

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 299**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01)
C07F 9/6527 (2006.01)
C07F 9/6574 (2006.01)
C07H 19/213 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2018 PCT/US2018/018556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018 WO18152450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2018 E 18708032 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3582853**

54 Título: **Compuestos di-nucleótidos cíclicos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

17.02.2017 US 201762460562 P
30.03.2017 US 201762479169 P
29.08.2017 US 201762551645 P
29.08.2017 US 201762551647 P
29.08.2017 US 201762551668 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2022

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

KIM, DAE-SHIK;
FANG, FRANK;
ENDO, ATSUSHI;
CHOI, HYEONG-WOOK;
HAO, MING-HONG;
BAO, XINGFENG y
HUANG, KUAN-CHUN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 906 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos di-nucleótidos cíclicos para el tratamiento del cáncer

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N° 62/460.562, presentada el 17 de febrero de 2017; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 62/479.169, presentada el 30 de marzo de 2017; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 62/551.645, presentada el 29 de agosto de 2017; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 62/551.647, presentada el 29 de agosto de 2017; y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N° 62/551.668, presentada el 29 de agosto de 2017.

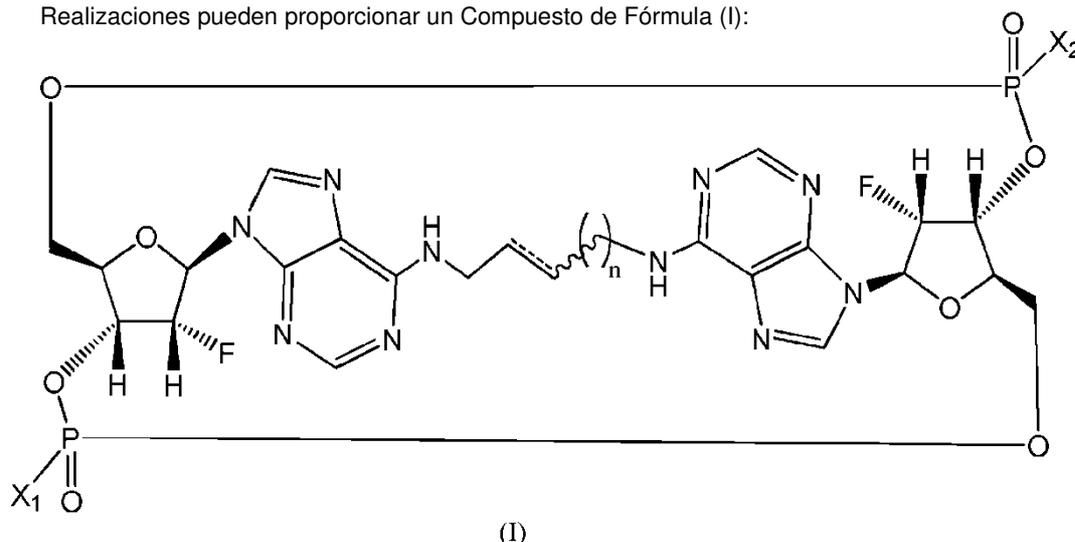
ANTECEDENTES

STING (siglas inglesas de estimulador de genes de interferón) es una molécula de señalización en la respuesta innata al ADNdc en el citosol. Se ha informado de la delección de STING en múltiples cánceres humanos. Además, la desregulación de la señalización de STING en cánceres humanos también se ha reseñado en melanoma (Xia T, et al., "Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis" *Cancer Res.* 2016) y el cáncer de colon. (Xia T, et al., "Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis" *Cell Rep.* 2016;14:282-97). Curiosamente, en esos estudios, los resultados del análisis genómico demostraron que la pérdida de expresión de STING no se debe a la delección o mutación de genes, sino a través de cambios epigenéticos. (Xia, *Cancer Res.* 2016; Xia, *Cell Rep.* 2016). La actividad de protección contra el cáncer de STING también está respaldada por la evidencia obtenida de estudios con modelos de ratones. Ratones transgénicos para STING han mostrado un control defectuoso del tumor. (Woo SR, et al. "STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors" *Immunity* 2014;41:830-42).

Además, el papel de STING en la protección de la ontogénesis se ha demostrado en varios modelos espontáneos de ratón, incluyendo el glioma (Ohkuri T, et al., "Protective role of STING against gliomagenesis: Rational use of STING agonist in anti-glioma immunotherapy" *Oncoimmunology.* 2015;4:e999523), y cáncer de colon (Zhu Q, et al., "Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation" *J. Immunol.* 2014;193:4779-82). Este efecto anti-tumoral puede deberse a su capacidad de contrarrestar la sobre-activación de NF- κ B y STAT3. (Okihuri 2015). La activación de la vía STING también mostró una potente actividad en modelos de tumores de ratón preclínicos. (Woo 2014; Chandra D, et al. "STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer" *Cancer Immunol Res.* 2014;2:901-10; Corrales L, et al., "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity" *Cell Rep.* 2015;11:1018-30; Curran E, et al. "STING Pathway Activation Stimulates Potent Immunity against Acute Myeloid Leukemia" *Cell Rep.* 2016;15:2357-66; Tang CH, et al. "Agonist-Mediated Activation of STING Induces Apoptosis in Malignant B Cells" *Cancer Res.* 2016;76:2137-52). Esta actividad antitumoral se debe probablemente a la alteración de la vasculatura del tumor y seguida de la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa. (Corrales L, et al., "The host STING pathway at the interface of cancer and immunity" *J. Clin. Invest.* 2016;126:2404-11). Recientemente se han propuesto di-nucleótidos cíclicos con diferentes estructuras multicíclicas como posibles moduladores de STING (documento WO 2015/185565 A1). También se han descrito derivados cíclicos de GMP-AMP (cGAMP) como agentes para alterar la señalización del segundo mensajero y como aglutinantes de STING (documento WO 2014/179335 A1). Además, se ha explorado la activación de STING a través de análogos cíclicos de adenosina-inosina monofosfato (cAIMP) para desarrollar inmunoterapias fijadas como objetivo a STING (Lioux T, et al. "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Cyclic Adenosine-Inosine Monophosphate (cAIMP) Analogs That Activate Stimulator of Interferon Genes (STING)" *J. Med. Chem.* 2016;59:10253-267). Por consiguiente, la estimulación directa de STING en un microentorno del tumor por un agonista puede representar un enfoque para tratar múltiples tipos de cáncer.

BREVE SUMARIO

Realizaciones pueden proporcionar un Compuesto de Fórmula (I):



(en que P₁ es el fósforo inferior izquierdo y P₂ es el fósforo superior derecho como se representa arriba) que tiene sustituyentes y una estereoquímica como se indica en la Tabla 1, que figura más adelante, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El

=====

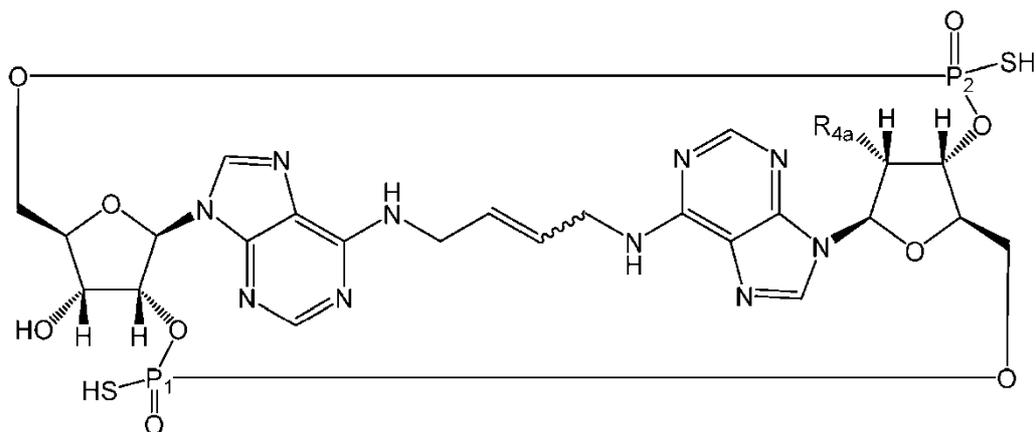
indica un enlace sencillo o doble.

En los casos en los que un átomo de fósforo tiene cuatro sustituyentes que difieren, ese átomo de fósforo será un estereocentro. SpSp/RpRp/SpRp/RpSp se refiere a la estereoquímica del fósforo como se indica.

TABLA 1

Compuesto n ^o	n	Geometría (Trans, Cis o Saturada)	X ₁	X ₂	configuración estereoquímica (P ₁)	configuración estereoquímica (P ₂)
1	1	Trans	SH	SH	S	R
2	1	Trans	SH	SH	R	R
3	1	Trans	SH	SH	S	S
4	1	Cis	SH	SH	R	R
5	1	Cis	SH	SH	S	R
6	1	Saturada	SH	SH	S	R
8	2	Trans	SH	SH	No determinada	No determinada
9	1	Trans	OH	OH	n/d	n/d
11	2	Trans	SH	SH	No determinada	No determinada
12	2	Trans	SH	SH	No determinada	No determinada

Realizaciones pueden proporcionar, además, un Compuesto de Fórmula (II):



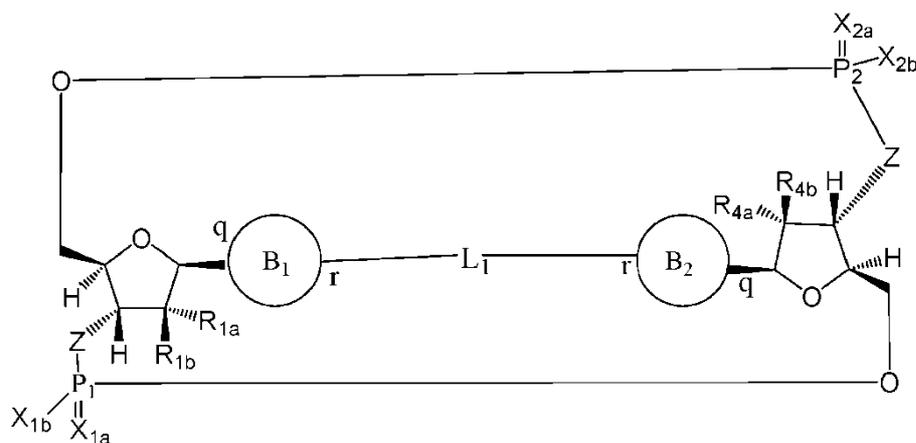
(II)

5 que tiene sustituyentes y una estereoquímica como se indica en la Tabla 2, que figura más adelante, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En los casos en los que un átomo de fósforo tiene cuatro sustituyentes que difieren, ese átomo de fósforo será un estereocentro.

TABLA 2

Compuesto nº	R _{4a}	Configuración geométrica	configuración estereoquímica (P ₁ , P ₂)
13	-OH	trans	S,R
14	-OH	trans	R,R
15	-F	trans	S,R
16	-F	trans	R,R

10 Realizaciones pueden proporcionar un compuesto de Fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

- 15 R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;
 R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;
 20 R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;
 R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;
 25 P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

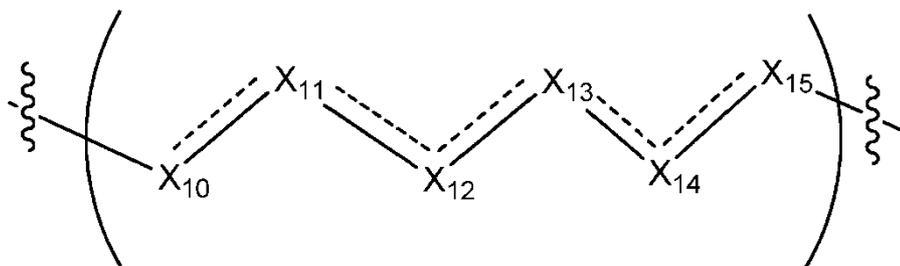
Z es -O- o -NH-;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

5 X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

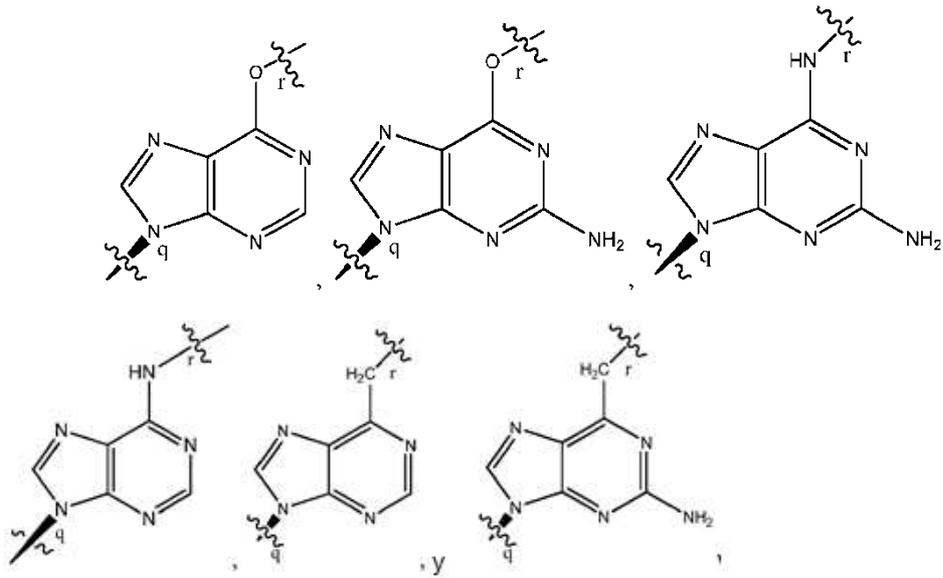
en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)Oalquilo C₁₋₆;

10 L₁ en la fórmula (III) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es



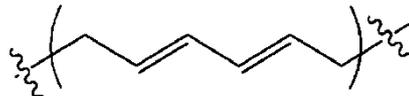
en donde

- 15 indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de
- 20 en L₁ indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de
- 25 en L₁ indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de
- 30 en L₁ indica un triple enlace, 0 apariciones de
- 35 en L₁ indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de
- 40 en L₁ indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;
- en donde X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH₂- o -CH-, en donde el -CH₂- o -CH- está no sustituido o está sustituido con (i) -OH, (ii) -F, (iii) -Cl, (iv) -NH₂ o (v) -D, y cuando X₁₀ o X₁₅ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;
- 45 y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C₃ o un heterocicloalquilo C₃, incluyendo dicho heterocicloalquilo C₃ un átomo de N u O;
- 50 en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:

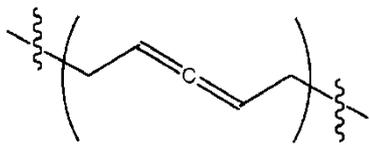


5 en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (III).

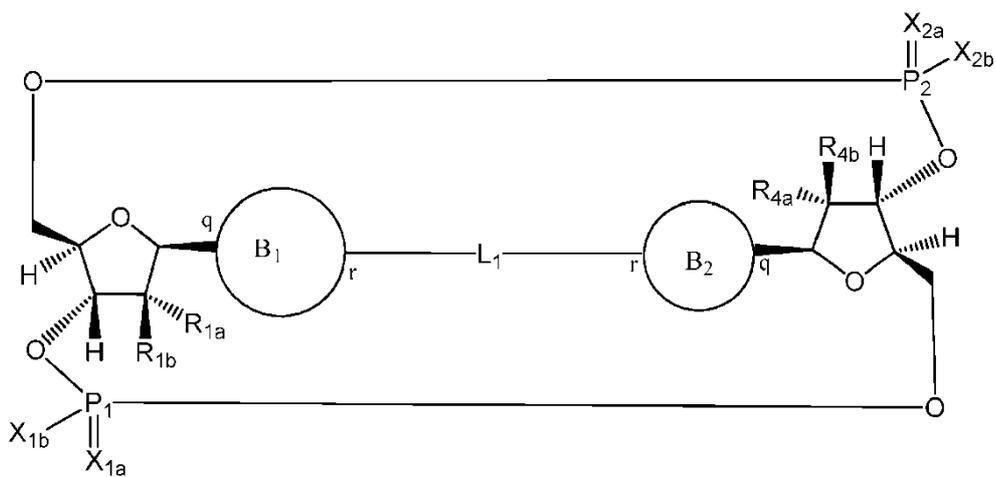
En algunas realizaciones en las que L₁ incluye un triple enlace o más de un doble enlace, L₁ puede ser, por ejemplo,



10 o



15 Realizaciones pueden proporcionar también un compuesto de Fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

20

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos -F;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos -F;

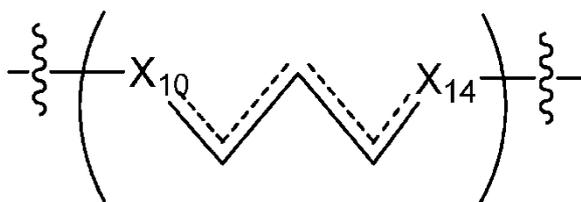
P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (III) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es



en donde



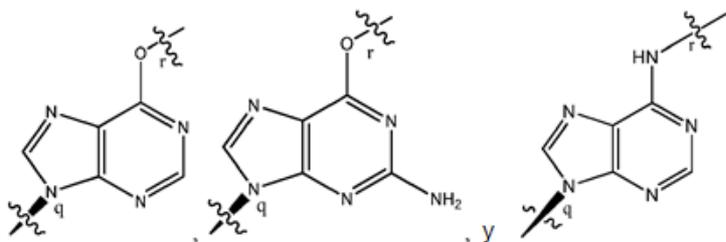
indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de



en L₁ indica a doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

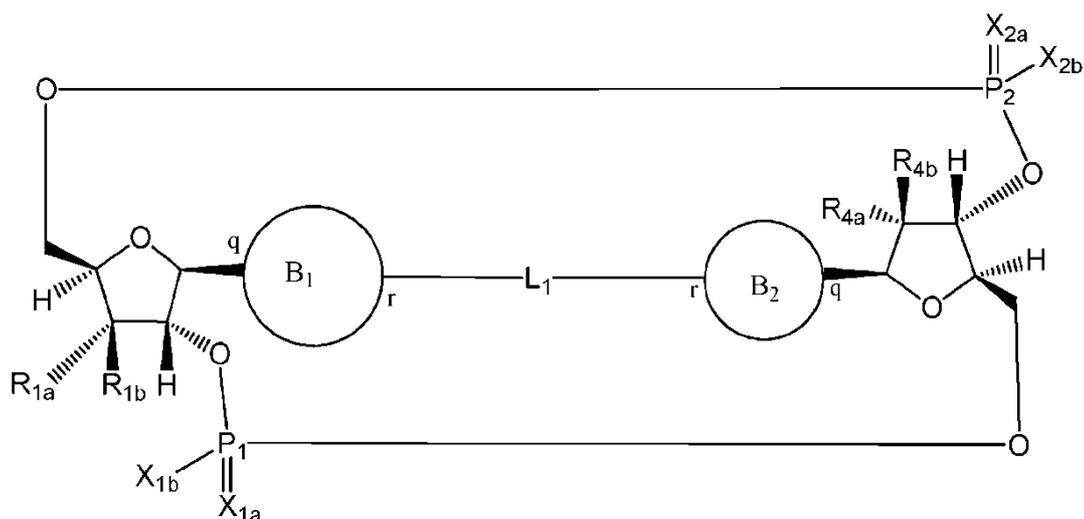
en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (III).

Realizaciones pueden proporcionar un compuesto de Fórmula (IV):



(IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

5 R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;

10 R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;

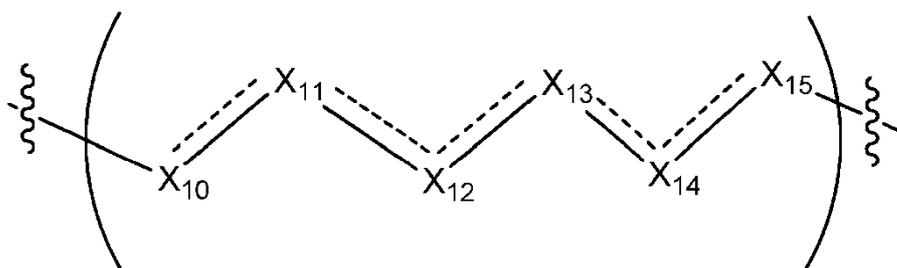
P_1 y P_2 , cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

15 X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

20 en donde R_5 se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)Oalquilo C₁₋₆;

L_1 en la fórmula (IV) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es



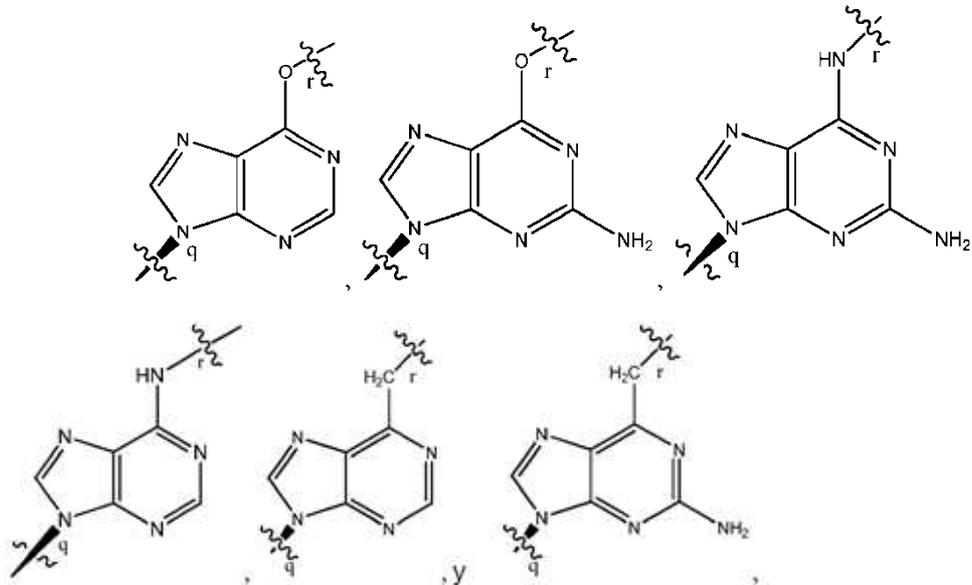
25 en la que indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de en L_1 indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de en L_1 indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de en L_1 indica un triple enlace, 0 apariciones de en L_1 indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de en L_1 indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;

30 en donde X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} y X_{15} se seleccionan independientemente de un enlace, -CH₂- o -CH-, en donde el -CH₂- o -CH- está no sustituido o está sustituido con (i) -OH, (ii) -F, (iii) -Cl, (iv) -NH₂ o (v) -D, y cuando X_{10} o X_{15} es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;

35 y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} y X_{15} pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C₃ o un heterocicloalquilo C₃, incluyendo dicho heterocicloalquilo C₃ un átomo de N u O;

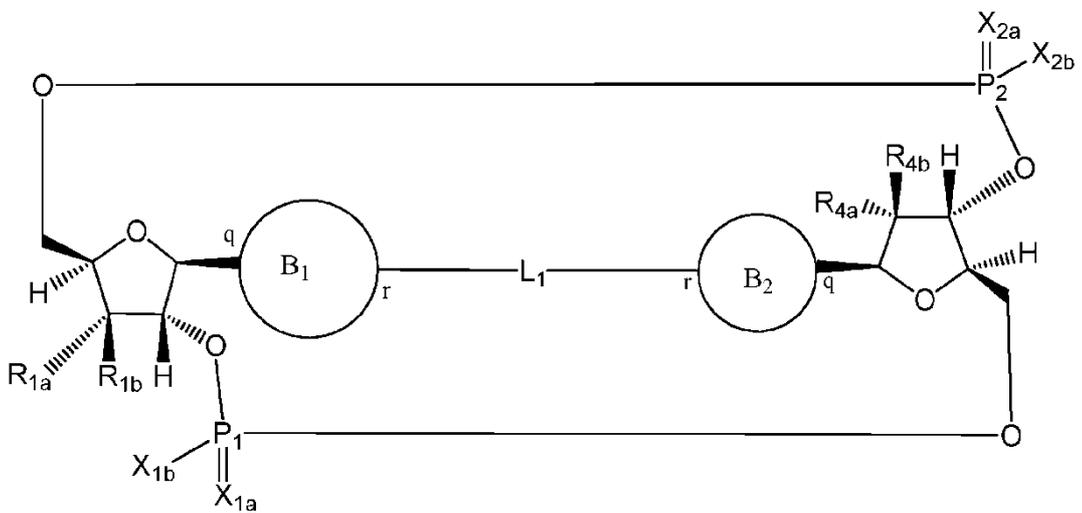
en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:

5



en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (IV).

10 Realizaciones pueden proporcionar también un compuesto de Fórmula (IV):



(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

15

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos -F;

20

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos -F;

25

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;
 en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

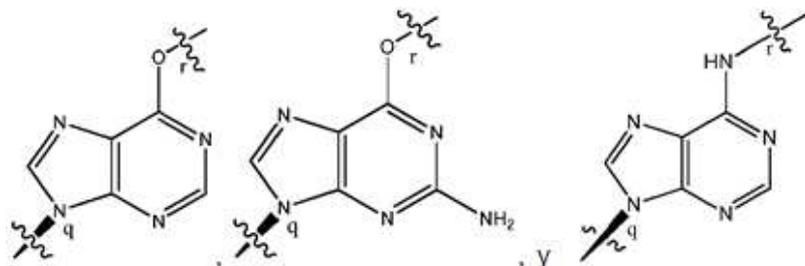
5 L₁ en la fórmula (IV) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es



10 en la que ----- indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de ----- en L₁ indica a doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

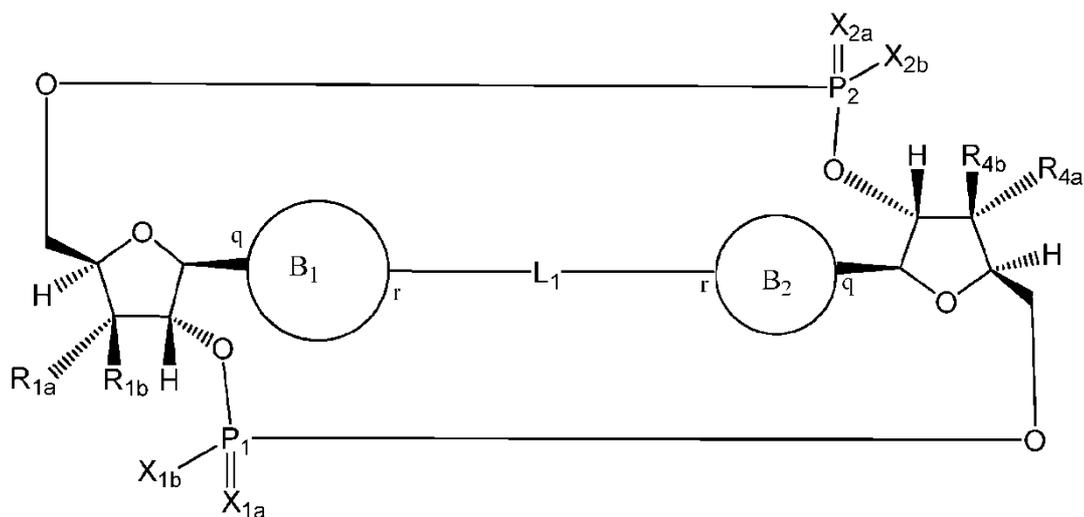
en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

15 en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (IV).

20 Realizaciones pueden proporcionar un compuesto de Fórmula (V):



(V)

25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;

30 R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

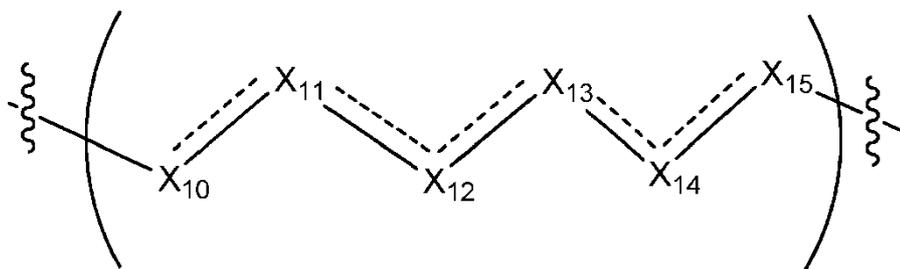
5

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

10 en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)Oalquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (V) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es



15

en la que indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de en L₁ indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de en L₁ indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de en L₁ indica un triple enlace, 0 apariciones de en L₁ indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de en L₁ indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;

20

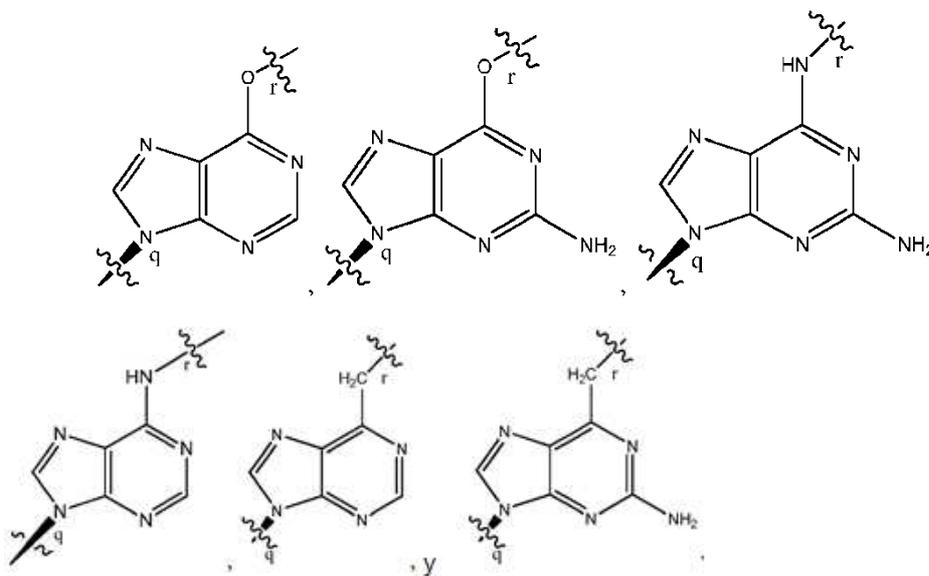
en donde X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH₂- o -CH-, en donde el -CH₂- o -CH- está no sustituido o está sustituido con (i) -OH, (ii) -F, (iii) -Cl, (iv) -NH₂ o (v) -D, y cuando X₁₀ o X₁₅ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;

25

y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C₃ o un heterocicloalquilo C₃, incluyendo dicho heterocicloalquilo C₃ un átomo de N u O;

30

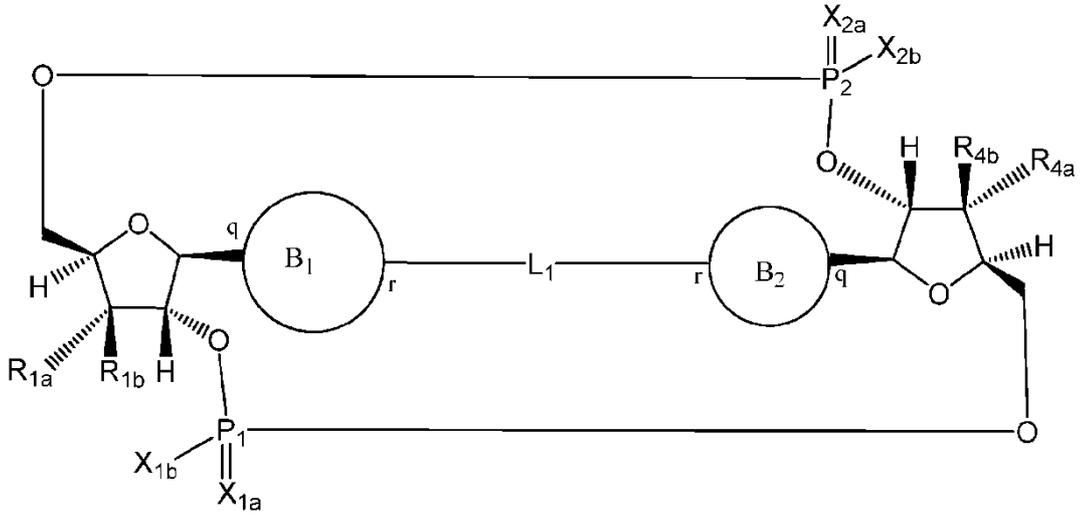
en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



35

en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (V).

Realizaciones pueden proporcionar también un compuesto de Fórmula (V):



(V)

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

10

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos -F;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

15

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos -F;

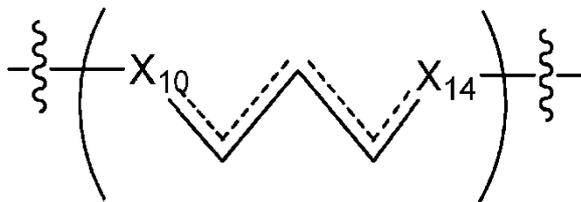
P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

20

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅; en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (V) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es



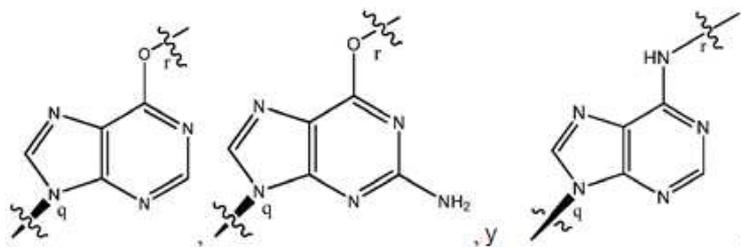
25

en la que ----- indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de ----- en L₁ indica a doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

30

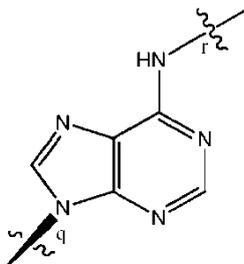
en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



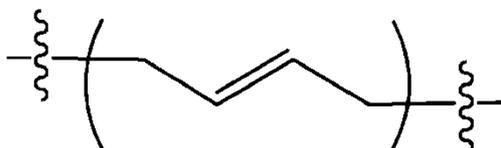
en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (V).

- 5 En algunas realizaciones de compuestos y/o sales como se reseña en las Fórmulas de arriba, (i) la configuración estereoquímica de P₁ y P₂ son ambos R, la configuración estereoquímica de P₁ es R y de P₂ es S, o la configuración estereoquímica de P₁ es S y de P₂ es R; (ii) una aparición de --- en L₁ indica un doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es trans; y (iii) Z es -O-.
- 10 Realizaciones adicionales de compuestos y/o sales como se reseña en las Fórmulas de arriba se pueden encontrar en otros aspectos en esta memoria. Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, en donde R_{1a} y R_{4a} son cada uno -F. En algunas realizaciones R_{1b} y R_{4b} son cada uno -F. En algunas realizaciones B₁ y B₂ son cada uno



15

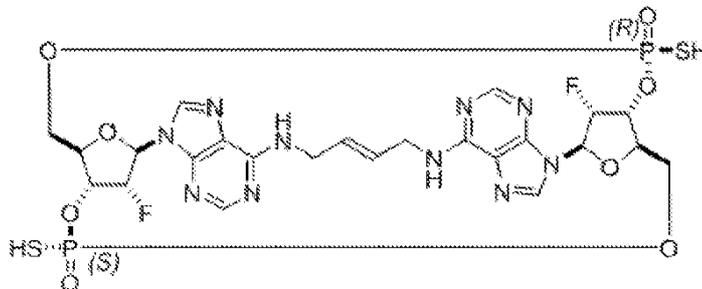
En algunas realizaciones, X_{1a} y X_{2a} son ambos =O, y X_{1b} y X_{2b} son ambos -SH. En algunas realizaciones, L₁ es

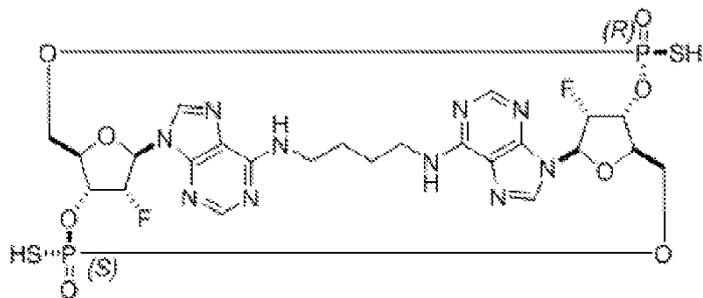
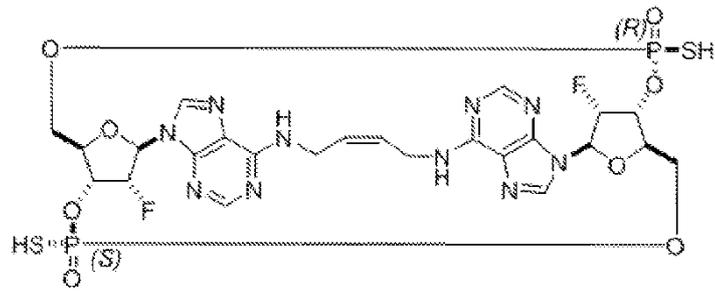
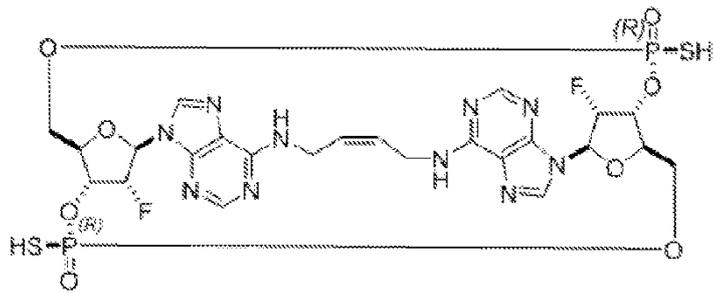
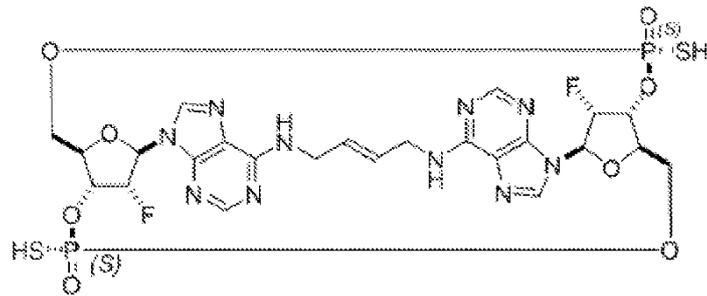
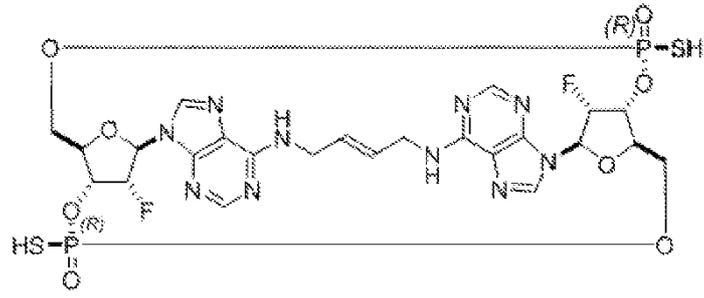


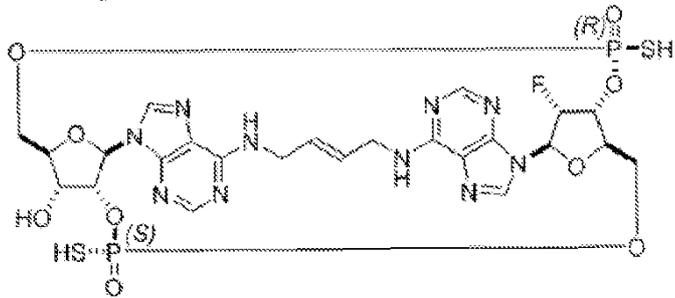
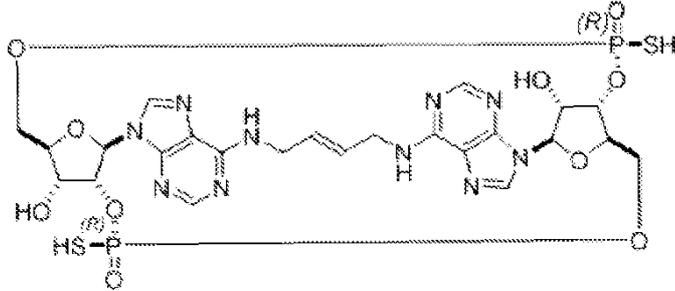
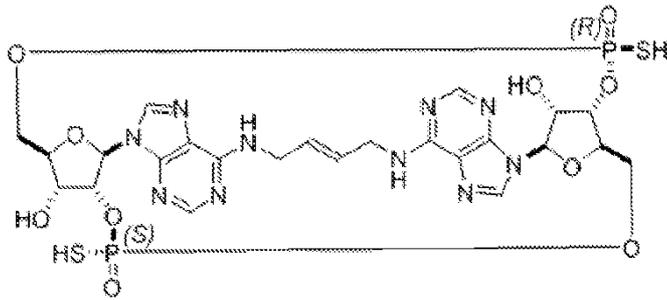
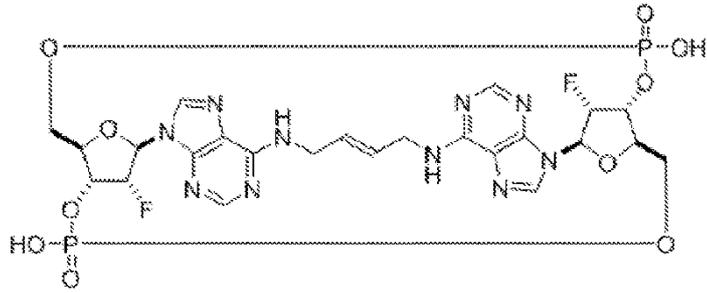
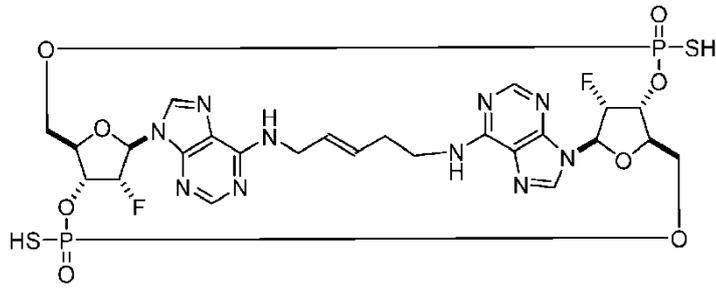
20

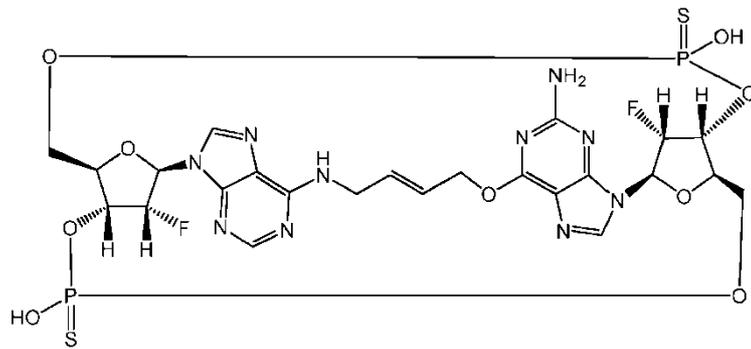
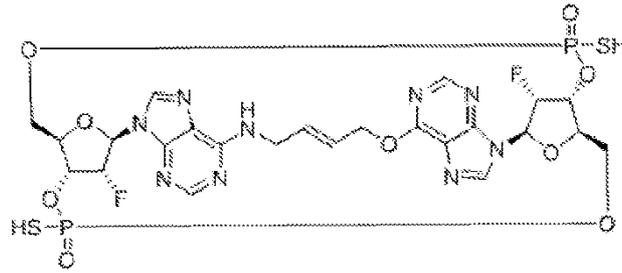
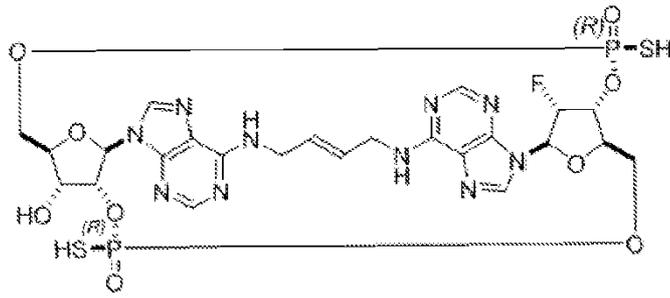
En algunas realizaciones, el enlazador es de cuatro carbonos de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador es de cinco carbonos de longitud.

25 Algunas realizaciones proporcionan un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

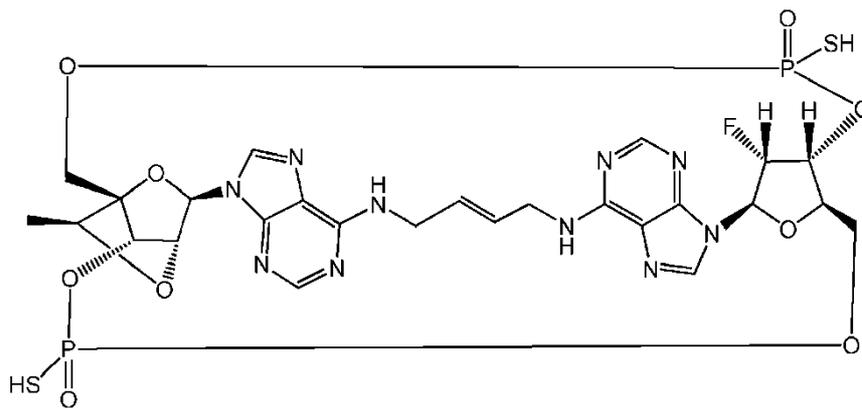


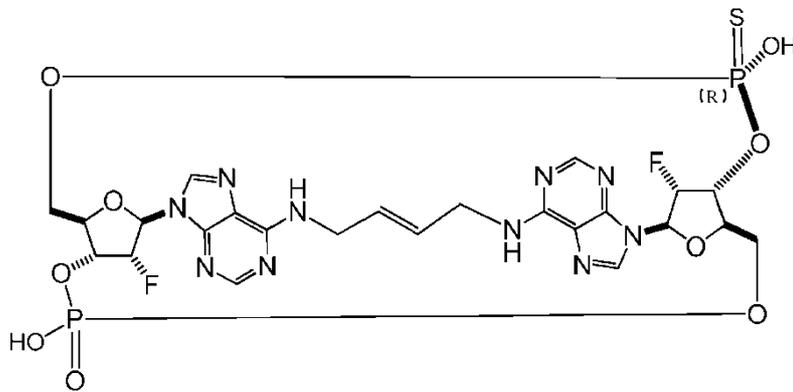
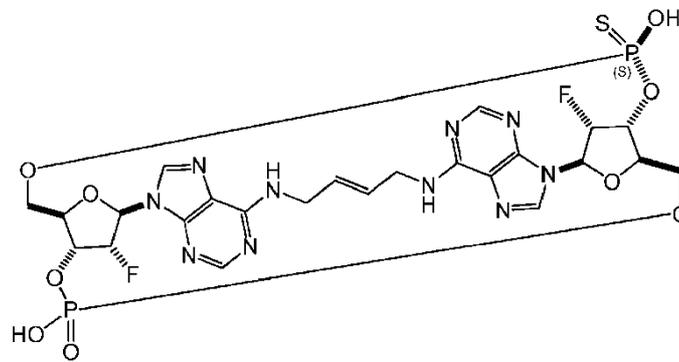
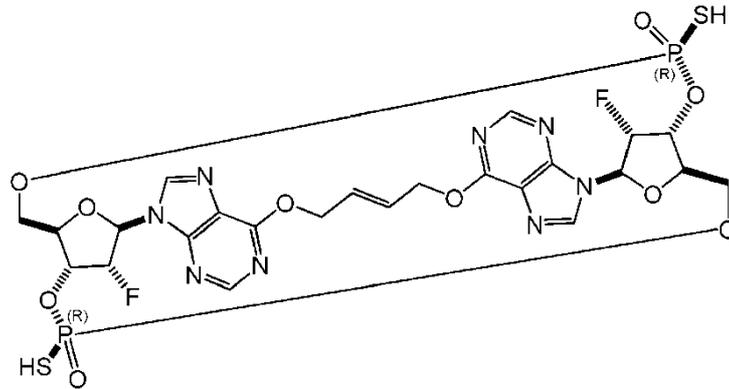
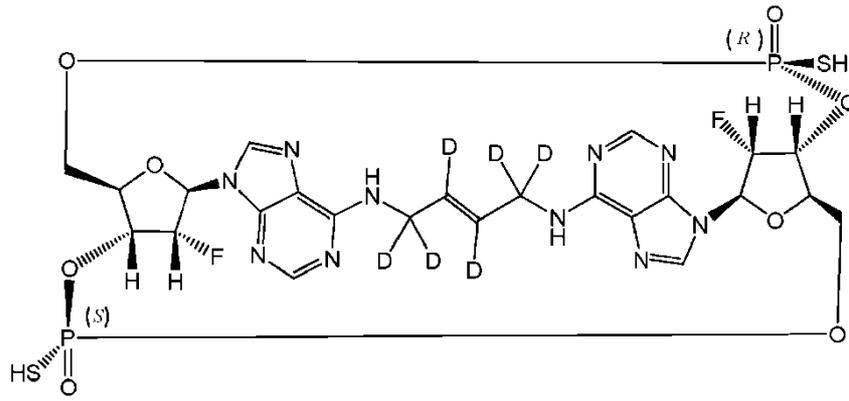


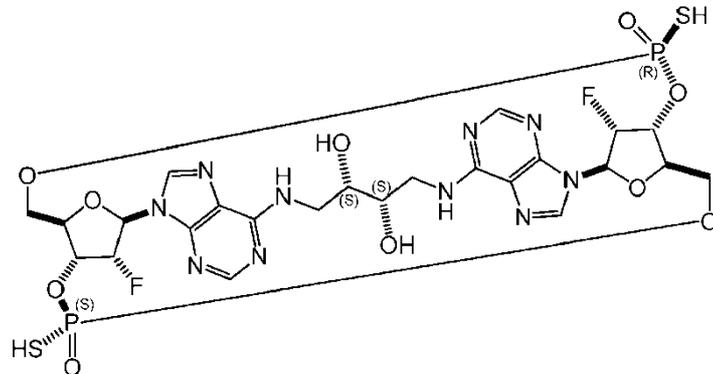
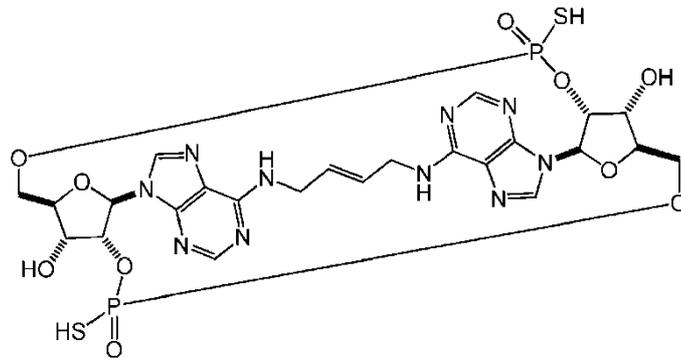
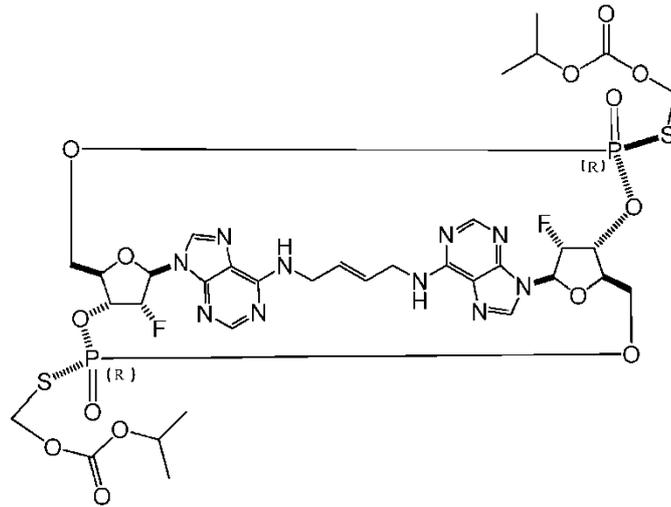
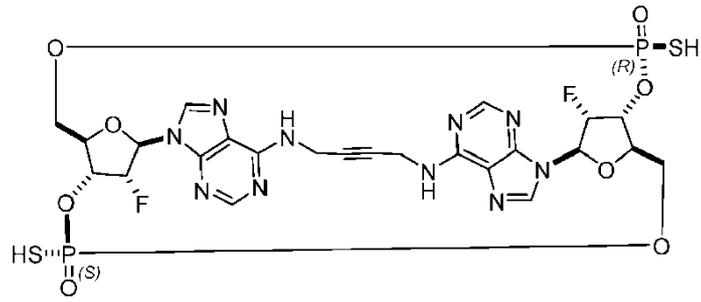


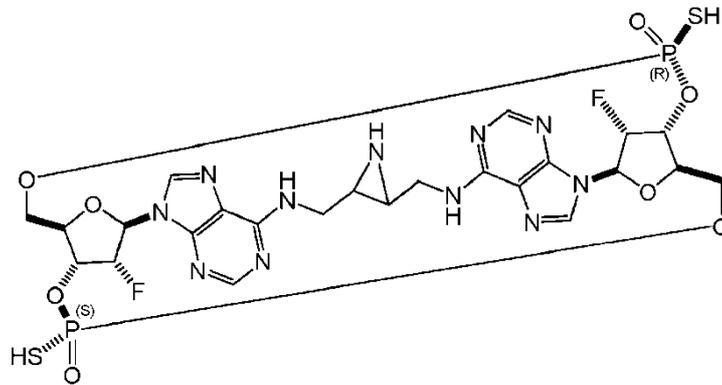
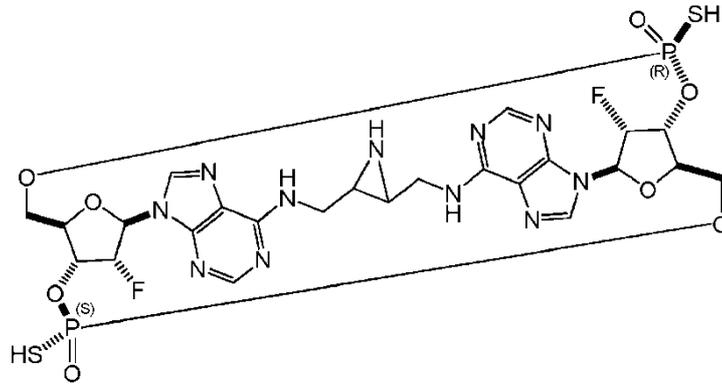
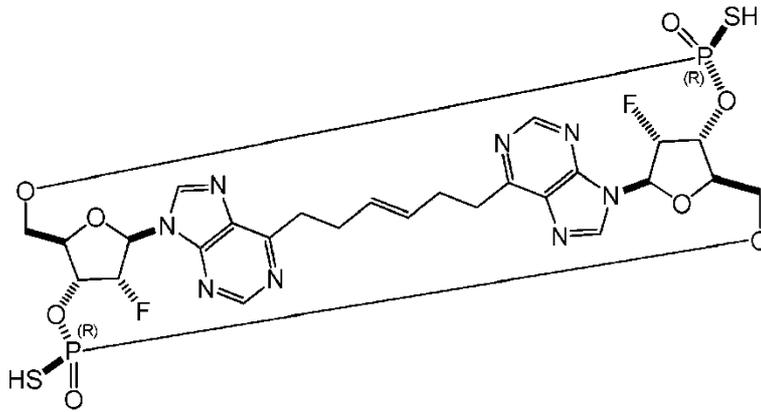
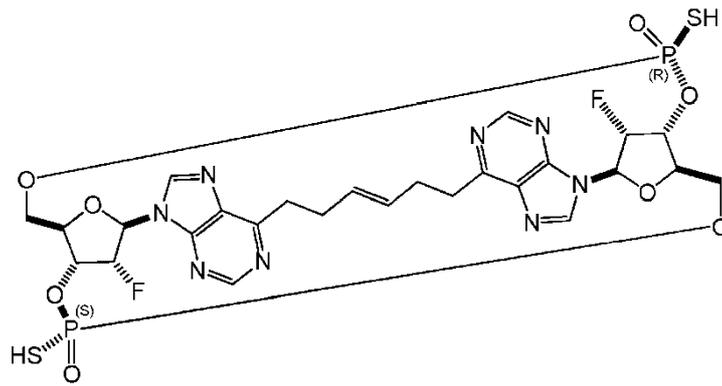


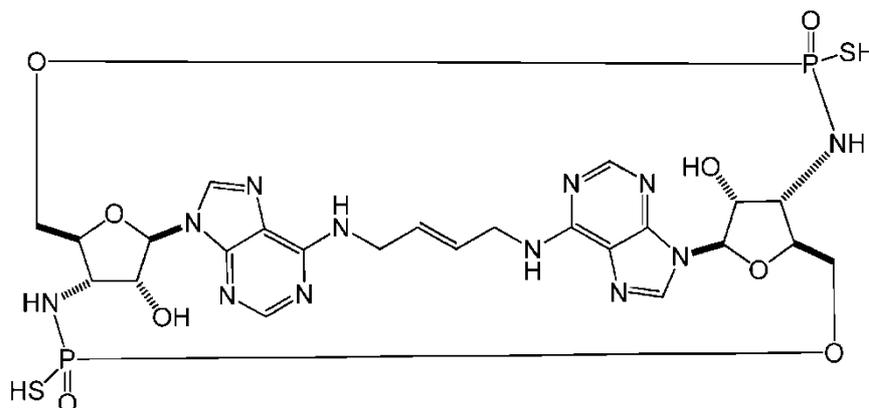
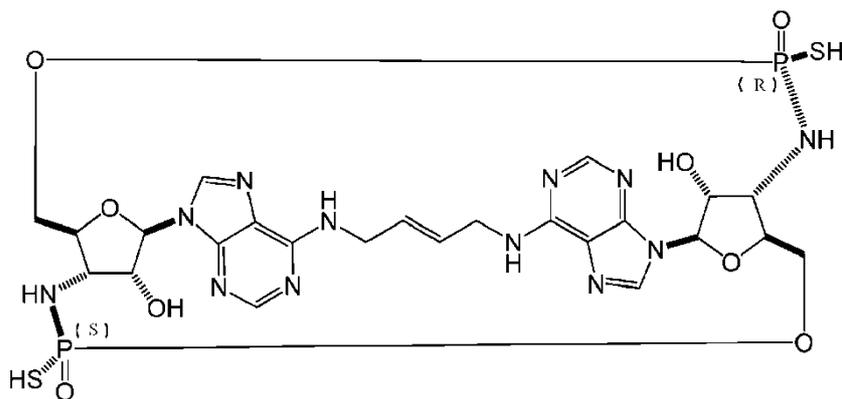
y







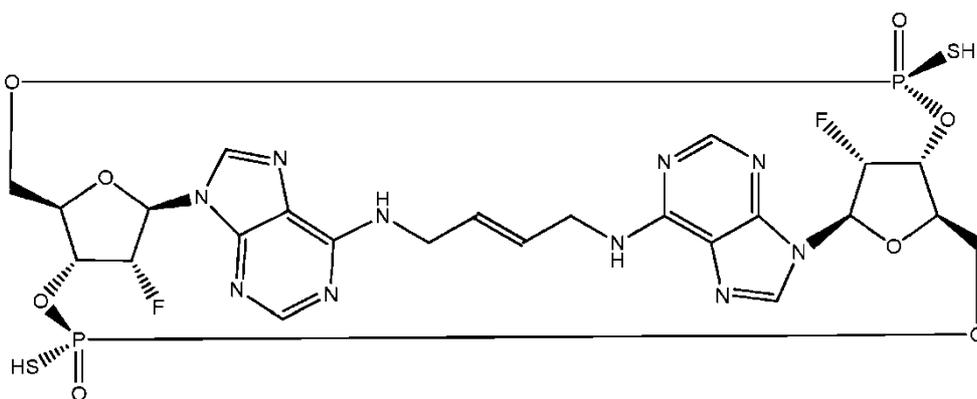




5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Realizaciones pueden proporcionar un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable con una o más de (i) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en un ensayo informador de células que expresa la variante genética HAQ STING; (ii) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan la variante AQ STING humana; (iii) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan variante WT STING humana; y (iv) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan la variante REF STING humana. Una realización proporciona un compuesto que tiene la siguiente estructura:

10



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Realizaciones adicionales pueden proporcionar una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto reseñado en esta memoria, en donde la sal es una sal de diamonio. Realizaciones adicionales pueden proporcionar compuestos reseñados en esta memoria como una sal de trietilamina (TEA). Realizaciones adicionales pueden proporcionar una composición farmacéutica que incluya un compuesto o sal como se reseña en esta memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

5 Uso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reseña en esta memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

Realizaciones pueden proporcionar el uso de un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica reseñado en esta memoria en un tratamiento contra el cáncer.

10 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer, que comprende identificar a un individuo que tiene un cáncer tratable mediante un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica reseñado en esta memoria; y administrar a dicho individuo una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica mediante la cual se ha identificado el cáncer como tratable.

15 En algunas realizaciones, se identifica que el individuo tiene un cáncer tratable mediante un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica reseñado en esta memoria mediante la presencia de un alelo de la variante de REF STING en el paciente.

20 Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar el cáncer que tiene un alelo de REF STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

25 Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar el cáncer que tiene un alelo de WT de STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

30 Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar el cáncer que tiene un alelo de AQ STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

35 Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar el cáncer que tiene un alelo de HAQ de STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de riñón y glioma. En algunas realizaciones, el cáncer es metastásico.

40 En algunas realizaciones de compuestos de las fórmulas presentadas en esta memoria, uno de los enlaces en L₁ es un doble enlace. En realizaciones adicionales, ese doble enlace tiene una geometría trans. En realizaciones adicionales, L₁ está saturado. En determinadas adicionales, L₁ incluye cinco átomos de carbono. En otras realizaciones, L₁ incluye 4 átomos de carbono.

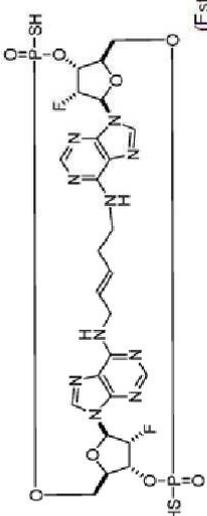
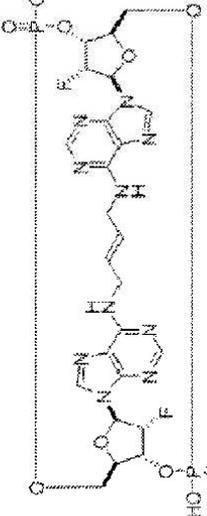
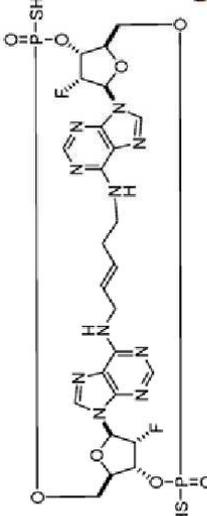
45 Realizaciones pueden proporcionar, además, mezclas de compuestos como se reseñan en esta memoria, incluyendo mezclas de estereoisómeros de estos compuestos. Por ejemplo, se puede proporcionar una mezcla de Compuesto 11 y Compuesto 12, o se puede proporcionar una mezcla de Compuesto 2 y Compuesto 4. Por supuesto, estos no son ejemplos limitantes y son posibles otras mezclas.

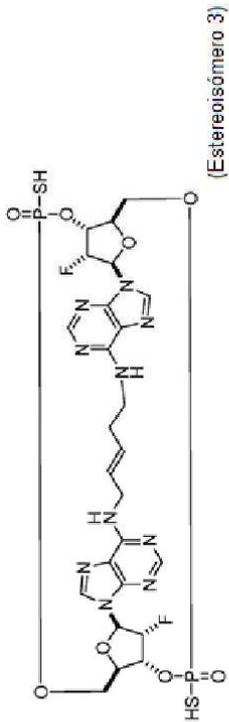
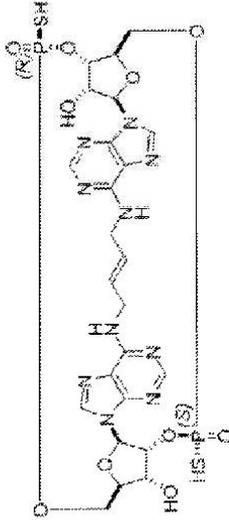
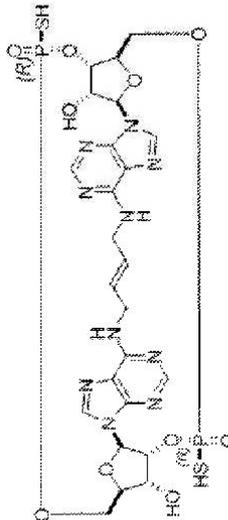
Realizaciones particulares se recogen en la Tabla 3 que figura a continuación.

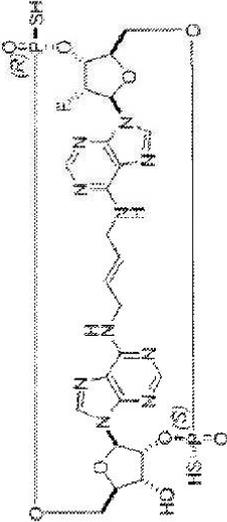
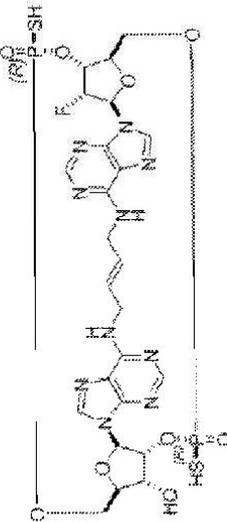
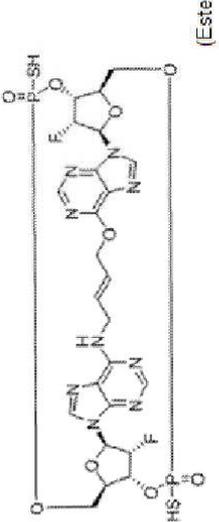
TABLA 3

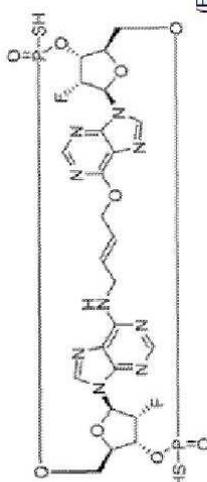
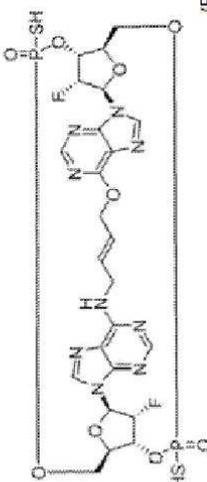
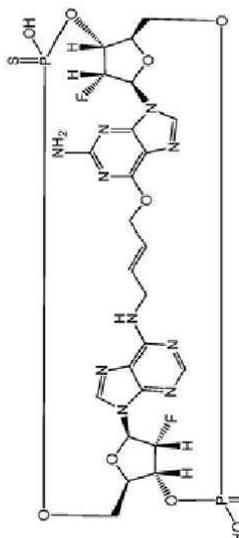
Compuesto N°	Estructura
1	
2	
3	

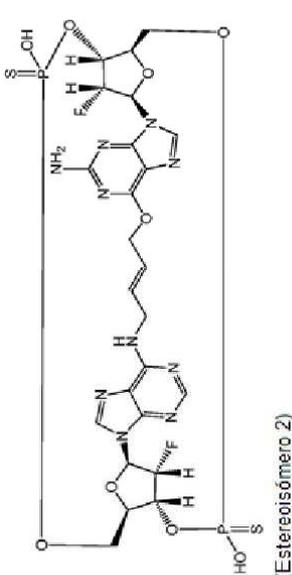
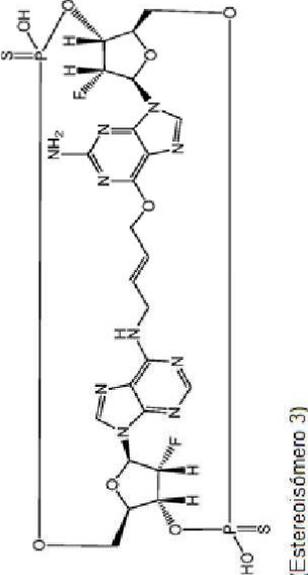
Compuesto N°	Estructura
4	
5	
6	

<p>Compuesto N° 8</p>	<p>Estructura</p>  <p>(Esteresómero 1)</p>
<p>9</p>	
<p>11</p>	 <p>(Esteresómero 2)</p>

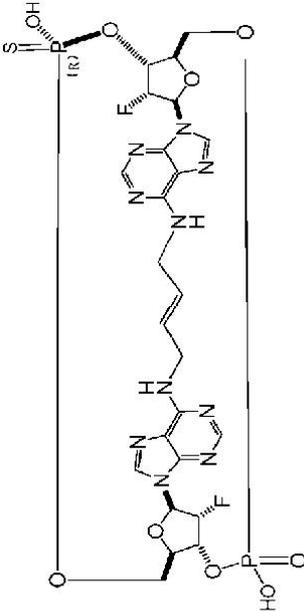
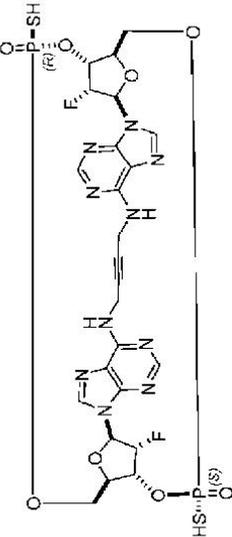
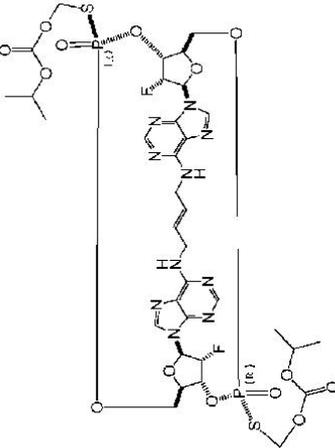
Compuesto N°	Estructura
12	 <p>(Esteroisómero 3)</p>
13	
14	

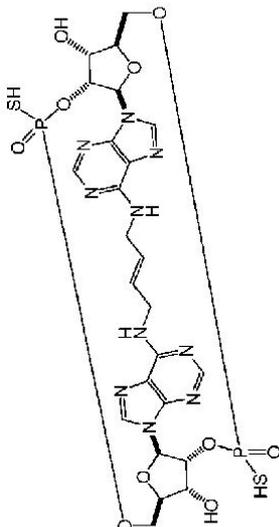
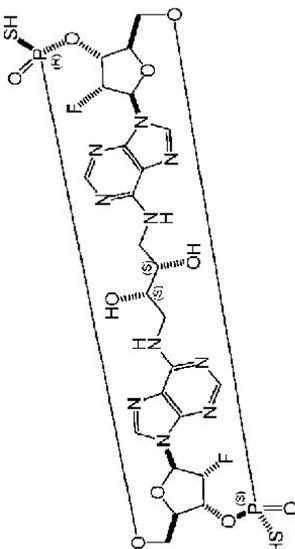
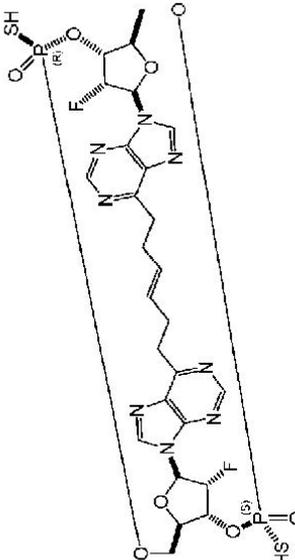
Compuesto N°	Estructura
15	
16	
18	

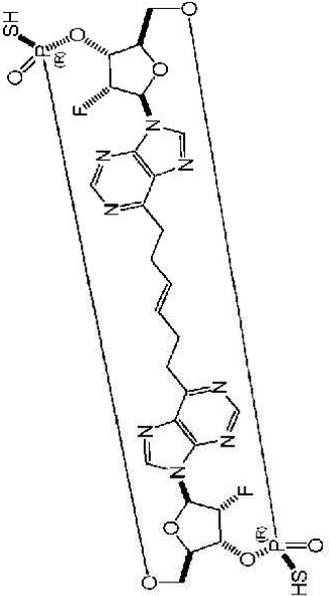
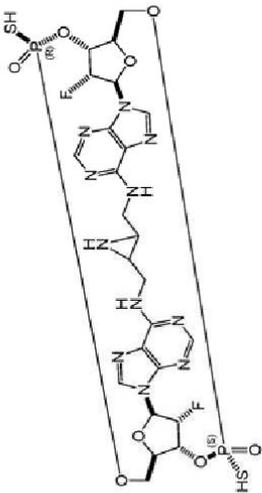
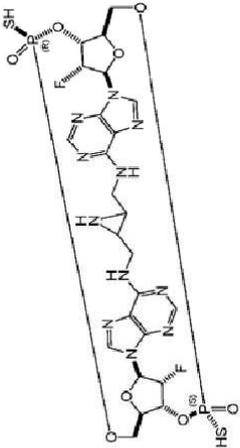
<p>Compuesto N° 19</p>	<p>Estructura</p>  <p>(Estereoisómero 2)</p>
<p>20</p>	 <p>(Estereoisómero 3)</p>
<p>21</p>	 <p>(Estereoisómero 1)</p>

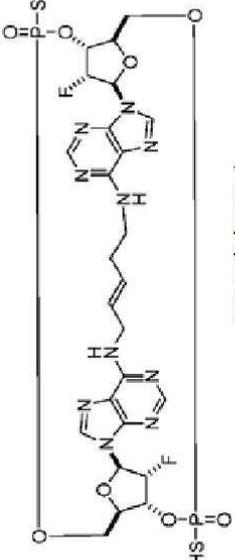
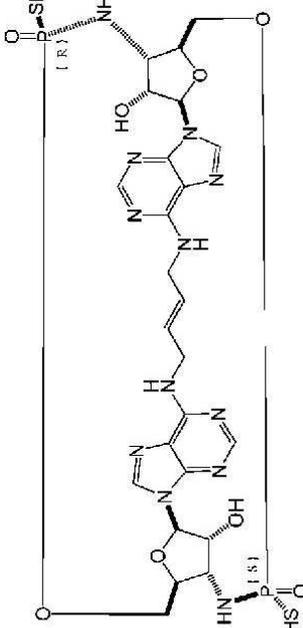
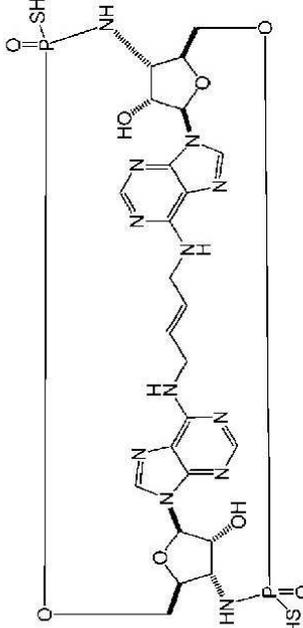
<p>Compuesto N° 22</p>	<p>Estructura</p>
<p>23</p>	 <p>(Estereoisómero 2)</p>
<p>24</p>	 <p>(Estereoisómero 3)</p>

<p>Compuesto N° 25</p>	<p>Estructura</p>
<p>25</p>	
<p>26</p>	
<p>27</p>	

Compuesto N°	Estructura
28	
29	
30	

Compuesto N°	Estructura
31	
32	
33	

<p>Compuesto N° 34</p>	<p>Estructura</p> 
<p>35</p>	 <p>(Estereoisómero 1)</p>
<p>36</p>	 <p>(Estereoisómero 2)</p>

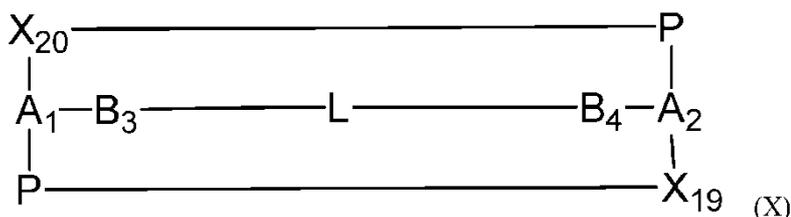
Compuesto Nº	Estructura
37	 <p style="text-align: center;">estereoisómero 4</p>
38	 <p style="text-align: center;">(R)</p>
39	 <p style="text-align: center;">(S)</p>

En la tabla anterior, los Compuestos 8, 11 y 12 se dibujan con la misma fórmula estructural y se refieren a tres estereoisómeros separados. Sin embargo, la solicitante observa que la quiralidad del fósforo del Compuesto 8 no es necesariamente la misma que la quiralidad del fósforo para otros compuestos marcados como "Estereoisómero 1" tal como, por ejemplo, el Compuesto 21. Lo mismo es válido para los otros estereoisómeros.

Realizaciones pueden referirse a enlazadores C₄-C₆ que pueden unirse de forma covalente en cualquier extremo a bases purina o pirimidina que forman parte de un dinucleótido cíclico. En una realización, los enlazadores son enlazadores de buteno, penteno o hexeno unidos en cualquier extremo a bases purina. En otra realización, los enlazadores son enlazadores de buteno unidos en cualquier extremo a bases purina; en otra realización, los enlazadores son enlazadores de transbuteno con el doble enlace situado entre los dos carbonos centrales.

Las siguientes realizaciones numeradas son ilustrativas del uso de estos enlazadores C₄-C₆:

1. Un compuesto de Fórmula (X):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

A₁ y A₂ son restos de azúcar y pueden ser iguales o diferentes;

B₃ y B₄ son bases purina o pirimidina que pueden ser iguales o diferentes y que forman nucleótidos con, respectivamente, A₁ y A₂;

L es un enlazador alquilo;

X₁₉ y X₂₀ son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en -O-, -CH-, -NH- y -S-, en donde -CH- y -NH- pueden estar sustituidos o no sustituidos.

2. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de la realización numerada 1, en donde -CH- y -NH- de X₁₉ y X₂₀ pueden estar sustituidos con alquilo C₁₋₆.

3. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la realización numerada 1, en donde L es buteno, penteno o hexano.

4. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la realización numerada 3, en donde L es un enlazador transbuteno con un doble enlace en su centro.

Compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de las realizaciones numeradas pueden ser útiles, por ejemplo, para tratar el cáncer. A₁, A₂, B₃ y B₄ pueden estar además sustituidos con, por ejemplo, hidroxilo, halógeno o metoxi. Cada uno de los fósforos en la Fórmula (X) puede estar sustituido, por ejemplo, con -SH, -OH, =O o =S hasta que se satisfaga su valencia.

Ejemplos de análogos de dinucleótidos cíclicos que pueden beneficiarse de enlazadores de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los identificados en los documentos US 2014/0205653 A1; US 2014/0329889 A1; US 2014/0341976 A1; US 2015/0056224 A1; US 2016/0362441 A1; US 2017/0158724 A1; US 2017/044206 A1; US 5,547,941; US 7,569,555 B2; US 7,592,326 B2; US 7,709,458 B2; US 9,549,944 B2; WO 2009/133560 A1; WO 2015/074145 A1; WO 2015/077354 A1; WO 2015/185565 A1; WO 2016/100261 A1; WO 2016/120305 A1; WO 2016/145102 A1; WO 2017/027645 A1; WO 2017/027646 A1; WO 2017/075477 A1; WO 2017/093933 A1; WO 2017/123657 A1; WO 2017/175156 A1; EP 1740,192 B1; CN 102199183 A; Corrales, L. et al., "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity," Cell Reports, 11: 1018-1030 (2015); y Lioux, T. et al., "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Cyclic Adenosine-Inosine Monophosphate (cAIMP) Analogs That Activate Stimulator of Interferon Genes (STING)," J. Med. Chem., 59: 10253-10267(2016). Todos esos documentos, incluyendo los compuestos en los mismos, se incorporan aquí como referencia; si algún componente de cualquiera de esos documentos contradice o es de otra manera inconsistente con algo en esta memoria descriptiva, entonces prevalece esta memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, un compuesto como se reseña en esta memoria se proporciona como un ácido libre. En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona como una sal de NH₄ o como una sal de trietilamina (TEA).

Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, que incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto reseñado en esta memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se indica arriba.

5 En algunas realizaciones, un compuesto se administra en forma de un ácido libre. En algunas realizaciones, un compuesto se administra en forma de una sal de diamonio (NH₄). Se contemplan composiciones farmacéuticas que incluyen un Compuesto de Fórmula I, de Fórmula II, de Fórmula III, de Fórmula IV, de Fórmula V, de la Tabla 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable. Realizaciones
10 pueden proporcionar un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, en la que n es 1; la geometría del doble enlace es trans; X₁ y X₂ son cada uno SH; la estereoquímica en P₁ es S; y la estereoquímica en P₂ es R; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica como se reseña en esta memoria. Los cánceres tratados como se reseña en esta memoria pueden ser cánceres metastásicos. Pueden seleccionarse, por ejemplo, de linfoma, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de riñón y glioma. También se contemplan usos de compuestos, sales y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer y/o la
20 preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer, que comprende identificar a un individuo que tiene un cáncer tratable mediante un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica como se reseña en esta memoria, y administrar al individuo un compuesto, sal farmacéuticamente
25 aceptable o composición farmacéutica mediante el cual el paciente ha sido identificado como tratable. En algunas realizaciones, se identifica que el individuo tiene un cáncer tratable mediante un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica reseñado en esta memoria mediante la presencia de un alelo humano de la variante de REF STING en el paciente.

30 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un alelo REF STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable, o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

35 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un alelo WT de STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable, o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

40 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un alelo AQ STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable, o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

45 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un alelo HAQ de STING, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable, o composición farmacéutica como se reseña en esta memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra una síntesis de Compuesto 1a y Compuesto 2a.

50 La FIG. 2A y la FIG. 2B muestran una síntesis alternativa de Compuesto 1 y Compuesto 1a. Esa síntesis alternativa también se muestra en la FIG. 2C a la FIG. 2E.

La FIG. 3 muestra un espectrógrafo de ¹H RMN para el Compuesto 1.

55 La FIG. 4A, la FIG. 4B y la FIG. 4C, muestran resultados de cristalografía de rayos X (dibujos ORTEP) para, respectivamente, un cristal asimétrico de Compuesto 1, una primera molécula del cristal asimétrico y una segunda molécula del cristal asimétrico.

60 La FIG. 4D muestra los resultados de la cristalografía de rayos X (dibujo ORTEP) para un cristal del Compuesto 2.

La FIG. 5A y la FIG. 5B muestra una ruta de síntesis para los Compuestos 18, 19 y 20.

65 La FIG. 6 muestra un mapa del vector de expresión para WT STING (pLenti-WT STING-Puro humano).

La FIG. 7 y la FIG. 8 acompañan al Ejemplo 108 y muestran la actividad curativa de Compuesto 1a en un modelo de tumor dual CT26.

5 La FIG. 9 acompaña al Ejemplo 109 y muestra un gráfico de volumen del tumor para los tumores tratados y la curva de supervivencia.

La FIG. 10 acompaña al Ejemplo 110 y muestra un gráfico de volumen del tumor para los tumores tratados y la curva de supervivencia.

10 La FIG. 11 muestra una imagen de la estructura cristalina de rayos X de WT STING humano en complejo con el Compuesto 1.

La FIG. 12 muestra el dominio C-terminal de REF STING humano en complejo con el Compuesto 1.

15 La FIG. 13 muestran un ejemplo de síntesis de Compuesto 38 y Compuesto 39.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES

20 En esta memoria se proporcionan compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. Los compuestos pueden activar el estimulador de genes de interferón (STING).

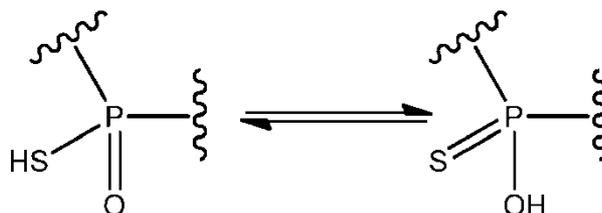
25 En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona en forma de un ácido libre. En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona, por ejemplo, como una sal de NH₄ o una sal de TEA. La referencia a un número de compuesto seguido de una "a" indicará una sal de diamonio del compuesto dado. Por ejemplo, "Compuesto 1a" se refiere a la sal de diamonio del Compuesto 1.

30 Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, que incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un Compuesto de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, Fórmula IV o Fórmula V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En algunas realizaciones, un compuesto se administra en forma de un ácido libre. En algunas realizaciones, el compuesto se administra, por ejemplo, en forma de una sal de diamonio (NH₄). También se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer que incluyen un compuesto reseñado en esta memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Realizaciones como se reseñan en esta memoria pueden utilizarse para tratar el cáncer o para preparar medicamentos útiles para el tratamiento del cáncer. "Cáncer" puede incluir, pero no se limita a cáncer de colon, cáncer de hígado, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda y glioma.

Los expertos en la técnica reconocerán que en los casos en los que los sustituyentes unidos a los átomos de fósforo (P₁,P₂) tienen enlaces tanto simples como dobles, pueden ser susceptibles de tautomerización. Por ejemplo, los compuestos pueden tautomerizar en equilibrio. A continuación se muestra un ejemplo:



45 Se debe considerar que tautómeros de este tipo están dentro del alcance de las reivindicaciones. Una representación estructural de cualquier tautómero para un compuesto dado representará el mismo compuesto.

50 En algunas realizaciones, el compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos reseñados en esta memoria se proporciona como un ácido libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos reseñados en esta memoria se proporciona como una sal de NH₄, que puede ser una sal de diamonio.

55 Tal como se utiliza en esta memoria, "alquilo C₁₋₆" o "alquilo "C₁-C₆" pretende incluir grupos hidrocarbonados alifáticos de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆ de cadena recta (lineal) saturados y grupos hidrocarbonados alifáticos de C₃, C₄, C₅ o C₆ ramificados saturados. Por ejemplo, "alquilo C₁₋₆" pretende incluir grupos alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ y C₆. Ejemplos de alquilo incluyen restos que tienen de uno a seis átomos de carbono, tales como, pero no limitados a metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, s-pentilo o n-hexilo. De manera similar, "alquilo C₁₋₃" o "alquilo

C1-C3" pretende incluir grupos hidrocarbonados alifáticos de C₁, C₂ o C₃ de cadena recta (lineal) saturados y grupos hidrocarbonados alifáticos C₃ ramificados saturados.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cicloalquilo C₃₋₆" o "cicloalquilo C_{3-C6}" se refiere a un anillo hidrocarbonado no aromático, saturado o insaturado, que tiene de 3 a 6 átomos de carbono (p. ej., C_{3-C6}). Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo y ciclohexenilo. El término "cicloalquilo C₅₋₆" o "cicloalquilo C_{5-C6}" se refiere a un anillo hidrocarbonado no aromático, saturado o insaturado, que tiene 5 o 6 átomos de carbono (p. ej., C_{5-C6}).

10 El término "heterocicloalquilo C₅₋₆" o "heterocicloalquilo C_{5-C6}" se refiere a un anillo monocíclico de 5-6 miembros no aromático, saturado o insaturado, que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N o S), a menos que se especifique lo contrario. El término "heterocicloalquilo C₄₋₆" o "heterocicloalquilo C_{4-C6}" se refiere a un anillo monocíclico de 4-6 miembros no aromático, saturado o insaturado, que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N o S), a menos que se especifique lo contrario. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a piperidinilo, piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, tetrahidrofuranilo, isoindolinilo, indolinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, triazolidinilo, oxiranilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiofeno, dihidropiranilo, piranilo, morfolinilo, 1,4-diazepanilo, 1,4-oxazepanilo y similares.

20 Ejemplos adicionales de grupos heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a acridinilo, azocinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, benzisoxazolilo, benzisotiazolilo, benzimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizino, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxfenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo(4H)-ona, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, 30 pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizino, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo, triazinilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,5-triazolilo, 1,3,4-triazolilo y xantenilo.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "arilo C₅₋₆" o "arilo C_{5-C6}" se refiere a un anillo hidrocarbonado aromático que tiene 5 a 6 átomos de carbono (p. ej., C_{5-C6}) que no contiene heteroátomo alguno en la estructura del anillo.

40 El término "heteroarilo C₃₋₆" o "heteroarilo C_{3-C6}" se refiere a un monocíclico aromático de 3-6 miembros que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N, o S), a menos que se especifique lo contrario, excepto que un anillo heteroarilo no incluirá más de un átomo de oxígeno o un átomo de azufre. El término "alquenilo C₂₋₆" incluye grupos alifáticos insaturados que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos y que contienen al menos un doble enlace. Por ejemplo, el término "alquenilo C₂₋₆" incluye grupos alquenilo de cadena lineal (p. ej., etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo) y grupos alquenilo ramificados. En determinadas realizaciones, un grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada tiene 45 seis o menos átomos de carbono en su estructura (p. ej., C_{2-C6} para cadena lineal, C_{3-C6} para cadena ramificada). El término "alquenilo C₂₋₆" incluye grupos alquenilo que contienen de dos a seis átomos de carbono.

50 El término "alquinilo C₂₋₆" incluye grupos alifáticos insaturados que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono, pero que contienen al menos un triple enlace. Por ejemplo, "alquinilo" incluye grupos alquinilo de cadena lineal (p. ej., etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo) y grupos alquinilo ramificados. En determinadas realizaciones, un grupo alquinilo de cadena lineal o ramificada tiene seis o menos átomos de carbono en su cadena principal (p. ej., C_{2-C6} para cadena lineal, C_{3-C6} para cadena ramificada). El término "alquinilo C₂₋₆" incluye grupos alquinilo que contienen de dos a seis átomos de carbono.

55 **Métodos de Tratamiento**

Realizaciones pueden proporcionar un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, que incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto reseñado en esta memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 En algunas realizaciones, el compuesto administrado se proporciona en forma de un ácido libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto administrado se proporciona en forma de una sal de NH₄ o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona en forma de una sal de NH₄.

65

La expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a un resto que tiene sustituyentes designados que reemplazan uno o más átomos de hidrógeno en uno o más átomos que portan hidrógeno en el resto.

Se pretende que los productos químicos nombrados o representados incluyan todos los isótopos de átomos que se producen de forma natural que se presentan en los presentes compuestos. Isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno ^1H incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono ^{12}C incluyen ^{13}C y ^{14}C .

Dosificaciones

La dosis óptima para el tratamiento del cáncer se puede determinar empíricamente para cada uno de los individuos utilizando métodos conocidos y dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad de los agentes; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del individuo; el momento y la vía de administración; y otros medicamentos que esté tomando el individuo. Las dosis óptimas se pueden establecer utilizando ensayos y procedimientos de rutina que son bien conocidos en la técnica. La administración de los compuestos anteriores puede realizarse por cualquier vía adecuada.

"Sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a sales por adición de ácidos o sales por adición de bases de los compuestos de la presente divulgación. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que retiene la actividad del compuesto precursor y no imparte efecto indebidamente perjudicial o indeseable alguno en un sujeto al que se administra y en el contexto en el que se administra. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a complejos metálicos y sales de ácidos tanto inorgánicos como carboxílicos. Sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales metálicas tales como sales de aluminio, calcio, hierro, magnesio, manganeso y complejas. Además, sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de ácidos, tales como de ácido acético, aspártico, alquil sulfónico, arilsulfónico, axetílico, bencenosulfónico, benzoico, bicarbónico, bisulfúrico, bitartárico, butírico, edetato cálcico, cámsílico, carbónico, clorobenzoico, cítrico, edético, edisílico, estólico, esilo, esílico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucónico, glutámico, glicólico, glicolilarsanílico, hexámico, hexilresorcinoico, hidrábámico, bromhídrico, clorhídrico, hidrocloreuro, yodhídrico, hidroxinaftoico, isetiónico, lactico, lactobiónico, maleico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, metilnitrítico, metilsulfúrico, múcico, mucónico, napsílico, nítrico, oxálico, p-nitrometanosulfónico, pamoico, pantoténico, fosfórico, monohidrógeno fosfórico, dihidrógeno fosfórico, ftálico, poligalactourónico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfónico, sulfúrico, tánico, tartárico, teoclico, toluenosulfónico y similares. También se pueden preparar sales de sodio y sales de potasio.

Realizaciones pueden ser sales de diamonio. Sales farmacéuticamente aceptables se pueden derivar de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a cisteína. Los expertos en la técnica conocen métodos para producir compuestos en forma de sales (véase, p. ej., Stahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH; Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, 2002; Berge y col., J. Pharm. Sci. 66: 1, 1977).

Una "cantidad eficaz" de un agente terapéutico es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico observable en comparación con el cáncer que no se trata en un sujeto o paciente.

Agentes activos tal como se reseña en esta memoria se pueden combinar con un soporte farmacéuticamente aceptable para proporcionar formulaciones farmacéuticas de los mismos. La elección particular del soporte y la formulación dependerá de la vía de administración particular a la que se destina la composición.

"Soporte farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un soporte, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que está formulado. Soportes, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las composiciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, hidrógeno-fosfato disódico, hidrógeno-fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polietilenglicol y grasa de lana.

Las composiciones de la presente invención pueden ser adecuadas para administración por vía parenteral, oral, inhalatoria, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o de depósito implantado, etc. En algunas realizaciones, la formulación comprende ingredientes procedentes de fuentes naturales o no naturales. En algunas realizaciones, la formulación o el soporte se puede proporcionar en una forma estéril. Ejemplos no limitantes de un soporte estéril incluyen agua libre de endotoxinas o agua apirógena.

El término "parenteral", tal como se utiliza en esta memoria, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En realizaciones particulares, los compuestos se administran por vía intravenosa, oral, subcutánea o por vía intramuscular. Formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril

también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentra el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión.

5 Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante
10 alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos comúnmente utilizados, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, también pueden utilizarse para los fines de formulación.

15 Para la administración oral, se puede proporcionar un compuesto o una sal en una forma de dosificación oral aceptable, que incluye, pero no se limita a cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los soportes comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se pueden añadir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de
20 cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se puede combinar con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Además, también se pueden añadir conservantes. Ejemplos adecuados de conservantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como disolventes, por ejemplo, etanol, propilenglicol,
25 alcohol bencílico, clorobutanol, sales de amonio cuaternario y parabenos (tales como metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, etc.).

"Liberación inmediata" pretende incluir una liberación convencional, en la que la liberación del fármaco comienza inmediatamente después de la administración. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "liberación inmediata"
30 incluye formas de dosificación que permiten que el fármaco se disuelva en el contenido gastrointestinal, sin intención de retrasar o prolongar la disolución o absorción del fármaco. El objetivo es que el fármaco sea liberado rápidamente después de la administración, por ejemplo, que sea posible liberar al menos el 80 % del fármaco en el espacio de aproximadamente 30 minutos después del comienzo de la disolución en un test de disolución.

35 "Liberación sostenida" o "liberación prolongada" incluye formas de dosificación, cuyas características de liberación del fármaco del curso del tiempo y/o ubicación se eligen para lograr objetivos terapéuticos o de conveniencia que no ofrecen las formas de dosificación convencionales, tales como una solución o una forma de dosificación de liberación inmediata.

40 La expresión "estado estacionario" significa que se ha alcanzado una concentración en plasma para un agente activo dado y que se mantiene con dosis posteriores del agente activo a una concentración que está en o por encima de la concentración terapéutica mínima efectiva y está por debajo de la concentración plasmática mínima tóxica para un agente activo dado.

45 La expresión "formulación única", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un único soporte o vehículo formulado para suministrar cantidades eficaces de ambos agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo único está diseñado para suministrar una cantidad eficaz de cada uno de los agentes junto con cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, cápsula, píldora o un parche.

50 La expresión "dosis unitaria" se utiliza en esta memoria para dar a entender la administración simultánea de ambos agentes juntos, en una forma de dosificación, al paciente que está siendo tratado. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es una única formulación. En determinadas realizaciones, la dosis unitaria incluye uno o más vehículos, de manera que cada uno de los vehículos incluye una cantidad eficaz de un agente junto con soportes y excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es uno o más comprimidos, cápsulas,
55 píldoras o parches administrados al paciente al mismo tiempo.

La expresión "intervalo de dosis", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un límite superior e inferior de una variación aceptable de la cantidad de agente especificado. Típicamente, se puede administrar una dosis de un agente en cualquier cantidad dentro del intervalo especificado a pacientes que se someten a tratamiento.

60 El término "tratar" se utiliza en esta memoria con el significado de mitigar, reducir o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Por ejemplo, en relación con el cáncer, el término "tratar" puede significar detener, retrasar la aparición (es decir, el período anterior a la manifestación clínica de una enfermedad o síntoma de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar un síntoma de una enfermedad. El término "proteger" se utiliza en esta memoria para dar a entender prevenir el retraso o tratar, o todo, según corresponda, el desarrollo o la continuación o
65 el agravamiento de los síntomas de la enfermedad en un sujeto.

El término "sujeto" o "paciente" pretende incluir animales que son capaces de padecer o estar afectados por cáncer. Ejemplos de sujetos o pacientes incluyen mamíferos, p. ej., seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano, p. ej., un ser humano que padece, corre el riesgo de padecer, o es potencialmente capaz de padecer cáncer.

El término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de" significa habitualmente dentro del 20 %, más preferiblemente dentro del 10 % y lo más preferiblemente todavía dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa aproximadamente dentro de un logaritmo (es decir, un orden de magnitud) preferiblemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referencias similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en esta memoria o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en esta memoria está destinada simplemente a servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada uno de los valores separados que se encuentren dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en esta memoria, y cada uno de los valores separados se incorpora en la memoria descriptiva como si se indicara individualmente en esta memoria.

Trastornos proliferativos de células ejemplares que pueden tratarse utilizando uno o más compuestos descritos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a cáncer, una afección de precáncer o precancerosa, y lesiones metastásicas en tejidos y órganos del cuerpo. Trastornos de proliferación celular pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia.

Un compuesto descrito en esta memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede utilizar para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular, o para tratar o prevenir el cáncer, en un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer en relación con la población en general, o se puede utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines.

Formulaciones Farmacéuticas y Vías de Administración

En esta memoria se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento del cáncer. Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un soporte o excipiente, estabilizador, agente aromatizante y/o agente colorante.

El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar utilizando una diversidad de vías de administración conocidas por los expertos en la técnica. Vías de administración incluyen la administración oral. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede tomarse por vía oral en forma de un líquido, jarabe, comprimido, cápsula, polvo, rociado, pastilla masticable o disco soluble. Alternativamente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía intravenosa o transdérmica. Los expertos en la técnica conocen vías de administración adicionales (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A.R., Ed., 20^a edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa).

En algunas realizaciones, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable se formula como una pasta, jalea o suspensión. Por ejemplo, el fármaco se disuelve, atrapa o suspende en forma de partículas de fármaco, partículas microencapsuladas o partículas de fármaco-polímero en una solución gelatinosa o semi-sólida. Una ventaja de una formulación de jalea oral es que es más fácil de administrar el fármaco a pacientes que tienen dificultad para tragar comprimidos, cápsulas o píldoras. En determinadas realizaciones, el compuesto se mezcla y se suspende a fondo en un medio apropiado para formar una pasta o un gel. Opcionalmente, se pueden mezclar agentes adicionales para proporcionar sabor durante la administración oral. La mantequilla de cacahuete o el alginato, aromatizados con frambuesa y un edulcorante son ejemplos de los muchos agentes enmascaradores del sabor adecuados. En diversas realizaciones, la pasta o jalea también se puede formular con aglutinantes o excipientes adecuados conocidos en la técnica para la administración tópica.

Se conocen en la técnica métodos para preparar formulaciones de liberación sostenida en forma de comprimidos, cápsulas o píldoras. En algunas realizaciones, la formulación de liberación sostenida se prepara revistiendo el ingrediente activo del fármaco con un polímero, preferiblemente un polímero insoluble en agua. Por ejemplo, un polímero insoluble en agua utilizado en el campo farmacéutico como un agente de revestimiento de liberación sostenida, agente de revestimiento entérico o agente de revestimiento gástrico. El polímero insoluble en agua puede incluir, por ejemplo, etilcelulosa, goma laca purificada, goma laca blanca, copolímero de metacrilato de aminoalquilo RS, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetiletil-celulosa,

acetato-ftalato de celulosa, copolímero de ácido metacrílico L, copolímero de ácido metacrílico LD, copolímero de ácido metacrílico S, copolímero de metacrilato de aminoalquilo E o dietilaminoacetato de polivinil acetal.

5 El tipo, grado de sustitución y peso molecular de los polímeros insolubles en agua pueden depender de la solubilidad del ingrediente activo en agua o un alcohol, la concentración de liberación sostenida deseado y similares. Los polímeros insolubles en agua se pueden utilizar solos o en combinación. Puede incorporarse, además, un aceite hidrogenado, ácido esteárico o cetanol como agente auxiliar de revestimiento, y un triglicérido de cadena media, triacetina, citrato de trietilo o cetanol como plastificante.

10 En algunas realizaciones, la formulación de liberación sostenida es un comprimido o gránulo de tipo matriz. El ingrediente activo se puede recubrir con hasta 3 tipos diferentes de polímeros. Estos tres tipos diferentes de polímeros pueden incluir: 1) un polímero insoluble en agua, tal como etilcelulosa; 2) un polímero gelificante independiente del pH, tal como hidroxipropilmetilcelulosa; y 3) un polímero gelificante dependiente del pH, tal como alginato de sodio. Estos tres tipos diferentes de polímeros se pueden utilizar juntos para atenuar la velocidad de liberación de los fármacos.

Formas de Dosificación: Propiedades de Liberación

20 Las formulaciones de liberación sostenida pueden lograr un cierto grado de efecto sostenido. Sin embargo, la exposición y/o la biodisponibilidad del ingrediente activo puede variar en base a una diversidad de factores, tales como, por ejemplo, la ventana de absorción, los soportes o excipientes utilizados en la formulación, el modo de suministro de la formulación y/o el tiempo de tránsito del ingrediente activo a través del tracto gastrointestinal del paciente.

25 Una terapia puede contener al menos una porción de liberación sostenida para realizar una función de liberación sostenida y una porción de liberación inmediata para realizar una función de liberación inmediata. En ciertas realizaciones, cuando la terapia es en una forma de dosificación única, puede ser en forma de comprimidos formados a partir de una mezcla de gránulos de liberación sostenida que constituyen una porción de liberación sostenida y gránulos de liberación inmediata que constituyen una porción de liberación inmediata, una preparación de cápsula obtenida llenando una cápsula con gránulos de liberación sostenida y gránulos de liberación inmediata, o comprimidos recubiertos por prensado en los que se forma una capa exterior que constituye una porción de liberación inmediata sobre un núcleo interior que constituye una porción de liberación sostenida. Sin embargo, no hay limitación para las realizaciones anteriores.

35 Además, no existen limitaciones particulares sobre el estado de contención del fármaco en la composición o en una porción de liberación inmediata o una porción de liberación sostenida; el compuesto puede dispersarse uniformemente en la composición, porción de liberación inmediata o porción de liberación sostenida, o puede estar contenido en solo una parte de la composición, porción de liberación inmediata o porción de liberación sostenida, o puede estar contenido de tal manera que haya un gradiente de concentración.

40 Una porción de liberación sostenida en la composición de acuerdo con la presente invención puede contener al menos una sustancia polimérica no dependiente del pH o una sustancia polimérica dependiente del pH para controlar la liberación del fármaco.

45 Una sustancia polimérica no dependiente del pH utilizada en esta memoria puede comprender una sustancia polimérica cuyo estado de carga apenas cambia bajo las condiciones de pH que se encuentran generalmente en el tracto gastrointestinal, específicamente de pH 1 a pH 8. Esto significa, por ejemplo, una sustancia polimérica que no tiene grupos funcionales cuyo estado de carga cambia en función del pH, tal como grupos funcionales de carácter básico tales como grupos amino, o grupos funcionales de carácter ácido, tales como grupos de ácido carboxílico. Obsérvese que la sustancia polimérica no dependiente del pH puede incluirse para dar a la composición de acuerdo con la presente invención una función de liberación sostenida, pero también puede incluirse para otro propósito. Además, la sustancia polimérica no dependiente del pH utilizada en la presente invención puede ser insoluble en agua, o puede hincharse en agua o disolverse en agua para formar un gel.

55 Ejemplos de sustancias poliméricas insolubles en agua que no dependen del pH incluyen, pero no se limitan a éteres de celulosa, ésteres de celulosa y copolímeros de ácido metacrílico-ácido acrílico (nombre comercial Eudragit, fabricado por Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Alemania). Ejemplos incluyen, pero no se limitan a alquil éteres de celulosa tal como etilcelulosa (nombre comercial Ethocel, fabricado por Dow Chemical Company, EE.UU.), etil metilcelulosa, etil propilcelulosa o isopropil celulosa, y butil celulosa, aralquil éteres de celulosa, tales como bencil celulosa, cianoalquil éteres de celulosa tales como cianoetilcelulosa, ésteres de ácidos orgánicos de celulosa, tales como acetato-butirato de celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa o butirato de celulosa y acetato-propionato de celulosa, copolímeros de acrilato de etilo-metacrilato de metilo (nombre comercial Eudragit NE, fabricado por Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Alemania) y el copolímero de metacrilato de aminoalquilo RS (nombres comerciales Eudragit RL, Eudragit RS). No existen limitaciones particulares sobre el diámetro medio de partícula de un polímero insoluble en agua utilizado en la presente invención, pero habitualmente cuanto menor es este diámetro medio de partícula mejor será el rendimiento, siendo el diámetro medio de partícula preferiblemente de 0,1 a 100 μm , más preferiblemente de 1 a 50 μm , de manera particularmente preferida de 3 a 15 μm , lo más preferiblemente de 5 a

15 µm. Además, ejemplos de sustancias poliméricas no dependientes del pH, solubles en agua o que se hinchan en agua, incluyen, pero no se limitan a poli(óxido de etileno) (nombre comercial Polyox, fabricado por Dow Chemical Company, peso molecular 100.000 a 7.000.000), hidroxipropil celulosa de baja sustitución (nombre comercial L-HPC, fabricado por Shin-Etsu Chemical, Japón), hidroxipropilcelulosa (nombre comercial HPC, fabricada por Nippon Soda, Co., Ltd, Japón), hidroxipropil metilcelulosa (nombres comerciales Metolose 60SH, 65SH, 90SH, fabricado por Shin-Etsu Chemical, Japón) y metilcelulosa (nombre comercial Metolose SM, fabricado por Shin-Etsu Chemical, Japón).

En algunas realizaciones, una sola sustancia polimérica no dependiente del pH puede estar contenida en la composición, o puede estar contenida una pluralidad de sustancias poliméricas no dependientes del pH. La sustancia polimérica no dependiente del pH, si se utiliza en las realizaciones descritas en esta memoria, puede ser una sustancia polimérica insoluble en agua, más preferiblemente etilcelulosa, un copolímero de acrilato de etilo-metacrilato de metilo (nombre comercial Eudragit NE), o un copolímero de metacrilato de aminoalquilo RS (nombre comercial Eudragit RL, Eudragit RS). Es particularmente preferible al menos uno de etilcelulosa y un copolímero de metacrilato de aminoalquilo RS. La más preferible es etilcelulosa. No existen limitaciones particulares sobre la cantidad de sustancia polimérica no dependiente del pH contenida en la composición; esta cantidad puede ajustarse según sea apropiado de acuerdo con el propósito, tal como controlar la liberación sostenida del fármaco.

Una sustancia polimérica dependiente del pH que se puede utilizar en realizaciones reseñadas en esta memoria puede comprender una sustancia polimérica cuyo estado de carga cambia bajo las condiciones de pH que se encuentran generalmente en el tracto gastrointestinal, específicamente de pH 1 a pH 8. Esto significa, por ejemplo, una sustancia polimérica que tiene grupos funcionales cuyo estado de carga cambia en función del pH, tal como grupos funcionales de carácter básico tales como grupos amino, o grupos funcionales de carácter ácido, tales como grupos de ácido carboxílico. Los grupos funcionales dependientes del pH de la sustancia polimérica dependiente del pH son preferiblemente grupos funcionales de carácter ácido, teniendo la sustancia polimérica dependiente del pH lo más preferiblemente grupos ácido carboxílico.

Una sustancia polimérica dependiente del pH utilizada en la presente invención puede ser insoluble en agua, o puede hincharse en agua o disolverse en agua para formar un gel. Ejemplos de sustancias poliméricas dependientes del pH utilizadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a sustancias poliméricas entéricas. Ejemplos de sustancias poliméricas entéricas incluyen, pero no se limitan a copolímeros de ácido metacrílico-metacrilato de metilo (Eudragit L100, Eudragit S100, fabricados por Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Alemania), copolímeros de ácido metacrílico-acrilato de etilo (Eudragit L100-55, Eudragit L30D-55, fabricados por Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Alemania), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HP-55, HP-50, fabricado por Shin-Etsu Chemical, Japón), acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (AQOAT, fabricado por Shin-Etsu Chemical, Japón), carboximetil etilcelulosa (CMEC, fabricada por Freund Corporation, Japón) y acetato-ftalato de celulosa.

Ejemplos de sustancias poliméricas dependientes del pH que se hinchan en agua o se disuelven en agua para formar un gel incluyen, pero no se limitan a ácido algínico, pectina, polímero de carboxivinilo y carboximetilcelulosa. En la presente invención, una sola sustancia polimérica dependiente del pH puede estar contenida en la composición, o puede estar contenida una pluralidad de sustancias poliméricas dependientes del pH. La sustancia polimérica dependiente del pH utilizada en la presente invención es preferiblemente una sustancia polimérica entérica, más preferiblemente un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo, un copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa o acetato-succinato de hidroxipropil metilcelulosa, de manera particularmente preferida un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo.

Cuando se utiliza una sustancia polimérica dependiente del pH en el procedimiento de fabricación de una composición de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar un producto disponible comercialmente de tipo polvo o tipo granular, o un tipo de suspensión en el que la sustancia polimérica dependiente del pH se ha dispersado en un disolvente de antemano tal cual, o un producto disponible comercialmente de este tipo se puede utilizar dispersado en agua o en un disolvente orgánico. Cuanto menor sea el diámetro de partícula de la sustancia polimérica dependiente del pH, mejor será el rendimiento, siendo la sustancia polimérica dependiente del pH preferiblemente del tipo de polvo. En el caso de un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo, un ejemplo es Eudragit L100-55. No existen limitaciones particulares sobre el diámetro medio de partícula de una sustancia polimérica dependiente del pH utilizada en la presente invención, pero el diámetro medio de partícula es preferiblemente de 0,05 a 100 µm, más preferiblemente de 0,05 a 70 µm, lo más preferiblemente de 0,05 a 50 µm. Además, no existen limitaciones particulares sobre la cantidad de sustancia polimérica dependiente del pH, por ejemplo, en el caso de una sustancia polimérica entérica, la cantidad es generalmente de 0,1 a 90 partes en peso, preferiblemente de 1 a 70 partes en peso, más preferiblemente de 5 a 60 partes en peso, de manera particularmente preferida de 10 a 50 partes en peso, basado en 100 partes en peso de la composición.

Una terapia de acuerdo con realizaciones reseñadas en esta memoria puede contener, además, cualquiera de diversos aditivos, tales como cualquiera de diversos soportes farmacológicamente aceptables, tales como diluyentes, lubricantes, aglutinantes y desintegrantes, así como conservantes, colorantes, edulcorantes, plastificantes, agentes de recubrimiento de película, etcétera, según sea necesario. Ejemplos de diluyentes incluyen, pero no se limitan a lactosa, manitol, fosfato cálcico dibásico, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa cristalina, anhídrido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, metasilicato de aluminato de magnesio o similares. Ejemplos de lubricantes incluyen,

pero no se limitan a estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, estearil fumarato de sodio o similares. Ejemplos de aglutinantes incluyen, pero no se limitan a hidroxipropil celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa, polivinilpirrolidona o similares. Ejemplos de desintegrantes incluyen, pero no se limitan a carboximetil celulosa, carboximetil celulosa cálcica, croscarmelosa sódica, carboximetil almidón sódico, hidroxipropil celulosa poco sustituida o similares. Ejemplos de conservantes incluyen, pero no se limitan a ésteres de ácido paraoxibenzoico, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, ácido deshidroacético, ácido sórbico o similares. Ejemplos preferibles de colorantes incluyen, pero no se limitan a, pigmentos de laca insolubles en agua, pigmentos naturales (p. ej., beta-caroteno, clorofila, óxido férrico rojo), óxido férrico amarillo, óxido férrico rojo, óxido férrico negro o similares. Ejemplos preferibles de edulcorantes incluyen, pero no se limitan a sacarina sódica, glicirrizato dipotásico, aspartamo, estevia o similares. Ejemplos de plastificantes incluyen, pero no se limitan a ésteres de ácidos grasos de glicerol, citrato de trietilo, propilenglicol, polietilenglicol o similares. Ejemplos de agentes de recubrimiento de película incluyen, pero no se limitan a hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil celulosa o similares.

Métodos de Fabricación

Para fabricar realizaciones como se reseña en esta memoria se puede utilizar un solo método convencional, o una combinación de métodos convencionales. Por ejemplo, cuando se fabrican gránulos que contienen fármaco como una porción de liberación sostenida o una porción de liberación inmediata, la granulación es la operación principal, pero esto puede combinarse con otras operaciones, tales como mezclar, secar, tamizar y clasificar. Como método de granulación se puede utilizar, por ejemplo, un método de granulación en húmedo, en el que se añaden un aglutinante y un disolvente al polvo y se lleva a cabo la granulación, un método de granulación en seco, en el que se comprime el polvo y se lleva a cabo la granulación, un método de granulación fundida, en el que se añade un aglutinante que funde al calentar y se lleva a cabo el calentamiento y la granulación, o similares.

Además, de acuerdo con el método de granulación, un método operativo tal como un método de granulación por mezclado utilizando un mezclador planetario, un mezclador de tornillo o similar, un método de granulación por mezclado de alta velocidad utilizando un mezclador Henschel, un Super mezclador o similar, un método de granulación por extrusión utilizando un granulador cilíndrico, un granulador rotatorio, un granulador de extrusión de tornillo, un granulador tipo molino de pellets o similar, un método de granulación de alto cizallamiento en húmedo, un método de granulación en lecho fluidizado, un método de granulación por compresión, un método de granulación por trituración o un método de granulación por pulverización. Después de la granulación, se puede secar utilizando un secador, un lecho fluidizado o similar, el craqueo y el tamizado para obtener los gránulos o gránulos finos para su uso. Además, se puede utilizar un disolvente de granulación cuando se prepara la composición de acuerdo con la presente invención. No existen limitaciones particulares sobre un disolvente de granulación de este tipo, el cual puede ser agua o cualquiera de diversos disolventes orgánicos, por ejemplo, agua, un alcohol inferior, tal como metanol o etanol, una cetona, tal como acetona o metil etil cetona, cloruro de metileno o una mezcla de los mismos.

Para los gránulos de liberación sostenida contenidos en realizaciones, se mezclan al menos un fármaco y al menos uno seleccionado de sustancias poliméricas no dependientes del pH y sustancias poliméricas dependientes del pH, se añaden un diluyente y un aglutinante según sea necesario, y se lleva a cabo la granulación para obtener materia granular. La materia granular obtenida se seca utilizando un secador de bandeja, un secador de lecho fluidizado o similar, y el tamizado se lleva a cabo utilizando un molino o un oscilador, con lo que se pueden obtener los gránulos de liberación sostenida. Alternativamente, como método de fabricación de gránulos de liberación sostenida en la presente invención, es posible añadir al menos un fármaco, al menos uno seleccionado de sustancias poliméricas no dependientes del pH y sustancias poliméricas dependientes del pH y, según sea necesario, un diluyente y un aglutinante utilizando un compactador en seco, tal como un compactador de rodillos o una máquina para hacer tabletas, y llevar a cabo la granulación mientras se mezcla, y luego llevar a cabo la granulación rompiendo hasta un tamaño adecuado. La materia granular preparada utilizando un granulador de este tipo se puede utilizar tal cual como gránulos o gránulos finos de acuerdo con la presente invención, o puede romperse adicionalmente utilizando un molino motorizado, un granulador de rodillos, un molino de velocidad de rotor o similar, y tamizar para obtener gránulos de liberación sostenida. Obsérvese que los gránulos de liberación inmediata también se pueden fabricar como los gránulos de liberación sostenida.

Se puede fabricar un producto moldeado por compresión como una porción de liberación sostenida o una porción de liberación inmediata que contiene fármaco, o como una composición reseñada en esta memoria utilizando un único método convencional, o una combinación de métodos convencionales. Por ejemplo, al menos un fármaco, al menos uno seleccionado de sustancias poliméricas no dependientes del pH y sustancias poliméricas dependientes del pH, un diluyente tal como manitol o lactosa, un aglutinante tal como polivinilpirrolidona o celulosa cristalina, un desintegrante tal como carmelosa sódica o crospovidona y un lubricante tal como estearato de magnesio o talco, y la formación de comprimidos se lleva a cabo utilizando un método ordinario, mediante el cual se puede obtener el producto moldeado por compresión. En este caso, la formación de comprimidos es la operación principal en el método de fabricación del producto moldeado por compresión, pero esto puede combinarse con otras operaciones tales como mezclado, secado, formación de recubrimiento de azúcar y recubrimiento.

Ejemplos del método para la formación de comprimidos incluyen, pero no se limitan a moldeo por compresión directa, en el cual al menos un fármaco y aditivos farmacológicamente aceptables se mezclan y luego la mezcla se moldea

por compresión directamente en comprimidos utilizando una máquina de formación de comprimidos y compresión de gránulos en seco o compresión de gránulos en húmedo, en que los gránulos de liberación sostenida o los gránulos de liberación inmediata de acuerdo con la presente invención se someten a moldeo por compresión después de añadir un lubricante o un desintegrante según sea necesario. No existen limitaciones particulares en la máquina de fabricación de comprimidos utilizada en el moldeo por compresión; por ejemplo, se puede utilizar una máquina para hacer comprimidos de un solo punzón, una máquina para hacer comprimidos rotativa o una máquina para hacer comprimidos recubiertos por prensado.

Los gránulos de liberación sostenida o los gránulos de liberación inmediata que contienen fármaco, o el producto moldeado por compresión de acuerdo con las realizaciones de esta memoria, se pueden utilizar tal cual en forma de gránulos o un comprimido como composición, pero también se pueden someter a un procesamiento adicional para fabricar la composición. Por ejemplo, al producto moldeado por compresión o a los gránulos se le puede dar un recubrimiento de película utilizando un material de base de película tal como etilcelulosa, caseína, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico L, acetato-ftalato de celulosa, goma laca o similar, o se le puede dar un recubrimiento de azúcar utilizando un líquido de recubrimiento de azúcar que contiene sacarosa, alcohol de azúcar, polvo de goma arábica, talco o similares, produciendo así comprimidos recubiertos con película o comprimidos recubiertos con azúcar. Un disolvente en esta técnica de revestimiento puede ser agua purificada, pero también se puede utilizar un disolvente orgánico tal como un alcohol, una cetona, un éter o un hidrocarburo clorado, o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, como disolvente orgánico se pueden utilizar etanol, acetona, cloruro de metileno o similares. Además, como aparato de revestimiento se puede utilizar un aparato que se utiliza normalmente en técnicas de revestimiento para fabricar medicamentos, con ejemplos que incluyen un aparato de revestimiento por pulverización, en el que el revestimiento se lleva a cabo pulverizando un líquido de revestimiento o similar, y un granulador de lecho fluidizado con rotor para revestimiento.

En el caso de fabricar preparaciones en cápsulas, las preparaciones en cápsulas se pueden fabricar llenando gránulos de liberación sostenida o gránulos de liberación inmediata como se indica arriba, o mini-comprimidos en cápsulas de gelatina dura o cápsulas de HPMC utilizando una máquina automática de llenado de cápsulas. Alternativamente, en el caso de las preparaciones para la administración por tubo o un jarabe seco que se utiliza mezclado con agua o similar cuando se toma, los gránulos de liberación sostenida o los gránulos de liberación inmediata como antes se pueden mezclar con un espesante o un dispersante de manera que se dispersen estos gránulos, convirtiéndose luego la mezcla en gránulos o comprimidos. Además, se puede preparar un líquido o jalea utilizando agua y sustancias seleccionadas de dispersantes, emulsionantes, espesantes, conservantes, ajustadores de pH, edulcorantes, aromatizantes, fragancias, etcétera. Sin embargo, con respecto a otros métodos de fabricación, no existen limitaciones a lo anterior.

Para que las realizaciones descritas en esta memoria puedan entenderse más completamente, se recogen los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLOS

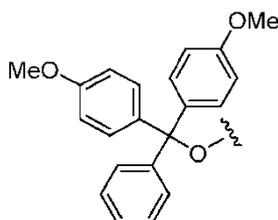
A lo largo de los ejemplos se pueden utilizar las siguientes abreviaturas.

All: alilo

BOP: hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio

DMT: 4,4'-dimetoxitritilo

(DMTO-:



)

Bz: benzoilo

ib: isobutirilo

Base de Hunig: i-Pr₂NEt (diisopropiletilamina)

AlilOH: alcohol alílico

5 OAlI: -OCH₂CHCH₂

ACN: acetonitrilo

10 All: -CH₂CHCH₂

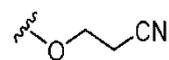
2-NitroBnBr: bromuro de 2-nitrobencilo Bz: benzoilo

ib: isobutirilo

15 i-Pr: isopropilo

CE: cianoetilo

20 (-OCE:



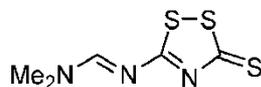
)

25 DEAD: azodicarboxilato de dietilo

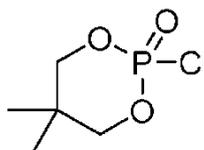
DIAD: azodicarboxilato de diisopropilo

DCM: diclorometano

30 DDTT: N,N-dimetil-N'-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)formimidamida

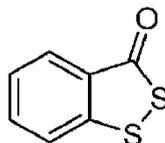


35 DMOCP: 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosfinano 2-óxido



40 TBS: t-butildimetilsililo

3H-benzo[c][1,2]ditiol-3-ona:

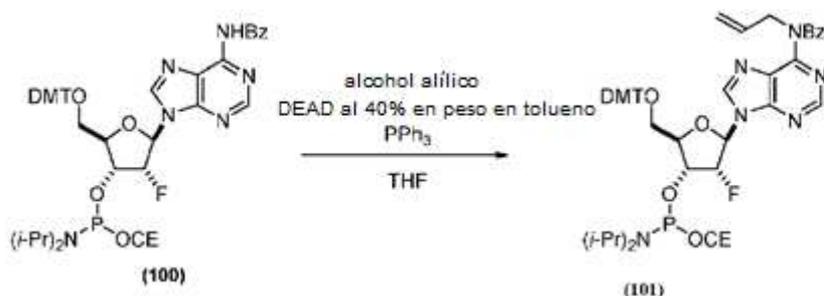


45 **Ejemplo 1 -- Síntesis de Compuesto 1a**

Un esquema completo de esta síntesis está disponible en la FIG. 1.

Etapas A

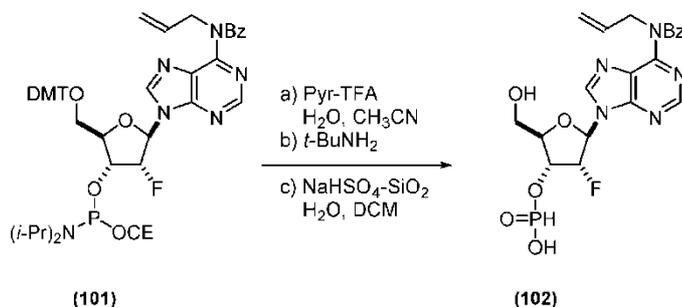
50



5 A una mezcla de (2-cianoetil) diisopropilfosforoamidita de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-ilo (Compuesto 100) (mezcla de diastereómeros de fósforo; 80,0 g, 91,332 mmol, 1 eq, ChemGenes Corporation n° de catálogo ANP-9151), alcohol alílico (9,63 ml, 142 mmol, 1,55 eq) y trifetilfosfina (38,3 g, 146 mmol, 1,60 eq) en THF (1,1L) se añadió DEAD (solución al 40 % en peso en tolueno; 54,2 ml, 137 mmol, 1,5 eq.) a temperatura ambiente. Se continuó agitando a temperatura ambiente y se controló la reacción mediante LC/MS. Una vez completada (19 h), la mezcla se concentró *in vacuo* (35 °C) y la mezcla resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (800 g x 2 columnas, EtOAc del 40 a 60 % en n-heptano tamponado con trietilamina al 0,5 %) para dar Compuesto 101 en forma de una espuma blanca (84,2 g, rendimiento cuantitativo, mezcla de diastereómeros de fósforo).

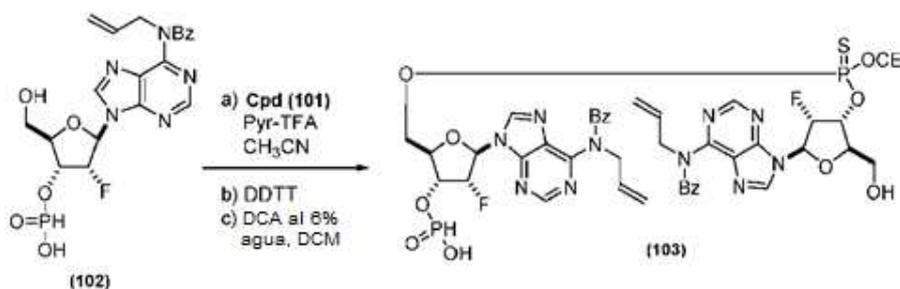
15 ¹H RMN (3:2 mezcla de diastereómeros de fósforo, 400 MHz, CDCl₃) δ 1,14 - 1,21 (m, 12 H) 2,40 (t, J=6,2 Hz, 1,2 H) 2,59 (t, J=6,2 Hz, 0,8 H) 3,27 (d, J=8,6 Hz, 1 H) 3,52 - 3,66 (m, 5 H) 3,78 (s 2,4 H) 3,79 (s 3,6 H) 4,28 - 4,34 (m, 1 H) 4,84 - 4,96 (m, 0,4 H) 4,99 (d, J=5,5 Hz, 2 H) 4,95 - 5,10 (m, 0,6 H) 5,05 (d, J=10,9 Hz, 1 H) 5,22 (a d, J=17,6 Hz, 1 H) 5,64 (a d, J=53,2 Hz, 0,6 H) 5,70 (a d, J=51,6 Hz, 0,4 H) 5,96 - 6,75 (m, 1 H) 6,20 (d, J=16,0 Hz, 0,6 H) 6,24 (d, J=17,2 Hz, 0,4 H) 6,74 - 6,79 (m, 4 H) 7,02 - 7,06 (m, 2H) 7,17 - 7,24 (m, 8 H) 7,32 - 7,34 (m, 2 H) 7,41 - 7,44 (m, 2 H) 8,11 (s, 1H) 8,52 (s, 0,4 H) 8,54 (s, 0,6 H).

20 Etapa B



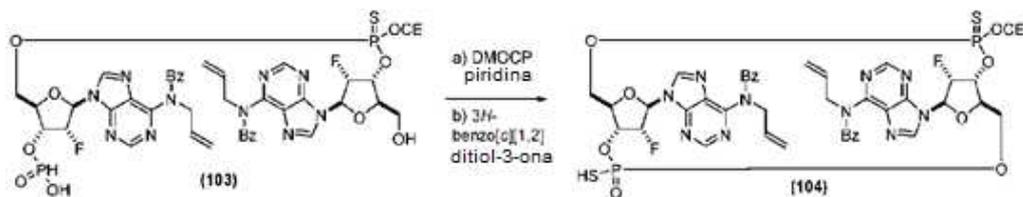
25 A una solución de Compuesto 101 (3,00 g, 3,28 mmol, 1 eq) en acetonitrilo (30 ml) se añadió agua (0,118 ml, 6,55 mmol, 2,0 eq) y sal trifluoroacetato de piridina (0,759 g, 3,93 mmol, 1,2 eq). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 minuto, se añadió *tert.*-butilamina (14,5 g, 21,0 ml, 0,20 mol, 60 eq). Tras la escisión completa del grupo cianoetilo (controlada por LC/MS), la mezcla de reacción se concentró *in vacuo* y se destiló azeotrópicamente dos veces con acetonitrilo. La mezcla bruta se disolvió en DCM (45,0 ml) y se trató con agua (0,118 ml, 6,55 mmol, 2,0 eq) y NaHSO₄-SiO₂ (1,18 g, 6,55 mmol, 2 eq) a temperatura ambiente. Tras la escisión completa del grupo DMT (controlada por LC/MS, aproximadamente 1 hora), la mezcla de reacción se filtró y se lavó dos veces con DCM/MeOH (9/1, 20 ml). Los filtrados combinados se concentraron *in vacuo* y se trataron con una mezcla 1:1 de n-heptano/tolueno (~30 ml). La capa superior se eliminó por decantación. Se repitió la misma operación una vez más con n-heptano/tolueno (1/1, 30 ml) y la capa inferior se destiló azeotrópicamente dos veces con acetonitrilo para dar Compuesto 102 (se supuso un rendimiento teórico del 100 %). El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

Etapa C



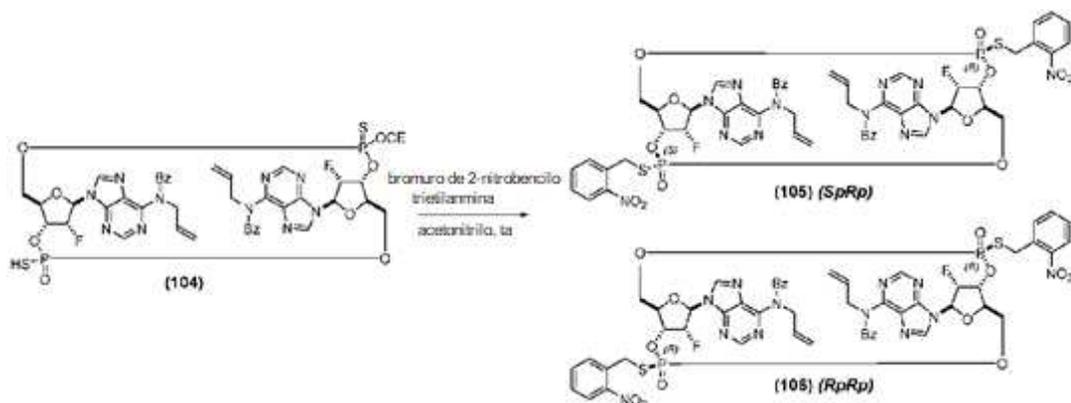
5 A una mezcla de Compuesto 102 (1,56 g, 3,27 mmol, 1 eq) y Compuesto 101 (3,00 g, 3,28 mmol, 1 eq) en acetonitrilo (30 ml) se añadió sal trifluoroacetato de piridina (secada azeotrópicamente con piridina; 0,760 g, 3,94 mmol, 1,25 eq). Después de 5 minutos, se añadió DDTT (0,840 g, 4,09 mmol, 1,30 eq, n^o de catálogo RN-1588 de ChemGenes Corporation) y, tras la sulfuración completa (controlada por LC/MS), la mezcla de reacción se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en DCM (30 ml) y se trató con agua (0,57 ml, 32 mmol, 10 eq) y ácido dicloroacético al 6 % (1,56 ml, 18,9 mmol, 6,0 eq) en DCM (30 ml). Después de 20 minutos, la reacción se extinguió con piridina (20 ml) y se concentró *in vacuo*. El residuo se destiló azeotrópicamente con piridina para dar Compuesto 103 (3,22 g, rendimiento teórico asumido del 100 %). El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

Etapa D



15 A una solución de Compuesto 103 (3,22 g, 3,15 mmol, 1 eq) en piridina (100 ml) se añadió DMOCP (1,45 g, 7,88 mmol, 2,50 eq) a temperatura ambiente. Tras completar la macrociclización (controlada por LC/MS), se añadió agua (1,7 ml, 94,5 mmol, x 10 veces con respecto a DMOCP) seguido de 3H-benzo[c][1,2]ditiol-3-ona (0,795 g, 4,73 mmol, 1,5 eq). Tras la completa sulfuración (aproximadamente 40 minutos), la mezcla de reacción se concentró parcialmente *in vacuo* a aproximadamente 15 ml y se vertió en una mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado (50 ml) y agua (30 ml). Después de 10 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con una mezcla 1:1 de EtOAc/MTBE (60 ml x 3 veces). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (25 ml), se secaron sobre Mg₂SO₄ y se concentraron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH al 0-20 % en DCM) para dar Compuesto 104 (3,31 g, 3,20 mmol, rendimiento teórico asumido del 100 %) en forma de un aceite pardo. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

Etapa E



30 A una solución de Compuesto 104 (3,31 g, 3,20 mmol, 1 eq) en acetonitrilo (66,2 ml) se añadió bromuro de 2-nitrobencilo (2,42 g, 11,2 mmol, 3,50 eq) y trietilamina (1,78 ml, 12,8 mmol, 4,00 eq). Una vez completada la reacción (controlada por LC/MS, aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente), la mezcla de reacción se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (60 % de acetato de etilo/n-heptano a 100 % de acetato de etilo) para dar 0,568 g de producto en forma de una mezcla de diastereómeros de fósforo. La separación por HPLC preparativa de los diastereómeros dio Compuesto 105 (isómero SR; 0,225 g, 0,180 mmol, rendimiento global

del 5,6 % de Compuesto 101) y Compuesto 106 (isómero RR; 0,187 g, 0,149 mmol, rendimiento global del 4,7 % de Compuesto 1).

5 Compuesto 105 (*SpRp*) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,63 (s, 1H), δ = 8,61 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 2H), 7,99 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,65 - 7,44 (m, 8H), 7,40 - 7,31 (m, 4H), 7,25 - 7,21 (m, 4H), 6,15 - 5,89 (m, 5H), 5,61 (dd, J = 52,0, 5,1 Hz, 1H), 5,55 (ddd, J = 51,2, 4,7, 2,7 Hz, 1H) 5,51 - 5,42 (m, 1H), 5,31 - 5,22 (m, 2H), 5,11 (dd, J = 3,9, 9,8 Hz, 2H), 5,04 - 4,95 (m, 4H), 4,55 - 4,37 (m, 7H), 4,29 - 4,12 (m, 3H)

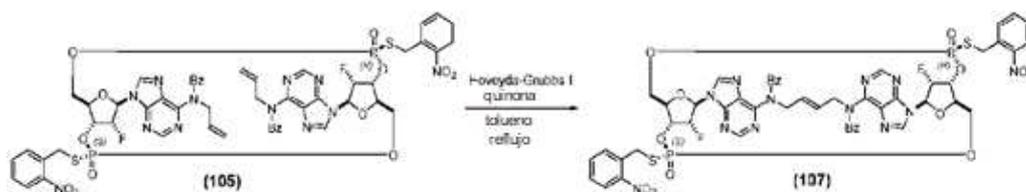
10 Compuesto 106 (*RpRp*) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,65 (s, 2H), 8,06 (dd, J = 1,4, 8,0 Hz, 2H), 7,98 (s, 2H), 7,57 - 7,52 (m, 6H), 7,47 - 7,32 (m, 6H), 7,25 - 7,21 (m, 4H), 6,15 (d, J = 18,7 Hz, 2H), 6,09 - 5,99 (m, 2H), 5,82-5,76 (m, 2H), 5,60 (dd, J = 51,8, 4,9 Hz, 2H), 5,27 (dd, J = 1,2, 17,2 Hz, 2H), 5,12 (dd, J = 1,0, 10,4 Hz, 2H), 5,06 - 4,96 (m, 4H), 4,55 - 4,40 (m, 4H), 4,36 - 4,24 (m, 4H), 4,21 - 4,02 (m, 2H)

Condiciones de HPLC preparativa:

Instrumento		Agilent 1200				
Columna de HPLC		Columna Waters Sunfire Prep C18 OBD, 5 um, 30 x 250 mm, n ^o 186003969				
Caudal:		50 ml/min				
fase móvil		A: agua, B: acetonitrilo				
Gradiente	Tiempo (min)	0	8	9,9	10	12
	% B	50	99	99	50	50
Tiempo de procesamiento		12 min				
Volumen de inyección		150 ul (0,08 g/ml en acetonitrilo)				
detección		UV 254 nm				
Tiempo de retención	de Compuesto (<i>SpRp</i>)	105	7,7min			
	de Compuesto (<i>RpRp</i>)	106	8,0min			

15

Etapas F



20

A una solución calentada (90 °C) de Compuesto 105 (519 mg, 0,414 mmol, 1 eq) en tolueno (519 ml) se añadió Hoveyda-Grubbs Catalyst™ de 2^a generación ((1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro (o-isopropoxifenilmetileno)rutenio; disponible en SIGMA-ALDRITCH® Catálogo N^o 569755; CAS 301224-40-8; 91 mg, 0,15 mmol, 0,35 eq) y quinona (0,102 ml, 1,243 mmol, 3,0 eq). La mezcla se calentó a reflujo y el progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Después de 3 horas, se añadió un catalizador adicional (91 mg, 0,15 mmol, 0,35 eq) y se continuó la reacción durante 3 horas adicionales. Después de enfriar, la mezcla se trató con DMSO (0,59 ml, 8,3 mmol, 20 eq) a temperatura ambiente durante 15 horas, se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, 66 % de acetato de etilo en n-heptano a 100 % de acetato de etilo) para dar Compuesto 107 (200 mg, 0,163 mmol, 39 % de rendimiento) en forma de una espuma seca parda.

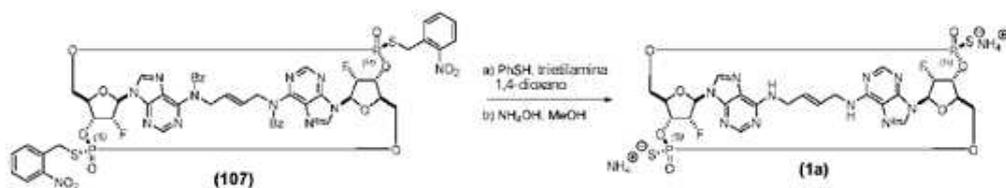
25

30

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,19 (s, 1H), 8,12 (dd, J = 7,8 Hz, 1,9 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,63 (a d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,53 - 7,41 (m, 10H), 7,35 - 7,30 (m, 2H), 7,25 - 7,20 (m, 4H), 6,23 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 6,14 (d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,86 - 5,75 (m, 1H), 5,75 (dt, J = 15,3, 5,0 Hz, 1H), 5,67 (dt, J = 15,3, 4,7 Hz, 1H), 5,60 (dd, J = 52,0, 3,9 Hz, 1H), 5,48 (dd, J = 50,4, 3,9 Hz, 1H) 5,50 - 5,39 (m, 1H), 4,91 - 4,64 (m, 4H), 4,57 - 4,25 (m, 9H), 4,15 (d, J = 7,03 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 7,03 Hz, 1H).

35

Etapas G



5 A una solución de Compuesto 107 (88 mg, 0,072 mmol, 1 eq) en 1,4-dioxano (1,76 ml) se añadió tiofenol (0,88 mL, 8,55 mmol, 119 eq) y trietilamina (0,88 mL, 6,31 mmol, 88 eq). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por LC/MS, 13 horas), se añadieron metanol (5,28 ml) e hidróxido de amonio al 28 % (3,52 ml) y la mezcla resultante se calentó a 50 °C. Una vez completada la reacción (controlada por LC/MS, 5 horas), la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión parduzca resultante se filtró y se lavó con agua (15 ml). El filtrado se filtró de nuevo para eliminar sólidos adicionales. El filtrado final se extrajo dos veces con una mezcla 1:1 de tolueno y heptano (30 ml). La capa acuosa se concentró *in vacuo* y luego se resuspendió en agua (6 ml). El sólido resultante se separó por filtración y el filtrado se sometió a HPLC preparativa para dar la sal de diamonio de Compuesto 1 (a la que también se alude como Compuesto 1a) (39 mg, 0,050 mmol, rendimiento del 70 %) en forma de un sólido blanco.

15 Compuesto 1a (*SpRp, trans*) ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ = 9,05 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 6,34 (s a, 2H), 5,88 (s a, 2H), 5,66 (a d, *J* = 51,6 Hz, 1H), 5,59 (a d, *J* = 52,2 Hz, 1H) 5,01 (s a, 2H), 4,68 - 4,34 (m, 6H), 4,07 - 3,82 (m, 2H), 3,79 - 3,55 (m, 2H); ³¹P RMN (162 MHz, CD₃OD) δ = 55,48 (s, 1P), 55,16 (s, 1P).

Condiciones de HPLC preparativa de Compuesto 1a:

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC
Columna de HPLC	Waters XBridge C18, 10 x 100 mm, nº 1413
Caudal:	3,0 ml/min
Temperatura de la columna	35 °C
fase móvil	A: NH ₄ OH al 0,1% en agua, B: NH ₄ OH al 0,1% en acetonitrilo
Gradiente (% B)	0 → 50
Tiempo de procesamiento	20min
Volumen de inyección	50 ul (4 mg/ml en agua)
detección	UV 260 nm
Tiempo de retención	6,5 min

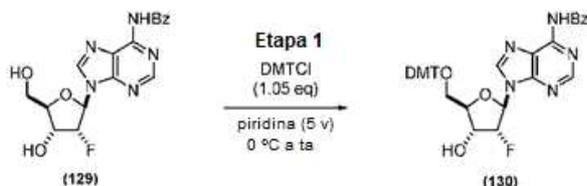
20

Ejemplo 1.1 -- Síntesis Alternativa de Compuesto 1a

Una ruta de síntesis alternativa para Compuesto 1a se recoge en la FIG. 2A y la FIG. 2B, así como en la FIG. 2C y se reseña a continuación.

25

Etapa 1



30 Compuesto 129 (570 g, 1,53 mol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se disolvió en piridina (2,85 L, 35,2 mol, 4,89 peso, 5,0 vol, 23 eq). La mezcla se enfrió a 2,6 °C y se trató con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTCl; 543 g, 1,60 mol, 0,953 peso, 1,05 eq). La mezcla se agitó de 0 a 5 °C durante 2 h y luego se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante LC/MS y se confirmó la conversión completa después de agitar durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió por debajo de 5 °C y se enfrió bruscamente mediante tratamiento con MeOH (124 ml, 3,05 mol, 0,172 peso, 0,217 vol, 2,0 eq) durante 15 minutos. La mezcla se co-evaporó con tolueno (2,00 L, 3,04 peso, 3,51 vol) en vacío y luego se diluyó con una mezcla de EtOAc (2,850 L, 4,5 peso, 5,0 vol) y n-heptano (2,85 L, 3,42 peso, 5,0 vol). La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (solución al 9 % en peso en agua; 2,0 L, 3,5 vol). Se añadió EtOAc adicional (2,85 L, 4,5 peso, 5,0 vol) para disolver completamente el producto bruto. Después de agitar durante 5 minutos, se separaron las dos capas. La capa orgánica se lavó con agua (2,0 L, 3,5 peso, 3,5 vol). El sólido

35

comenzó a precipitar lentamente de la capa orgánica. Se separó la capa de agua. A continuación, la capa orgánica se concentró a aprox. 1 vol. El producto bruto se suspendió con una mezcla de n-heptano (2,00 L, 2,40 peso, 3,51 vol) y tolueno (0,50 L, 0,76 peso, 0,88 vol). Después de agitar durante 15 minutos, se recogió el sólido amarillo pálido mediante filtración en vacío. La torta de filtración se lavó secuencialmente con: (1) una mezcla de n-heptano (0,60 L, 0,72 peso, 1,05 vol) y tolueno (0,30 L, 0,46 peso, 0,53 vol), y luego (2) n-heptano (3,00 L, 3,6 peso, 5,26 vol). El sólido se secó sin calor durante 30 minutos y luego se transfirió a bandejas para secar a 50 °C en un horno de vacío durante la noche para dar Compuesto 130 en forma de un sólido amarillo pálido (996,7 g, 1,47 mol, 1,75 peso, rendimiento del 97%).

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,99 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 2H), 7,64 - 7,59 (m, 1H), 7,57 - 7,50 (m, 2H), 7,41 - 7,36 (m, 2H), 7,32 - 7,15 (m, 7H), 6,83 - 6,76 (m, 4H), 6,31 (dd, J = 2,5, 17,0 Hz, 1H), 5,68 (ddd, J = 2,3, 4,7, 52,7 Hz, 1H), 4,88 - 4,77 (m, 1H), 4,26 - 4,21 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,57 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,43 (dd, J = 4,1, 10,7 Hz, 1H), 2,60 (s a, 1H)

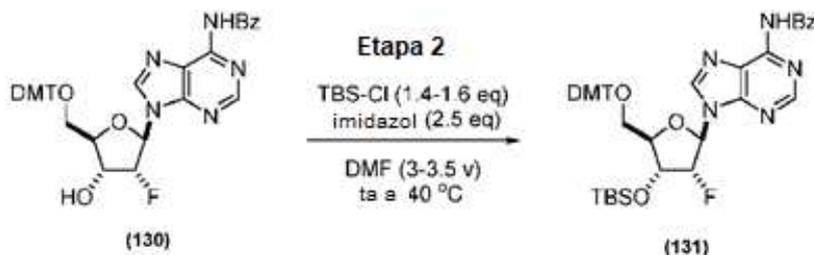
15 Etapa 1'



Compuesto 129 (430 g, 1,15 mol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) e imidazol (118 g, 1,73 mol, 0,274 peso, 1,50 eq) se disolvieron en DMF (1,72 L, 3,78 peso, 4,0 vol) y la mezcla resultante se enfrió a 5 °C. Se añadió TBS-Cl (191 g, 1,27 mol, 0,444 peso, 1,10 eq). La mezcla se agitó de 0 hasta 11 °C durante 2 h, se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente (progreso controlado por LCMS). La reacción se completó 6 h después de la adición de TBS-Cl, pero se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 h adicionales. La mezcla se enfrió a 2 °C y se trató con metanol (93 ml, 74 g, 2,3 mol, 0,17 peso, 0,22 peso, 2,0 eq) durante 10 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con una mezcla de MTBE (1,72 L, 1,23 kg, 2,96 peso, 4,0 vol) y EtOAc (1,72 L, 1,55 kg, 3,60 peso, 4,0 vol) seguido de NH₄Cl saturado (solución al 28 % en peso en agua; 2,15 L, 5,0 vol). Los sólidos comenzaron a caer lentamente de la solución. Se dejó que la mezcla se calentara a 24 °C y se añadió agua (1,08 L, 1,08 kg, 2,5 peso, 2,5 vol) a (T-interno = 22 °C). Comenzaron a precipitar más sólidos de la mezcla. Se añadieron a la mezcla agua adicional (1,08 L, 1,08 kg, 2,5 peso, 2,5 vol) y MTBE (1,40 L, 1,04 kg, 2,4 peso, 3,3 vol). El sólido blanquecino se recogió mediante filtración en vacío. El reactor se lavó con agua (320 ml, 0,74 vol) y luego con MTBE (1,80 L, 1,33 kg, 3,10 peso, 4,19 vol) para transferir cualquier sólido restante al filtro. La torta de filtración se lavó secuencialmente con: (1) agua (1,80 L, 1,80 kg, 4,2 peso, 4,2 vol). (2) agua (1,80 L, 1,80 kg, 4,2 peso, 4,2 vol), (3) una mezcla de MTBE (0,90 L, 0,67 kg, 1,5 peso, 2,1 vol) y n-heptano (0,90 L, 0,62 kg, 1,4 peso, 2,1 vol), (4) una mezcla de MTBE (0,90 L, 0,67 kg, 1,5 peso, 2,1 vol) y n-heptano (0,90 L, 0,62 kg, 1,4 peso, 2,1 vol). El sólido recuperado se secó en vacío a 40 °C a lo largo de 2 días para dar Compuesto 133 en forma de un sólido blanco (483 g, 0,991 mol, 1,12 peso, 86 % de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,97 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 2H), 7,64 - 7,58 (m, 1H), 7,56 - 7,51 (m, 2H), 6,40 (dd, J = 2,3, 16,0 Hz, 1H), 5,45 (ddd, J = 2,7, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 4,75 - 4,66 (m, 1H), 4,22 - 4,17 (m, 1H), 4,07 (dd, J = 2,3, 11,7 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 2,7, 11,7 Hz, 1H), 2,38 (dd, J = 2,7, 7,0 Hz, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,11 (s, 3H).

Etapa 2

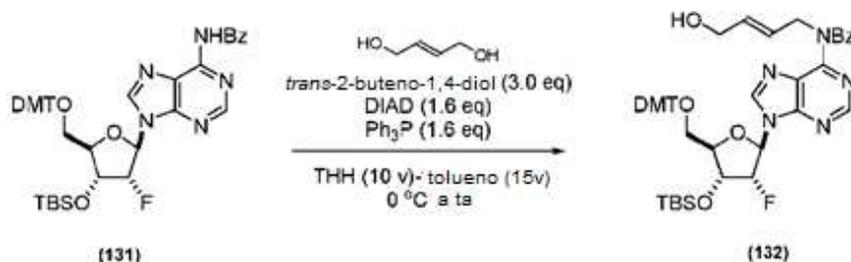


Compuesto 130 (993 g, 1,47 mol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) e imidazol (150 g, 2,20 mol, 0,151 peso, 1,5 eq) se disolvieron en DMF (3,48 L, 3,28 kg, 3,3 peso, 3,5 vol) y la mezcla se enfrió a 5 °C. Se añadió TBS-Cl (244 g, 1,62 mol, 0,245 peso, 1,10 eq). La reacción se agitó a 0 hasta 5 °C durante 2 h, se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se controló por LCMS. Después de 17 h, se añadió un imidazol adicional (100 g, 1,47 mol, 0,10 peso, 1,0 eq) y TBS-Cl (111 g, 735 mmol, 0,112 peso, 0,50 eq) y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 2 h y a 35 °C durante 2 h. La mezcla resultante se enfrió a 13,6 °C y se trató con MeOH (119 ml, 2,94 mol, 2,94 mol, 2 eq) durante

10 minutos. En un reactor separado se añadió hielo (5 kg, 5 peso) y NH_4Cl saturado (solución al 28 % en peso en agua; 5,0 L, 5 vol). La mezcla de reacción se añadió a la mezcla de hielo/ NH_4Cl . Un sólido blanquecino comenzó a precipitar de la solución inmediatamente. Se añadieron a la mezcla 2 kg adicionales de hielo (2 kg, 2 peso) y agua (3,0 L, 3 vol). El matraz de reacción se lavó con agua (0,50 L, 0,5 vol) y se añadió el material lavado a la mezcla. Se añadió n-heptano (2,00 L, 2 vol) a la mezcla y se continuó agitando durante 10 minutos. El sólido blanquecino se recogió mediante filtración en vacío. La torta de filtración se lavó con: (1) agua (4,0 L, 4,0 vol), (2) agua (4,0 L, 4,0 vol), (3) n-heptano (4,0 L, 4,0 vol), (4) n-heptano (4,0 L, 4,0 vol). El sólido recuperado se secó en vacío a 45 °C durante 4 días para dar Compuesto 131 en forma de un sólido blanquecino (1,095 kg, 1,39 mol, 1,10 peso, 94 % de rendimiento).

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 9,09 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,02 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,63 - 7,59 (m, 1H), 7,55 - 7,50 (m, 2H), 7,37 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,29 - 7,17 (m, 7H), 6,79 (d, J = 7,9 Hz, 4H), 6,29 (dd, J = 2,9, 16,2 Hz, 1H), 5,60 (ddd, J = 2,7, 3,9, 53,1 Hz, 1H), 4,78 (ddd, J = 4,7, 6,4, 15,8 Hz, 1H), 4,26 - 4,22 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,58 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,26 (dd, J = 3,7, 10,7 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,02 (s, 3H)

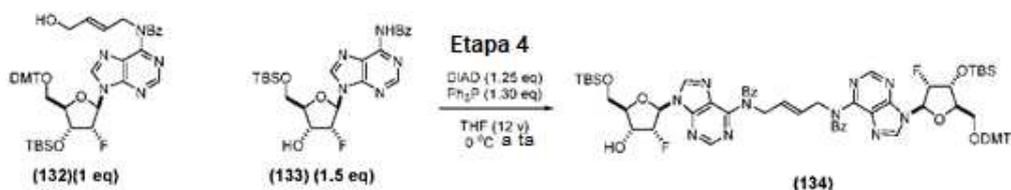
Etapa 3



20 Compuesto 131 (1000 g, 1,27 mol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) y *trans*-2-buteno-1,4-diol (geometría de olefina confirmada mediante ^1H -RMN; 335 g, 3,80 mol, 0,335 peso, 3,0 eq) se destilaron azeotrópicamente dos veces con THF (3,0 L, 3,0 vol). El residuo se disolvió en una mezcla de THF (10 L, 10 vol) y tolueno (15 L, 15 vol). Se añadió trifenilfosfina (432 g, 1,65 mol, 0,432 peso, 1,3 eq) y luego la mezcla de reacción se enfrió a -5 °C. Se añadió DIAD (0,320 L, 1,65 mol, 333 g, 0,333 peso, 0,320 vol, 1,3 eq) lentamente a lo largo de 20 minutos mientras se mantenía la T interna por debajo de 5 °C. La reacción se agitó a 0 - 5 °C durante 1 h y se controló mediante LCMS. Se retiró el baño de hielo y la mezcla se dejó calentar a ta. Después de agitar durante la noche (17 h), se añadieron trifenilfosfina (83 g, 0,32 mol, 0,083 peso, 0,25 eq) y DIAD (62 ml, 0,32 mol, 64 g, 0,064 peso, 0,062 vol, 0,25 eq). Después de 1 hora adicional a ta, la mezcla de reacción se diluyó con MTBE (10 L, 10 vol), se lavó dos veces con NaCl semi-saturado (solución al 18 % en peso en agua; 2 x 4 L) y se concentró en vacío hasta obtener un aceite espeso. La mezcla se volvió a disolver en una mezcla de MTBE (4,00 L, 4 vol) y n-heptano (0,50 L, 0,5 vol) y luego se enfrió a 0 °C. Se añadió a la solución un cristal iniciador de óxido de trifenilfosfina. Los sólidos comenzaron a precipitar lentamente de la solución y se agitó durante la noche. El sólido blanco se recogió mediante filtración en vacío y se lavó con MTBE (2 L, 2 vol) para aislar 540 g de óxido de trifenilfosfina. El filtrado se concentró y se purificó a través de Biotage 150L KP-Sil (SiO_2 5 kg; pretratado con TEA al 1 % en Hep/EtOAc; eluyentes: heptano/EtOAc (48 L de EtOAc al 33 % con TEA al 1 %, 24 L de EtOAc al 50 % con TEA al 1 %, 24 L de EtOAc al 66 % con TEA al 1 %) → EtOAc al 100 % con TEA al 1 %). La columna se controló mediante TLC (EtOAc/n-heptano 2:1). Las fracciones de producto limpio se combinaron y se concentraron en vacío para dar Compuesto 132 en forma de un sólido en espuma blanca pálida (634 g, contenían 14 % en peso de co-producto derivado de DIAD, 545 g netos, 0,63 mol, 50 % de rendimiento ajustado). Las fracciones de la mezcla se combinaron y se concentraron en vacío para dar un sólido en espuma amarilla pálida (750 g), que se sometió a repurificación mediante Biotage 150M HP-Sphere (2,5 kg de SiO_2 ; se pretrató con TEA al 1 % en Hep/EtOAc; se cargó la muestra con eluyentes de tolueno: Hep/EtOAc/TEA al 1 % (12 L de EtOAc al 50 % con TEA al 1 %, 16L de EtOAc al 66 % con TEA al 1 %) → EtOAc con TEA al 1 %). La columna se controló mediante TLC (2/1/0,03 EtOAc/n-hep/TEA). Las fracciones de producto limpio se combinaron y se concentraron en vacío para dar Compuesto 132 adicional en forma de un sólido en espuma blanco pálido (206 g, 0,24 mol, 18% de rendimiento).

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,58 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,43 - 7,37 (m, 2H), 7,32 - 7,28 (m, 2H), 7,24 - 7,15 (m, 8H), 7,03 - 6,98 (m, 2H), 6,78 - 6,73 (m, 4H), 6,18 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,88 (td, J = 5,5, 15,6 Hz, 1H), 5,77 (td, J = 5,1, 15,6 Hz, 1H), 5,60 (ddd, J = 2,7, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 5,03 - 4,96 (m, 2H), 4,91 (ddd, J = 4,5, 6,6, 16,6 Hz, 1H), 4,18 - 4,14 (m, 1H), 3,88 - 3,82 (m, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,52 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,14 (dd, J = 3,5, 10,9 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

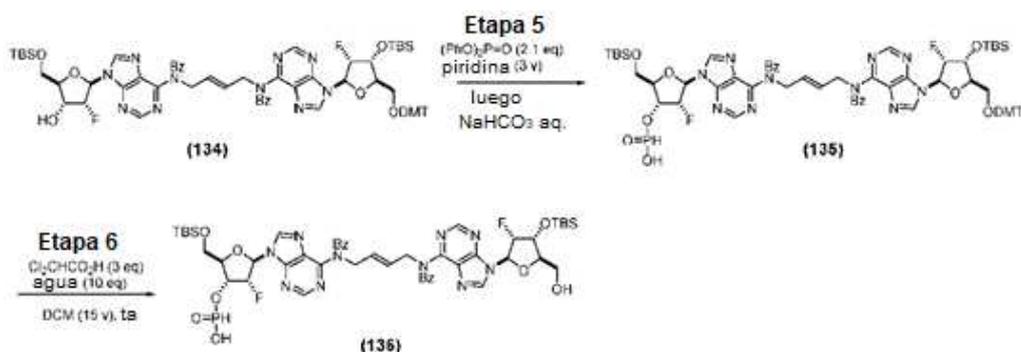
Etapa 4



Compuesto 132 (800 g, 0,930 mol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) y **Compuesto 133** (522 g, 1,07 mol, 0,652 peso, 1,15 eq) se secaron azeotrópicamente con THF (2 x 3 L, 2 x 3,8 vol) y se volvieron a disolver en THF (9,60 L, 8,45 kg, 12,0 vol) a ta. Se añadió trifenilfosfina (317 g, 1,21 mol, 0,396 peso, 1,30 eq) y la mezcla se enfrió por debajo de - 5 °C. Se añadió DIAD (226 ml, 1,16 mol, 235 g, 0,294 peso, 0,283 vol, 1,25 eq) a una T interna por debajo de 7 °C. Se dejó que la reacción se calentara a ta lentamente. La reacción se controló mediante LCMS. Después de 21 h, la mezcla de reacción se concentró en vacío hasta obtener un aceite espeso, se destiló azeotrópicamente con n-heptano (2,00 L, 1,37 kg, 1,71 peso, 2,50 vol) y luego se volvió a disolver en una mezcla de MTBE (2,40 L, 1,78 kg, 2,2 peso, 3,0 vol) y n-heptano (800 ml, 547 g, 0,68 peso, 1,0 vol). La solución se sembró con óxido de trifenilfosfina y se enfrió a 5 °C, se diluyó con n-heptano (400 ml, 274 g, 0,34 peso, 0,50 vol) y se agitó a 5 °C durante 30 minutos. El precipitado sólido blanco se recogió mediante filtración en vacío y se lavó con una mezcla 2:1 (v/v) de MTBE y n-heptano (1,8 L) para dar óxido de trifenilfosfina (455 g). El filtrado se concentró en vacío y se purificó mediante Biotage 150 L KP-Sil (SiO₂ 5 kg; pretratado con TEA al 1 %; la muestra se cargó disolviendo en tolueno; eluyentes: 9:1 heptano/EtOAc (16 L) y 15 TEA, 3,6:1 (46 L), 2:1 (20 L) y TEA al 1 %, 1:1 (30 L) y TEA al 1 % y EtOAc al 100 % (16 L) y TEA al 1 %). Las fracciones de producto limpio combinadas se concentraron en vacío para dar Compuesto 134 adicional en forma de un sólido en espuma blancuzca (662,2 g). Las fracciones de la mezcla se combinaron y concentraron en vacío (480 g). Un sólido insoluble blanco formado por dilución con tolueno (300 ml) antes de cargarlo en Biotage 150L se eliminó mediante filtración en vacío. El material soluble en tolueno se purificó mediante Biotage 150M HP-Sphere (SiO₂ 2,5 kg (pre-tratado con TEA al 1 %); carga de muestra con tolueno; eluyentes: 2:1 heptano/EtOAc (26 L) con TEA al 1 %, 1 :1 (25 L) con TEA al 1 %, 1:4 (34 L) con TEA al 1 %). La columna se controló mediante TLC (1:1 heptano/EtOAc). Las fracciones de producto limpio combinadas se concentraron en vacío para dar Compuesto 134 adicional en forma de una espuma blancuzca pálida (165,5 g. Total 662,2 +165,5 g = 827,7 g, 930 mmol, 1,03 peso, 67 % de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,47 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,38 - 7,31 (m, 5H), 7,27 - 7,19 (m, 6H), 7,14 - 7,06 (m, 3H), 6,93 - 6,87 (m, 2H), 6,76 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 6,26 (dd, J = 2,0, 16,0 Hz, 1H), 6,15 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,86 (dd, J = 4,7, 15,2 Hz, 1H), 5,80 (dd, J = 4,7, 15,2 Hz, 1H), 5,51 (ddd, J = 2,7, 4,3, 52,8 Hz, 1H), 5,31 (ddd, J = 2,0, 4,3, 52,8 Hz, 1H), 4,87 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 4,85 - 4,81 (m, 1H), 4,79 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,71 - 4,59 (m, 1H), 4,20 - 4,13 (m, 2H), 4,06 (dd, J = 2,7, 11,3 Hz, 1H), 3,90 (dd, J = 2,7, 11,7 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,52 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,18 (dd, J = 3,9, 10,9 Hz, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 6H), 0,07 (s, 3H)

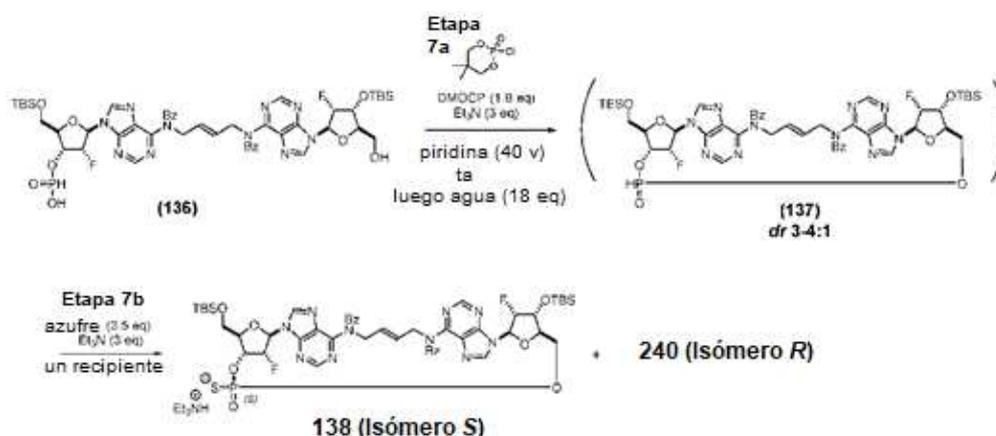
Etapas 5-6



A una solución de Compuesto 134 (410,7 g, 309 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) en piridina (1,23 L, 1,21 kg, 15,2 mol, 2,9 peso, 3,0 vol, 49 eq) se añadió fosfito de difenilo (90 ml, 109 g, 0,46 mol, 0,26 peso, 0,22 vol, 1,5 eq). La reacción se agitó a ta y se controló mediante LCMS. Después de 2 h (80 % de conversión) se añadió fosfito de difenilo adicional (29,9 ml, 36,2 g, 155 mmol, 0,088 peso, 0,073 vol, 0,50 eq). Después de 1 h adicional, se añadió fosfito de difenilo extra (6,0 ml, 7,2 g, 31 mmol, 0,018 peso, 0,015 vol, 0,10 eq) y se continuó la reacción durante 0,5 h adicionales (conversión del 98 %). La mezcla de reacción se añadió a una mezcla de NaHCO₃ saturada (solución al 9 % en peso en agua; 2,1 L, 5 vol) y agua (1,0 L, 2,5 vol), manteniendo la T interna en 4,7 a 12 °C. El reactor se lavó con un pequeño volumen de EtOAc. Se continuó la agitación a ta durante 30 minutos y se controló la reacción mediante LCMS (conversión del 100 %). La mezcla de reacción se extrajo dos veces con una mezcla 1:1 de EtOAc y MTBE (2 x 8,2 L, 2 x 20 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (4,1 L, 10 vol), se concentraron en vacío y se destiló azeotrópicamente con tolueno (3 x 4,1 L, 3 x 10 vol; alimentación continua) para eliminar piridina para dar Compuesto 135 (quedaron 0,55 eq de piridina).

Etapa 6 - El Compuesto 135 bruto se disolvió en diclorometano (3,08 L, 4,07 kg, 9,9 peso, 7,5 vol) a temperatura ambiente. Se añadió agua (55,7 ml, 0,136 vol, 10 eq) seguido de una solución de ácido dicloroacético (77 ml, 120 g, 0,93 mol, 0,29 peso, 0,19 vol, 3,0 eq) en DCM (3,08 L, 7,5 vol), al tiempo que se mantenía la T interna por debajo de 25 °C. (Se convirtió en una solución naranja). Después de 30 min, se añadió trietilsilano (Et₃SiH; 494 ml, 359 g, 3,09 mol, 0,875 peso, 1,20 vol, 10,0 eq) (la T interna pasó de 18,2 °C a 17 °C) y se continuó agitando durante 20 min. Se añadió trietilamina (431 ml, 313 g, 3,09 mol, 0,762 peso, 1,05 vol, 10,0 eq) (la T interna pasó de 17,8 °C a 22 °C). La mezcla se concentró a 1,55 kg (3,8 peso), se redisolvió en EtOAc (6,2 L, 5,5 kg, 14 peso, 15 vol), se lavó secuencialmente con: agua (1) (1,0 L, 2,5 vol) y NaHCO₃ saturado (solución al 9 % en peso en agua, 0,82 L, 2,0 vol). La solución de EtOAc producto en bruto se almacenó a -20 °C a lo largo de la noche; 0,82 L, 2,0 vol) y al día siguiente la solución se concentró en vacío a 25 °C. La mezcla bruta así obtenida (654 g) se trituró con: (1) n-heptano (3,01 L, 7,5 vol), (2) una mezcla de n-heptano (2,46 L, 6,0 vol) y tolueno (0,82 L, 2,0 vol). La parte de la solución (sobrenadante) se separó por decantación y el sólido que quedaba en el fondo se disolvió en acetonitrilo (4,1 L, 10 vol). La mezcla se concentró en vacío a 25 °C y se destiló azeotrópicamente con acetonitrilo dos veces para dar Compuesto 136. El producto se utilizó para la etapa posterior sin purificación (se supuso un rendimiento teórico del 100 %).

Etapa 7



Etapa 7a Compuesto 136 (337 g, 309 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se disolvió en piridina anhidra (13,5 L, 13,2 kg, 39 peso, 40 vol) a ta. Se añadió trietilamina (129 ml, 927 mmol, 94 g, 0,28 peso, 0,38 vol, 3,0 eq) seguido de 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosfinano 2-óxido (DMOCP; 103 g, 556 mmol, 0,31 peso, 1,80 eq). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se controló mediante LCMS (conversión del 100 %) para generar Compuesto 137.

Etapa 7b TEA (129 ml, 927 mmol, 94 g, 0,28 peso, 0,38 vol, 3,0 eq), agua (100 ml, 5,56 mol, 0,30 peso, 0,30 peso, 18 eq) y azufre (34,7 g, 1,08 mol, 0,10 peso, 3,5 eq) se añadieron a la mezcla anterior de Compuesto 137. Después de 90 minutos (conversión del 100 %), se añadió NaHCO₃ (solución al 9% en peso en agua; 3,37 L, 10 vol) al tiempo que se mantenía la T interna por debajo de 30 °C (16,6 °C a 27 °C). La mezcla resultante se filtró para eliminar las sales. El filtrado se concentró en vacío, se diluyó con MTBE (5,1 L, 15 vol) y se lavó dos veces con NaCl (solución al 30 % en peso en agua; 2 x 1,35 L, 2 x 4 vol). Los sólidos insolubles se separaron por filtración y el filtrado se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente con tolueno (4,0 L, 12 vol). El sólido resultante se eliminó por filtración y la mezcla bruta se disolvió en tolueno y se purificó mediante Biotage 150L KP-Sil (SiO₂ 5 kg; pretratado con Hep/EtOAc/TEA (1,5/1,5/0,03 CV); eluido con: EtOAc/TEA (3/0,03 CV), EtOAc/MeOH/TEA (4/0,2/0,04 CV), EtOAc/MeOH/TEA (2/0,2/0,02 CV) La columna fue controlada por TLC (EtOAc/MeOH/TEA = 9/1/0,1). Las fracciones que contenían el isómero *Sp* se combinaron y concentraron en vacío para dar Compuesto 138 en forma de un sólido en espuma rosa claro (isómero *Sp*; 154 g, 128 mmol, 0,46 peso, rendimiento del 41,3 %). Las fracciones que contenían el isómero *Rp* se combinaron y concentraron en vacío para dar Compuesto 240 en forma de un sólido en espuma rosa claro (isómero *Rp*; 64 g, 53 mmol, 0,19 peso, rendimiento del 17 %).

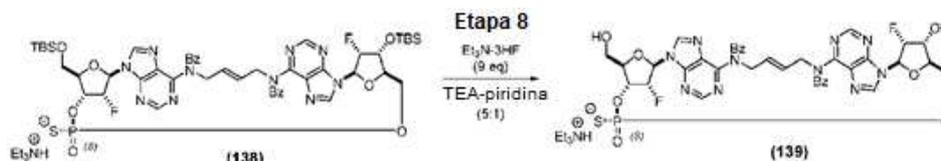
Compuesto 138 (isómero Sp):

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,51 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,49 - 7,44 (m, 2H), 7,38 - 7,27 (m, 4H), 7,25 - 7,21 (m, 2H), 7,14 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 6,44 (dd, J = 2,5, 13,9 Hz, 1H), 6,18 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 5,78 (td, J = 6,3, 15,6 Hz, 1H), 5,69 (td, J = 4,7, 15,6 Hz, 1H), 5,56 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,20 - 5,06 (m, 1H), 4,95 - 4,79 (m, 4H), 4,69 (dd, J = 4,3, 16,0 Hz, 1H), 4,54 - 4,38 (m, 3H), 4,35 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 4,32 - 4,29 (m, 1H), 4,05 (dd, J = 1,6, 11,7 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 3,1, 11,7 Hz, 1H), 3,14 - 3,06 (m, 6H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 9H), 0,91 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,12 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), 0,05 (s, 3H)

Compuesto 240 (isómero Rp):

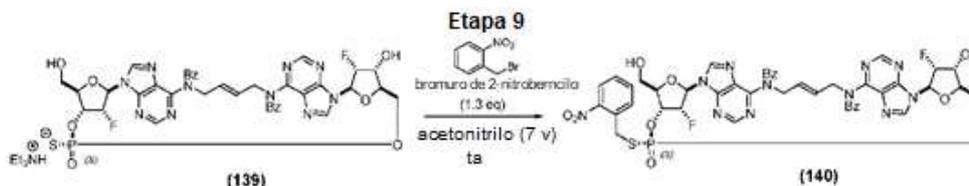
¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,54 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,39 - 7,09 (m, 10H), 6,39 (dd, J = 2,3, 14,1 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 5,72 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 5,68 (dd, J = 4,3, 51,2 Hz, 1H), 5,43 - 5,29 (m, 1H), 5,10 - 4,96 (m, 3H), 4,90 - 4,83 (m, 2H), 4,78 - 4,72 (m, 1H), 4,52 (ddd, J = 3,9, 6,6, 17,2 Hz, 1H), 4,44 - 4,35 (m, 2H), 4,31 - 4,26 (m, 1H), 4,20 - 4,12 (m, 2H), 3,87 (dd, J = 3,5, 11,7 Hz, 1H), 3,79 - 3,77 (m, 1H), 3,15 - 3,09 (m, 6H), 1,33 (t, J = 7,4 Hz, 9H), 0,94 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 0,13 (s, 3H), 0,12 (s, 3H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 3H)

Etapa 8



Compuesto 138 (221 g, 183 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se disolvió en una mezcla de piridina (530 ml, 6,56 mol, 519 g, 2,3 peso, 2,4 vol) y TEA (2,65 L, 19,0 mol, 1,93 kg, 8,7 peso, 12 vol, 104 eq). Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (264 ml, 1,62 mol, 262 g, 1,2 peso, 1,2 vol, 8,9 eq en forma de complejo, 27 eq de HF) y la mezcla se agitó a TA mientras se controlaba la conversión por LCMS. Después de 3 h (conversión del 97 %), se añadió metoxitrimetilsilano (TMSOMe; 1,40 L, 10,2 mol, 1,06 kg, 4,8 peso, 6,3 vol, 55 eq) y se continuó agitando durante 30 minutos. Un sólido pegajoso cubrió el reactor. La parte de la solución (sobrenadante) se separó por decantación. El sólido se trituró dos veces con tolueno (2 x 2,2 L, 2 x 10 vol); el sobrenadante se separó por decantación. El sólido bruto que quedó en el reactor se disolvió en diclorometano (2,2 L, 10 vol) y se lavó con NH₄Cl (solución al 28 % en peso en agua; 2,2 L, 10 vol). La capa acuosa se volvió a extraer con diclorometano (2,2 L, 10 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una mezcla de NaCl (solución al 36 % en peso en agua; 1,1 L, 5 vol) y agua (1,1 L, 5 vol), y luego se concentraron en vacío para dar Compuesto 139 en forma de una espuma seca de color tostado (152 g, 155 mmol, 0,70 peso, rendimiento del 85 %). El producto bruto se tomó en la siguiente etapa sin purificación.

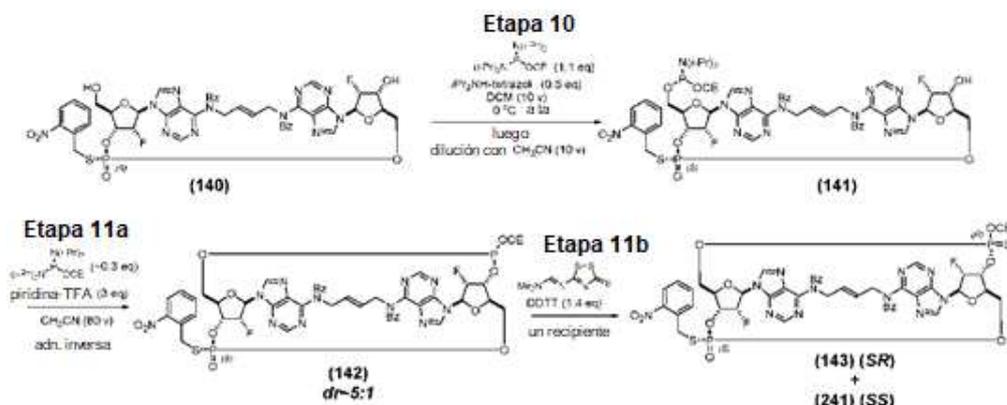
Etapa 9



Compuesto 139 (150 g, 153 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se destiló azeotrópicamente con acetonitrilo (4 L, 27 vol) y luego se volvió a disolver en acetonitrilo (1,05 L, 0,83 kg, 5,5 peso, 7,0 vol) a ta. Se añadió bromuro de 2-nitrobencilo (44,4 g, 205 mmol, 0,30 peso, 1,34 eq) a ta y la reacción se controló mediante LCMS. Después de 23 h (conversión del 100%), se añadieron EtOAc (1,50 L, 10 vol), NH₄Cl (solución al 28 % en peso en agua; 300 ml, 2 vol) y agua (300 ml, 2 vol) (pH = 6) y la mezcla resultante se concentró parcialmente en vacío a 25 °C hasta un peso de 1,11 kg. Se añadió EtOAc (2,25 L, 15 vol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Se separaron las dos capas. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (750 ml, 5 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con: (1) una mezcla de NaCl (solución al 36 % en peso en agua; 300 ml, 2 vol) y agua (300 ml, 2 vol) y (2) agua (600 ml, 4 vol.). Después, la capa orgánica se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente con n-heptano (1,50 L, 10 vol). Se añadió MTBE (0,95 L, 6,3 vol) al sólido bruto y la mezcla se calentó a 40 °C. La mezcla se diluyó con EtOAc (300 ml, 2 vol) y se enfrió lentamente a 0 °C. Se dejó sedimentar el sólido denso y el sobrenadante se bombeó a través de un tubo de frita de filtro. El sólido se lavó dos veces con MTBE (2 x 300 ml, 2 x 2 vol); el sobrenadante se bombeó a través del tubo de frita de filtro cada vez) y se secó en vacío a 40 °C durante la noche para dar Compuesto 140 en forma de un sólido amarillo pálido (156 g). El filtrado se concentró en vacío, produciendo un aceite pardo (17,8 g), el cual se sometió a purificación mediante Biotage Snap-Ultra 340 g (eluyentes: MeOH al 0 a 5 % en EtOAc) para dar Compuesto 140 adicional en forma de un sólido amarillo pálido (5,8 g). Total 156 g + 5,8 g = 161,8 g (neto 152 mmol, 95 % puro, rendimiento del 99 %)

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,46 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,09 - 8,06 (m, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,54 - 7,51 (m, 1H), 7,49 - 7,45 (m, 4H), 7,37 - 7,28 (m, 3H), 7,24 - 7,19 (m, 3H), 7,16 - 7,11 (m, 2H), 6,22 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,14 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,83 - 5,61 (m, 3H), 5,60 - 5,48 (m, 1H), 5,07 (dd, J = 3,5, 51,6 Hz, 1H), 5,06 - 4,96 (m, 1H), 4,79 (dd, J = 4,9, 15,8 Hz, 1H), 4,69 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 4,67 - 4,56 (m, 1H), 4,48 - 4,40 (m, 3H), 4,37 - 4,30 (m, 1H), 4,27 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 4,19 - 4,13 (m, 1H), 3,93 - 3,85 (m, 1H), 3,85 - 3,78 (m, 1H)

Etapas 10-11



Etapa 10 Compuesto 140 (95 % puro, 73,2 g netos, 72,3 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) y N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (25,3 ml, 79,5 mmol, 0,33 peso, 0,35 vol, 1,10 eq) se destilaron azeotrópicamente con acetonitrilo anhidro tres veces (3 x 2 L), se volvieron a disolver en diclorometano (0,73 L, 10 vol) y se enfrió a 0-5 °C. Se añadió tetrazoluro de diisopropilammonio (6,19 g, 36,1 mmol, 0,085 peso, 0,50 eq). La mezcla de reacción resultante se agitó a 0 °C durante 10 h, se calentó a 10 °C a lo largo de 2 h, se mantuvo a 10 °C durante 10 h y se calentó a ta a lo largo de 2 h. La reacción se controló mediante LCMS y TLC (EtOAc con TEA al 0,5 %). Después de 18 h, se añadió acetonitrilo anhidro (0,73 L, 10 vol) y la mezcla se almacenó a -20 °C a lo largo de 3 días.

Etapa 11a La mezcla de la Etapa 10 se calentó a temperatura ambiente y se añadió a través de un embudo de goteo en porciones (100 mL cada 30 minutos, a lo largo de 9 h) a una mezcla de sal trifluoroacetato de piridina (destilada azeotrópicamente previamente con piridina dos veces; 41,9 g, 217 mmol, 0,57 peso, 3,0 eq) y acetonitrilo (5,85 L, 80 vol). La reacción se controló mediante LCMS. Después de 13 h, se añadió una solución de N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidito de 2-cianoetilo (5,8 mL, 18 mmol, 0,25 eq) en acetonitrilo (24 mL) a lo largo de 4 h. La cantidad de reactivo adicional se determinó basándose en el Compuesto 140 restante (~ 30 % basado en LCMS). Se observó más conversión del diol después de 6 h.

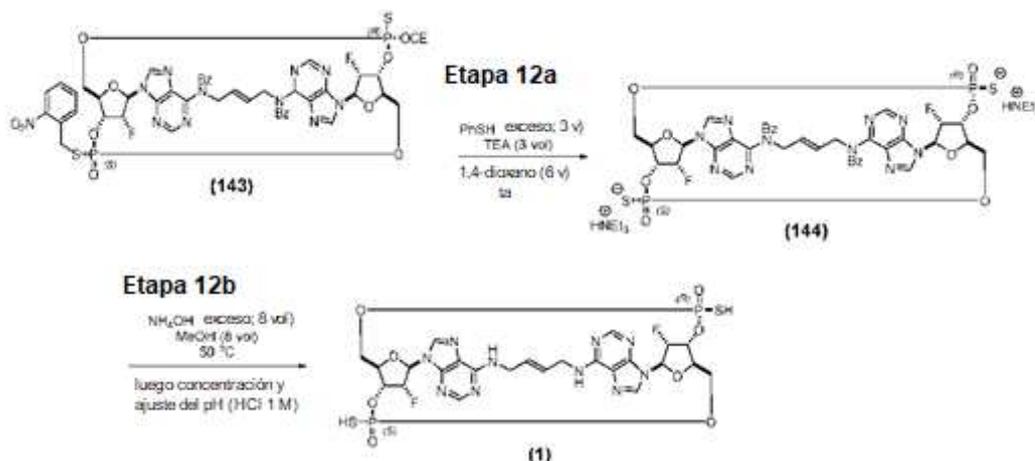
Etapa 11b Se añadió ((dimetilaminometilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazolina-3-tiona (DDTT; 20,8 g, 101 mmol, 0,28 peso, 1,4 eq) y se continuó agitando durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró parcialmente a ~ 800 mL y se diluyó con MTBE (1,46 L, 20 vol), NaHCO₃ (solución al 9 % en peso en agua; 1,1 L, 15 vol) y agua (0,37 L, 5 vol), pH = 8. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de MTBE (1,46 L, 20 vol) y EtOAc (1,10 L, 15 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con NaCl aq. al 30 % (2 x 0,73 L, 2 x 10 vol), se concentraron en vacío a 35 °C y se destiló azeotrópicamente con tolueno (1,46 L, 20 vol). LCMS y TLC (EtOAc) indicaron Compuesto 143 (SpRp, deseado): Compuesto 241 (SpSp)= 5: 1

El producto bruto se purificó mediante Biotage 150M KP-Sil, (SiO₂ 2,5 kg; eluyentes: EtOAc/Hep: 2:1 (4 CV), 3:1 (2,5 CV), 4:1 (2,5 CV), EA al 100 % (3 CV), MeOH al 5-10 % en EA 4 CV) para dar Compuesto 143 (36 g, 31,5 mmol, rendimiento del 44 %).

Compuesto 143 (SpRp): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,59 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,03 - 7,99 (m, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,56 - 7,53 (m, 2H), 7,49 - 7,40 (m, 5H), 7,35 - 7,28 (m, 2H), 7,24 - 7,16 (m, 4H), 6,92 (s, 1H), 6,29 (d, J = 14,9 Hz, 1H), 6,08 (d, J = 20,7 Hz, 1H), 5,97 - 5,83 (m, 1H), 5,76 (td, J = 4,7, 15,6 Hz, 1H), 5,61 - 5,51 (m, 2H), 5,40 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 5,29 - 5,17 (m, 1H), 4,91 (dd, J = 7,4, 14,9 Hz, 1H), 4,86 - 4,75 (m, 3H), 4,63 (dd, J = 3,7, 9,2 Hz, 1H), 4,58 - 4,43 (m, 5H), 4,34 - 4,19 (m, 4H), 2,79 (td, J = 5,9, 16,8 Hz, 1H), 2,66 (td, J = 6,3, 16,8 Hz, 1H).

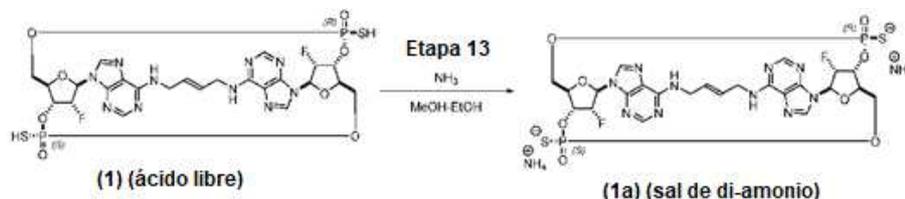
Compuesto 241 (SpSp) ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,11 (s, 1H), 8,03 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,56 - 7,40 (m, 7H), 7,33 - 7,28 (m, 2H), 7,23 - 7,17 (m, 4H), 6,22 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 6,15 (d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,85 (dd, J = 3,5, 51,2 Hz, 1H), 5,75 - 5,45 (m, 5H), 4,95 - 4,23 (m, 14H), 2,82 (t, J = 6,1 Hz, 2H).

Etapa 12



Compuesto 143 (71,6 g, 62,6 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se disolvió en 1,4-dioxano (0,43 L, 6 vol). Se añadió tienofenol (215 ml, 2,09 mol, 230 g, 3,2 peso, 3 vol, > 30 eq), seguido de trietilamina (215 ml, 1,54 mol, 156 g, 2,2 peso, 3 vol). Se observó algo de exotermia (la T interna aumentó en ~ 7 °C), por lo tanto, se utilizó un baño de agua/hielo para enfriar y controlar la T interna por debajo de 27 °C. La reacción se controló mediante LCMS. Después de 2 h, se añadieron MeOH (0,57 L, 8 vol) y NH₄OH (28 % en peso; 15 mol, 0,57 L, 8 vol, > 200 eq). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 5 h, se enfrió a ta y se agitó durante la noche. Después de 14 h, se añadió agua (0,72 L, 10 vol) (no se observó sólido) y la mezcla se extrajo tres veces con una mezcla 1:1 (v/v) de n-heptano y tolueno (3 x 0,86 L, 3 x 12 vol), seguido de tolueno (0,57 L, 8 vol). La capa acuosa se concentró en vacío a 40-50 °C y se diluyó con agua (1,07 L, 15 vol). La suspensión resultante se mantuvo durante la noche a ta. El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con agua (0,36 L, 5 vol). El filtrado estaba todavía turbio y se filtró a través de celite y un filtro Kuno. Todavía estaba presente una turbidez. Se añadió HCl (solución 1,0 M en agua; 132 ml, 132 mmol, 2,1 eq) a lo largo de 1 h y se comprobó el pH (pH < 2). Se continuó agitando a ta durante 1 h y la mezcla se filtró. La torta de filtración se lavó con agua (8 x 0,20 L), se secó en un horno de vacío a 35 °C durante 2 días y sin calor durante 1 día para dar Compuesto 1 en forma de un sólido naranja pálido (44,88 g, 60,1 mmol, 0,63 p, rendimiento del 96 %).

Etapa 13



Al Compuesto 1 ácido libre (22,42 g, 30,03 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se añadió amoníaco (solución 2,0 M en MeOH; 220 ml, 440 mmol, 10 vol, 15 eq). Se añadió EtOH (55 ml, 2,5 vol) y la solución resultante se filtró a través de un filtro Kuno (0,45 micras; PTFE), aumentando con una mezcla 1:1 (v/v) de MeOH y EtOH (90 mL, 4 vol). El filtrado se concentró en vacío a 30 °C, produciendo un sólido blanquecino, el cual se secó a ta durante la noche, se trituroó con una espátula (fácil de romper) y se secó adicionalmente en vacío a ta. Después, el sólido aislado se suspendió en tolueno (250 ml) y se agitó a ta durante 30 minutos. A continuación, se recogió el sólido mediante filtración en vacío y se lavó con tolueno dos veces (2 x 50 ml). A continuación, el sólido se secó en vacío en un horno de vacío para dar 22,4 g de Compuesto 1a (la sal de di-amonio de Compuesto 1).

Recristalización: Compuesto 1a (22,14 g, 28,36 mmol, 1 peso, 1 vol, 1 eq) se disolvió en una mezcla de agua (664 ml, 30 vol) e hidróxido de amonio (28 % en peso; 2,5 ml, 18 mmol, 0,63 eq.) (pH = 9-10) y se extrajo con tolueno tres veces (3 x 300 ml, 3 x 14 vol), EtOAc tres veces (3 x 200 ml, 3 x 9 vol) y tolueno tres veces (3 x 300 ml, 3 x 14 vol). La capa acuosa resultante se trató con HCl (solución 1,0 M en agua; 90 ml, 90 mmol, 3,2 eq) a lo largo de un período de 3,5 horas (pH ≤ 2). La mezcla se agitó durante 30 minutos y luego se recogió el precipitado sólido mediante filtración en vacío. La torta de filtración se lavó con agua tres veces (3 x 200 ml, 3 x 9 vol) y se secó en vacío durante la noche. Amoníaco (solución 2,0 M en MeOH; 250 ml, 500 mmol, 17,6 eq) y etanol (100 ml) se añadieron al sólido y la mezcla resultante se concentró en vacío hasta que aparecieron cristales (~100 ml), momento en el cual la concentración se detuvo y la mezcla se agitó durante 20 minutos. Se añadió etanol (45 mL) y la mezcla se concentró parcialmente (se eliminaron 45 mL). Se repitió la misma operación dos veces más y luego se enfrió la mezcla a 0 °C y se agitó durante 3,5 h. El sólido blanco se recogió mediante filtración en vacío y se lavó con etanol frío (20 ml), seguido de acetato de etilo (2 x 50 mL). El sólido blanco se secó en vacío a ta durante 3 días para dar Compuesto 1a en forma de un sólido

blanco (16,6 g, 21,3 mmol, 0,75 peso, rendimiento del 75 %). El filtrado se concentró en vacío y se secó en vacío a ta durante 3 días para dar Compuesto 1a en forma de un sólido blanquecino (4,16 g, 5,3 mmol, rendimiento del 18 %).

Ejemplo 1.2 - Análisis por ¹H RMN de Compuesto 1

5 Un espectrógrafo de ¹H RMN de Compuesto 1a se muestra en la FIG. 3. El espectro resultante era: ¹H-RMN Espectro (400MHz, DMSO-d₆, δ_H 2,49 ppm, 80 °C)

10 δ(ppm) : 3,05-3,13(4H, m), 3,70(1H, dd, J=13, 5 Hz), 3,78(1H, dd, J=12, 4Hz), 4,21-4,24(2H, m), 4,28(1H, m), 4,38(1H, m), 4,53-4,68(2H, m), 5,22(1H, m), 5,76(2H, s), 5,78(1H, m), 6,26(1H, m), 6,29(1H, m), 8,13(1H, s), 8,14(1H, s), 8,36(1H, s a), 8,59(1H, s a).

Ejemplo 1.3 - Análisis por Rayos X de Compuesto 1

15 Aproximadamente 2 mg de Compuesto 1 se disolvieron en 600 uL de agua. Se colocaron 120 uL de esta solución en otro vial de vidrio y luego este vial se almacenó en un recipiente fijo con 3 mL de MeCN a temperatura ambiente durante 1 semana. Este es el método de preparación de la muestra por difusión de vapor de H₂O/MeCN.

20 Un monocristal de bloque incoloro (0,1 x 0,1 x 0,1 mm) encontrado en la solución de cristalización se dispersó en Parabar 10312 líquido y se montó en un aparato MicroMounts™ de doble espesor (MiTeGen). Los datos de difracción se recopilaron a -160 °C en XtaLAB PRO P200 MM007HF (Rigaku) con el método de oscilación del eje ω utilizando radiación Cu-Kα monocromática en espejo multicapa.

25 La FIG. 4A muestra una figura ORTEP de moléculas de Compuesto 1 en una unidad asimétrica, junto con un cierto número de moléculas de agua desordenadas. La FIG. 4B muestra la estructura cristalina de una de las moléculas de Compuesto 1 de la FIG. 4A. La FIG. 4C muestra la estructura cristalina de la otra molécula de Compuesto 1 mostrada en la FIG. 4A.

30 La estructura cristalina de Compuesto 1 se resolvió con un factor R final de 0,1354. El parámetro Flack fue casi cero (0,083(17)), lo que indica que la configuración absoluta de Compuesto 1 es (R, S). El análisis de la estructura cristalina también indicó que estaban presentes muchas moléculas de agua en el gran canal de Compuesto 1, lo que indicó que las moléculas de agua podían deslizarse fácilmente fuera del canal. El análisis también confirmó que las conformaciones de ambas moléculas cristalográficamente independientes y la unidad asimétrica eran casi las mismas.

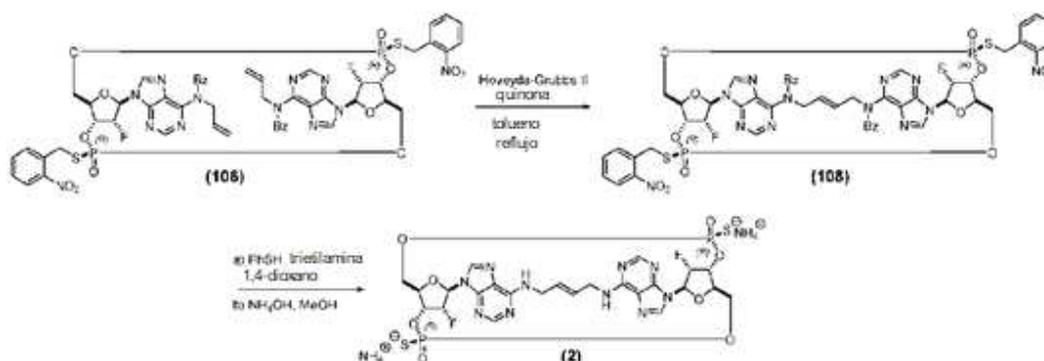
35 A continuación se muestran parámetros adicionales del análisis por rayos X:

Temperatura	113 K
Longitud de onda	1,54184 Å
Sistema cristalino, Grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁
Parámetro de red	a = 8,1584(3) Å
	b = 35,451(2) Å
	c = 15,9146(6) Å
	β = 91,313(3) °
Volumen	4601,7(4) Å ³
Valor Z, densidad calculada	4, 1,127 g/cm ³
Tamaño del cristal	0,1 × 0,1 × 0,1 mm
Número total de reflexiones/número de reflexiones únicas	52006/17198 [R(intensidad) = 0,0876]
Compleitud	92,2 %
Determinación de fases	Métodos directos (SHELXT Versión 2014/5)
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ² (SHELXL Versión 2014/7)
Datos/parámetros	17198/1116
Indicador de bondad de ajuste	1,545
Residuos: R(I>2σ(I))	0,1354
Residuos: Rw	0,3886
Parámetro de Flack	0,083(17)

Temperatura	113 K
Diferencia de pico Máxima y Mínima	1,17 y -0,88 e/Å ³

Ejemplo 2 - Síntesis de Compuesto 2

- 5 Compuesto 106 (isómero *RpRp* de Compuesto 105), obtenido del Ejemplo 1, Etapa E, se procesó por separado a través del Ejemplo 1, Etapa F y del Ejemplo 1, Etapa G para dar el compuesto 2a (isómero RR de Compuesto 1a):



- 10 Compuesto 108 (*RpRp*) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,12 (dd, J = 8,2, 0,8 Hz, 2H), 7,99 (s, 2H), 7,96 (s, 2H), 7,65 - 7,48 (m, 10H), 7,38 - 7,33 (m, 2H), 7,26 - 7,24 (m, 4H), 6,22 (d, J = 17,6 Hz, 2H), 5,95 - 5,84 (m, 2H), 5,71 (dd, J = 50,8, 3,9 Hz, 2H), 5,73 - 5,71 (m, 2H), 4,88 - 4,77 (m, 4H), 4,59 - 4,38 (m, 8H), 4,19 (m, 2H).

- 15 Compuesto 2a (*RpRp, trans*) ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ = 8,70 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 6,34 (s a, 2H), 5,83 (s a, 2H), 5,73 - 5,53 (m, 2H), 5,38 - 5,01 (m, 2H), 4,76 - 4,32 (m, 6H), 3,95 (s a, 2H), 3,69 - 3,64 (m, 2H); ³¹P RMN (162 MHz, CD₃OD) δ = 55,57 (s, 1P), 55,32 (s, 1P).

Ejemplo 2.1 - Análisis por Rayos X de Compuesto 2

- 20 Se pesó Compuesto 2 (0,5 mg) y se disolvió en acetonitrilo/solución de amoníaco al 28 %. Luego, esta solución se almacenó a temperatura ambiente con la tapa fija sin apretar. Después de 2 semanas apareció un cristal en forma de varilla.

- 25 Un monocristal de bloque incoloro (0,1 x 0,1 x 0,5 mm) encontrado en la solución de cristalización se dispersó en Parabar 10312 líquido y se montó en un aparato MicroMounts™ de doble espesor (MiTeGen). Los datos de difracción se recopilaron a -160 °C en XtaLAB PRO P200 MM007HF (Rigaku) con el método de oscilación del eje ω utilizando radiación Cu-Kα monocromática en espejo multicapa.

- 30 La FIG. 4D muestra una figura ORTEP de una molécula de Compuesto 2.

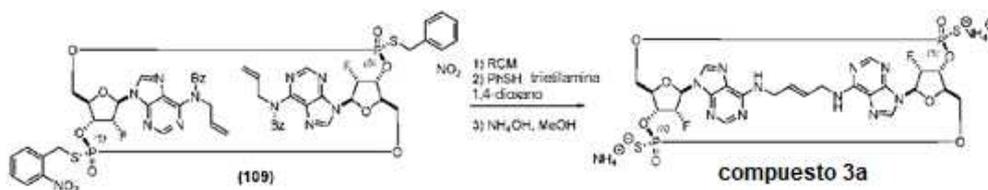
A continuación se muestran parámetros adicionales de este análisis por rayos X:

Temperatura	113 K
Longitud de onda	1,54187 Å
Sistema cristalino, Grupo espacial	Monoclínico, P2
Parámetro de red	a = 14,20210(11) Å
	b = 7,99219(7) Å
	c = 19,03500(14) Å
	β = 94,2005(7)°
Volumen	2154,78(3) Å ³
Valor Z	2
Tamaño del cristal	0,1 × 0,1 × 0,5 mm
Número total de reflexiones/número de reflexiones únicas	29195/8152 [R(intensidad) = 0,0216]
Compleitud	94,8 %

Temperatura	113 K
Determinación de fases	Métodos directos (SHELXT Versión 2014/5)
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ² (SHELXL Versión 2014/7)
Datos/parámetros	8152/518
Indicador de bondad de ajuste	1,099
Residuos: R(I>2σ(I))	0,0711
Residuos: Rw	0,2133
Parámetro de Flack	0,020(8)
Diferencia de pico Máxima y Mínima	1,95 y -0,64 e/Å ³

Ejemplo 3 - Síntesis de Compuesto 3

- 5 Compuesto 109 (isómero *SpSp* de Compuesto 105), obtenido del Ejemplo 1, Etapa E, se procesó por separado a través del Ejemplo 1, Etapa F y del Ejemplo 1, Etapa G para dar Compuesto 3a (isómero *SS* de Compuesto 1a):

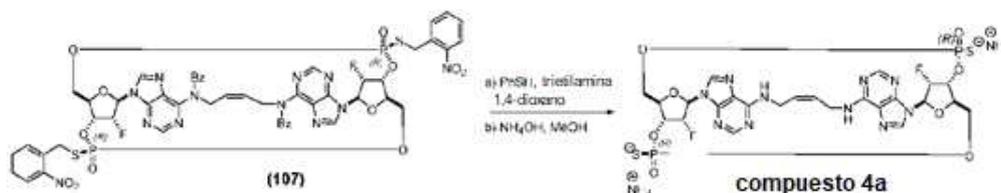


- 10 **Compuesto 109** (isómero *SpSp* de Compuesto 105): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,52 (s, 2H), 7,99 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,91 (s, 2H), 7,63 - 7,40 (m, 10H), 7,35 - 7,28 (m, 2H), 7,23 - 7,16 (m, 4H), 6,10 - 5,93 (m, 4H), 5,92 - 5,75 (m, 2H), 5,62 - 5,50 (m, 2H), 5,26 - 5,16 (m, 2H), 5,09 - 5,03 (m, 2H), 4,98 - 4,91 (m, 4H), 4,61 - 4,25 (m, 10H)

- 15 **Compuesto 3a** (*SpSp, trans*): ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ = 8,97 (s a, 1H), 8,84 (s a, 1H), 8,21 (s a, 2H), 6,31 (s a, 2H), 6,08 (a d, J = 53,5 Hz, 1H), 5,89 (s a, 2H), 5,63 (a d, J = 52,4 Hz, 1H), 5,13 - 4,96 (m, 2H), 4,72 - 4,32 (m, 6H), 4,01 (a d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,67 (s a, 2H).

Ejemplo 4 -- Síntesis de Compuesto 4a

- 20 Compuesto 107, obtenido del Ejemplo 2, Etapa F, aislado como el único isómero *cis* mediante cromatografía en gel de sílice, se procesó por separado a través del Ejemplo 1, Etapa G para dar Compuesto 4a.

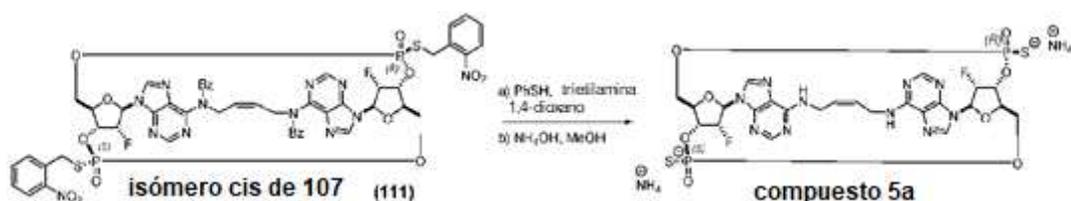


- 25 **Compuesto 107**: ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,13 (s, 2H), 8,12 - 8,08 (m, 2H), 7,91 (s, 2H), 7,65 - 7,55 (m, 4H), 7,54 - 7,45 (m, 6H), 7,33 - 7,27 (m, 2H), 7,23 - 7,16 (m, 4H), 6,14 (d, J = 17,6 Hz, 2H), 5,88 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 2H), 5,76 - 5,61 (m, 4H), 5,21 - 4,99 (m, 4H), 4,60 - 4,46 (m, 4H), 4,45 - 4,37 (m, 2H), 4,30 - 4,13 (m, 4H), 3,49 (d, J = 5,1 Hz, 2H)

- 30 **Compuesto 4a** (RpRp, *cis* de 1a, Compuesto 4a): ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,48 (s a, 2H), 8,02 (s a, 2H), 6,29 (d, J = 14,8 Hz, 2H), 5,99 (s a, 2H), 5,43 (d, J = 51,2 Hz, 2H), 5,03 - 4,88 (m, 2H), 4,43 (a d, J = 11,7 Hz, 2H), 4,32 (a d, J = 9,4 Hz, 2H), 4,27 - 4,17 (m, 2H), 4,21 - 4,02 (m, 2H), 3,97 (a dd, J = 6,1, 12,3 Hz, 2H).

Ejemplo 5 -- Síntesis de Compuesto 5

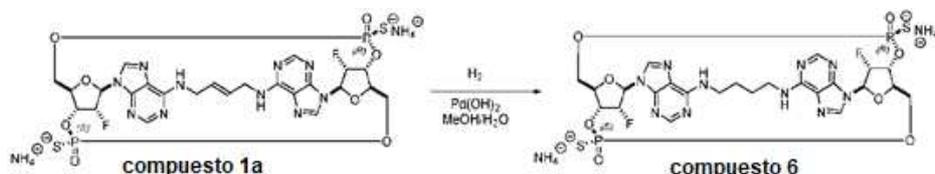
- 35 El isómero *cis* obtenido del Ejemplo 1, Etapa F se procesó por separado a través del Ejemplo 1, Etapa G para dar Compuesto 5a.



Compuesto 111 (isómero cis de Compuesto 107): $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,48 (s, 1H), 8,15 - 8,09 (m, 1H), 8,03 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,65 - 7,06 (m, 11H), 6,07 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 5,98 (d, J = 20,3 Hz, 1H), 5,97 - 5,79 (m, 1H), 5,84 (dd, J = 3,5, 51,2 Hz, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,50 (dd, J = 3,9, 52,0 Hz, 1H), 5,38 - 5,21 (m, 2H), 5,18 - 5,02 (m, 2H), 5,02 - 4,95 (m, 1H), 4,78 - 4,69 (m, 1H), 4,60 - 4,16 (m, 10H)

Compuesto 5a (SpRp, cis of 1a): $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,88 (s a, 1H), 8,51 (s a, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 6,38 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 6,33 (d, J = 14,1 Hz, 1H), 6,14 - 6,09 (m, 2H), 6,01 (d, J = 49,2 Hz, 1H), 5,42 (d, J = 49,6 Hz, 1H), 5,02 - 4,87 (m, 2H), 4,76 - 3,92 (m, 8H), 3,75 - 3,56 (m, 2H)

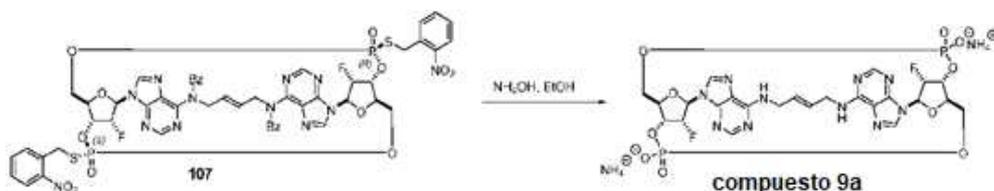
Ejemplo 6 -- Síntesis de Compuesto 6a (SpRp)



A una solución de **compuesto 1a** (1,5 mg, 2,0 μmol) en MeOH/ H_2O (0,6/0,5 ml) a temperatura ambiente se añadió hidróxido de paladio sobre carbono (20 % en peso base seca, 2 mg). La mezcla resultante se trató con hidrógeno (globo) al tiempo que se controlaba la reacción mediante LCMS. Tras completarse el consumo del material de partida, la mezcla se filtró y se lavó con metanol hasta que todo el producto se aclaró. El filtrado se concentró en vacío y el residuo se disolvió en agua (1 ml). La purificación con RHPLC proporcionó **compuesto 6a** (0,9 mg).

LCMS (MS m/z 749,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Ejemplo 7 -- Síntesis de Compuesto 9



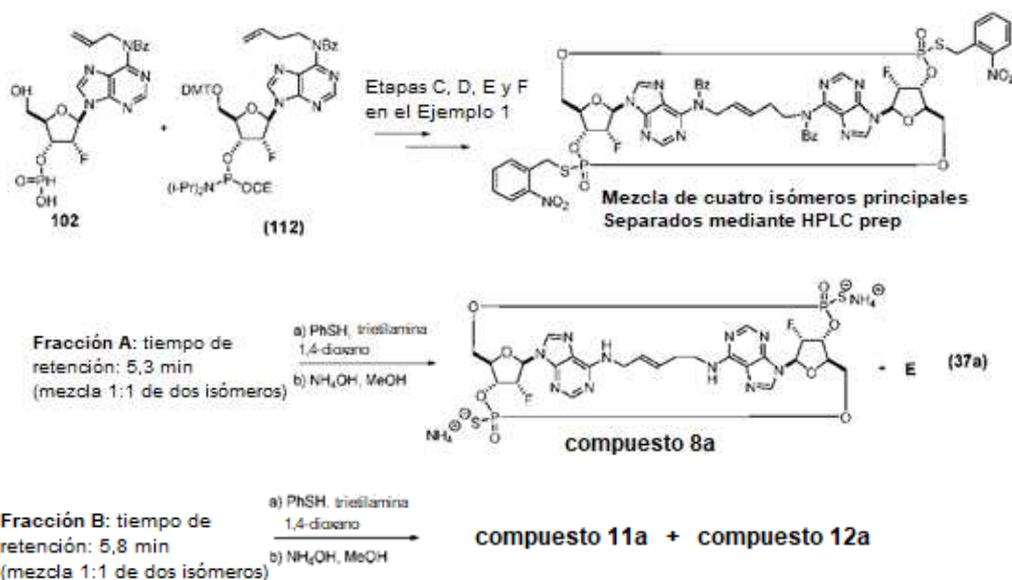
A una solución de **107** (3,7 mg, 3,02 μmol) en EtOH (1,5 mL) se añadió hidróxido de amonio (1 mL). La mezcla resultante se calentó a 50 $^\circ\text{C}$ durante 8 h y se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se trató con 2 mL de agua y el sólido resultante se separó por filtración. El filtrado se sometió a HPLC preparativa para dar **compuesto 9a** (2,5 mg).

Compuesto 9a $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,67 (s a, 1H), 8,50 (s a, 1H), 8,25 (s a, 1H), 8,12 (s a, 1H), 6,47 - 6,28 (m, 2H), 5,92 - 5,79 (m, 2H), 5,74 (d, J = 50,8 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 52,4 Hz, 1H), 5,16 - 4,95 (m, 2H), 4,71 - 4,25 (m, 6H), 4,17 - 3,97 (m, 2H), 3,83 - 3,61 (m, 2H).

LCMS: MS m/z 715,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 8 -- Rutas de síntesis para los compuestos 8a, 11a y 12a

Con Compuesto 112 y Compuesto 102 como materiales de partida, los compuestos 8, 11 y 12 se prepararon mediante las mismas secuencias de reacción que se describen en el Ejemplo 1.



5

Condiciones de HPLC preparativa para las fracciones A y B

Instrumento	Agilent 1200					
Columna de HPLC	Columna Waters Sunfire Prep C18 OBD, 5 um, 19 x 100 mm, n° 186002567					
Caudal:	20ml/min					
fase móvil	A: agua, B: acetonitrilo					
Gradiente	Tiempo (min)	0	8	9,9	10	11
	% B	40	99	99	40	40
Tiempo de procesamiento	12min					
Volumen de inyección	250 ul (0,03 g/ml en acetonitrilo)					
detección	UV 254 nm					
Tiempo de retención	Fracción A	5,3 min				
	Fracción B	5,8 min				

10 **Compuesto 8a:** La Fracción A se prosiguió a través de la Etapa G, Ejemplo 1 para dar dos isómeros que se separaron por HPLC. Compuesto 8a era un isómero de funcionamiento más rápido (tiempo de retención: 4,1 min) y Compuesto 37a (tiempo de retención: 4,5 min) era un isómero de funcionamiento más lento.

15 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,01 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 6,34 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 5,92 (dd, J = 2,7, 51,2 Hz, 1H), 5,85 - 5,71 (m, 2H), 5,37 (d, J = 51,6 Hz, 1H), 4,81 - 4,56 (m, 6H), 4,52 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,42 (a d, J = 9,4 Hz, 3H), 4,05 (dd, J = 4,1, 11,9 Hz, 1H), 3,95 (a dd, J = 4,3, 12,1 Hz, 1H), 3,94 - 3,84 (m, 1H), 3,62 (a dd, J = 4,9, 15,4 Hz, 1H), 2,71 - 2,58 (m, 1H), 2,46 - 2,33 (m, 1H) ^{31}P RMN (162 MHz, METANOL- d_4) δ = 55,36 (s, 1P), 55,18 (s, 1P) LCMS: MS m/z 761,2 [M+H] $^+$

20 **Compuesto 37a:** ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,95 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,15 (s a, 1H), 6,34 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,96 - 5,68 (m, 3H), 5,40 (dd, J = 2,7, 51,6 Hz, 1H), 4,85 (s, 3H), 4,58 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,49 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,43 - 4,33 (m, 3H), 4,29 (dd, J = 8,6, 14,1 Hz, 1H), 4,05 (dd, J = 4,5, 11,9 Hz, 1H), 3,95 (dd, J = 4,9, 12,3 Hz, 1H), 3,94 - 3,86 (m, 1H), 2,67 - 2,55 (m, 1H), 2,52 - 2,40 (m, 1H).

25

Compuesto 8a/37a Condiciones de HPLC preparativa:

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC
Columna de HPLC	Waters XBridge C18, 10 x 100 mm, n° 1413
Caudal:	4,0ml/min
Temperatura de la columna	35 °C
fase móvil	A: NH ₄ OH al 0,1% en agua, B: NH ₄ OH al 0,1% en acetonitrilo
Gradiente (% B)	0 \rightarrow 50

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC	
Tiempo de procesamiento	20min	
Volumen de inyección	50 ul (4 mg/ml en agua)	
detección	UV 260 nm	
Tiempo de retención	Compuesto 8a	4,1 min
	Compuesto 37a	4,5 min

La Fracción B se prosiguió a través de la Etapa G, Ejemplo 1 para dar dos isómeros que se separaron por HPLC prep descrita más adelante. Compuesto 11a es un isómero de funcionamiento más rápido (tiempo de retención: 11,2 min) y Compuesto 12a es un isómero de funcionamiento más lento (tiempo de retención: 12,1 min)

Compuesto 11a: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,63 (s a, 2H), 8,18 (s a, 1H), 8,17 (s a, 1H), 6,34 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 6,32 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 5,86 - 5,65 (m, 2H), 5,48 (d, J = 48,5 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 43,8 Hz, 1H), 4,84 - 4,53 (m, 6H), 4,47 - 4,36 (m, 2H), 4,05 - 3,91 (m, 2H), 3,96 - 3,85 (m, 1H), 3,70 - 3,54 (m, 1H), 2,66 - 2,54 (m, 1H), 2,43 - 2,30 (m, 1H)

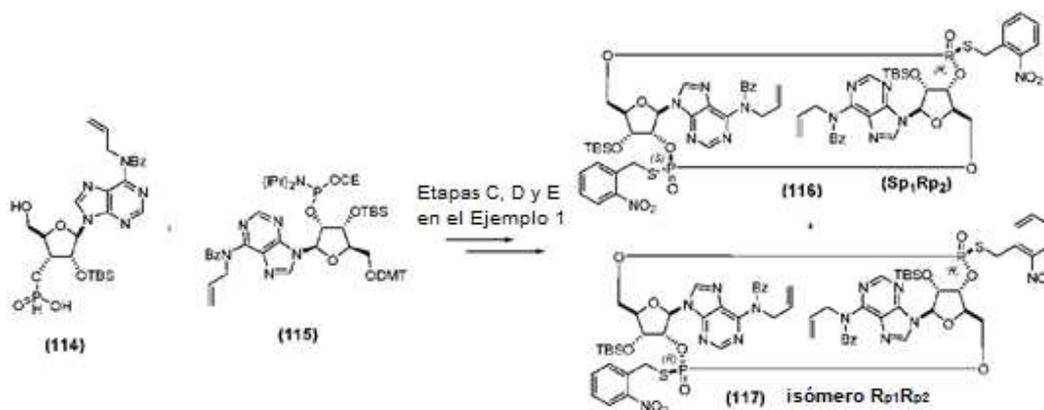
Compuesto 12a: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,56 (s a, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,95 (s a, 1H), 6,35 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 5,82 - 5,65 (m, 2H), 5,50 (d, J = 51,2 Hz, 1H), 5,36 (d, J = 53,9 Hz, 1H), 4,74 - 4,33 (m, 8H), 4,26 - 4,16 (m, 1H), 4,07 - 3,93 (m, 3H), 2,64 - 2,44 (m, 2H).

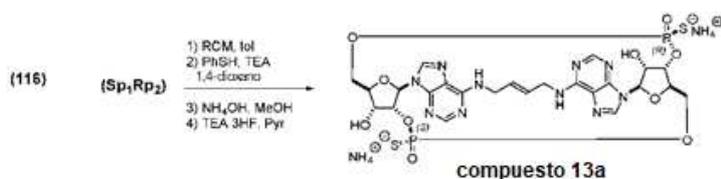
Compuesto 11a/12a Condiciones de HPLC preparativa:

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC	
Columna de HPLC	Waters XTerra C18, 10 x 100 mm, n° 3128	
Caudal:	3,0ml/min	
Temperatura de la columna	35 °C	
fase móvil	A: Ácido fórmico al 0,1% en agua, B: Ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo	
Gradiente (% B)	0 → 30	
Tiempo de procesamiento	20min	
Volumen de inyección	50 ul (2,5 mg/ml en agua)	
detección	UV 260 nm	
Tiempos de retención	Compuesto 11a	11,2 min
	Compuesto 12a	12,1 min

Ejemplo 9 -- Rutas de síntesis para los compuestos 13 y 14

Con Compuesto 114 y Compuesto 115 como materiales de partida, los Compuestos 13 y 14 se prepararon mediante las mismas secuencias de reacción que se describen en el Ejemplo 1, más la etapa de desprotección de TBS.





5 **Compuesto 116:** $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 9,36 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,76 (s, 2H), 8,07 (a dd, J = 1,8, 7,6 Hz, 3H), 8,05 - 8,00 (m, 2H), 7,99 (s, 1H), 7,87 - 7,82 (m, 1H), 7,70 - 7,65 (m, 1H), 7,63 - 7,55 (m, 3H), 7,55 - 7,41 (m, 6H), 7,39 - 7,35 (m, 1H), 7,30 - 7,26 (m, 1H), 6,37 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 5,89 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,36 - 5,27 (m, 2H), 5,15 (ddd, J = 3,7, 8,4, 11,7 Hz, 1H), 4,64 - 4,43 (m, 4H), 4,43 - 4,38 (m, 1H), 4,37 - 4,30 (m, 1H), 4,23 - 4,13 (m, 2H), 4,11 - 3,98 (m, 2H), 3,97 - 3,86 (m, 1H), 0,97 (s, 9H), 0,83 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H), 0,16 (s, 3H), -0,13 (s, 3H).

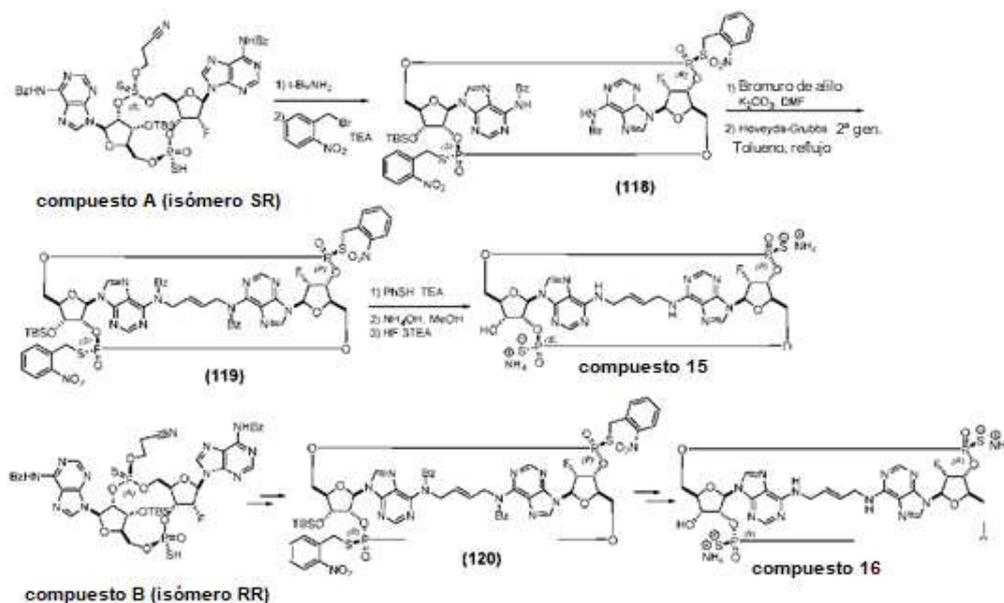
10 **Compuesto 13a:** $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,78 (s a, 1H), 8,47 (s a, 1H), 8,21 (s a, 1H), 8,08 (s a, 1H), 6,44 - 6,21 (m, 1H), 6,19 - 6,03 (m, 1H), 6,01 - 5,78 (m, 2H), 5,38 - 4,95 (m, 2H), 4,67 - 4,45 (m, 5H), 4,45 - 4,35 (m, 1H), 4,34 - 4,29 (m, 1H), 4,25 (a d, J = 11,3 Hz, 1H), 4,18 - 3,89 (m, 2H), 3,88 - 3,54 (m, 2H). $^{31}\text{P RMN}$ (162 MHz, METANOL- d_4) δ = 56,89 (s a, 1P), 56,37 (s a, 1P)

15 **Compuesto 117 (isómero Rp_1Rp_2 de Compuesto 116):** $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 9,36 (s a, 1H), 9,11 (s a, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,14 - 7,96 (m, 6H), 7,72 - 7,27 (m, 13H), 6,44 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 5,84 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,59 - 5,50 (m, 1H), 5,48 - 5,44 (m, 1H), 5,33 - 5,24 (m, 1H), 4,75 - 3,85 (m, 11H), 0,90 (s, 9H), 0,79 (s, 9H), 0,20 (s, 3H), 0,11 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), -0,21 (s, 3H)

20 **Compuesto 14a** (isómero Rp_1Rp_2 de compuesto 13a) LCMS: MS m/z 743,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 10 -- Rutas de síntesis para los compuestos 15 y 16

25



30 A una solución de compuesto A (2,63 g, 2,46 mmol) en MeCN (26,3 ml) se le añadió terc.-butilamina (13,15 ml, 124,1 mmol). Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se destiló azotrópicamente con MeCN. El residuo se disolvió en MeCN (52,6 ml) y se trató con 1-(bromometil)-2-nitrobenceno (1,064 g, 4,925 mmol) y trietilamina (0,755 ml, 5,42 mmol). Una vez completada la reacción (controlada por LC/MS), la mezcla de reacción se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (66 % de acetato de etilo/100 % de n-heptano) para dar 0,226 g de **Compuesto 118**. El producto aislado se disolvió en DMF (5 mL) y se añadieron bromuro de alilo (0,046 ml, 0,528 mmol) y carbonato de potasio (0,073 g, 0,528 mmol).

35 La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba el progreso mediante LCMS. Después de 19 h, se añadieron una mezcla 1/1 de MTBE/EtOAc (12/12 mL), una solución acuosa saturada de NH_4Cl (15 ml) y agua (10 mL). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (5 mL) dos veces, se secó sobre MgSO_4 y se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (50 % de acetato

de etilo/n-heptano a 100 % de acetato de etilo) para dar 37 mg de producto bis-alilado. El producto aislado (37 mg, 0,027 mmol) se disolvió en tolueno (55 mL) y se calentó a reflujo suave (baño de aceite a 120-125 °C). Se añadió una solución de catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación ((1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio; disponible en SIGMA-ALDRICH® Catálogo N° 569755; CAS 301224-40-8; 8,5 mg, 0,014 mmol) y quinona (5,9 mg, 0,054 mmol) en tolueno (10 mL). La mezcla se calentó a reflujo y el progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Tras el consumo completo del material de partida, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se trató con DMSO (0,059 ml, 0,81 mmol) durante 15 horas. La mezcla resultante se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, 66 % de acetato de etilo en n-heptano a 100 % de acetato de etilo) para dar Compuesto 119 (2,2 mg).

Compuesto 119: ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,49 (s, 1H), 8,12 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,05 - 8,02 (m, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,70 - 7,10 (m, 17H), 6,27 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 6,15 - 6,05 (m, 1H), 5,97 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,94 - 5,72 (m, 3H), 4,94 (s a, 2H), 4,86 - 4,69 (m, 2H), 4,67 - 4,60 (m, 1H), 4,60 - 4,44 (m, 4H), 4,39 - 4,33 (m, 1H), 4,31 - 4,10 (m, 6H), 0,96 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,19 (s, 3H)

Compuesto 119 se prosiguió a través de la Etapa G en el Ejemplo 1, seguido de desprotección de TBS con TEA 3HF para dar compuesto 15a.

Compuesto 15a: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,76 (s a, 1H), 8,44 (s a, 1H), 8,24 (s a, 1H), 8,07 (s a, 1H), 6,45 - 6,19 (m, 2H), 6,12 - 5,75 (m, 2H), 5,54 (a d, *J* = 51,6 Hz, 1H), 5,67 - 5,06 (m, 2H), 4,66 - 4,37 (m, 3H), 4,47 - 4,37 (m, 1H), 4,36 - 4,22 (m, 2H), 4,17 - 3,94 (m, 2H), 3,94 - 3,80 (m, 1H), 3,80 - 3,59 (m, 2H)

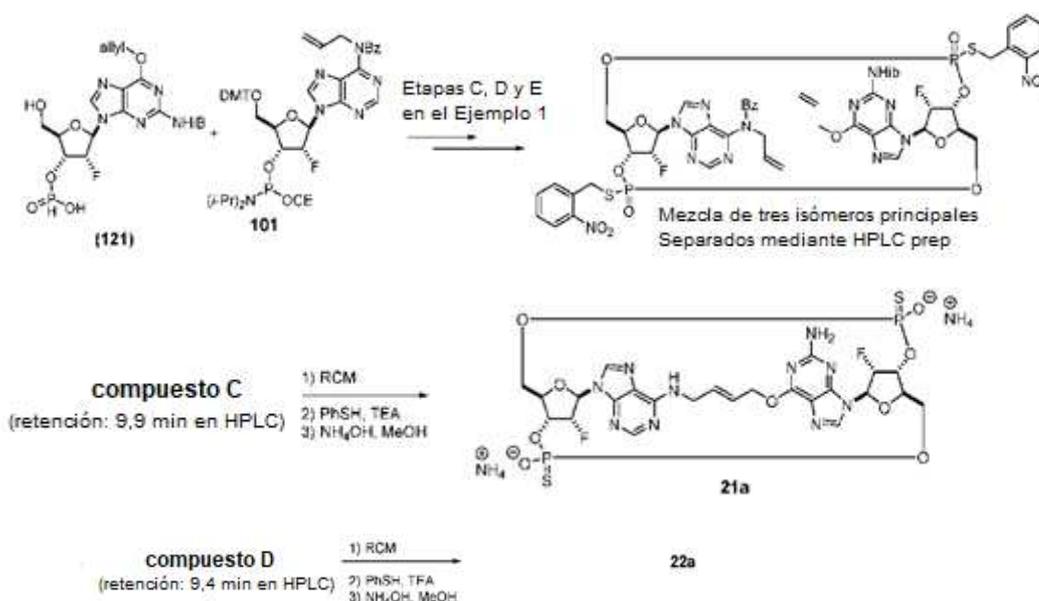
Compuesto 16 se obtuvo a partir de compuesto B (isómero RR de compuesto A) mediante las mismas secuencias que se describen en compuesto 15.

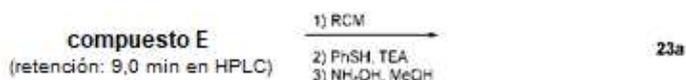
Compuesto 120 (isómero Rp₁Rp₂ de Compuesto 119): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,89 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,85 - 7,74 (m, 4H), 7,69 - 7,61 (m, 2H), 7,58 (s, 1H), 7,55 - 7,48 (m, 1H), 7,45 - 7,30 (m, 6H), 7,22 - 7,15 (m, 1H), 7,13 - 7,04 (m, 3H), 6,76 - 6,68 (m, 1H), 6,31 - 6,22 (m, 1H), 6,22 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,12 - 5,99 (m, 2H), 5,94 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,92 - 5,81 (m, 1H), 5,67 (dd, *J* = 3,5, 51,2 Hz, 1H), 5,08 - 4,93 (m, 2H), 4,87 - 4,77 (m, 1H), 4,60 - 4,22 (m, 8H), 4,21 - 4,16 (m, 1H), 4,11 - 4,02 (m, 1H), 3,94 (a d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 3,66 (dd, *J* = 4,7, 11,3 Hz, 1H), 0,90 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H)

Compuesto 16a: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,54 (s a, 1H), 8,24 (s a, 1H), 8,17 (s a, 1H), 8,08 (s a, 1H), 6,44 - 6,23 (m, 2H), 6,07 - 5,68 (m, 2H), 5,43 (d, *J* = 50,4 Hz, 1H), 5,31 - 5,05 (m, 2H), 4,69 - 4,26 (m, 6H), 4,19 - 3,90 (m, 2H), 3,90 - 3,57 (m, 3H)

Ejemplo 11 -- Rutas de síntesis de Compuestos análogos de Adenina/Guanina (A/G) -- Compuesto 21, Compuesto 22 y Compuesto 23

Con **Compuesto 121** y **Compuesto 101** como materiales de partida, análogos de adenina/guanina se prepararon mediante las mismas secuencias de reacción que se describen en el Ejemplo 1.





Condiciones de HPLC preparativa para la separación de compuestos **C**, **D** y **E**

Instrumento		Agilent 1100				
Columna de HPLC		Columna Waters Sunfire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100 mm, nº 186002567				
Caudal:		12ml/min				
fase móvil		A: agua, B: acetonitrilo				
Gradiente	Tiempo (min)	0	13	14,5	14,51	16
	% B	40	99	99	40	40
Tiempo de procesamiento		16min				
Volumen de inyección		150 μ l (0,027 g/ml en acetonitrilo)				
detección		UV 254 nm				
Tiempo de retención	Compuesto C	9,9 min				
	Compuesto D	9,4 min				
	Compuesto E	9,0 min				

5

Compuesto **D**: ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,60 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,04 - 8,01 (m, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,99 - 7,95 (m, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,63 - 7,51 (m, 5H), 7,46 - 7,41 (m, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 3H), 7,25 - 7,20 (m, 2H), 6,96 - 6,84 (m, 1H), 6,19 - 5,99 (m, 4H), 5,67 (dd, J = 4,3, 52,3 Hz, 1H), 5,47 (dd, J = 1,4, 17,4 Hz, 1H), 5,36 - 5,24 (m, 4H), 5,14 - 5,09 (m, 1H), 5,08 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 5,04 - 4,98 (m, 2H), 4,51 - 4,30 (m, 10H), 4,21 - 4,13 (m, 1H), 2,83 - 2,67 (m, 1H), 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,14 (d, J = 6,6 Hz, 3H)

10

Compuesto D se prosiguió través de las Etapas F y G, Ejemplo 1 para dar Compuesto 22.

15 **Compuesto 22**: LCMS: MS m/z 763,07 [M+H]⁺

Compuesto C: ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 9,08 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,07 - 8,02 (m, 2H), 8,02 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,55 - 7,30 (m, 9H), 7,24 - 7,19 (m, 2H), 6,58 - 6,45 (m, 1H), 6,23 - 5,97 (m, 4H), 5,97 - 5,86 (m, 1H), 5,63 - 5,57 (m, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,48 - 5,44 (m, 1H), 5,35 - 5,30 (m, 1H), 5,29 - 5,22 (m, 1H), 5,18 - 5,13 (m, 2H), 5,11 - 5,07 (m, 1H), 5,02 - 4,97 (m, 2H), 4,51 - 4,22 (m, 9H), 4,14 - 4,07 (m, 1H), 2,99 - 2,85 (m, 1H), 1,20 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,17 (d, J = 7,0 Hz, 3H)

20

Compuesto C se prosiguió a través de las Etapas F y G, Ejemplo 1 para dar Compuesto 21 **Compuesto 21**: LCMS: MS m/z 763,13 [M+H]⁺

25

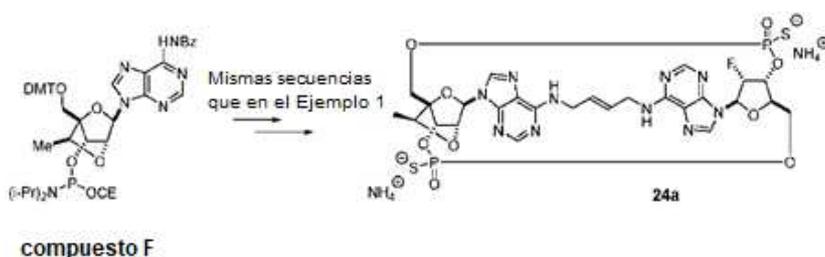
Compuesto **E**: ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,99 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,02 - 7,94 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,68 - 7,63 (m, 1H), 7,60 - 7,55 (m, 1H), 7,54 - 7,49 (m, 2H), 7,45 - 7,31 (m, 5H), 7,25 - 7,21 (m, 2H), 6,22 - 5,94 (m, 6H), 5,56 (a dd, J = 5,1, 51,5 Hz, 1H), 5,54 - 5,46 (m, 1H), 5,34 - 5,29 (m, 1H), 5,29 - 5,22 (m, 2H), 5,16 - 5,08 (m, 3H), 5,02 - 4,96 (m, 2H), 4,62 - 4,54 (m, 1H), 4,52 - 4,26 (m, 9H), 2,93 - 2,81 (m, 1H), 1,21 (d, J = 2,3 Hz, 3H), 1,20 (d, J = 2,0 Hz, 3H)

30

Compuesto E se prosiguió través de las Etapas F y G, Ejemplo 1 para dar Compuesto 23 **Compuesto 23**: LCMS: MS m/z 763,18 [M+H]⁺

35 **Ejemplo 12 -- Síntesis de Compuesto 24**

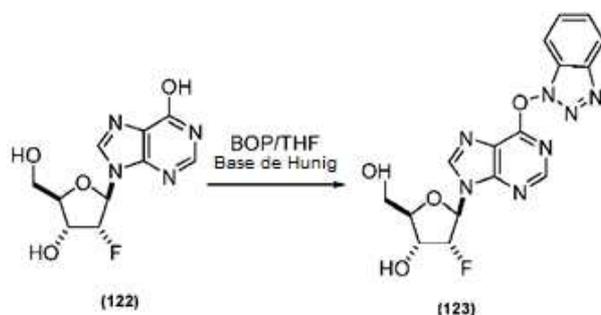
Con compuesto F, Compuesto 24a se preparó a través de las mismas secuencias de reacción que se describen en el Ejemplo 1.



Compuesto 24: ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,95 (s a, 1H), 8,29 (s a, 1H), 8,23 (s a, 1H), 8,08 (s a, 1H), 6,31 (a d, J = 12,9 Hz, 2H), 6,23 - 6,07 (m, 1H), 6,04 - 5,84 (m, 2H), 5,71 (a d, J = 50,8 Hz, 1H), 5,27 - 4,32 (m, 7H), 4,27 - 4,16 (m, 1H), 4,12 (dd, J = 5,7, 11,9 Hz, 1H), 4,07 - 3,98 (m, 1H), 3,78 - 3,62 (m, 2H), 1,40 (d, J = 7,0 Hz, 3H)

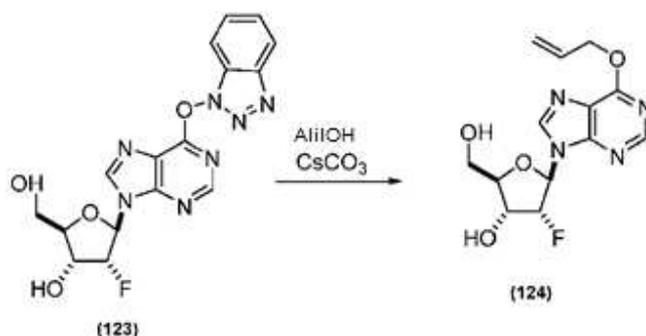
Ejemplo 13 - Síntesis de Compuesto 18, Compuesto 19 y Compuesto 20

Una ruta para esta síntesis se muestra en la FIG. 3.



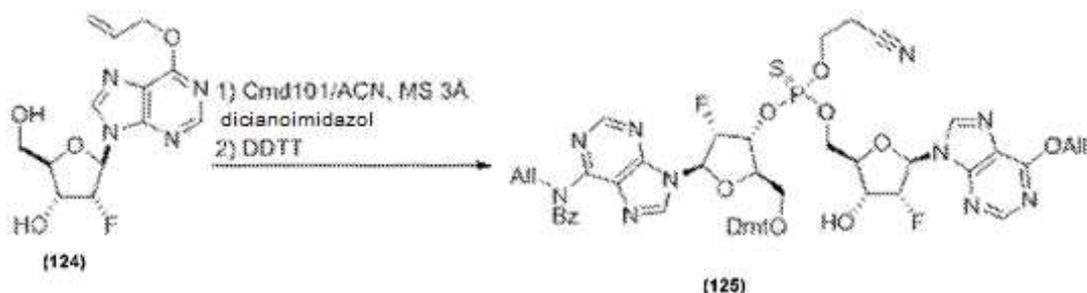
A una solución de 9-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il)-9H-purin-6-ol (100 mg, 0,37 mmol) y Base de Hunig (0,129 ml, 0,74 mmol) en DMF (1 ml) se añadió BOP (327 mg, 0,74 mmol) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante la noche. UPLC-MS indicó que la reacción se completó. El disolvente se eliminó en rotavapor de alto vacío. El residuo se disolvió en DCM y se purificó utilizando Biotage (columna de gel de Si de 24 g, EtOAc en Heptano = 0 a 100 %, 10 vol, 100 %, 10 vol) para proporcionar 105 mg del aducto de BOP con un rendimiento del 73 %.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 3,74 - 3,84 (m, 1 H) 3,92 - 4,00 (m, 1 H) 4,12 - 4,19 (m, 1 H) 4,62 - 4,74 (m, 1 H) 5,37 - 5,57 (m, 1 H) 6,41 - 6,52 (m, 1 H) 7,47 - 7,55 (m, 1 H) 7,57 - 7,64 (m, 2 H) 8,03 - 8,14 (m, 1 H) 8,36 - 8,46 (m, 1 H) 8,86 (s, 1 H)



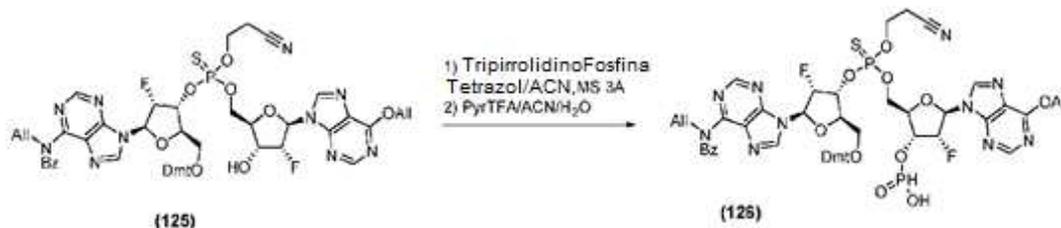
A una solución de (2R,3R,4R,SR)-5-(6-((1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)oxi)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3-ol (135 mg, 0,349 mmol) en alcohol alílico (3 ml) se añadió carbonato de cesio (500 mg, 1,535 mmol) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. UPLC-MS indicó que la reacción se completó. La reacción se trató con NaHCO₃ sat./salmuera y se extrajo con EtOAc/Hept. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El disolvente y los compuestos orgánicos volátiles en el filtrado se eliminaron en un rotavapor. El residuo se purificó utilizando Biotage (columna de gel de Si de 12 g, EtOAc en Heptano = 0 a 100 %, 10 vol, 100 %, 10 vol) para proporcionar 100 mg del aducto de alilo deseado con un rendimiento del 92 %.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 8,56 (s, 1 H) 8,47 (s, 1 H) 6,29 - 6,41 (m, 1 H) 6,06 - 6,21 (m, 1 H) 5,33 - 5,53 (m, 2 H) 5,22 - 5,31 (m, 1 H) 5,02 - 5,14 (m, 2 H) 4,56 - 4,71 (m, 1 H) 4,10 - 4,18 (m, 1 H) 3,88 - 3,96 (m, 1 H) 3,70 - 3,79 (m, 1 H)

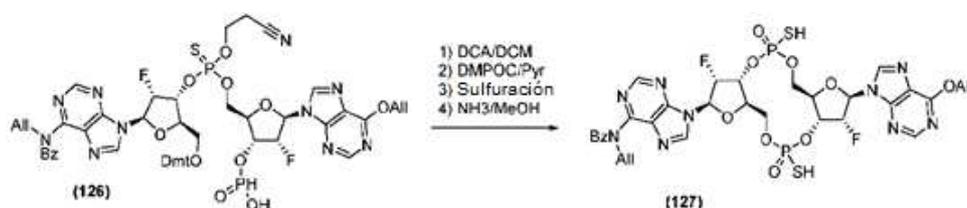


A una solución de diisopropilfosforoamidita (150 mg, 0,164 mmol) y (2R,3R,4R,5R)-5-(6-(aliloxi)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3-ol (76 mg, 0,246 mmol) en acetonitrilo (1069 μ l, 20,47 mmol) se añadieron tamices moleculares (3 A, 150 mg) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h antes de añadir 1H-imidazol-4,5-dicarbonitrilo (38,7 mg, 0,328 mmol) a TA. La mezcla se agitó a TA durante 1 h. UPLC-MS indicó que la reacción se completó. Se añadió (E)-N,N-dimetil-N'-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)formimidamida (37,0 mg, 0,18 mmol). UPLC-MS indicó que la sulfuración se completó en 30 min. La reacción se trató con NaHCO₃ sat./salmuera y se extrajo con EtOAc/Hept. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El disolvente y los compuestos orgánicos volátiles en el filtrado se eliminaron en un rotavapor. El residuo se purificó utilizando Biotage (columna de gel de Si de 25 g, EtOAc en Heptano = 0 a 100 %, 15 vol, 100 %, 10 vol).

¹H RMN (500 MHz, METANOL-*d*₄, dos diastereómeros ~1:1) δ ppm 8,62 - 8,63 (m, 1 H) 8,57 - 8,58 (m, 1 H) 8,48 - 8,50 (m, 1 H) 8,44 - 8,46 (m, 1 H) 8,40 - 8,41 (m, 1 H) 8,38 - 8,39 (m, 1 H) 8,33 - 8,35 (m, 1 H) 8,25 - 8,27 (m, 1 H) 7,22 - 7,33 (m, 11 H) 7,11 - 7,20 (m, 17 H) 7,05-7,11 (m, 4 H) 6,83 - 6,92 (m, 6 H) 6,65 - 6,77 (m, 11 H) 6,28 - 6,41 (m, 5 H) 6,23 - 6,28 (m, 2 H) 6,10 - 6,22 (m, 5 H) 6,00 - 6,10 (m, 4 H) 5,89 - 6,00 (m, 5 H) 5,52 - 5,57 (m, 2 H) 5,45 - 5,52 (m, 3 H) 5,41 - 5,45 (m, 1 H) 5,24 - 5,34 (m, 4 H) 5,13 - 5,17 (m, 3 H) 5,07 - 5,12 (m, 5 H) 4,93 - 4,98 (m, 4 H) 4,88 - 4,93 (m, 5 H) 4,73 - 4,82 (m, 3 H) 4,50 - 4,59 (m, 2 H) 4,36 - 4,48 (m, 4 H) 4,27 - 4,36 (m, 5 H) 4,16 - 4,27 (m, 5 H) 3,83 - 4,04 (m, 5 H) 3,73 - 3,78 (m, 13 H) 3,64 - 3,73 (m, 4 H) 3,52 - 3,58 (m, 1 H) 3,45 - 3,51 (m, 2 H) 3,35 - 3,41 (m, 2 H) 3,16 - 3,23 (m, 2 H) 3,08 - 3,15 (m, 2 H) 2,84 - 2,93 (m, 2 H) 2,79 - 2,83 (m, 2 H) 2,70 - 2,77 (m, 2 H) 2,61 - 2,69 (m, 3 H)

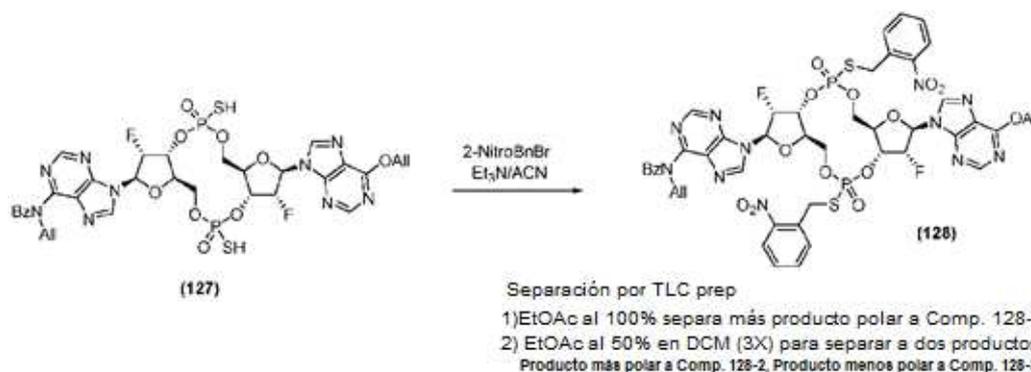


A una solución de O-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-(aliloxi)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metil) O-(2-cianoetil) fosforotioato de O-((2R,3R,4R,5R)-5-(6-(N-alilbenzamido)-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-ilo) (120 mg, 0,104 mmol) en acetonitrilo (4171 μ l, 79,852 mmol) se añadieron tamices moleculares (3A, 1 peso) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h antes de añadir tripirrolidinofosfina (71,6 μ l, 0,311 mmol). A continuación, se añadió tetrazol 0,45 M en ACN (253 μ l, 0,114 mmol) en 7 porciones, en un intervalo de 2 min. La TLC (EtOAc/Hept = 2:1, RfSM = 0,7, RfProd = 0,0 a 0,6) fue incompleta. Se añadieron 2X del reactivo de fosforilación y terazol. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 10 min. Ni UPLC-MS ni TLC indicaron SM restante alguna. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz que contenía acetonitrilo (20,8 ml), agua (104 μ l, 5,776 mmol) y sal trifluoroacetato de piridina (421 mg, 2,178 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min. UPLC-MS indicó que se formó el producto deseado. La mezcla de reacción se combinó con EtOAc y se lavó con HCl [0,1 N]/salmuera y luego se NaHCO₃ sat./salmuera para prevenir la desprotección de DMT. La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (1X). La capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y luego se filtró. Los disolventes y componentes volátiles en el filtrado se eliminaron en rotavapor para proporcionar el producto bruto que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación ulterior.



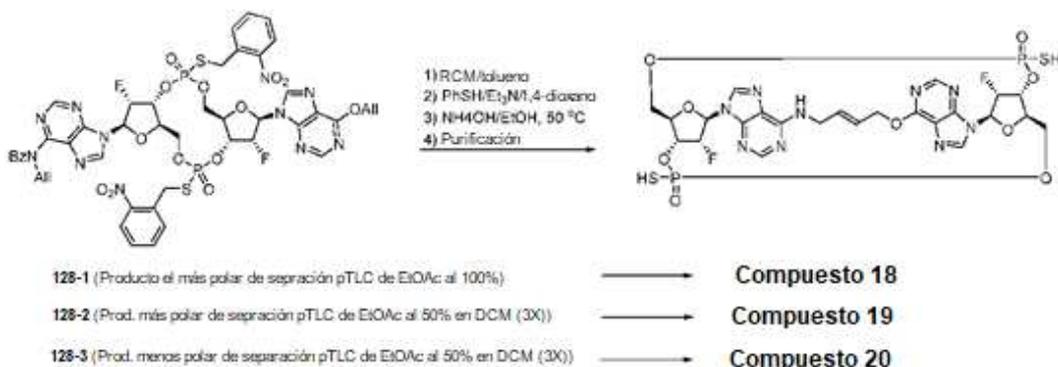
El compuesto intermedio hidrógeno-fosfonato bruto se disolvió en DCM (2635 μ l, 40,946 mmol) y agua (29,5 μ l, 1,638 mmol) antes de añadir ácido dicloroacético (135 μ l, 1,638 mmol) en DCM (2635 μ l, 40,946 mmol) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 5 min. UPLC-MS indicó que la reacción se completó. La reacción se neutralizó con piridina (510 μ l, 6,308 mmol). Los componentes volátiles se eliminaron en rotavapor y luego en rotavapor de alto vacío. El residuo se destiló azeotrópicamente con piridina una vez más antes de utilizarse para la ciclación.

El hidrógeno-fosfonato desprotegido de DMT bruto (80 mg, 0,087 mmol) se disolvió en piridina (1831 μ l, 22,639 mmol) antes de añadir 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosfinano 2-óxido (48,2 mg, 0,261 mmol) a TA. La mezcla se agitó a TA durante 10 min. La UPLC no mostró pico de SM alguno a los 2,1 min. La reacción se extinguió mediante la adición de agua (47,1 μ l, 2,612 mmol) seguido de la adición inmediata de 3H-benzo[c][1,2]ditiol-3-ona (21,97 mg, 0,131 mmol). Después de 10 min, la UPLC mostró que no quedaba material de partida. La reacción se agitó a TA durante 1 h. No se encontraron cambios en UPLC-MS. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO₃ sat. y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO antes de filtrarse. El residuo después de la evaporación del disolvente se disolvió en MeOH antes de que se añadiera NH₃-H₂O. La mezcla se agitó durante 5 min antes de eliminar todo el disolvente y los componentes volátiles en un rotavapor y en un rotavapor de alto vacío.



El compuesto intermedio de CDN se disolvió en acetonitrilo (1484 μ l, 28,417 mmol) y 1,4-dioxano (496 μ l, 5,797 mmol) antes de añadir TEA (39,6 μ l, 0,284 mmol) y 1-(bromometil)-2-nitrobenzono (49,1 mg, 0,227 mmol) a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. UPLC-MS indicó que la reacción estaba incompleta. Ni la TLC (EtOAc) ni la HPLC indicaron que quedara bromuro de o-nitrobenzilo. Se añadió 1-(bromometil)-2-nitrobenzono (49,1 mg, 0,227 mmol) y TEA (39,6 μ l, 0,284 mmol). La reacción se agitó durante 5 h. La reacción se trató con NaHCO₃ sat./salmuera y se extrajo con EtOAc/Hept. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El disolvente y los compuestos orgánicos volátiles en el filtrado se eliminaron en un rotavapor. El residuo se purificó utilizando Biotage (columna de gel de Si de 12 g, EtOAc en Heptano = 0 a 100%, 15 vol, 100 %, 10 vol, MeOH al 10 % en EtOAc, 6 vol). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado. La evaporación del disolvente proporcionó el producto deseado. Se utilizó TLC prep (EtOAc) para aislar el isómero más polar que conduce al producto final Compuesto 18. Se separaron otros dos isómeros utilizando TLC prep (EtOAc/DCM = 1:1, funcionando 3 veces). El isómero más polar se convirtió en Compuesto 19 y el isómero menos polar se convirtió en Compuesto 20.

El producto más polar de la primera TLC p (EtOAc), designó **Compuesto 128-1**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 8,62 (s, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 8,00 - 8,07 (m, 2 H) 7,99 (s, 1 H) 7,96 (s, 1 H) 7,56 - 7,64 (m, 2 H) 7,48 - 7,56 (m, 3 H) 7,42 - 7,48 (m, 1 H) 7,34 - 7,42 (m, 2 H) 7,29 - 7,34 (m, 1 H) 7,18 - 7,25 (m, 2 H) 6,09 - 6,21 (m, 3 H) 5,98 - 6,09 (m, 2 H) 5,63 - 5,75 (m, 1 H) 5,52 - 5,63 (m, 1 H) 5,42 - 5,51 (m, 2 H) 5,32 (dd, *J*=10,27, 0,98 Hz, 1 H) 5,27 (dd, *J*=17,12, 1,47 Hz, 1 H) 5,13 (d, *J*=5,87 Hz, 2 H) 5,09 - 5,12 (m, 1 H) 4,95 - 5,05 (m, 2 H) 4,36 - 4,54 (m, 7 H) 4,23 - 4,31 (m, 2 H) 4,15 - 4,21 (m, 1 H) El producto más polar de la segunda TLC p designó **Compuesto 128-2** (EtOAc/DCM = 1:1, 3X) ¹H RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 8,75 (s, 1 H) 8,59 (s, 1 H) 8,43 (s, 1 H) 8,39 (s, 1 H) 8,01 - 8,07 (m, 2 H) 7,38 - 7,56 (m, 7 H) 7,27 - 7,35 (m, 1 H) 7,15 - 7,26 (m, 3 H) 6,45 (d, *J*=19,91 Hz, 1 H) 6,38 (d, *J*=19,52 Hz, 1 H) 5,95 - 6,26 (m, 4 H) 5,83 (dd, *J*=51,54, 4,69 Hz, 1 H) 5,73 (dd, *J*=51,54, 4,69 Hz, 1 H) 5,46 - 5,57 (m, 1 H) 5,28 - 5,36 (m, 1 H) 5,19 - 5,28 (m, 1 H) 5,16 (dt, *J*=5,56, 1,51 Hz, 2 H) 5,03 - 5,10 (m, 1 H) 4,95 (a d, *J*=5,50 Hz, 2 H) 4,41 - 4,62 (m, 4 H) 4,28 - 4,40 (m, 2 H) 4,12 - 4,27 (m, 4 H) El producto menos polar de la TLC p de segunda vez designó **Compuesto 128-3** (EtOAc/DCM = 1:1, 3X) ¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 8,53 (s, 1 H) 8,36 (s, 1 H) 7,95 - 8,02 (m, 2 H) 7,95 (s, 1 H) 7,89 (s, 1 H) 7,53 - 7,61 (m, 2 H) 7,44 - 7,53 (m, 4 H) 7,36 - 7,44 (m, 2 H) 7,25 - 7,31 (m, 1 H) 7,12 - 7,20 (m, 2 H) 5,91 - 6,18 (m, 4 H) 5,85 - 5,91 (m, 1 H) 5,72 - 5,79 (m, 1 H) 5,61 - 5,72 (m, 1 H) 5,47 - 5,57 (m, 1 H) 5,40 - 5,47 (m, 1 H) 5,25 - 5,32 (m, 1 H) 5,15 - 5,23 (m, 1 H) 4,99 - 5,14 (m, 3 H) 4,92 (d, *J*=5,47 Hz, 2 H) 4,52 - 4,60 (m, 2 H) 4,37 - 4,52 (m, 4 H) 4,35 (d, *J*=3,13 Hz, 1 H) 4,30 (d, *J*=5,47 Hz, 1 H) 4,25 (d, *J*=2,74 Hz, 1 H) 4,20 (d, *J*=4,69 Hz, 1 H)



A la solución a reflujo de CDN protegido con 2-nitrobencilo (10 mg, 8,696 μ mol) en tolueno (20 ml, 187,761 mmol) se añadió la solución de catalizador Hoveyda-Grubbs de 2^a generación ((1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro (o-isopropoxifenilmetileno)rutenio; disponible en SIGMA-ALDRITCH® Catálogo N° 569755; CAS 301224-40-8; 2,73 mg, 4,348 μ mol) y benzoquinona (2,350 mg, 0,022 mmol) en tolueno (2 ml). La solución resultante se sometió a reflujo durante 4 h (temp. del baño de aceite 120-125 °C). TLC (EtOAc, R_fsm = 0,8, R_fp_{varilla} = 0,3) y UPLC-MS indicaron que la reacción estaba incompleta. Se añadió 1 ml de la solución de catalizador de Ru. La reacción se sometió a reflujo durante 2 h más. Todavía queda mucha SM sin reaccionar. Se añadió otro 1 ml de la solución de catalizador de Ru. La reacción se sometió a reflujo durante 2 h más. No se detectó SM en HPLC de fase inversa. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se enfrió bruscamente con DMSO (0,019 ml, 0,261 mmol). La evaporación del disolvente proporcionó el producto bruto que se purificó en una columna de gel de Si (columna de gel de Si de 10 g, eluyente de 50 a 100 %, 15 vol, 100 %, 10 vol). Las fracciones que contenían los productos con la MS deseada se combinaron y se sometieron a rotavapor. El residuo se purificó una vez más en TLC prep (EtOAc).

A la CDN bloqueada en puente purificada de TLCp (2,5 mg, 2,228 μ mol) (el isómero trans) en 1,4-dioxano (0,5 ml, 5,845 mmol) se añadió tiofenol (0,25 ml, 2,428 mmol) y TEA (0,25 ml, 1,794 mmol) a 20 °C. La mezcla se agitó a TA durante 3 h. UPLC indicó que se completó la conversión.

Se añadió metanol (1,5 ml), seguido de la adición de NH₃ al 29 % en H₂O (1,0 ml). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 6 h y se enfrió a RT.

La suspensión de la mezcla de reacción se filtró y se lavó con agua (25 mL). Se formaron precipitaciones en el filtrado después del lavado con agua. El filtrado se filtró de nuevo para eliminar algo de sólidos.

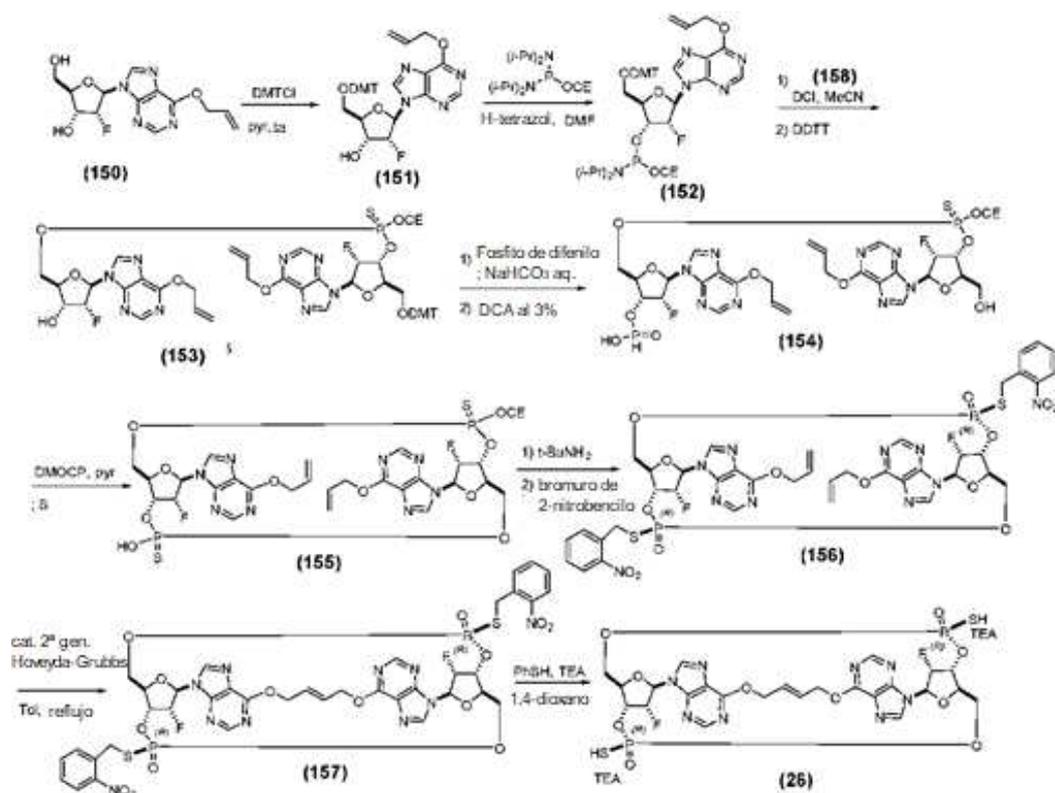
El filtrado resultante se extrajo con una mezcla de tol/Hep (3X, 1/1, 25 ml cada uno). La capa acuosa se concentró in vacuo y luego se disolvió en agua (6 mL). Los precipitados se filtraron una vez más. UPLC indicó que se formó el producto deseado. El producto se purificó con HPLC de fase inversa utilizando el mismo método para purificar otros análogos de CDN bloqueados basados.

Para Compuesto 18: LCMS: MS *m/z* 748,11 [M+H]⁺ 746,15 [M-H]⁻

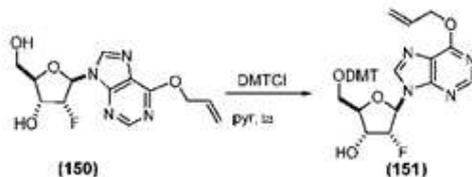
Para Compuesto 19: LCMS: MS *m/z* 748,06 [M+H]⁺ 746,17 [M-H]⁻

Para Compuesto 20: LCMS: MS *m/z* 748,09 [M+H]⁺ 746,21 [M-H]⁻

Ejemplo 13 -- Síntesis de Compuesto 26



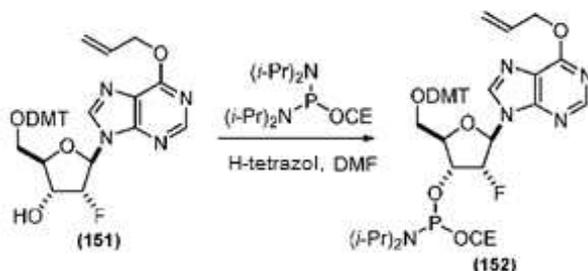
Compuesto 151



- 5 A una solución de Compuesto 150 (0,70 g, 2,256 mmol) en piridina (10,5 ml) a 0 °C se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,803 g, 2,369 mmol). La solución resultante se agitó durante la noche al tiempo que se calentaba a temperatura ambiente. Una vez completado (controlado por LCMS), se añadieron una solución saturada de NH₄Cl (10 ml) y MTBE (20 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de MTBE/EtOAc (3/1, 12 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NaCl al 30 % (5 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, 50 % a 70 % de EtOAc en n-heptano) dio 0,942 g de Compuesto 151.

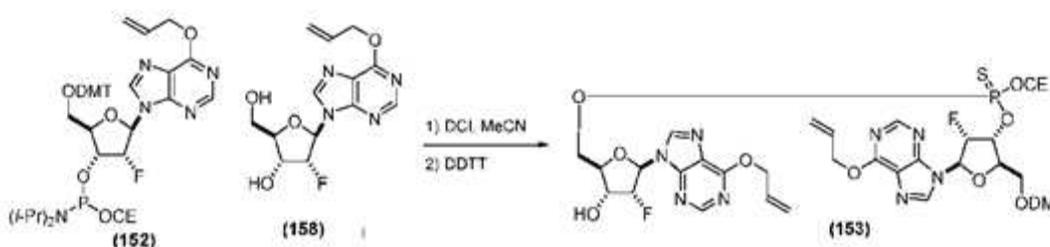
15 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,47 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,43 - 7,35 (m, 2H), 7,30 - 7,26 (m, 4H), 7,25 - 7,17 (m, 3H), 6,82 - 6,75 (m, 4H), 6,28 (dd, *J* = 2,3, 17,6 Hz, 1H), 6,22 - 6,10 (m, 1H), 5,63 (ddd, *J* = 2,7, 4,7, 53,1 Hz, 1H), 5,47 (qd, *J* = 1,4, 17,3 Hz, 1H), 5,31 (dd, *J* = 1,2, 10,6 Hz, 1H), 5,13 (t, *J* = 1,4 Hz, 1H), 5,12 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H), 4,89 - 4,76 (m, 1H), 4,21 (td, *J* = 3,2, 6,8 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,55 (dd, *J* = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,44 (dd, *J* = 4,3, 10,9 Hz, 1H), 2,29 - 2,21 (m, 1H).

Compuesto 152



A una solución de Compuesto 151 (0,942 g, 1,538 mmol) en DMF (7,5 mL) a temperatura ambiente se añadieron 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (0,927 g, 3,075 mmol), 1,2,3,4-tetrazol 0,45 M (2,8 mL, 1,2 mmol) y 1-metilimidazol (30 μ l, 0,38 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4h. Una vez completado (controlado por LCMS), se añadieron TEA (0,50 ml, 3,6 mmol), DMF (11,3 mL) y agua (1,9 mL). La mezcla resultante se extrajo tres veces con n-heptano (3 mL cada vez). La capa de DMF se diluyó con agua (4 ml) y se extrajo con una mezcla de tolueno/n-heptano (1/1, 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NaCl al 30 % (3 mL cada vez), se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación del residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 50 g, 33 % a 40 % de EtOAc en n-heptano TEA al 1%) dio 1,115 g de Compuesto 152 (mezcla diastereomérica 3:2) en forma de una espuma sólida blanca.

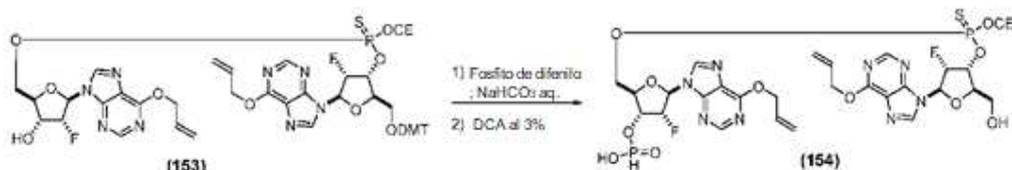
Compuesto 153



Una mezcla de Compuesto 152 (1,115 g, 1,372 mmol) y Compuesto 158 (0,650 g, 2,095 mmol) se destiló azeotrópicamente dos veces con MeCN (20 mL cada vez). Al residuo resultante se añadieron MeCN (20,0 ml) y 1H-imidazol-4,5-dicarbonitrilo (0,243 g, 2,058 mmol). Una vez completada la reacción (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se trató con (E)-N,N-dimetil-N'-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)formimidamida (0,422 g, 2,058 mmol). Tras completarse la sulfuración, se añadieron una solución saturada de $NaHCO_3$ (20 mL) y MTBE (30 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de MTBE/EtOAc (15/15 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de NaCl al 30 % (10 mL), se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación del residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 50 g, 33 % a 100 % de EtOAc en n-heptano con TEA al 1 %) dio 0,88 g de Compuesto 153.

LC/MS (ESI) m/z 1076,48 $[M+Na]^+$.

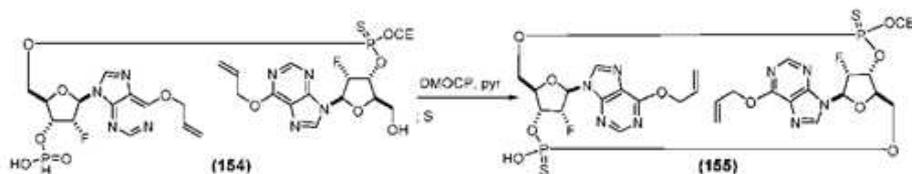
Compuesto 154



A una solución de Compuesto 153 (0,880 g, 0,835 mmol) en piridina (8,8 ml) a temperatura ambiente se añadió fosfito de difenilo (0,323 ml, 1,67 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se controló mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla se añadió a una mezcla de una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (13,2 ml) y agua (4,4 ml) al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 30 $^{\circ}C$, lavando con EtOAc (8,8 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente y la hidrólisis se controló mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla se extrajo dos veces con una mezcla de EtOAc/MTBE (1/1, 26 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NaCl al 30 % (3 ml), se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno (7 mL cada vez). El producto bruto se disolvió en diclorometano (6,6 ml) y se trató con agua (0,15 ml, 8,35 mmol,) y ácido dicloroacético al 6 % (0,41 ml, 5,0 mmol) en diclorometano (6,6 ml) a temperatura ambiente. Tras la desprotección completa de DMT (controlada por LCMS), se añadió trietilsilano (2,7 ml, 17 mmol). Después de 10 min de agitación, la mezcla resultante se trató con piridina (4,4 ml) y TEA (1 ml) y se concentró en vacío. El residuo se trituró tres veces con n-heptano (8,8 ml cada vez) y se destiló azeotrópicamente dos veces con MeCN. El producto bruto (Compuesto 154) se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

LC/MS (ESI) m/z 814,29 $[M-H]^-$.

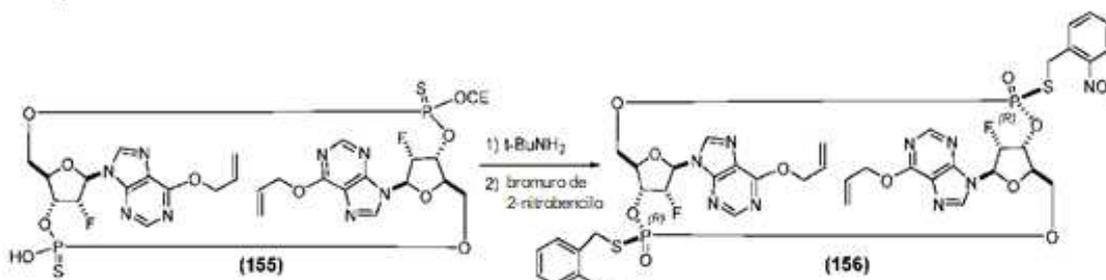
Compuesto 155



A una solución de Compuesto 154 (0,681 g, 0,835 mmol) en piridina (68 ml) a temperatura ambiente se añadió 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxaforinano-2-óxido (0,462 g, 2,505 mmol). La solución resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se controló mediante LCMS. Una vez completada, se añadieron agua (0,45 ml, 25 mmol) (10 eq de DMOCP) y azufre (0,134 g, 4,175 mmol). Tras la sulfuración completa (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se trató con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (13,6 ml) y se concentró en vacío. El residuo se trató con EtOAc (27 ml) y agua (13,6 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de EtOAc/MTBE (1/1, 27 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NaCl al 30 % (13,6 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación del residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 25 g, MeOH al 0 % a 10 % en EtOAc) dio 0,693 g (rendimiento teórico) de Compuesto 155.

LC/MS (ESI) m/z 830,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compuesto 156

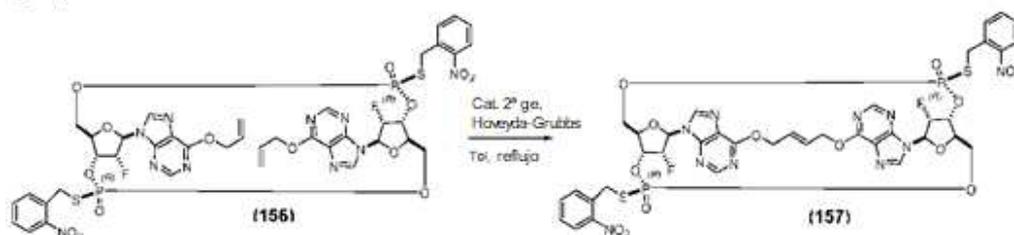


A una solución de Compuesto 155 (0,693 g, 0,835 mmol) en acetonitrilo (14 ml) a temperatura ambiente se añadió terc.-butilamina (14 ml, 131 mmol). La solución resultante se agitó durante 10 min y se controló mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente dos veces con MeCN. Al residuo se añadieron acetonitrilo (14 ml) y bromuro de 2-nitrobencilo (0,541 g, 2,51 mmol). Después de agitarla durante la noche, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 100 g, EtOAc al 75 % a 100 % en n-heptano y MeOH al 0 % a 10 % en EtOAc) para dar 0,103 g de Compuesto 156.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,59 (s, 2H), 8,05 (a d, J = 8,2 Hz, 2H), 8,03 (s, 2H), 7,58 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,48 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,45 - 7,37 (m, 2H), 6,20 (a d, J = 18,8 Hz, 2H), 6,21 - 6,08 (m, 2H), 5,98 - 5,83 (m, 2H), 5,69 (dd, J = 4,7, 52,0 Hz, 1H), 5,47 (a d, J = 17,2 Hz, 2H), 5,31 (a d, J = 10,6 Hz, 2H), 5,14 (a d, J = 5,5 Hz, 4H), 4,54 - 4,46 (m, 2H), 4,45 - 4,40 (m, 2H), 4,37 - 4,26 (m, 4H), 4,21 - 4,11 (m, 2H).

Basándose en metodología de síntesis, datos de RMN (simétricos) y tiempo de retención de HPLC (isómero de elución más lenta), la solicitante cree que compuesto 156 tiene estereoquímica de fósforo RR. Esta asignación estereoquímica estaría sujeta a confirmación mediante cristalografía de rayos X.

Ejemplo 157

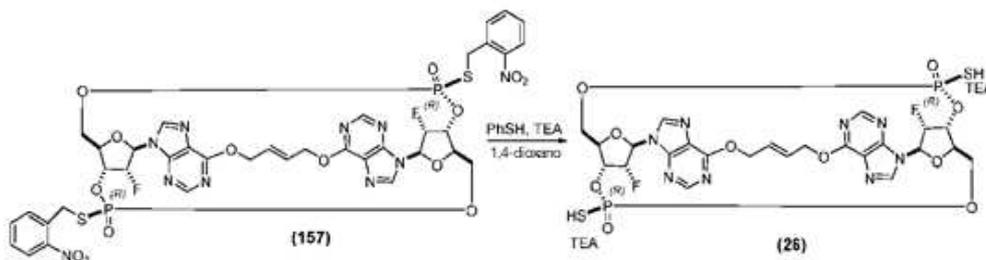


A una solución de Compuesto 156 (0,103 g, 0,098 mmol) en tolueno (103 ml) se añadió a reflujo una solución de catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación ((1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio; disponible en SIGMA-ALDRITCH® Catálogo N° 569755; CAS 301224-40-8; 31 mg,

0,049 mmol) y quinona (32 mg, 0,295 mmol) en tolueno (10 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 2 h y se añadió catalizador adicional (16 mg, 0,025 mmol). Una vez completada, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con DMSO (0,14 ml, 2,0 mmol) durante la noche. La mezcla resultante se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, metanol al 0 % a 10 % en EtOAc) para dar el producto deseado, que se purificó ulteriormente mediante TLC prep (EtOAc) para dar 3,6 mg de compuesto 157.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,11 (dd, *J* = 1,2, 8,2 Hz, 2H), 8,09 (s, 2H), 7,68 (s, 2H), 7,67 - 7,58 (m, 4H), 7,52 - 7,48 (m, 2H), 6,26 (d, *J* = 17,6 Hz, 2H), 6,02 - 5,97 (m, 2H), 5,97 - 5,88 (m, 2H), 5,68 (dd, *J* = 3,9, 50,8 Hz, 2H), 5,15 (a d, *J* = 10,9 Hz, 2H), 4,99 (a d, *J* = 10,9 Hz, 2H), 4,56 - 4,44 (m, 8H), 4,25 (a t, *J* = 6,1 Hz, 2H).

Compuesto 26

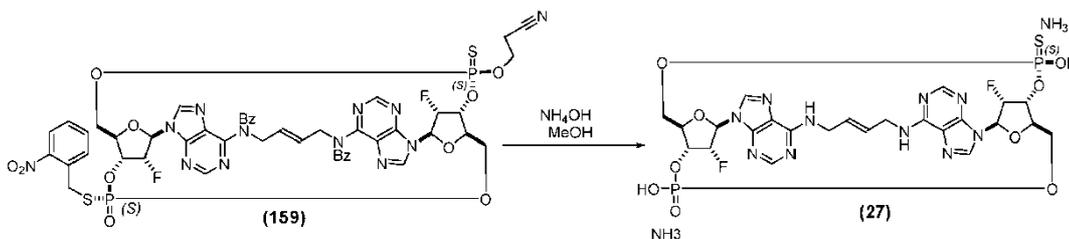


A Compuesto 157 (3,6 mg, 3,5 μmol) se añadieron 1,4-dioxano (0,11 mL), tiofenol (0,045 mL, 0,44 mmol) y TEA (0,054 mL, 0,39 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada la conversión, se añadió agua (0,5 mL). La mezcla resultante se extrajo tres veces con una mezcla de n-heptano/tolueno (1/1, 0,4 mL cada vez) y luego tolueno (0,3 mL). La capa acuosa se concentró en vacío y se trató con agua (0,5 mL). El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con agua (0,5 mL). La liofilización de los filtrados combinados dio 2,0 mg de sal de bis-TEA Compuesto 26 en forma de un sólido en espuma blanca.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,67 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,41 (d, *J* = 14,8 Hz, 2H), 6,07 - 6,01 (m, 2H), 5,56 (dd, *J* = 3,1, 51,2 Hz, 2H), 5,48 - 5,41 (m, 2H), 5,08 (a d, *J* = 12,1 Hz, 2H), 4,99 - 4,88 (m, 2H), 4,52 (a d, *J* = 12,5 Hz, 2H), 4,40 (a d, *J* = 9,8 Hz, 2H), 3,98 (dd, *J* = 5,7, 12,3 Hz, 2H), 3,14 (c, *J* = 7,4 Hz, 12H), 1,27 (t, *J* = 7,4 Hz, 18H).

Ejemplo 15 -- Síntesis de Compuesto 27

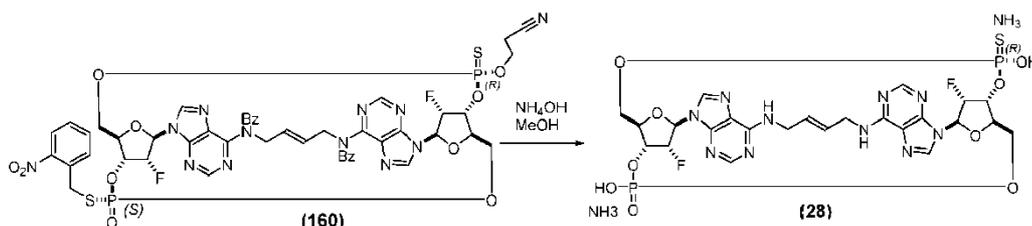
Compuesto 27 se preparó a partir de Compuesto 159, un subproducto en la Etapa 11b de una ruta para Compuesto 1 mostrada en la FIG. 2B.



A una solución de Compuesto 159 (2,0 g, 1,75 mmol) en metanol (24 ml) se añadió hidróxido de amonio al 28 % (12 ml). La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 5 h y se enfrió a temperatura ambiente. Una vez completada (controlado por LCMS) la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se trató con agua (20 ml) y se extrajo tres veces con una mezcla de tolueno/EtOAc (1/1, 24 mL cada vez). La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 1,0 M (3,5 ml, 3,5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y 0 °C durante 30 min. La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua (20 mL). La torta se secó en un horno de vacío a 35 °C durante la noche y se disolvió con una mezcla de NH₄OH al 28 % (2 mL) y MeOH (20 mL). La solución resultante se concentró en vacío y se trató con EtOH (4 ml) para formar una suspensión. El sólido resultante se recogió por filtración y se secó en vacío. Se obtuvieron 70 mg de Compuesto 27 en forma de un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 9,03 (s a, 1H), 8,31 (s a, 1H), 8,26 (s a, 1H), 8,13 (s a, 1H), 6,43 - 6,24 (m, 2H), 5,97 - 5,83 (m, 2H), 5,71 (a d, *J* = 51,6 Hz, 1H), 5,64 (a d, *J* = 50,0 Hz, 1H), 5,12 - 4,99 (m, 1H), 4,96 - 4,90 (m, 1H), 4,68 - 4,32 (m, 6H), 4,14 - 3,97 (m, 2H), 3,77 - 3,62 (m, 2H).

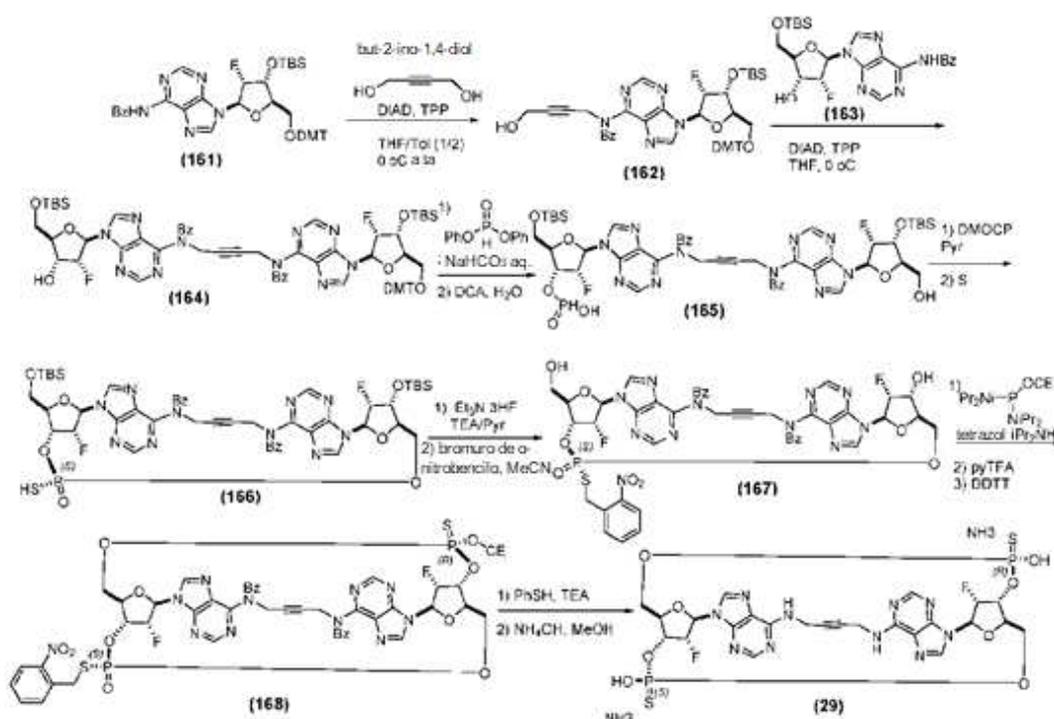
Ejemplo 16 -- Síntesis de Compuesto 28



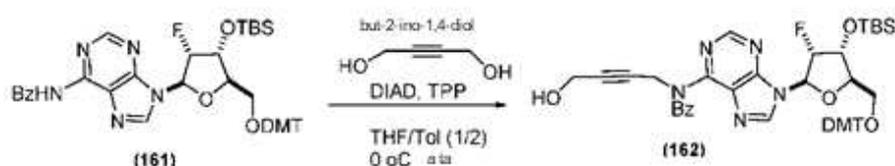
Compuesto 28 se preparó a partir de Compuesto 160, un producto en la Etapa 11 de una ruta para Compuesto 1 mostrada en la FIG. 2B, utilizando el mismo método para Compuesto 27.

5 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,70 (s a, 1H), 8,49 (s a, 1H), 8,24 (s a, 1H), 8,10 (s a, 1H), 6,52 - 6,26 (m, 2H), 5,94 - 5,78 (m, 2H), 5,69 (a d, J = 54,7 Hz, 1H), 5,48 - 5,26 (m, 1H), 5,14 (a d, J = 53,1 Hz, 2H), 5,06 - 4,94 (m, 1H), 4,74 - 4,19 (m, 4H), 4,10 - 3,93 (m, 2H), 3,76 - 3,58 (m, 2H)

10 Ejemplo 17 -- Síntesis de Compuesto 29



Compuesto 162



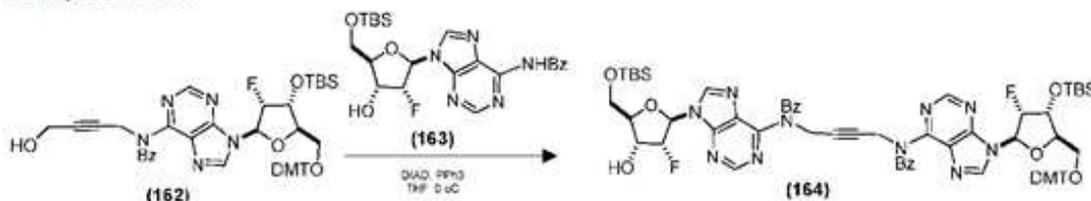
15 Compuesto 161 (5,0 g, 6,329 mmol) y but-2-ina-1,4-diol (1,907 g, 22,153 mmol) se destilaron azetrópicamente dos veces con THF. El residuo se disolvió en THF (50,0 ml) y tolueno (75 ml). Se añadió trifenilfosfina (2,158 g, 8,228 mmol) y la solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C. Se añadió gota a gota DIAD (1,60 ml, 8,23 mmol) al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 10 °C. La solución resultante se agitó a 0-5 °C mientras se controlaba el progreso mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró en vacío para eliminar la mayor parte de THF. El residuo se diluyó con MTBE (50,0 ml) y se lavó dos veces con una solución acuosa de NaCl al 30 % (40,0 ml cada vez) y dos veces con agua (25 ml cada vez). La solución orgánica se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 100 g, EtOAc al 50 % a 70 % en *n*-heptano tamponado con TEA al 1 %) para dar 4,671 g de Compuesto 162.

25

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,61 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,43 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,33 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,18 (m, 8H), 7,05 - 7,01 (m, 2H), 6,76 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 6,20 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,59 (td, J = 3,1, 53,1 Hz, 1H), 5,19 (a d, J = 2,3 Hz, 2H), 4,93 - 4,83 (m, 1H), 4,18 - 4,15 (m, 1H), 4,01 (a d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,53 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,17 (dd, J = 3,7, 11,1 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,02 (s, 3H).

5

Compuesto 164



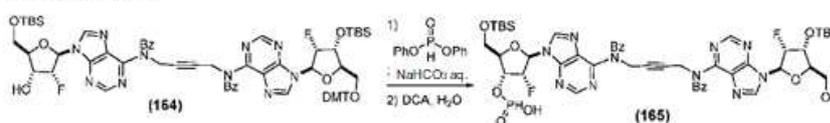
Compuesto 162 (4,671 g, 5,444 mmol), Compuesto 163 (3,32 g, 6,805 mmol) y trifetil fosfina (1,856 g, 7,077 mmol) se disolvieron en THF (56,1 ml) y se enfriaron por debajo de 5 °C. A la solución resultante se añadió DIAD (1,3 ml, 6,8 mmol) al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 10 °C. Después del consumo completo de Compuesto 162 (controlado por LCMS), la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 340 g, EtOAc al 55 % a 70 % en *n*-heptano tamponado con TEA al 1 %) para dar 3,879 g de Compuesto 164 en forma de un sólido de espuma blanca.

10

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,51 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,36 - 7,32 (m, 4H), 7,28 - 7,13 (m, 8H), 6,98 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 6,79 - 6,74 (m, 4H), 6,29 (dd, J = 2,0, 16,4 Hz, 1H), 6,19 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,53 (ddd, J = 2,7, 4,7, 53,1 Hz, 1H), 5,33 (ddd, J = 2,0, 3,9, 53,1 Hz, 1H), 5,23 - 5,21 (m, 1H), 5,05 - 5,01 (m, 2H), 4,99 - 4,94 (m, 2H), 4,81 (ddd, J = 4,3, 6,7, 16,7 Hz, 1H), 4,71 - 4,60 (m, 1H), 4,21 - 4,14 (m, 2H), 4,08 - 4,03 (m, 1H), 3,89 (dd, J = 3,1, 11,7 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 6H), 0,00 (s, 3H).

20

Compuesto 165



A una solución de Compuesto 164 (1,5 g, 1,13 mmol) en piridina (12,0 ml) se añadió fosfito de difenilo (0,35 ml, 1,8 mmol) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Tras completarse, la mezcla de reacción se añadió a una mezcla de NaHCO₃ acuosa saturada (22,5 ml) y agua (7,5 ml), al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 30 °C. Una vez completada la hidrólisis (controlada por LCMS), la mezcla resultante se extrajo dos veces con una mezcla de EtOAc/MTBE (30,0/30,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl aq al 30 % (15,0 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se destiló azeotrópicamente con tolueno tres veces y se disolvió en diclorometano (11 ml). agua (0,20 ml, 11 mmol) y ácido dicloroacético al 6 % (0,57 ml, 6,9 mmol) en diclorometano (11 ml) a temperatura ambiente. Tras la eliminación completa del grupo DMT (controlada por LCMS), se añadió trietilsilano (1,8 ml, 11 mmol). Después de 10 min de agitación, se añadió TEA (1,6 ml, 11 mmol) y la mezcla resultante se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (22,5 ml), se lavó con agua (3,8 ml) y solución acuosa saturada de NaHCO₃ (al 8 %) (3,0 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró en vacío. El producto bruto se trituró dos veces con *n*-heptano (33,8 ml) y una mezcla de *n*-heptano (9,0 ml) y tolueno (3,0 ml). El sobrenadante se separó por decantación y el sólido que quedó en el fondo se disolvió en acetonitrilo. La solución resultante se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente con acetonitrilo dos veces. El producto bruto, Compuesto 165, se utilizó para la siguiente etapa sin purificación (se supuso un rendimiento teórico del 100 %).

25

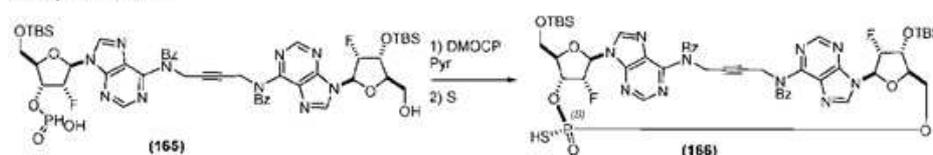
30

35

40

LC/MS (ESI) m/z 1089,74 [M+H]⁺.

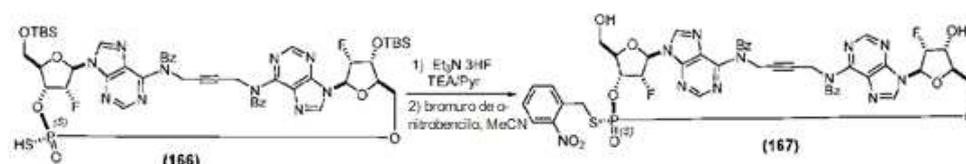
Compuesto 166



A una solución de Compuesto 165 (1,231 g, 1,13 mmol) en piridina (100 mL) a temperatura ambiente se añadieron TEA (0,47 ml, 3,4 mmol) y DMOCP (0,375 mg, 2,03 mmol). La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completado, se añadieron agua (0,41 mL, 22,6 mmol) y luego azufre (0,181 g, 5,651 mmol). Tras la sulfuración completa (controlada por LCMS), se añadieron NaHCO₃ acuosa saturada (al 8 %) (24,6 ml) y agua (10 mL). La mezcla resultante se concentró en vacío hasta ~ 50 mL y se extrajo dos veces con una mezcla de MTBE/EtOAc (31/31 ml) cada vez. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl aq al 30 % (25 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 100 g, metanol al 0 a 10 % en acetato de etilo tamponado con TEA al 1 %) para dar Compuesto 166 (0,484 g).

LC/MS (ESI) *m/z* 1103,65 [M+H]⁺.

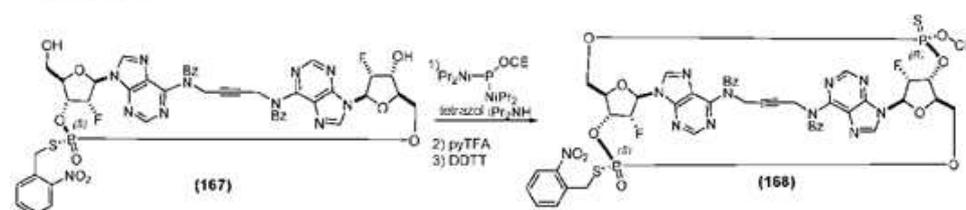
Compuesto 167



A una solución de Compuesto 166 (0,484 g, . 402 mmol) en piridina (1,2 ml) y TEA (5,8 ml) a temperatura ambiente se añadió Et₃N 3HF (0,581 ml, 3,563 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada la conversión, se añadió metoxitrimetilsilano (3,9 ml, 28 mmol). Después de 20 min de agitación a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante. Al residuo se añadió tolueno (5 mL) y después de 10 min de agitación, se decantó la capa de tolueno. La misma operación se repitió una vez más. El producto bruto resultante se disolvió en diclorometano (10 mL), se lavó con NH₄Cl acuoso saturado (al 27 % en peso) (5 ml) y NaCl aq al 30 % (2,4 ml) y se secó sobre MgSO₄. La filtración seguida de la concentración de la capa orgánica resultante dio 0,386 g de un sólido pardo pálido que se destiló azeotrópicamente con MeCN dos veces. El producto bruto resultante se disolvió en MeCN (4,6 ml) y se trató con bromuro de 2-nitrobencilo (0,103 g, 0,475 mmol) a temperatura ambiente. Una vez completada la alquilación (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, MeOH al 0 a 5 % en EtOAc) para dar 0,251 g de Compuesto 167 en forma de un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,42 (s a, 1H), 8,31 (s a, 1H), 8,22 (s a, 1H), 8,10 - 8,04 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,53 - 7,37 (m, 8H), 7,32 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,16 (m, 2H), 6,18 (a d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 6,26 - 6,14 (m, 1H), 5,56 (d, *J* = 53,1 Hz, 1H), 5,48 - 5,37 (m, 1H), 5,31 (s a, 1H), 5,15 (a d, *J* = 17,6 Hz, 1H), 4,92 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H), 4,82 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H), 4,88 - 4,77 (m, 1H), 4,76 - 4,66 (m, 1H), 4,58 - 4,33 (m, 3H), 4,29 (a d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,21 (s a, 1H), 4,13 - 4,06 (m, 1H), 3,93 - 3,79 (m, 2H).

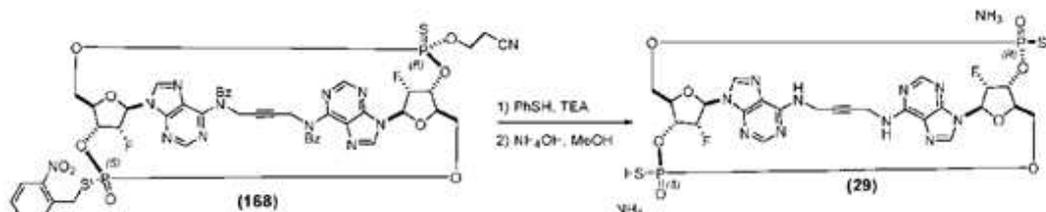
Compuesto 168



Compuesto 167 (0,224 g, 0,222 mmol) y 3-(bis(diisopropilamino)fosfinooxi)propanonitrilo (0,081 ml, 0,255 mmol) se disolvieron en MeCN (5 mL) y se concentraron. La misma operación se repitió dos veces más. La mezcla resultante se disolvió en diclorometano (2,2 ml), se enfrió a 0 °C y se trató con tetrazoluro de diisopropilamonio (0,019 g, 0,111 mmol). La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente a lo largo de la noche y se diluyó con MeCN (2,2 mL). La solución resultante se añadió a lo largo de 10 h mediante una bomba de jeringa a una solución de sal de trifluoroacetato de piridina (0,129 g, 0,665 mmol) en MeCN (18 ml). Después de 1 h adicional de agitación, se añadió 3-(bis(diisopropilamino)fosfinooxi)propanonitrilo (0,04 mL, 0,12 mmol) en MeCN (1 mL) a lo largo de 4 h. Se añadió (E)-N,N-dimetil-N'-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)formimidamida (0,064 g, 0,311 mmol). Tras la sulfuración completa (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se concentró en vacío y el residuo resultante se recogió con MTBE (4,5 ml). La solución orgánica resultante se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (al 8 %) (4 ml) y agua (2 ml). Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con una mezcla de MTBE/EtOAc (4/4 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con NaCl acuoso al 30 % (2 mL cada vez), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, EtOAc al 50 % a 100 % en n-heptano) para dar 64 mg de Compuesto 168.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,57 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,06 - 8,01 (m, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,62 - 7,56 (m, 2H), 7,55 - 7,50 (m, 2H), 7,49 - 7,43 (m, 3H), 7,42 - 7,34 (m, 2H), 7,30 - 7,18 (m, 5H), 6,33 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 6,10 (d, J = 20,7 Hz, 1H), 5,95 - 5,77 (m, 1H), 5,54 (dd, J = 4,3, 52,8 Hz, 1H), 5,46 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,32 - 5,18 (m, 1H), 5,10 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,85 - 4,81 (m, 2H), 4,78 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,64 (a dd, J = 4,1, 9,2 Hz, 1H), 4,55 (dd, J = 2,7, 12,1 Hz, 1H), 4,52 - 4,44 (m, 3H), 4,38 - 4,20 (m, 4H), 2,75 (td, J = 6,3, 17,6 Hz, 1H), 2,58 (td, J = 5,9, 17,2 Hz, 1H).

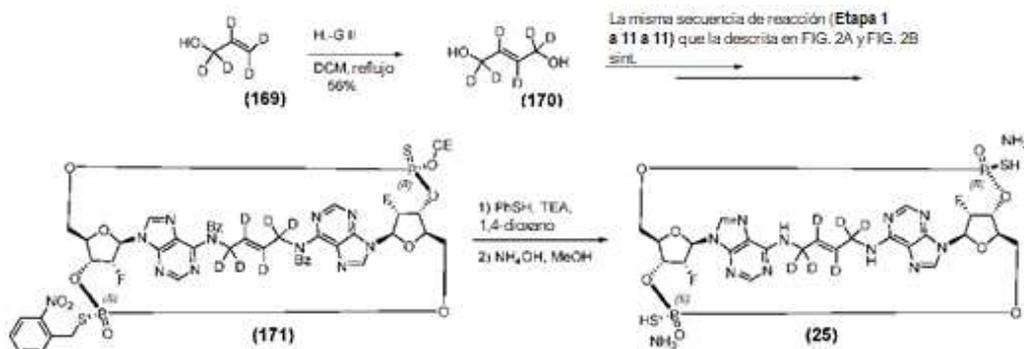
Compuesto 29



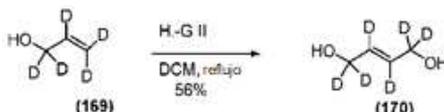
10 A una solución de Compuesto 168 (40 mg, 0,035 mmol) en 1,4-dioxano (0,5 mL) se añadieron tiofenol (0,24 ml, 2,3 mmol) y TEA (0,24 ml, 1,7 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completado, se añadieron metanol (0,64 ml) e hidróxido de amonio al 28 % (0,64 ml). La mezcla resultante se calentó a 50 °C, se agitó durante 5 h y se enfrió a temperatura ambiente. Una vez completada la desprotección (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se trató con agua (0,80 ml) y se extrajo tres veces con una mezcla de n-heptano/tolueno (1/1, 0,5 mL cada vez) y luego con tolueno (0,3 ml). La capa acuosa se concentró en vacío a 40-50 °C y se trató con agua (1 mL). El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con agua (0,3 ml). Los filtrados combinados se trataron con HCl 1,0 M (0,07 ml, 0,07 mmol). La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua (1 mL). La torta de filtración se disolvió con una solución 2,0 M de amoniaco (1,0 ml, 2,0 mmol) en MeOH. La solución resultante se concentró en vacío hasta 0,5 mL y se trató con EtOH (0,5 ml). La misma operación se repitió dos veces más. A la solución resultante se añadió gota a gota EtOAc (0,9 mL). Se produjo la precipitación. El sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con una mezcla 4/1 de EtOAc/EtOH (0,4 mL) y se secó en vacío durante la noche a temperatura ambiente. Se obtuvieron 12 mg de Compuesto 29.

25 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,88 (s a, 1H), 8,50 (s a, 1H), 8,20 (s a, 1H), 8,12 (s a, 1H), 6,42 - 6,17 (m, 2H), 5,84 - 5,54 (m, 1H), 5,52 (d, J = 51,6 Hz, 1H), 5,06 - 4,78 (m, 2H), 4,77 - 4,55 (m, 3H), 4,49 (a d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,42 (s a, 2H), 4,09 - 3,77 (m, 4H).

Ejemplo 18 -- Síntesis de Compuesto 25



Compuesto 170

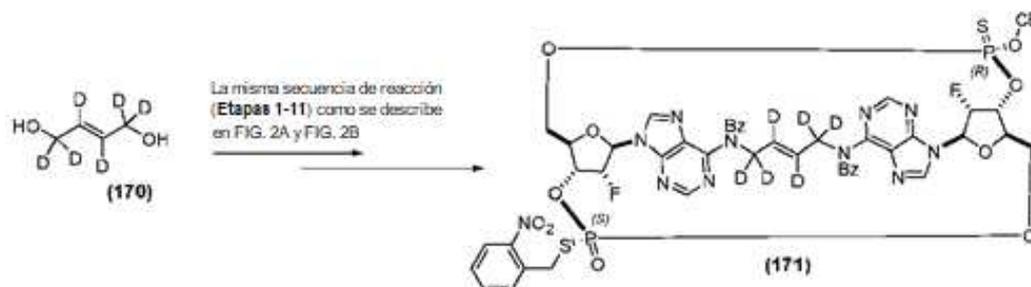


35 A una solución de catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (0,996 g, 1,585 mmol) en diclorometano (40,0 ml) a reflujo se añadió prop-2-en- d_5 -1-ol (10,0 g, 158 mmol). Después de 1 h, se añadió 1 % en moles de catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación adicional (0,996 g, 1,585 mmol). La solución resultante se agitó a reflujo durante la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 340 g

40 MeOH al 0 % a 10 % en EtOAc) para dar 4,2 g de Compuesto 170 en forma de un aceite pardo.

^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ = 130,87 (t, J = 23,8 Hz, 2C), 62,22 (quin, J = 21,9 Hz, 2C).

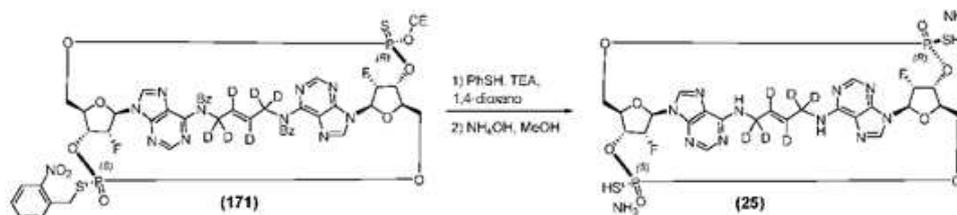
Compuesto 171



5 Con Compuesto 170 como material de partida, el compuesto Compuesto 171 se preparó mediante la misma secuencia de reacción (Etapas 1 a 11) que se describe en la ruta de síntesis para Compuesto 1 en la FIG. 2A y la FIG. 2B.

10 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,59 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,02 - 7,96 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,58 - 7,50 (m, 2H), 7,48 - 7,37 (m, 5H), 7,34 - 7,27 (m, 2H), 7,24 - 7,14 (m, 4H), 6,90 (s, 1H), 6,28 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 6,14 - 6,03 (m, 1H), 5,97 - 5,81 (m, 1H), 5,49 (dd, J = 4,7, 52,3 Hz, 2H), 5,43 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,30 - 5,15 (m, 1H), 4,75 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,61 (a dd, J = 4,3, 9,4 Hz, 1H), 4,53 (dd, J = 2,9, 11,9 Hz, 1H), 4,47 - 4,41 (m, 3H), 4,32 - 4,18 (m, 4H), 2,79 (td, J = 7,0, 17,2 Hz, 1H), 2,66 (td, J = 6,3, 16,8 Hz, 1H)

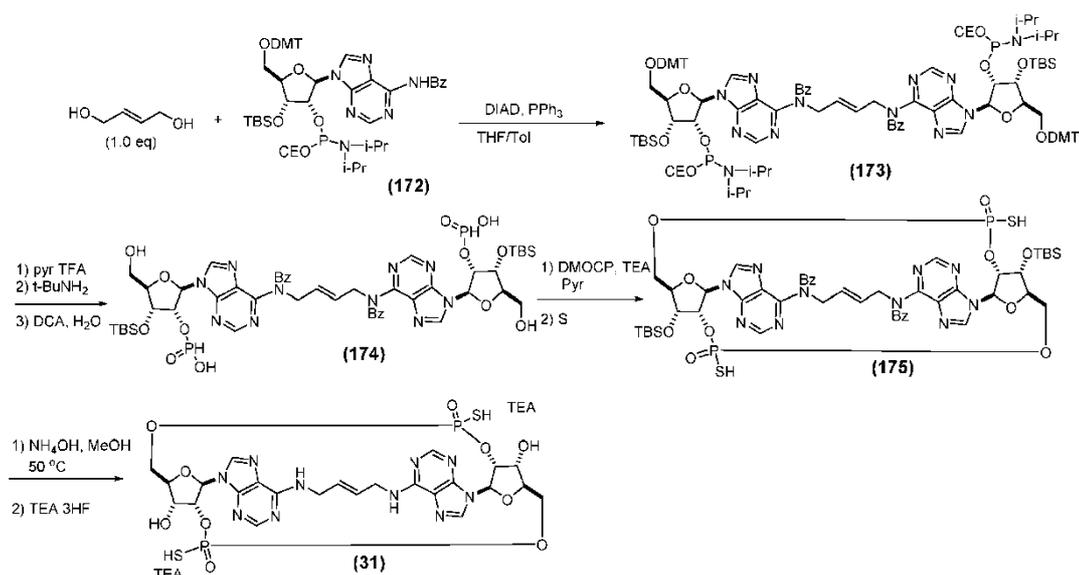
Compuesto 25



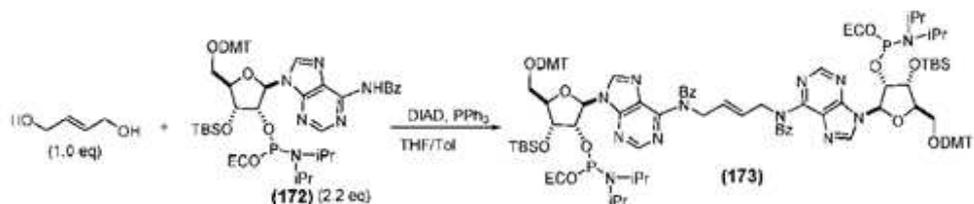
15 Con Compuesto 171 como material de partida, Compuesto 25 se preparó mediante la misma secuencia de reacción (Etapas 12-13) que se describe en la FIG. 2A y la FIG. 2B.

20 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ = 9,03 (s a, 1H), 8,30 (s a, 1H), 8,24 (s a, 1H), 8,10 (s a, 1H), 6,44 - 6,13 (m, 2H), 0,00 (d, J = 52,4 Hz, 1H), 0,00 (d, J = 51,2 Hz, 1H), 4,71 - 4,32 (m, 6H), 4,09 - 3,98 (m, 1H), 3,97 - 3,87 (m, 1H).

Ejemplo 19 - Síntesis de Compuesto 31 (ya sea RpRp o SpSp)

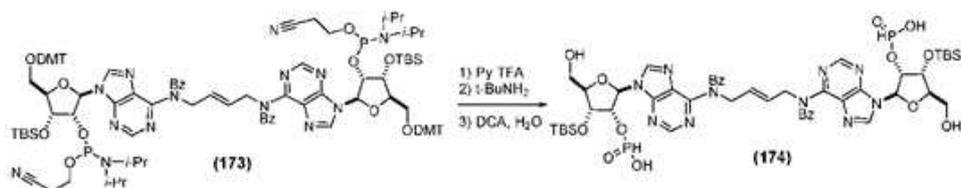


Compuesto 173



Una mezcla de (E)-but-2-eno-1,4-diol (0,10 g, 1,135 mmol) y Compuesto 172 (2,52 g, 2,55 mmol) se destiló azeotrópicamente con THF dos veces y se disolvió en THF (5,0 ml) y tolueno (7,5 ml). A la solución resultante se añadió trifetilfosfina (0,714 g, 2,724 mmol). La solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C y se trató con DIAD (0,53 ml, 2,72 mmol) al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 10 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó durante la noche al tiempo que se calentaba a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 50 g pretratado con TEA al 1 % en n-heptano/EtOAc (1/1), EtOAc al 50 % a 66 % en n-heptano) para dar 2,46 g de Compuesto 173 en forma de una espuma sólida blanca. Este material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

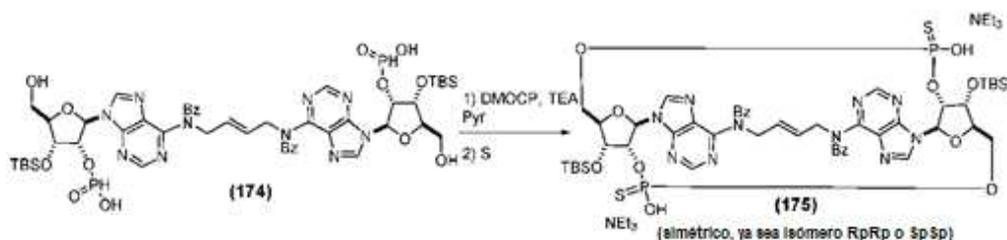
Compuesto 174



A una solución de Compuesto 173 (2,387 g, 1,177 mmol) en acetonitrilo (28,6 ml) se añadió agua (0,085 ml, 4,7 mmol), y sal trifluoroacetato de piridina (0,500 g, 2,589 mmol) a temperatura ambiente. Después de 1 min, se añadió 2-amino-2-metilpropano (19,1 ml, 182 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente con MeCN. El residuo se disolvió en diclorometano (24 mL) y se trató con agua (0,42 ml) y ácido dicloroacético al 6 % (1,2 ml, 14 mmol) en diclorometano (24 ml). Tras la desprotección completa de DMT (controlada por LCMS), la reacción se extinguió con piridina (12 ml) y la mezcla de reacción se concentró en vacío. El residuo resultante se trató con una mezcla de n-heptano/tolueno (15/15 ml) y se decantó la capa superior. La misma operación se repitió una vez más. El secado del residuo restante en vacío dio Compuesto 174, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

LC/MS (ESI) m/z 1151,64 [M+H]⁺.

Compuesto 175

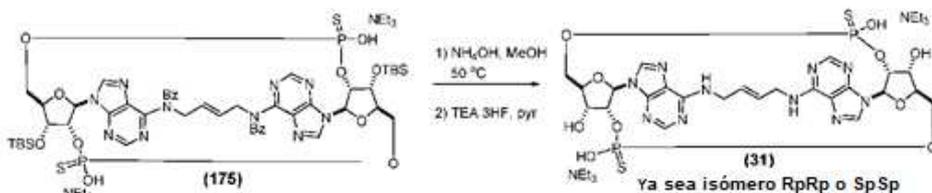


A una solución de Compuesto 174 (1,355 g, 1,177 mmol) en 2-óxido piridina (271 ml) a temperatura ambiente se añadió TEA (0,98 ml, 7,1 mmol) y 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxaforinano2-óxido (0,869 g, 4,708 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió todo el material de partida (controlado por LCMS). Una vez completada la reacción, se añadieron agua (0,85 ml, 47 mmol) (10 eq de DMOCP) y luego azufre (0,377 g, 11,77 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba por LCMS. Al completarse la sulfuración, la mezcla de reacción se trató con NaHCO₃ saturado acuoso (27 ml) y agua (10 mL) y se concentró en vacío. Al residuo resultante se añadieron una mezcla de MTBE/EtOAc (34/34 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (27 ml) y agua (20 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de EtOAc/MTBE (34/34 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NaCl al 30 % (7 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 50 g, MeOH al 0 % a 20 % en EtOAc con TEA al 1 %) para dar 56 mg del Compuesto 175 (simétrico basado en RMN; isómero RpRp o SpSp).

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 9,09 (s, 2H), 8,46 (s, 2H), 7,56 - 7,05 (m, 10H), 6,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,28 - 6,22 (m, 2H), 5,29 (ddd, J = 4,7, 7,8, 11,7 Hz, 2H), 5,00 (a d, J = 13,7 Hz, 2H), 4,84 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,76 (a d, J = 13,3 Hz, 2H), 4,31 (s a, 2H), 4,28 - 4,20 (m, 2H), 4,16 - 4,08 (m, 2H), 3,00 - 2,77 (m, 12H), 1,12 - 0,99 (m, 18H), 0,96 (s, 18H), 0,34 (s, 6H), 0,25 (s, 6H).

5

Compuesto 31

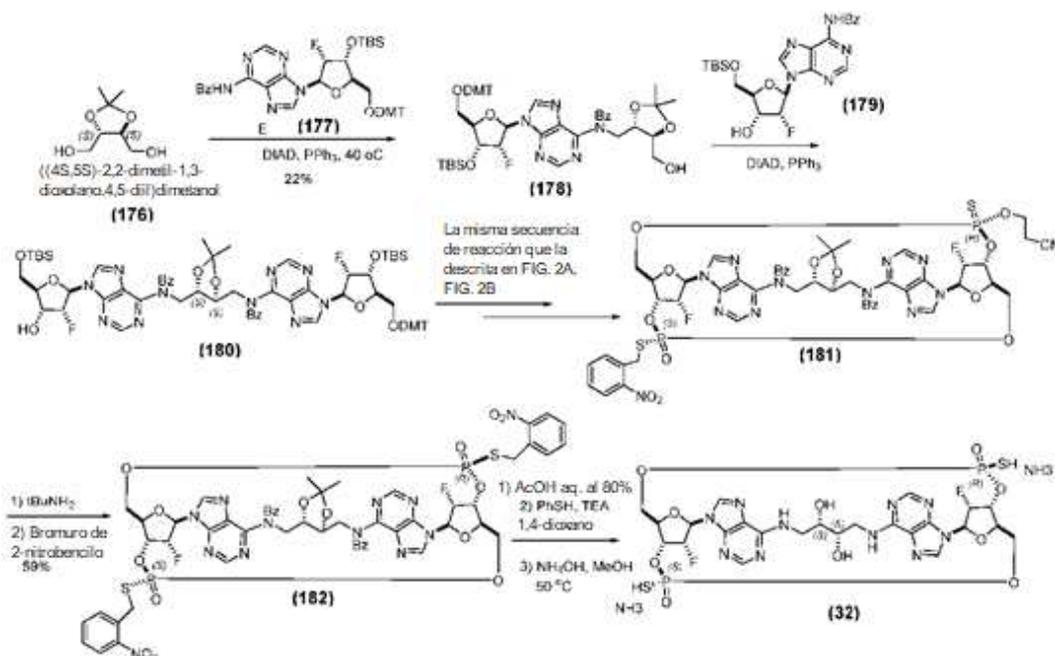


A una solución de Compuesto 175 (56 mg, 0,0405 mmol) en metanol (1,1 mL) se añadió hidróxido de amonio al 28 % (0,22 mL). La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 5 h, se enfrió a temperatura ambiente, se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente con MeCN dos veces. Al residuo resultante se añadió piridina (0,22 mL), TEA (0,11 mL) y TEA 3HF (0,11 ml, 0,69 mmol). La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 5 h, se enfrió a temperatura ambiente y se trató con metoxitrimetil silano (0,90 mL, 6,50 mmol) durante 30 min. La mezcla resultante se concentró en vacío y se disolvió en agua (5 mL). La solución acuosa resultante se extrajo tres veces con tolueno (5 mL cada vez) y se concentró en vacío. El producto bruto se disolvió en 1 mL de agua, se filtró a través de un filtro de jeringa y se acidificó con HCl 1 N para hacer un pH < 3. La mezcla resultante se mantuvo en un refrigerador (5 °C) durante 2 días y el sólido resultante se recogió por filtración. El sólido se disolvió en NH_3 2 M en MeOH (1,5 ml) y se concentró en vacío para dar 2,8 mg de Compuesto 31 en forma de una mezcla de NH_3 y sal TEA. El producto se disolvió en EtOH (1 mL), se trató con 0,1 ml de TEA, se concentró a 0,5 ml y se mantuvo en un congelador (-20 °C) durante la noche. Se eliminó el sobrenadante y el sólido restante se secó adicionalmente en vacío para dar 0,8 mg de sal bis TEA Compuesto 31 (simétrico por RMN; isómero RpRp o SpSp).

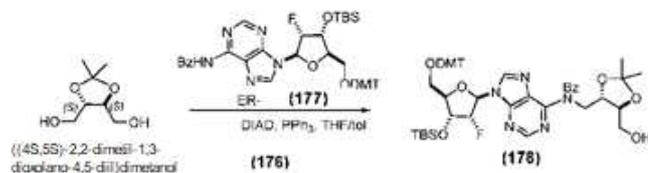
^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,26 - 7,83 (m, 4H), 6,37 (s a, 2H), 5,89 (s a, 2H), 5,36 - 5,07 (m, 2H), 4,95 (a d, J = 3,5 Hz, 2H), 4,58 (a dd, J = 6,3, 10,6 Hz, 2H), 4,43 (s a, 2H), 4,12 - 4,00 (m, 4H), 3,89 - 3,70 (m, 2H), 3,19 (c, J = 7,2 Hz, 12H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 18H)

25

Ejemplo 20 -- Síntesis de Compuesto 32



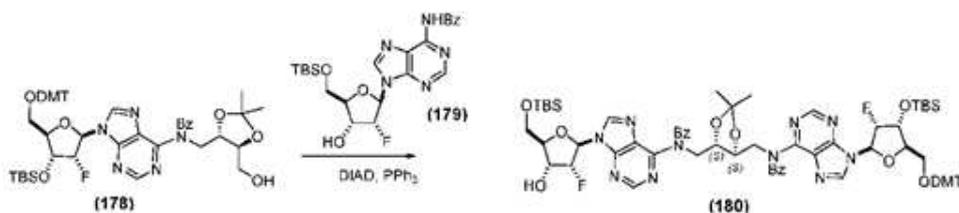
Compuesto 178



A una solución de Compuesto 177 (2,0 g, 2,532 mmol) y (+)-2,3-O-isopropilideno-L-treitol (Compuesto 176) (1,232 g, 7,595 mmol) en THF (20,0 ml) y tolueno (30,0 ml) se añadió trifenilfosfina (0,930 g, 3,544 mmol). La solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C y se trató con DIAD (0,64 ml, 3,3 mmol). La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente. Después de agitar durante 8 h a temperatura ambiente, se añadieron DIAD adicional (0,64 mL) y PPh₃ (0,93 g). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 2 días y se concentró en vacío. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 100 g pretratado con TEA al 1 % en n-heptano/EtOAc (1/1), EtOAc al 50 % a 70 % en n-heptano) dio 0,524 g de Compuesto 178 en forma de un sólido en espuma blanca.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,62 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,40 - 7,09 (m, 12H), 7,01 - 6,92 (m, 2H), 6,80 - 6,73 (m, 4H), 6,16 (dd, *J* = 2,7, 16,8 Hz, 1H), 5,49 (ddd, *J* = 3,1, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 4,85 - 4,75 (m, 2H), 4,63 (dd, *J* = 3,9, 14,8 Hz, 1H), 4,30 - 4,19 (m, 2H), 4,18 - 4,12 (m, 1H), 3,94 (tt, *J* = 3,5, 8,2 Hz, 1H), 3,84 (td, *J* = 5,5, 12,1 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,53 (dd, *J* = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,17 (dd, *J* = 3,5, 10,9 Hz, 1H), 2,94 (a t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 0,89 (s, 6H), 0,83 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), -0,01 (s, 3H)

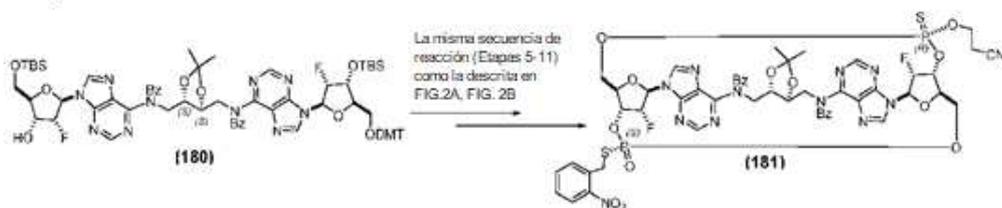
Compuesto 180



A una solución de Compuesto 178 (0,409 g, 0,84 mmol) en THF (6 mL) se añadieron trifenilfosfina (0,191 g, 0,728 mmol) y DIAD (0,142 ml, 0,728 mmol). Después de agitar durante 40 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂ 50 g pretratado con TEA al 1 % en n-heptano/EtOAc (1/1), EtOAc al 50 % a 66 % en n-heptano) para dar 0,533 g de Compuesto 180.

LC/MS: LRMS (ESI) *m/z* 1403,86 [M+H]⁺.

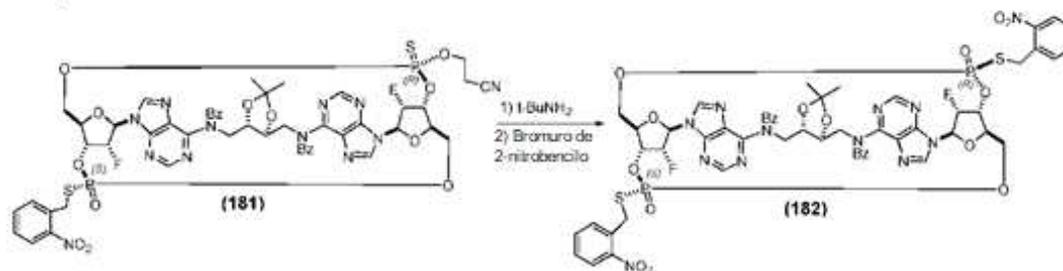
Compuesto 181



Con Compuesto 180 como material de partida, Compuesto 181 se preparó mediante la misma secuencia de reacción (Etapas 5-11) que se describe en la FIG. 2A y la FIG. 2B.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,72 (s, 1H), 8,14 - 8,06 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,62 - 7,53 (m, 6H), 7,53 - 7,45 (m, 1H), 7,43 - 7,33 (m, 2H), 7,30 - 7,24 (m, 3H), 7,19 - 7,12 (m, 2H), 6,11 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 6,05 (d, *J* = 19,5 Hz, 1H), 5,89 (dd, *J* = 3,5, 52,3 Hz, 1H), 5,57 - 5,46 (m, 1H), 5,41 (dd, *J* = 3,5, 53,1 Hz, 1H), 5,18 - 5,04 (m, 1H), 4,83 (dd, *J* = 4,7, 14,4 Hz, 1H), 4,78 - 4,73 (m, 1H), 4,70 (a d, *J* = 12,1 Hz, 1H), 4,64 - 4,48 (m, 4H), 4,46 - 4,35 (m, 4H), 4,33 - 4,27 (m, 2H), 4,16 - 4,06 (m, 2H), 4,05 - 3,96 (m, 1H), 2,55 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 1,26 (s, 6H).

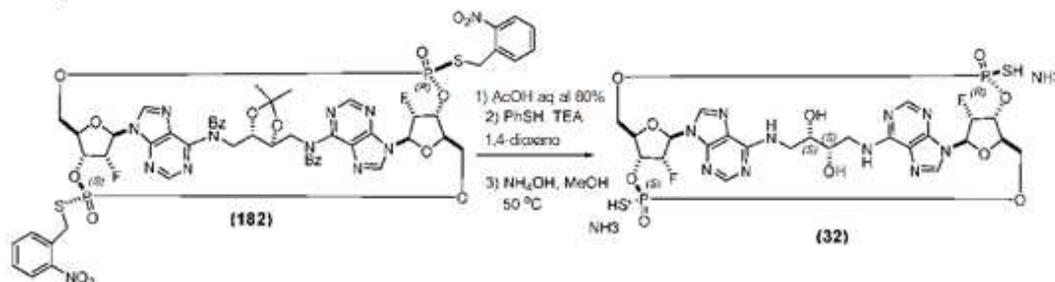
Compuesto 182



A una solución de Compuesto 181 (3,2 mg, 2,629 μmol) en diclorometano (0,5 ml) se añadió terc.-butilamina (0,5 ml, 4,7 mmol). Después de agitar durante 30 min, la solución de reacción se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente dos veces con MeCN. El residuo se disolvió en acetonitrilo (1 ml) y se trató con 1-(bromometil)-2-nitrobenceno (1,7 mg, 7,9 μmol). Tras la alquilación completa (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se concentró con purga de nitrógeno. La purificación del residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 4 g, EtOAc al 80 % a 100 % en n-heptano) dio 2 mg de Compuesto 182.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,12 (dd, J = 1,4, 8,0 Hz, 1H), 8,03 - 8,00 (m, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,70 - 7,29 (m, 13H), 7,21 (dt, J = 2,7, 7,6 Hz, 4H), 6,07 (d, J = 19,9 Hz, 1H), 5,94 (d, J = 21,1 Hz, 1H), 5,91 - 5,77 (m, 1H), 5,81 (dd, J = 4,3, 51,5 Hz, 1H), 5,62 - 5,49 (m, 1H), 5,54 (dd, J = 3,1, 52,7 Hz, 2H), 4,83 (c, J = 5,9 Hz, 1H), 4,72 - 4,63 (m, 2H), 4,61 - 4,28 (m, 13H), 1,42 (s, 3H), 1,28 (s, 3H).

Compuesto 32



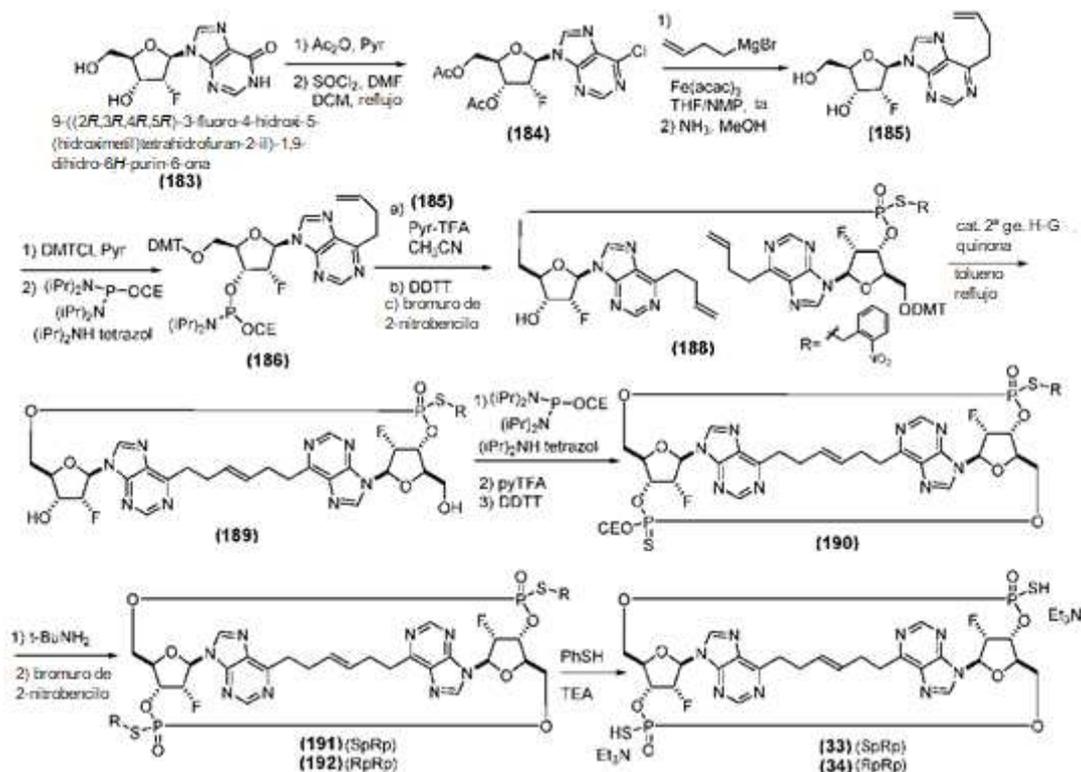
A Compuesto 182 (2,0 mg, 1,5 μmol) se añadieron ácido acético (0,8 ml) y agua (0,2 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 14 h y a 45-50 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno. Al residuo se añadieron 1,4-dioxano (0,12 mL), tiofenol (60 μl) y luego TEA (60 μl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Al completar, se añadieron metanol (160 μl) e hidróxido de amonio al 28 % (160 μl). La mezcla resultante se agitó a 50 $^{\circ}\text{C}$ hasta que se completó la desbenzilización (controlada por LCMS). Una vez completado, se añadió agua (0,3 ml). El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con agua (0,2 mL). El filtrado se extrajo dos veces con tolueno (0,5 mL cada vez) y se concentró en vacío a 40-50 $^{\circ}\text{C}$. El residuo se trató con agua (0,5 mL) y el sólido resultante se filtró y se lavó con agua (0,1 mL). La purificación por HPLC de las capas acuosas combinadas bajo las condiciones descritas a continuación dio 1,5 mg de Compuesto 32.

LC/MS: LRMS (ESI) m/z 781,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

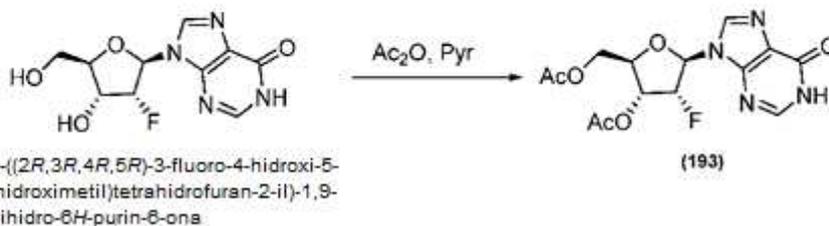
Condiciones de HPLC preparativa para Compuesto 32:

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC
Columna de HPLC	Waters XTerra C18, 10 x 100 mm, n $^{\circ}$ 1414
Caudal:	3,0 ml/min
Temperatura de la columna	35 $^{\circ}\text{C}$
fase móvil	A: NH_4OH al 0,1% en agua, B: NH_4OH al 0,1% en acetonitrilo
Gradiente (% B)	0 \rightarrow 5
Tiempo de procesamiento	20 min
Volumen de inyección	50 μl (1 mg/ml en agua)
detección	UV 260 nm
Tiempos de retención	12,7 min

Ejemplo 21 -- Síntesis de Compuesto 33 y Compuesto 34



Compuesto 193



5

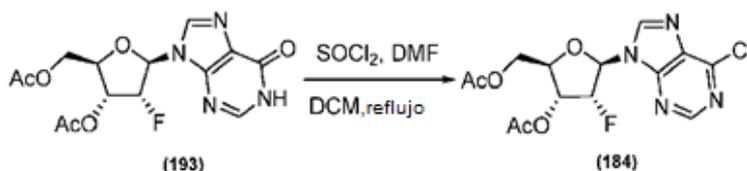
10

A una solución de 9-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona, Compuesto 183 (5.00 g, 18.5 mmol) en piridina (75 ml) a 0 °C se añadieron Ac₂O (7.0 ml, 74 mmol) y DMAP (0.565 g, 4.626 mmol). La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se trató con EtOAc (200 mL) y agua (50 ml). Se produjo la precipitación. El sólido resultante se recogió por filtración y se lavó con MTBE. El secado en vacío a 40 °C durante la noche dio 5,81 g de Compuesto 193 en forma de un sólido blanco.

15

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,53 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,15 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 6,37 (dd, J = 2,7, 19,1 Hz, 1H), 5,86 (ddd, J = 2,7, 5,1, 51,6 Hz, 1H), 5,62 (ddd, J = 5,5, 7,0, 16,0 Hz, 1H), 4,49 - 4,38 (m, 2H), 4,26 (dd, J = 4,7, 12,1 Hz, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,04 (s, 3H).

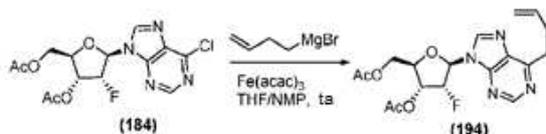
Compuesto 184



A una solución de Compuesto 193 en diclorometano (40,0 ml) a 0 °C se añadieron lentamente DMF (1,3 ml, 16,9 mmol) y cloruro de tionilo (1,28 ml, 17,5 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo y se agitó hasta que se consumió todo el material de partida (controlado por LCMS). Una vez completada, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (40 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (30 mL cada vez). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío para dar 2,81 g de Compuesto 184 en forma de un aceite pardo pálido.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,79 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 6,29 (dd, *J* = 2,0, 18,0 Hz, 1H), 5,79 (ddd, *J* = 1,6, 4,7, 51,6 Hz, 1H), 5,53 (ddd, *J* = 5,1, 7,6, 17,8 Hz, 1H), 4,58 - 4,48 (m, 2H), 4,33 (dd, *J* = 3,9, 12,5 Hz, 1H), 2,20 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).

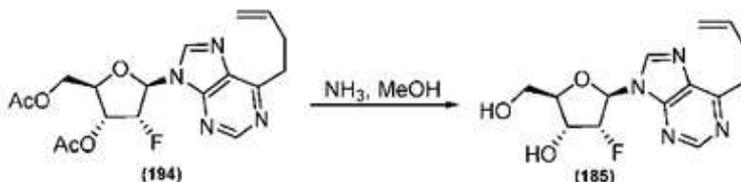
Compuesto 194



A una solución de Compuesto 184 (0,22 g, 0,59 mmol) en una mezcla de THF (7,7 ml) y NMP (0,77 ml) a temperatura ambiente se añadieron acetilacetato de hierro(III) (0,021 g, 0,059 mmol) y bromuro de 3-butenilmagnesio 0,5 M (1,77 ml, 0,885 mmol) en THF. Una vez completada la reacción (controlada por LCMS), se añadieron MTBE (10 mL) y HCl 0,1 N (10 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de EtOAc/MTBE (1/1, 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de NaCl al 30 % (5 mL), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron en vacío. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,90 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 6,26 (dd, *J* = 2,0, 18,4 Hz, 1H), 5,98 - 5,85 (m, 1H), 5,90 - 5,73 (m, 1H), 5,63 (ddd, *J* = 4,9, 7,5, 17,7 Hz, 1H), 5,12 - 5,05 (m, 1H), 4,98 (dd, *J* = 1,6, 10,2 Hz, 1H), 4,54 - 4,50 (m, 2H), 4,31 (dd, *J* = 5,1, 12,9 Hz, 1H), 3,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,70 - 2,64 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,05 (s, 3H).

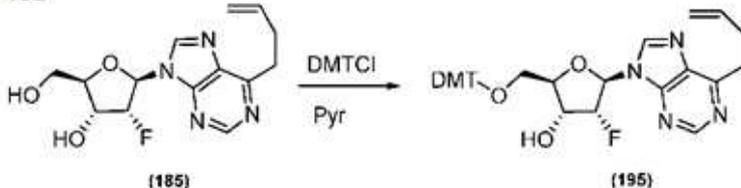
Compuesto 185



Producto bruto Compuesto 194 (0,232 g, 0,590 mmol en teoría) se disolvió en metanol (1,5 ml) y se trató con amoníaco 2,0 M (1,5 ml, 3,0 mmol) en MeOH a temperatura ambiente. Tras la desacetilación completa, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, MeOH al 0 % a 5 % en EtOAc) para dar 0,17 g de Compuesto 185.

LCMS: MS (ESI) *m/z* 309,20 [M+H]⁺

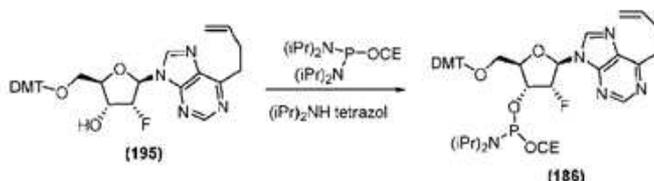
Compuesto 195



A una solución de Compuesto 185 (1,22 g, 2,928 mmol) en piridina (9,0 ml) a 0 °C se añadió 4,4'-(cloro(fenil)mileno)bis(metoxibenceno) (1,042 g, 3,075 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Al completarse, se añadieron MTBE (18 mL) y NaHCO₃ acuoso saturado (9,0 ml). Después de 10 min de agitación, las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con MTBE (18,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa al 30 % de NaCl (10 ml), se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 50 g, EtOAc al 50 % a 100 % en *n*-heptano con TEA al 1 %) dio 1,53 g de Compuesto 195 en forma de un sólido naranja.

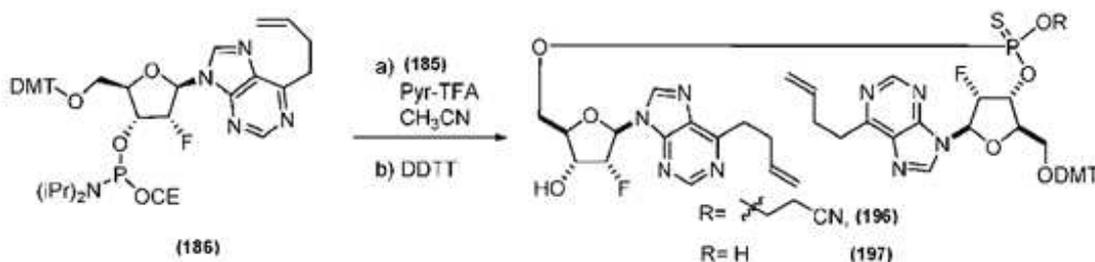
^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,86 - 8,78 (m, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,40 - 7,36 (m, 2H), 7,31 - 7,18 (m, 7H), 6,79 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 6,29 (dd, J = 2,3, 17,2 Hz, 1H), 5,92 (tdd, J = 6,4, 10,4, 17,0 Hz, 1H), 5,70 (ddd, J = 2,7, 4,7, 52,8 Hz, 1H), 5,09 (dd, J = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 4,97 (dd, J = 1,6, 10,2 Hz, 1H), 4,90 - 4,77 (m, 1H), 4,26 - 4,19 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,56 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,43 (dd, J = 4,3, 10,9 Hz, 1H), 3,33 - 3,28 (m, 2H), 2,70 - 2,64 (m, 2H), 2,20 (dd, J = 2,5, 7,2 Hz, 1H).

Compuesto 186



A una solución de Compuesto 195 (1,530 g, 2,505 mmol) en diclorometano (23 ml) a temperatura ambiente se añadieron 3-(bis(diisopropilamino)fosfinoxi)propanonitrilo (1,20 ml, 3,76 mmol) y tetrazoluro de diisopropilamonio (0,493 g, 2,881 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba el progreso mediante LCMS. Tras completar, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 50 g, EtOAc al 40 % a 66 % en *n*-heptano con TEA al 1 %) para dar 1,80 g de Compuesto 186 en forma de un sólido en espuma naranja pálida.

Compuestos 196 y 197

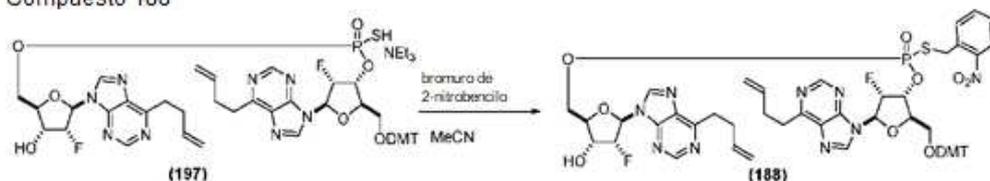


Compuesto 186 (1,8 g, 2,22 mmol) y Compuesto 185 (1,110 g, 2,664 mmol) se disolvieron en acetonitrilo (21,6 ml) y se concentraron en vacío. La misma operación se repitió una vez más. La mezcla resultante se disolvió en acetonitrilo (21,6 ml) y se trató con trifluoroacetato de piridinio (0,514 g, 2,664 mmol) a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por LCMS), se añadió ((dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazolina-3-tiona (0,911 g, 4,439 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Tras la sulfuración completa (controlada por LCMS), se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (30 ml) y la mezcla resultante se extrajo tres veces con MTBE (30 mL cada vez). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa al 30 % de NaCl (20 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 100 g, MeOH al 0 % a 10 % en EtOAc con TEA al 1 %) dio 0,481 g de Compuesto 196 y 1,315 g de Compuesto 197.

Compuesto 196: LCMS: MS (ESI) m/z 1073,25 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compuesto 197: LCMS: MS (ESI) m/z 995,23 $[\text{M}-\text{H}]^-$

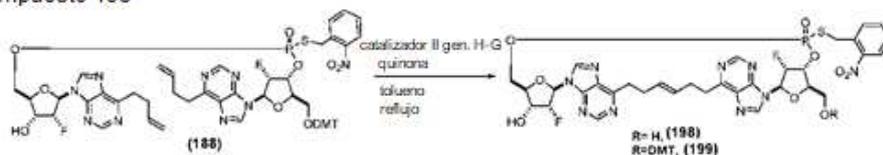
Compuesto 188



A una solución de sal TEA Compuesto 197 (1,315 g, 1,197 mmol) en MeCN (20 ml) a temperatura ambiente se añadió bromuro de 2-nitrobencilo (0,388 g, 1,796 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Al completarse, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 100 g, MeOH al 0 % a 5 % en EtOAc) para dar 0,90 g de Compuesto 188.

LCMS: MS (ESI) m/z 1154,29 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compuesto 198

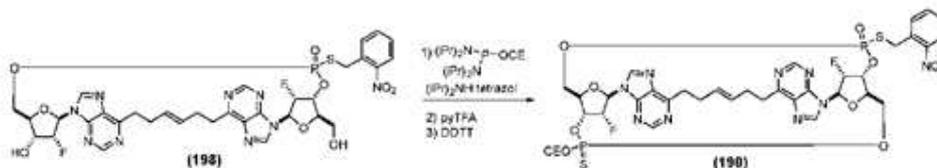


A una solución del Compuesto 188 (1,35 g, 1,192 mmol) en tolueno (540 ml) a reflujo suave (110-112 °C de T interna) se añadió una solución de Catalizador Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (0,187 g, 0,298 mmol) y quinona. (0,322 g, 2,981 mmol) en tolueno (20 mL). La solución resultante se agitó entre 110-112 °C al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Después de 4 h, se añadió catalizador adicional (0,10 g, 0,16 mmol) y se continuó agitando a reflujo. Una vez completada, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con DMSO (2,54 ml, 35,8 mmol). Después de agitar durante 3 h, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 50 g, MeOH al 0 % a 15 % en EtOAc) para dar una mezcla de Compuesto 198 y Compuesto 199. La mezcla se disolvió en diclorometano (2 mL) y se trató con agua (0,021 ml, 1,2 mmol) y ácido dicloroacético al 6 % (0,098 ml, 1,2 mmol) en diclorometano (2 mL). Después de 10 min, la reacción se extinguió con piridina (1 ml) y se concentró en vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (50 mL) y se lavó dos veces con una solución acuosa de NaCl al 30 % (15 mL cada vez) y se secó sobre MgSO₄. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 50 g, MeOH al 5 % a 10 % en DCM) dio 0,25 g de Compuesto 198.

Compuesto 199:LCMS: MS (ESI) m/z 1104,31 [M+H]⁺

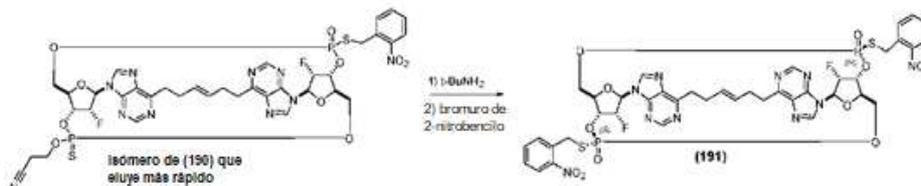
Compuesto 198:LCMS: MS (ESI) m/z 802,16 [M+H]⁺

Compuesto 190



Compuesto 198 (0,233 g, 0,291 mmol) y 3-(bis(diisopropilamino)fosfinoxi)propanonitrilo (0,111 ml, 0,349 mmol) se disolvieron en MeCN (10 mL) y se concentraron en vacío. La misma operación se repitió dos veces más. La mezcla resultante se disolvió en diclorometano (2,3 ml), se enfrió a 0-5 °C y se trató con tetrazoluro de diisopropilamonio (0,025 g, 0,145 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente a lo largo de la noche y se diluyó con acetonitrilo (2,3 ml). La solución resultante se añadió a lo largo de 7 h mediante una bomba de jeringa a una solución de sal trifluoroacetato de piridina (0,168 g, 0,872 mmol) en MeCN (18,6 ml). A continuación, se añadió 3-(bis(diisopropilamino)fosfinoxi)propanonitrilo (40 mg, 0,133 mmol) en MeCN (2 mL) a lo largo de 2 horas. Después de 1 h de agitación, se añadió (E)-N,N-dimetil-N'-(3-tioxo-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)formimidamida (0,119 g, 0,581 mmol) y la solución de reacción se agitó hasta que se completó la sulfuración (controlada por LCMS). Al completarse, la mezcla se concentró a vacío, se disolvió en MTBE (5 ml), y se trató con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (3,50 ml) y agua (1,2 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una mezcla de MTBE/EtOAc (5/3 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con solución acuosa al 30 % de NaCl (2,3 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, MeOH al 0 % a 20 % en EtOAc) dio 119 mg de Compuesto 190 (58 mg de isómeros de elución más rápida y 61 mg de isómeros de elución más lenta).

Compuesto 191 (isómero SpRp)

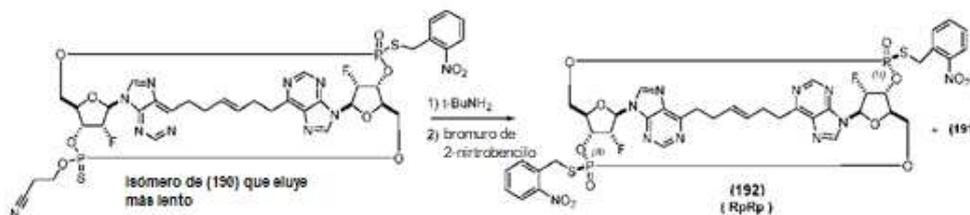


A una solución de los isómeros de elución más rápida de Compuesto 190 (58 mg, 0,062 mmol) en diclorometano (1,8 mL) se añadió terc.-butilamina (1,2 ml, 11 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió todo el material de partida (controlado por LCMS). Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró en vacío, se destiló azeotrópicamente dos veces con acetonitrilo y se disolvió en acetonitrilo (1,7 ml). A la solución resultante se añadió 1-(bromometil)-2-nitrobenceno (40,3 mg, 0,187 mmol). La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Tras la alquilación completa, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, MeOH al 0 % a 5 % en EtOAc) para dar 19 mg de Compuesto 191 (isómero SpRp).

- 5 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,42 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,13 (dd, *J* = 1,2, 8,2 Hz, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,98 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,69 - 7,67 (m, 1H), 7,61 - 7,34 (m, 5H), 6,33 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H), 6,19 (d, *J* = 19,9 Hz, 1H), 6,09 - 5,93 (m, 1H), 5,82 - 5,66 (m, 2H), 5,67 (dd, *J* = 3,5, 50,8 Hz, 1H), 5,35 - 5,32 (m, 2H), 4,62 - 4,29 (m, 11H), 3,35 - 3,28 (m, 1H), 3,18 - 3,14 (m, 2H), 3,01 - 2,91 (m, 1H), 2,84 - 2,78 (m, 1H), 2,60 - 2,49 (m, 3H).

Compuesto 192 (isómero RpRp)

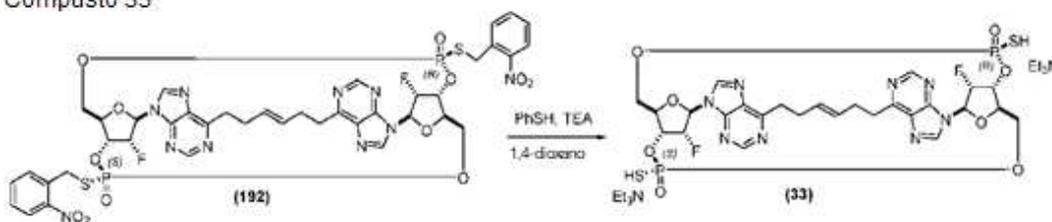


- 10 El isómero de elución más lenta de Compuesto 190 (60 mg) se procesó a través de la misma secuencia de reacción que se describe en el compuesto Compuesto 191 para dar 14 mg de Compuesto 192 y 7 mg de Compuesto 191.

- 15 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,18 (s, 2H), 8,10 (s, 2H), 8,10 (dd, *J* = 1,0, 8,0 Hz, 2H), 7,66 - 7,57 (m, 4H), 7,53 - 7,46 (m, 2H), 6,31 (d, *J* = 17,6 Hz, 2H), 6,19 - 6,05 (m, 2H), 5,84 (dd, *J* = 4,3, 50,8 Hz, 2H), 5,39 - 5,30 (m, 2H), 4,58 - 4,46 (m, 6H), 4,45 - 4,39 (m, 2H), 4,19 (ddd, *J* = 3,1, 6,3, 10,2 Hz, 2H), 3,32 (td, *J* = 3,5, 15,6 Hz, 2H), 3,06 (td, *J* = 6,3, 15,2 Hz, 2H), 2,67 - 2,57 (m, 4H).

- 20 Basándose en metodología de síntesis, datos de RMN (simétricos) y tiempo de retención de HPLC (isómero de elución más lenta) actividades biológicas de Compuesto 34, que se derivó del compuesto 192, la solicitante cree que Compuesto 192 tiene una estereoquímica de fósforo RR. Esta asignación estereoquímica estaría sujeta a confirmación mediante cristalografía de rayos X.

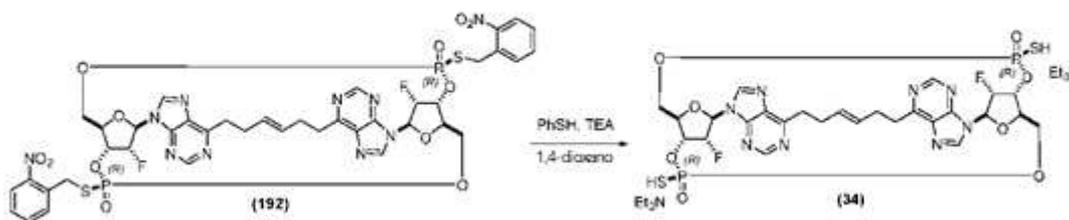
Compuesto 33



- 25 A una solución de Compuesto 192 (26 mg, 0,026 mmol) en 1,4-dioxano (0,52 ml) se añadieron tiofenol (0,26 ml, 2,5 mmol) y luego TEA (0,26 ml, 1,9 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó la desprotección (controlada por LCMS). Una vez completado, se añadió agua (2 mL). La mezcla resultante se extrajo tres veces con tolueno (2 mL cada vez). La capa acuosa se concentró en vacío a 40-50 °C y se disolvió en agua (2 mL). La mezcla resultante se extrajo cuatro veces con una mezcla de EtOAc/MTBE (1/1 ml cada vez). La capa acuosa se concentró en vacío para dar la sal bis-TEA de Compuesto 33.

- 35 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 9,06 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 6,43 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 6,38 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 6,27 (dd, *J* = 3,5, 51,1 Hz, 1H), 5,63 (dd, *J* = 2,7, 51,5 Hz, 1H), 5,30 - 5,14 (m, 2H), 5,06 - 4,91 (m, 2H), 4,58 (a d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 4,52 - 4,39 (m, 3H), 4,07 (dd, *J* = 4,7, 11,7 Hz, 1H), 3,98 (dd, *J* = 5,1, 12,5 Hz, 1H), 3,43 - 3,34 (m, 2H), 3,22 (c, *J* = 7,2 Hz, 12H), 2,98 - 2,86 (m, 2H), 2,79 - 2,45 (m, 4H), 1,32 (t, *J* = 7,4 Hz, 18H)

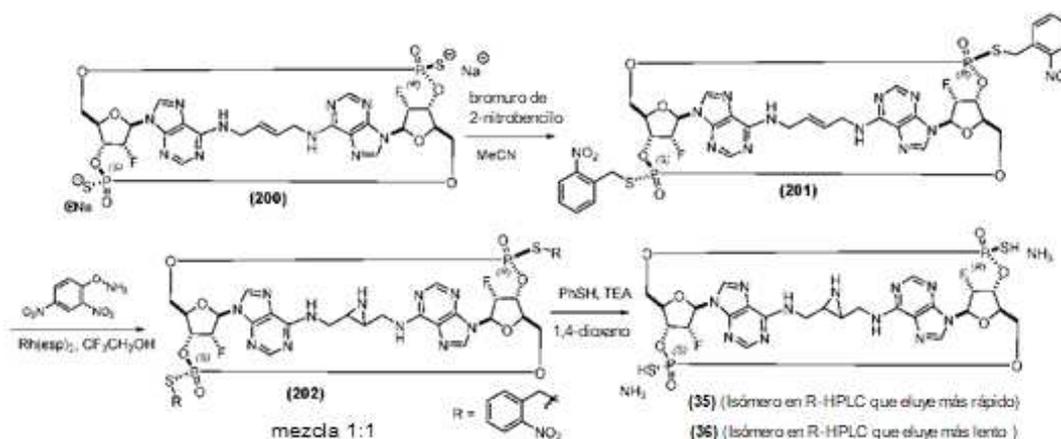
Compuesto 34



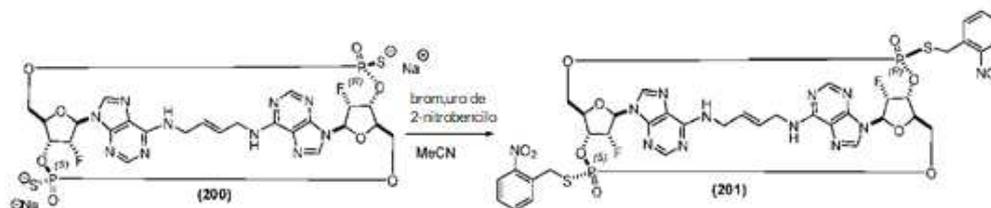
Con Compuesto 192 como un material de partida, Compuesto 34 se preparó mediante la misma secuencia de reacción que se describe en Compuesto 33.

^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,77 (s, 2H), 8,49 (s, 2H), 6,39 (d, J = 15,2 Hz, 2H), 5,71 (dd, J = 3,1, 51,2 Hz, 2H), 5,24 - 5,13 (m, 2H), 5,02 (dtd, J = 3,1, 9,0, 25,4 Hz, 2H), 4,54 (a d, J = 12,1 Hz, 2H), 4,42 (a d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,99 (dd, J = 5,9, 12,1 Hz, 2H), 3,20 (c, J = 7,3 Hz, 12H), 2,90 (ddd, J = 3,5, 10,2, 14,1 Hz, 2H), 2,81 - 2,70 (m, 2H), 2,55 - 2,43 (m, 2H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 18H).

Ejemplo 22 -- Síntesis de Compuesto 35 y Compuesto 36



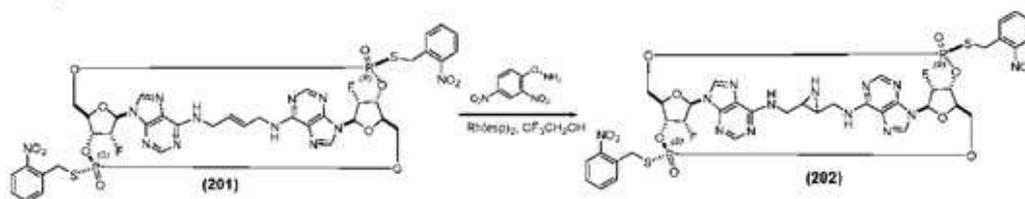
Compuesto 201



A la sal disódica de Compuesto 200 (0,10 g, 0,126 mmol) se añadieron bromuro de 2-nitrobenzilo (0,068 g, 0,316 mmol) y MeCN (2,0 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Al completarse, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, MeOH al 0 % a 5 % en DCM) para dar 115 mg de Compuesto 201.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,13 (dd, J = 0,8, 8,2 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,03 (dd, J = 1,0, 8,0 Hz, 1H), 7,80 (s a, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,70 - 7,65 (m, 1H), 7,62 - 7,54 (m, 2H), 7,53 - 7,47 (m, 2H), 7,45 - 7,39 (m, 1H), 7,34 - 7,27 (m, 1H), 6,23 (a d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,14 (a d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,95 (s a, 2H), 5,77 (td, J = 5,1, 15,2 Hz, 2H), 5,71 (td, J = 5,1, 15,6 Hz, 1H), 5,63 - 5,55 (m, 1H), 5,47 (a d, J = 11,7 Hz, 1H), 4,58 - 4,27 (m, 11H), 4,18 - 4,10 (m, 1H), 4,05 - 3,71 (m, 2H)

Compuesto 202

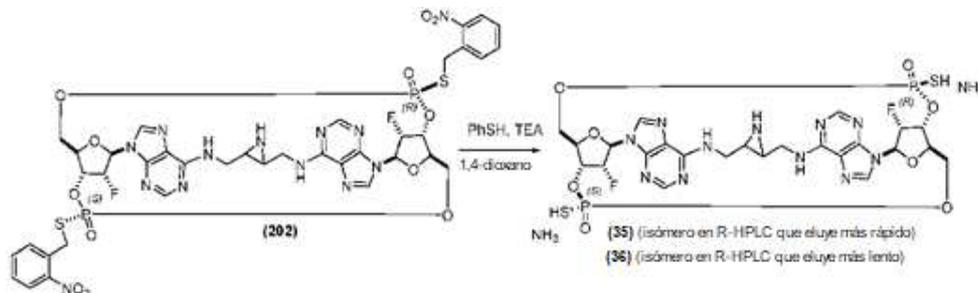


A una solución de Compuesto 201 (77 mg, 0,076 mmol) en 2,2,2-trifluoroetanol (2 ml) se añadieron en una porción O-(2,4-dinitrofenil)hidroxilamina (36,5 mg, 0,183 mmol) y ácido bis[rodio($\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetrametil-1,3-bencenodipropiónico)] (5,74 mg, 0,015 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se diluyó con DCM (10 mL) y se trató con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con DCM (10 mL cada vez). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, MeOH al 0 % a 15 % en EtOAc) para dar 3,3 mg de Compuesto 202.

LCMS: MS m/z 1032,07 [M+H]⁺

Compuesto 35 y Compuesto 36

5



A una solución de Compuesto 202 (3,3 mg, 3,2 μ mol) en 1,4-dioxano (0,40 ml) se añadieron tienol (0,2 ml, 1,9 mmol) y TEA (0,2 ml, 1,4 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada, la mezcla de reacción se trató con agua (2 mL) y se extrajo tres veces con tolueno (2 mL cada vez). La capa acuosa se concentró en vacío a 40-50 °C y se disolvió en agua (1,5 ml). El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con agua (0,5 mL). La separación por HPLC de los filtrados combinados bajo las condiciones descritas más adelante dio el Compuesto 35 (tiempo de retención: 8,4 min) y Compuesto 36 (tiempo de retención: 8,9 min).

10

15

Compuesto 35

LCMS: MS m/z 762,08 [M+H]⁺

20

Compuesto 36

LCMS: MS m/z 762,22 [M+H]⁺

Compuesto 35/Compuesto 36 Condiciones de HPLC preparativa:

Instrumento	Agilent 1200/1260 AS/FC	
Columna de HPLC	Waters XTerra C18, 10 x 100 mm, n° 3128	
Caudal:	3,0 ml/min	
Temperatura de la columna	35 °C	
fase móvil	A: Ácido fórmico al 0,1% en agua, B: Ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo	
Gradiente (% B)	0 → 50	
Tiempo de procesamiento	20 min	
Volumen de inyección	50 μ l (1 mg/ml en agua)	
detección	UV 260 nm	
Tiempos de retención	Compuesto 35	8,4 min
	Compuesto 36	8,9 min

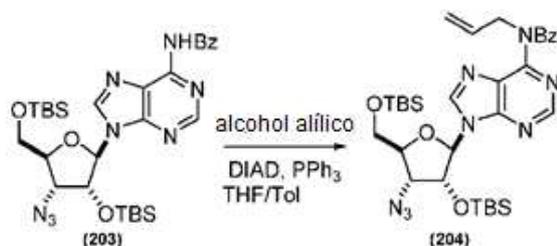
25

Ejemplo - 23 -- Síntesis de Compuesto 38 y Compuesto 39

La FIG. 13 muestran un ejemplo de síntesis de Compuesto 38 y Compuesto 39.

30

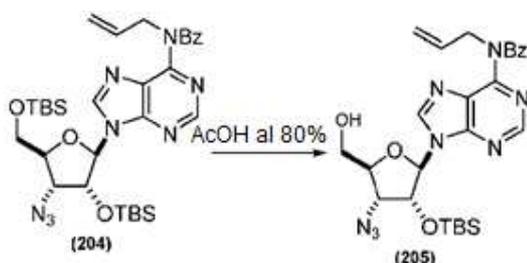
Etapa 1



5 A una solución de Compuesto 203 (5,82 g, 9,314 mmol) y alcohol alílico (0,95 ml, 14 mmol) en THF (50 mL) a 0 °C se añadió una solución de DIAD (2,4 ml, 11,6 mmol) y trifenilfosfina (2,93 g, 11,2 mmol) en tolueno (25 ml) al tiempo que la T interna se mantenía por debajo de 10 °C. La solución resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó mientras se controlaba la reacción mediante LCMS. Tras completar (5 h), la mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (100 g, EtOAc al 20 % a 60 % en n-heptano con) para dar 4,56 g de Compuesto 204 en forma de un aceite rosáceo.

10 **Compuesto 204:** ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,55 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,46 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,31 - 7,23 (m, 1H), 7,20 - 7,10 (m, 2H), 6,02 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,07 - 5,95 (m, 1H), 5,21 (dd, J = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 5,05 (dd, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 4,82 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 4,22 - 4,16 (m, 1H), 4,05 - 4,00 (m, 2H), 3,82 (dd, J = 2,5, 11,5 Hz, 1H), 0,95 (s, 9H), 0,81 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,13 (s, 3H), 0,00 (s, 3H), -0,23 (s, 3H).

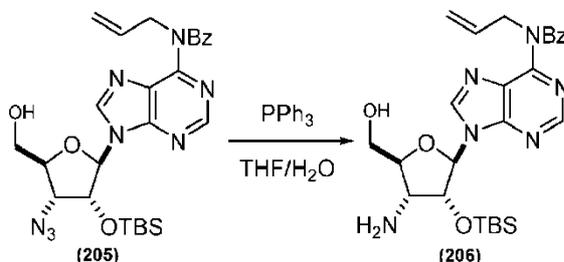
15 Etapa 2



20 A Compuesto 204 (4,56 g, 6,858 mmol) se añadieron ácido acético (80 ml) y agua (20 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y a 35 °C durante 1 día. La mezcla resultante se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 50 g, EtOAc al 33 % a 60 % en n-heptano) para dar 3,22 g de Compuesto 205 en forma de un sólido en espuma blanca.

25 **Compuesto 205:** ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,56 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,51 - 7,47 (m, 2H), 7,32 - 7,27 (m, 1H), 7,20 - 7,16 (m, 2H), 6,06 - 5,95 (m, 1H), 5,72 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 5,26 (dd, J = 5,5, 7,8 Hz, 1H), 5,20 (dd, J = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 5,06 (dd, J = 1,6, 10,2 Hz, 1H), 5,03 - 4,98 (m, 2H), 4,23 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 4,14 (s, 1H), 3,92 (dd, J = 1,6, 12,9 Hz, 1H), 3,68 (a d, J = 12,9 Hz, 1H), 0,75 (s, 9H), -0,14 (s, 3H), -0,62 (s, 3H).

30 Etapa 3

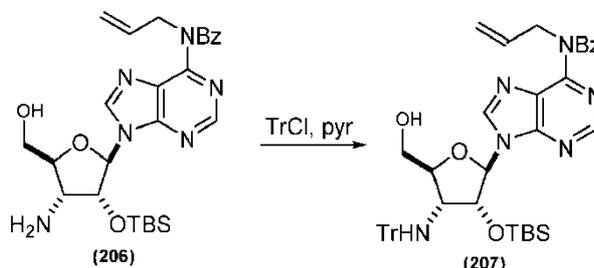


35 A una solución de Compuesto 205 (3,22 g, 5,847 mmol) en THF (120 mL) a temperatura ambiente se añadieron agua (30 ml) y trifenilfosfina (2,454 g, 9,355 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (18 h), la mezcla de reacción se concentró en vacío y se destiló azeotrópicamente tres veces con MeCN. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 (NH) 55 g, EtOAc al 20 % a 100 % en n-heptano) para dar 4,82 g de Compuesto 206 (63 % de pureza asumida). El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

40 **Compuesto 206:** ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,56 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,54 (qd, J = 1,6, 7,6 Hz, 2H), 7,31 - 7,27 (m, 1H), 7,19 - 7,15 (m, 2H), 6,07 - 5,94 (m, 1H), 5,84 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,50 (a d, J = 10,6 Hz, 1H), 5,20

(dd, $J = 1,6, 17,2$ Hz, 1H), 5,05 (dd, $J = 1,4, 10,4$ Hz, 1H), 5,02 - 4,98 (m, 2H), 4,95 - 4,91 (m, 1H), 4,16 - 4,08 (m, 2H), 3,96 (dd, $J = 1,6, 12,9$ Hz, 1H), 3,73 (dd, $J = 2,0, 5,5$ Hz, 1H), 3,73 - 3,67 (m, 1H), 0,78 (s, 9H), -0,20 (s, 3H), -0,46 (s, 3H).

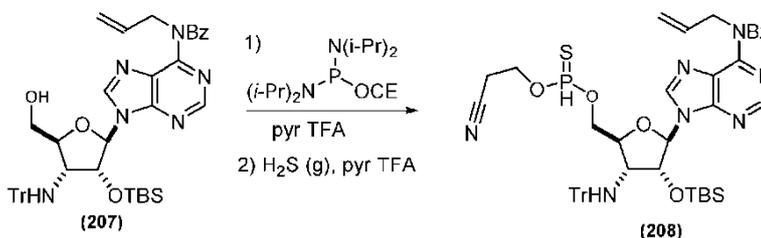
5 Etapa 4



A una solución de Compuesto 206 (4,82 g, 63 % de pureza, 5,72 mmol) en piridina (39,0 ml) a temperatura ambiente se añadieron TEA (1,3 ml, 8,6 mmol) y tritil-Cl (1,753 g, 6,289 mmol). Una vez completada la reacción (controlada por LC/MS), se añadió una solución saturada de NaHCO_3 (60 mL). La mezcla resultante se extrajo tres veces con una mezcla de MTBE/EtOAc (1/1, 70 mL cada vez). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de NaCl al 30 % (30 mL) y se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 50 g pretratado con TEA al 1 % en EtOAc/n-heptano, EtOAc al 20 % a 100 % en n-heptano TEA al 1%) dió 1,484 g de Compuesto 207 en forma de un sólido blanco.

Compuesto 207: ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) $\delta = 8,49$ (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,50 - 7,46 (m, 8H), 7,31 - 7,22 (m, 7H), 7,20 - 7,14 (m, 5H), 6,11 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 6,07 - 5,94 (m, 1H), 5,20 (dd, $J = 1,2, 17,2$ Hz, 1H), 5,06 (dd, $J = 1,4, 10,4$ Hz, 1H), 5,03 - 4,98 (m, 2H), 4,84 (dd, $J = 3,1, 10,6$ Hz, 1H), 4,52 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 3,78 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 3,64 - 3,57 (m, 1H), 3,26 - 3,16 (m, 3H), 0,77 (s, 9H), -0,18 (s, 3H), -0,63 (s, 3H).

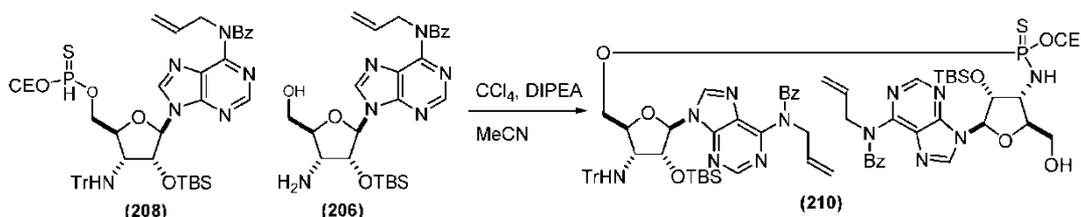
Etapa 5



A una solución de Compuesto 207 (0,50 g, 0,652 mmol) en MeCN (6 mL) a temperatura ambiente se añadieron 3-((bis(diisopropilamino)fosfanoil)oxi)propanonitrilo (0,393 g, 1,304 mmol) y trifluoroacetato de piridinio (0,113 g, 0,587 mmol). La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (1 h), la solución resultante se trató con gas sulfuro de hidrógeno (burbujeo) durante 1 min, seguido de trifluoroacetato de piridinio (0,252 g, 1,304 mmol). La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (1 h), la mezcla resultante se diluyó con MTBE (60 mL). La solución resultante se lavó dos veces con agua (15 mL cada vez) y solución acuosa de NaCl al 30 % (15 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 25 g, EtOAc al 25 % a 40 % en n-heptano) para dar 0,411 g de Compuesto 208 (mezcla diastereomérica 1:1 P) en forma de un sólido en espuma blanca.

Compuesto 208 (mezcla diastereomérica 1:1 P) ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) $\delta = 8,49$ (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,54 - 7,47 (m, 4H), 7,46 - 7,38 (m, 14H), 7,32 - 7,27 (m, 2H), 7,23 - 7,04 (m, 20H), 6,11 - 5,99 (m, 2H), 5,98 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 5,91 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 5,27 (dd, $J = 1,6, 6,3$ Hz, 1H), 5,23 (dd, $J = 1,6, 6,3$ Hz, 1H), 5,12 (dd, $J = 1,6, 6,3$ Hz, 1H), 5,09 (dd, $J = 1,2, 6,3$ Hz, 1H), 5,02 (a d, $J = 5,5$ Hz, 4H), 4,57 - 4,45 (m, 2H), 4,43 - 4,34 (m, 1H), 4,32 - 4,04 (m, 8H), 3,23 - 3,19 (m, 1H), 3,10 (s a, 2H), 3,06 - 2,99 (m, 1H), 2,96 - 2,89 (m, 2H), 2,73 (dt, $J = 1,4, 6,4$ Hz, 2H), 2,65 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 0,85 (s, 9H), 0,83 (s, 9H), 0,01 (s, 3H), -0,09 (s, 6H), -0,11 (s, 3H).

Etapa 6

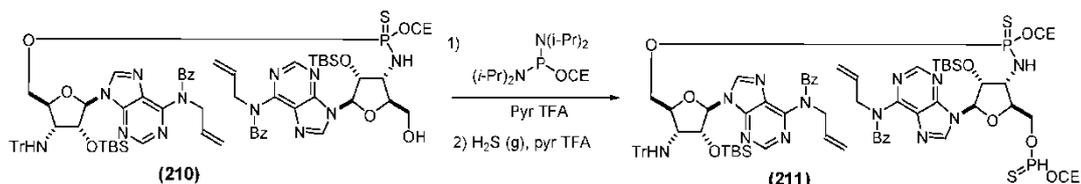


- 5 A una solución de Compuesto 208 (0,411 g, 0,457 mmol) y Compuesto 206 (0,293 g, 0,502 mmol) en acetonitrilo (5 ml) a temperatura ambiente se añadieron DIEA (0,16 ml, 0,91 mmol) y CCl_4 (0,18 ml, 1,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Tras completarse (1 h), la mezcla resultante se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 25 g, EtOAc al 33 % a 100 % en n-heptano) para dar 0,461 g de Compuesto 210 (mezcla diastereomérica 1:1 P) en forma de un sólido en espuma blanca.

15 **Compuesto 210:** ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 8,52 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,55 - 7,37 (m, 20H), 7,33 - 6,99 (m, 30H), 6,09 - 5,97 (m, 4H), 5,96 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,87 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 5,82 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,80 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 5,28 - 5,17 (m, 4H), 5,11 - 5,04 (m, 4H), 5,03 - 4,96 (m, 8H), 4,75 (t, J = 5,1 Hz, 1H), 4,70 (t, J = 4,5 Hz, 1H), 4,46 - 4,33 (m, 3H), 4,31 - 4,18 (m, 5H), 4,12 - 3,96 (m, 8H), 3,89 (a d, J = 11,7 Hz, 1H), 3,78 - 3,67 (m, 3H), 3,57 (dd, J = 2,9, 4,1 Hz, 1H), 3,56 - 3,44 (m, 2H), 3,08 - 3,01 (m, 2H), 2,99 - 2,93 (m, 1H), 2,91 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 2,77 - 2,73 (m, 1H), 2,72 - 2,53 (m, 4H), 0,84 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 3H), -0,05 (s, 6H), -0,08 (s, 3H), -0,12 (s, 3H), -0,15 (s, 3H), -0,18 (s, 3H).

20

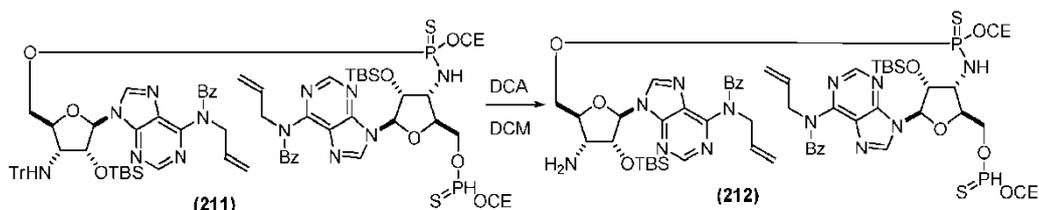
Etapa 7



- 25 A una solución de Compuesto 210 (0,461 g, 0,324 mmol) en MeCN (5,5 ml) a temperatura ambiente se añadieron 3-((bis(diisopropilamino)fosfanoil)oxi)propanonitrilo (0,195 g, 0,648 mmol) y trifluoroacetato de piridinio (0,050 g, 0,259 mmol). La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (40 min), la solución resultante se burbujeó con gas sulfuro de hidrógeno durante 1 min y luego se trató con trifluoroacetato de piridinio (0,138 g, 0,713 mmol). Una vez completado (controlado por LCMS), la solución resultante se diluyó con MTBE (30 mL), se lavó dos veces con agua (10 mL cada vez) y solución acuosa de NaCl al 30 % (10 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (SiO_2 25 g, EtOAc 33 % al 60 % en n-heptano) para dar 0,329 g de Compuesto 211 en forma de un sólido en espuma blanca.

35 **Compuesto 211:** LC/MS (ESI) m/z 1555,48 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapa 8



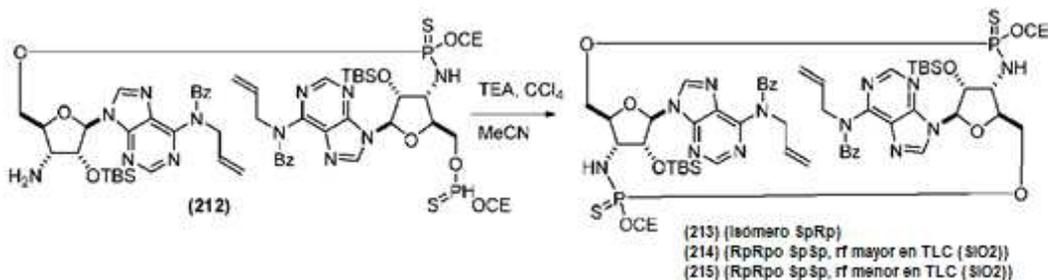
40

- 45 A una solución de Compuesto 211 (0,329 g, 0,211 mmol) en diclorometano (7,2 ml) a temperatura ambiente se añadieron agua (0,032 ml, 1,8 mmol) y ácido dicloroacético (0,29 ml, 3,6 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (30 min), la mezcla de reacción fue una solución saturada de NaHCO_3 (25 mL). La mezcla resultante se extrajo dos veces con DCM (30 mL cada vez). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de NaCl al 30 % (20 mL), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron en vacío. El producto bruto Compuesto 212 (rendimiento teórico de 0,278 g) se utilizó en la siguiente etapa sin purificación ulterior.

Compuesto 212: LC/MS (ESI) m/z 1313,40[M+H]⁺.

Etapa 9

5



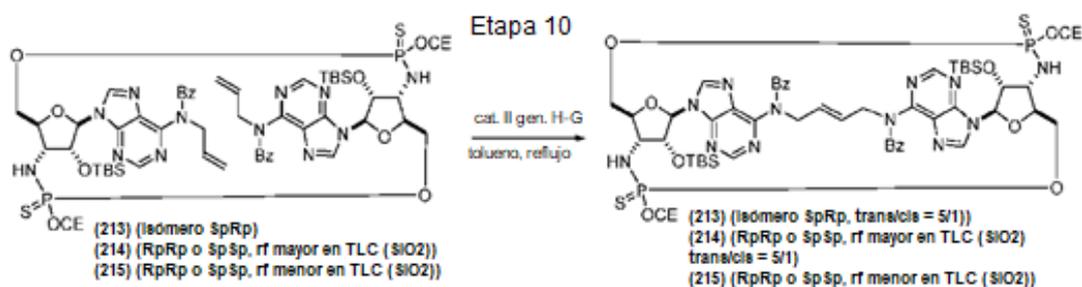
A una solución de Compuesto 212 (0,278 g, 0,212 mmol) en MeCN (55,6 ml) a temperatura ambiente se añadieron trietilamina (1,0 ml, 7,2 mmol) y CCl₄ (1,0 ml, 10 mmol). La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (30 min), la mezcla de reacción se concentró a ~20 mL en vacío y se diluyó con MTBE (30 mL). La mezcla resultante se lavó con agua (10 ml) y solución acuosa de NaCl al 30 % (10 mL cada vez), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂ 25 g, EtOAc al 20 % a 75 % en n-heptano) para dar 71 mg de Compuesto 213 (isómero SpRp), 43 mg de Compuesto 214 (isómero ya sea RpRp o SpSp, mayor rf en TLC (SiO₂)) y 24 mg de Compuesto 215 (ya sea isómero RpRp o SpSp, rf más baja en TLC (SiO₂)).

Compuesto 213 (isómero SpRp) ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,58 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,46 (dd, $J = 7,2, 15,4$ Hz, 4H), 7,36 - 7,27 (m, 2H), 7,18 (c, $J = 7,6$ Hz, 4H), 6,09 (s, 1H), 5,98 (s, 1H), 6,06 - 5,95 (m, 2H), 5,25 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H), 5,21 (dd, $J = 1,4, 10,4$ Hz, 1H), 5,12 - 5,03 (m, 3H), 5,00 - 4,92 (m, 3H), 4,87 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,60 (a d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 4,55 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 4,44 (a d, $J = 11,3$ Hz, 1H), 4,39 - 4,32 (m, 2H), 4,26 - 4,08 (m, 8H), 3,75 (dd, $J = 11,3, 16,0$ Hz, 1H), 3,49 (dd, $J = 8,2, 10,6$ Hz, 1H), 2,82 - 2,72 (m, 3H), 2,61 (td, $J = 5,9, 17,2$ Hz, 1H), 0,99 (s, 9H), 0,96 (s, 9H), 0,32 (s, 3H), 0,23 (s, 6H), 0,22 (s, 3H).

Compuesto 214 (isómero ya sea RpRp o SpSp, isómero mayor rf en TLC (SiO₂)): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,60 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 7,50 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H), 7,37 - 7,31 (m, 2H), 7,25 - 7,21 (m, 4H), 6,05 - 5,93 (m, 4H), 5,22 (dd, $J = 1,6, 17,2$ Hz, 2H), 5,09 (dd, $J = 1,0, 10,4$ Hz, 2H), 5,00 - 4,83 (m, 6H), 4,61 (dd, $J = 1,2, 11,7$ Hz, 2H), 4,25 (dq, $J = 4,3, 10,8$ Hz, 2H), 4,09 (a dd, $J = 3,7, 10,4$ Hz, 2H), 4,04 (td, $J = 5,5, 10,9$ Hz, 2H), 3,99 - 3,88 (m, 4H), 3,70 (dd, $J = 11,9, 15,0$ Hz, 2H), 2,71 (td, $J = 5,5, 17,1$ Hz, 2H), 2,49 - 2,37 (m, 2H), 0,98 (s, 18H), 0,25 (s, 6H), 0,24 (s, 6H).

Compuesto 215 (isómero ya sea RpRp o SpSp, isómero rf más baja en TLC (SiO₂)): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,54 (s, 2H), 8,06 (s, 2H), 7,47 - 7,44 (m, 4H), 7,32 - 7,27 (m, 2H), 7,20 - 7,15 (m, 4H), 6,06 - 5,95 (m, 2H), 5,92 (d, $J = 3,5$ Hz, 2H), 5,22 (dd, $J = 1,2, 17,2$ Hz, 2H), 5,07 (dd, $J = 1,4, 10,4$ Hz, 2H), 5,04 - 4,94 (m, 6H), 4,62 - 4,52 (m, 2H), 4,46 - 4,40 (m, 2H), 4,40 - 4,22 (m, 8H), 3,81 (dd, $J = 6,6, 12,1$ Hz, 2H), 2,89 - 2,71 (m, 4H), 0,88 (s, 18H), 0,08 (s, 6H), -0,07 (s, 6H).

Etapa 10



A una solución de Compuesto 213 (71 mg, 0,054 mmol) en tolueno (28,4 ml) a reflujo se añadió una solución de Catalizador Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (17,0 mg, 0,027 mmol) y P-benzoquinona (11,70 mg, 0,108 mmol en tolueno (8 mL)). La mezcla se calentó a reflujo y el progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Después de 3 h, se añadió catalizador adicional (8,5 mg, 0,0135 mmol) en tolueno (2,5 mL) y se continuó la reacción durante 2,5 horas adicionales. Después de enfriar, la mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en

columna de gel de sílice (SiO₂ 10 g, acetato de etilo al 33 % a 66 % en n-heptano) para dar 17 mg de Compuesto 216 (trans/cis = 5/1) en forma de una espuma seca parda.

5 **Compuesto 216:** ¹H RMN (isómero trans solo, 400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,37 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,36 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,13 (m, 5H), 5,97 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 5,75 (td, J = 5,5, 15,2 Hz, 1H), 5,69 (td, J = 5,5, 15,6 Hz, 1H), 5,07 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 5,03 (dd, J = 5,1, 15,2 Hz, 1H), 4,94 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 4,85 (dd, J = 5,1, 15,2 Hz, 1H), 4,74 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,67 (a d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,45 (a d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,42 - 4,34 (m, 2H), 4,28 - 4,19 (m, 2H), 4,19 - 4,06 (m, 4H), 3,96 - 3,84 (m, 1H), 3,82 - 3,68 (m, 1H), 3,56 (a dd, J = 12,1, 14,5 Hz, 1H), 3,33 (dd, J = 9,0, 10,9 Hz, 1H), 2,83 - 2,78 (m, 2H), 2,72 (td, J = 5,6, 16,6 Hz, 1H), 2,39 (td, J = 6,3, 17,2 Hz, 1H), 1,00 (s, 18H), 0,42 (s, 3H), 0,40 (s, 3H), 0,34 (s, 3H), 0,30 (s, 3H).

Compuesto 217

15 Compuesto 214 obtenido de la Etapa 9 se procesó por separado hasta la Etapa 10 para dar Compuesto 217 (mezcla 5/1 de isómeros trans/cis).

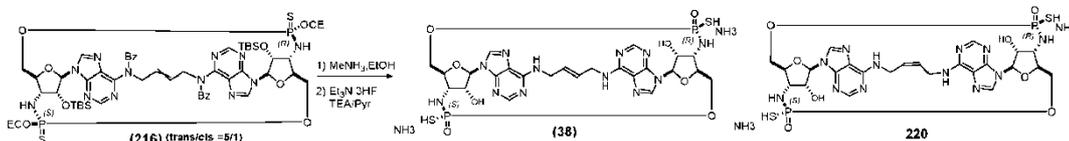
20 ¹H RMN (isómero trans solo, 400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,47 (s, 2H), 8,14 (s, 2H), 7,43 - 7,38 (m, 4H), 7,36 - 7,29 (m, 2H), 7,22 (t, J = 7,0 Hz, 4H), 5,83 (s, 2H), 5,77 (t, J = 3,3 Hz, 2H), 5,17 (d, J = 3,5 Hz, 2H), 5,11 - 5,04 (m, 2H), 4,70 (a dd, J = 3,5, 16,4 Hz, 2H), 4,62 (a d, J = 12,1 Hz, 2H), 4,16 - 4,08 (m, 6H), 3,93 (a dd, J = 3,7, 11,9 Hz, 2H), 3,74 - 3,64 (m, 2H), 3,49 (t, J = 12,9 Hz, 2H), 2,42 (td, J = 5,9, 18,4 Hz, 2H), 2,13 (ddd, J = 5,5, 7,8, 16,8 Hz, 2H), 1,00 (s, 18H), 0,40 (s, 6H), 0,34 (s, 6H).

Compuesto 218

25 Compuesto 215 obtenido de la Etapa 9 se procesó por separado hasta la Etapa 10 para dar Compuesto 218.

30 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,14 (s, 2H), 8,12 (s, 2H), 7,49 - 7,43 (m, 2H), 7,36 - 7,27 (m, 4H), 7,19 - 7,12 (m, 4H), 5,96 (s, 2H), 5,67 - 5,54 (m, 2H), 4,95 - 4,82 (m, 4H), 4,69 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,60 - 4,09 (m, 12H), 3,63 (dd, J = 8,8, 16,2 Hz, 2H), 2,93 (td, J = 5,9, 17,2 Hz, 2H), 2,82 - 2,72 (m, 2H), 0,99 (s, 18H), 0,30 (s, 6H), 0,27 (s, 6H).

Etapa 11



35 A Compuesto 216 (trans/cis = 5/1, 17 mg, 0,013 mmol) se añadió una solución de solución de metilamina (2 ml) (al 33 % en EtOH) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante a temperatura ambiente al tiempo que se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (1 h), la mezcla de reacción se concentró en vacío. Al residuo se añadió piridina (0,9 ml), TEA (0,45 ml) y trihidrofluoruro de trietilamina (0,36 ml, 2,2 mmol). La mezcla resultante se agitó a 50-60 °C durante 4 h y se enfrió a temperatura ambiente. Tras la desprotección de TBS completa (controlada por LCMS), la mezcla de reacción se trató con metoxitrimetilsilano (1,5 ml, 12 mmol) y se agitó durante 1 h. Se añadió agua (3 mL) y la mezcla resultante se extrajo dos veces con tolueno (3 ml cada vez) y dos veces con EtOAc (2 mL cada vez). La capa acuosa se filtró por filtro de jeringa y el filtrado se sometió a HPLC preparativa para dar 5,3 mg de Compuesto 38 y 1,1 mg de Compuesto 220.

45 **Compuesto 38** (*SpRp*, *trans*): ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 9,27 (s a, 1H), 8,47 (s a, 1H), 8,21 (s a, 1H), 8,09 (s a, 1H), 6,19 - 5,96 (m, 2H), 5,94 - 5,71 (m, 2H), 5,13 - 4,68 (m, 2H), 4,55 - 4,39 (m, 2H), 4,38 - 4,23 (m, 1H), 4,20 - 3,91 (m, 5H), 3,75 - 3,50 (m, 4H).

50 **Compuesto 220** (*SpRp*, *cis*): ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 9,08 (s, 1H), 8,72 (s a, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 6,22 - 6,14 (m, 2H), 6,10 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 5,01 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,41 (a d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,34 - 4,25 (m, 3H), 4,24 - 4,18 (m, 1H), 4,15 (dd, J = 6,1, 11,5 Hz, 1H), 4,08 - 3,99 (m, 4H), 3,71 - 3,57 (m, 3H).

Compuesto 39 y Compuesto 222

55 Compuesto 217 se procesó por separado hasta la Etapa 11 para dar Compuesto 39 y Compuesto 222.

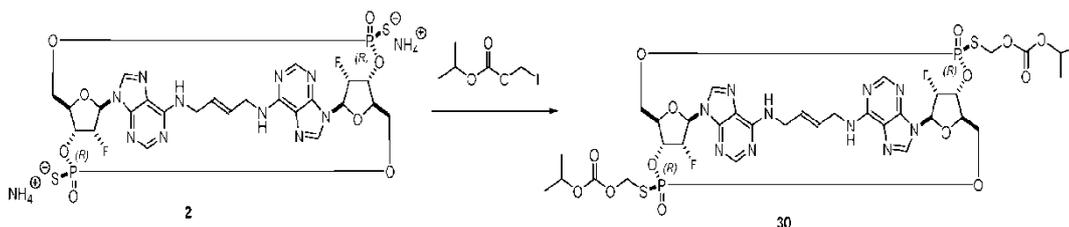
60 Compuesto 39 (*isómero trans*): ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,83 (s a, 1H), 8,43 (s a, 1H), 8,17 (s a, 1H), 8,11 (s a, 1H), 6,17 - 5,95 (m, 2H), 5,93 - 5,63 (m, 2H), 5,10 - 4,78 (m, 2H), 4,69 - 4,53 (m, 1H), 4,52 - 4,35 (m, 2H), 4,12 - 3,92 (m, 5H), 3,76 - 3,44 (m, 4H).

Compuesto 222 (*isómero cis*): ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,71 (s a, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,17 - 6,06 (m, 4H), 4,37 (a d, J = 9,8 Hz, 2H), 4,33 (d, J = 3,9 Hz, 2H), 4,27 (a dd, J = 7,0, 13,7 Hz, 2H), 4,06 (dd, J = 7,0, 11,3 Hz, 2H), 4,19 - 4,03 (m, 2H), 4,01 (a d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,74 (ddd, J = 3,9, 6,4, 10,5 Hz, 2H).

5 Compuesto 40

Compuesto 218 se procesó por separado a través de la Etapa 11 para dar Compuesto 40: ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,34 - 8,88 (m, 2H), 8,73 (s a, 1H), 8,34 - 8,02 (m, 2H), 6,20 - 5,96 (m, 2H), 5,89 (s a, 2H), 5,25 - 4,95 (m, 2H), 4,76 - 4,64 (m, 1H), 4,47 - 4,22 (m, 2H), 4,20 - 4,07 (m, 2H), 4,07 - 3,93 (m, 2H), 3,82 - 3,55 (m, 3H), 3,54 - 3,38 (m, 2H)

Ejemplo 24 - Síntesis de Compuesto 30



15 **Compuesto 2** (1,1 mg, 1,4 μmol) se añadió a una solución de carbonato de yodometil isopropilo (13,75 mg, 0,056 mmol) en acetona/agua (0,4/0,10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad, al tiempo que la reacción se controlaba mediante LCMS. Una vez completada (2 h), la mezcla de reacción se diluyó con agua (0,4 mL) y se extrajo tres veces con *n*-heptano (0,5 mL cada vez). La purificación del producto bruto en la capa acuosa proporcionó 0,5 mg de **Compuesto 30**.

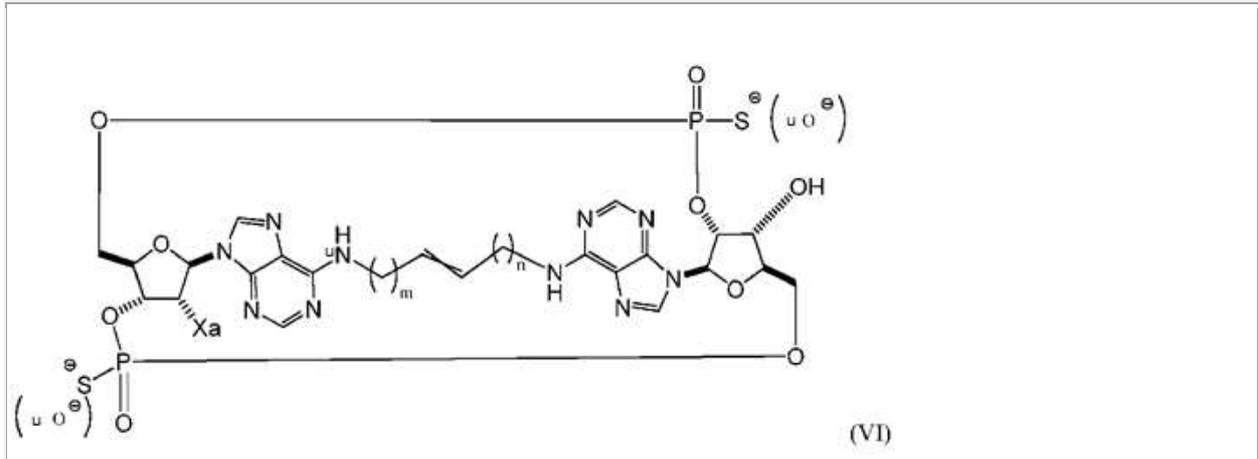
25 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 7,92 (s, 2H), 7,72 (s a, 2H), 6,22 (d, J = 17,2 Hz, 2H), 6,19 - 6,03 (m, 2H), 5,98 (a t, J = 6,3 Hz, 2H), 5,82 - 5,77 (m, 2H), 5,68 (dd, J = 2,3, 51,6 Hz, 1H), 5,54 (dd, J = 10,9, 13,7 Hz, 2H), 5,48 (dd, J = 10,9, 12,9 Hz, 2H), 4,94 (quin, J = 6,2 Hz, 2H), 4,71 - 4,63 (m, 2H), 4,63 - 4,56 (m, 2H), 4,50 - 4,43 (m, 2H), 4,22 - 4,12 (m, 2H), 4,05 - 3,90 (m, 2H), 1,33 (d, J = 4,3 Hz, 6H), 1,32 (d, J = 4,3 Hz, 6H).

Ejemplo 103 - Ensayo Informador de Actividad Agonista HAQ STING

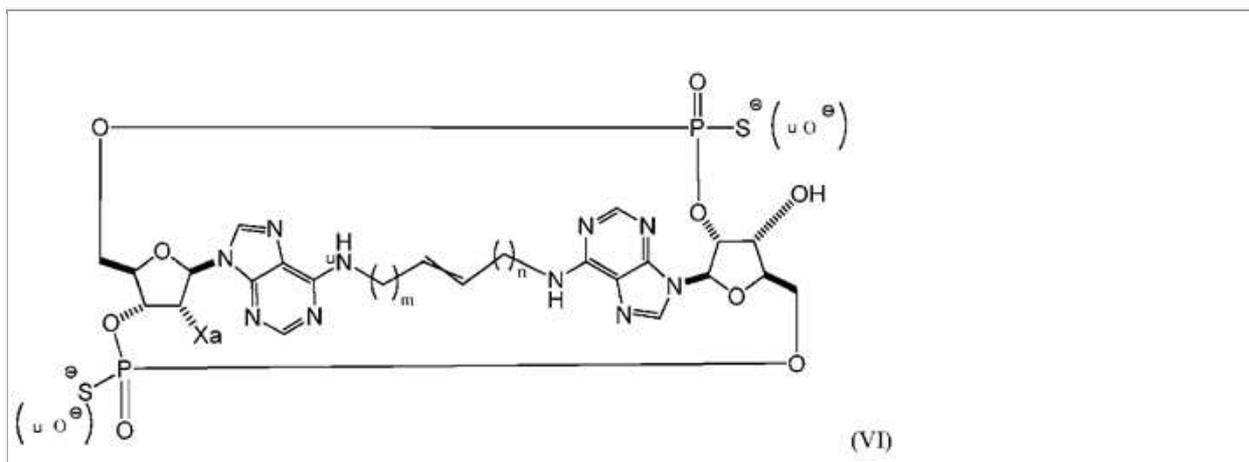
30 Células THP1-Dual™ (InvivoGen, Cat n° thpd-nfis) se emplearon para la determinación de la CE_{50} . Las células THP1 Dual™ se han caracterizado por portar el genotipo HAQ STING por el proveedor Invivogen (Insight 201402-1). Las células se cultivaron y mantuvieron bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. La inducción de la ruta del factor regulador del interferón (IRF) descrita en el manual del fabricante fue seguida para la determinación de CE_{50} . En resumen, las células se sembraron y se trataron con diferentes concentraciones de compuesto durante 20 h, al tiempo que se incubaron a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las células se resuspendieron y se añadió solución QUANTI-Luc™ (n° de Cat. : rep-qlc1). La emisión de luz resultante se midió con un luminómetro (Envision, Perkin Elmer). Se representaron gráficamente las señales obtenidas y la CE_{50} se calculó con el software GraphPad Prism7.

40 Los valores de CE_{50} se reseñan en las Tablas 4-8 que figuran más adelante. Los valores de CE_{50} pueden ser de un único ensayo o un promedio de múltiples ensayos. Precediendo a cada una de las tablas hay una estructura que se utiliza para revisar esa tabla.

TABLA 4



Enlazador (átomos de carbono en la cadena entre (m) y (n), inclusive)	Xa a 2'	Quiralidad de P		Número de Compuesto	CE50 de STING humano (µM)														
		lado 2'	lado 3'		HAQ	WT	AQ	REF											
enlazador de 4 carbonos	1	1	geometría	S	S	223	*	N/E	N/E	N/E									
											trans	S	R	13	26,7	N/E	N/E	N/E	
												R	R	14	58,2	69,8	*	*	
											cis	S	R		*	N/E	N/E	N/E	
												S	S	225	*	N/E	N/E	N/E	
											TBD	Xa = OH			226	*	N/E	N/E	N/E
											TBD				227	*	N/E	N/E	N/E
												Xa = F	No aplicable (fosfodiéster)		228	*	N/E	N/E	N/E
													trans	S	R	15	24,7	11,6	13,1
		cis	R	R	16	28,8	25,7	20,4	66,7										
enlazador de 5 carbonos	2	1	trans	R	R	230	*	N/E	N/E	N/E									
				TBD		231	*	N/E	N/E										
				TBD		232	*	N/E	N/E										
	1	2	trans	S	R	233	*	N/E	N/E	N/E									
				S	R	234	*	N/E	N/E	N/E									
				TBD		235	*	N/E	N/E										
enlazador de 6 carbonos	2	2	TBD	TBD		236	*	N/E	N/E										
				S	R	237	*	N/E	N/E	N/E									
				TBD		238	*	N/E	N/E										
	2	2	TBD	R	R	239	*	N/E	N/E	N/E									
				S	R	240	*	N/E	N/E	N/E									
				S	R	241	*	N/E	N/E	N/E									
2	2	TBD	S	R	242	*	N/E	N/E	N/E										
			S	R	243	*	N/E	N/E	N/E										
			R	R	243	*	N/E	N/E	N/E										



Enlazador (átomos de carbono en la cadena entre (m) y (n), inclusive)				Xa a 2'	Quiralidad de P		Número de Compuesto	CE50 de STING humano (µM)			
longitud	m	n	geometría		lado 2'	lado 3'		HAQ	WT	AQ	REF
* Indica que la actividad no era mensurable en el intervalo experimental de concentraciones.											

"N/E" indica "no evaluado."

- 5 La CE50 de STING humano (µM) se midió utilizando la forma de sal de amonio de cada uno de los compuestos en la Tabla 4.

TABLA 5

(VII)

Enlaces P enlazadores (entre NH en la cadena)	de 4 carbonos quiralidad		Número de Compuesto	CE50 de STING humano (µM)			REF
	Xb	Xb		HAQ	WT	AQ	
	-	OH	9	39,2	18,0	30,9	31,7
trans	RR		30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mezcla trans/cis	SR		1	4,1	0,9	1,2	4,8
	SS		3	16,4	9,9	13,7	42,7
	RR		2	6,1	3,4	3,5	11,4
	RR	-SH	10	17,9	9,0	10,2	34,3
cis	SS		244	*	>100	>100	>100
	RR		4	10,6	3,9	8,2	>100
	SR		5	87,1	49,1	>100	>100
saturada	SR		6	10,5	5,7	9,0	42,0

(VII)

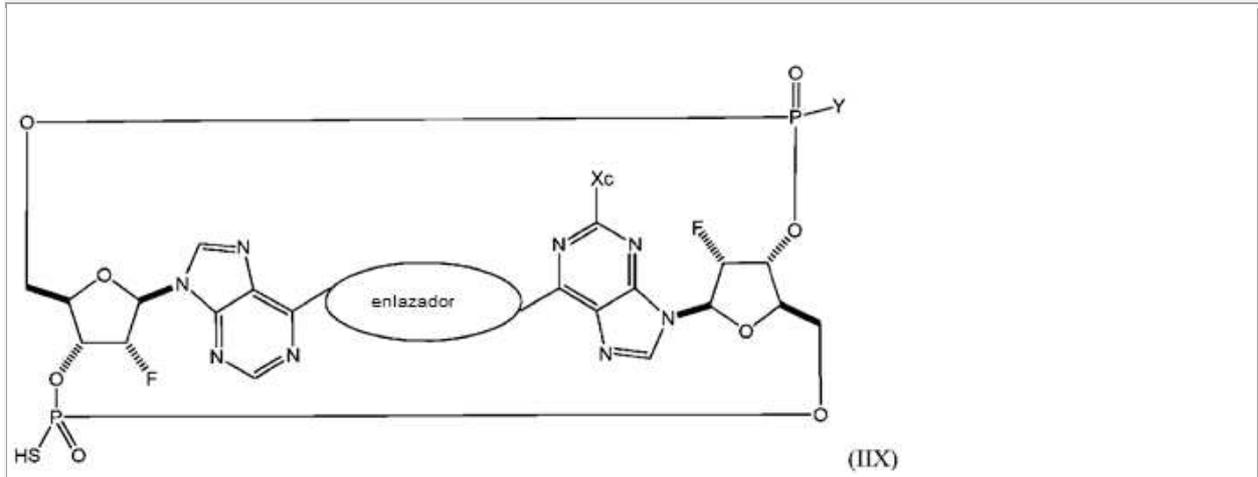
Enlaces P enlazadores (entre NH en la cadena)	de 4 carbonos quiralidad		Número de Compuesto	CE50 de STING humano (µM)			
	Xb	Xb		HAQ	WT	AQ	REF
			245	*	N/E	N/E	N/E
5C cis/trans TBD		N.D.	246	*	N/E	N/E	N/E
5C trans		N.D.	8	69,7	68,7	81,0	>100
5C trans		N.D.	7**	10,7	8,0	9,0	66,7
5C trans		N.D.	37	87,2	>100	82,2	>100
5C trans		N.D.	11	6,8	N/E	N/E	N/E
5C trans		N.D.	12	8,2	N/E	N/E	N/E

* Indica que la actividad no era mensurable en el intervalo experimental de concentraciones.
 ** Compuesto 7 es una mezcla 1:1 de Compuesto 11 y Compuesto 12.
 "N/E" indica "no disponible." "N.D." indica "no determinado."

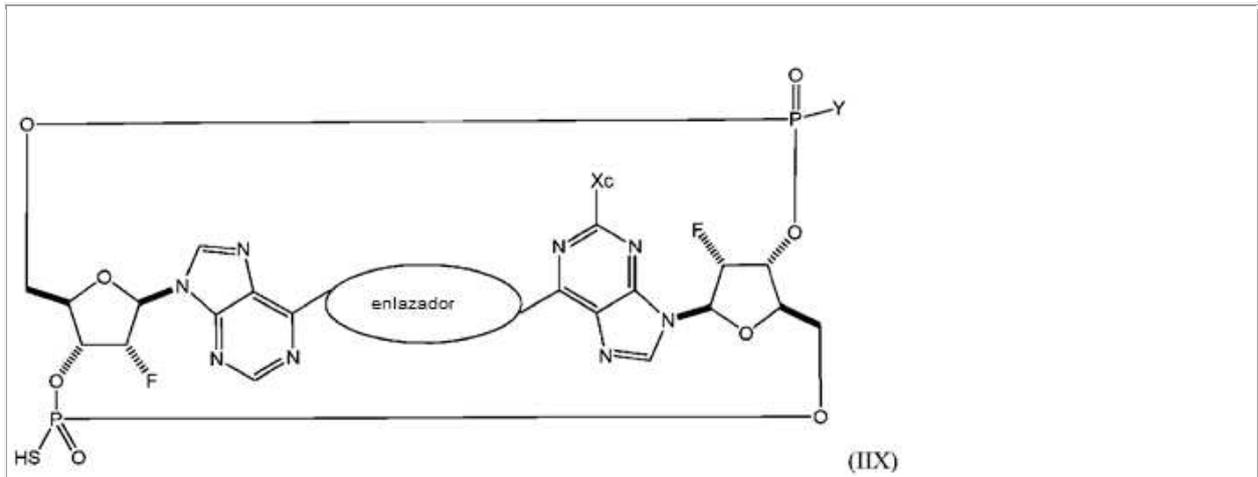
5

La CE50 de STING humano (µM) se midió utilizando la forma de sal de amonio de cada uno de los compuestos enumerados en la Tabla 5.

TABLA 6



Par bases	de	Xc =	Y =	enlazador	geometría	Quiralidad de P	Número Compuesto	CE50 de hSTING (µM)	
								HAQ	REF
AG		NH ₂			<i>cis</i>	N.D.	247	*	N/E
							22	41,2	N/E
							21	83,3	N/E
AI					<i>cis</i>	TBD	23	62,3	N/E
							248	*	N/E
							249	*	N/E
							18	2,3	N/E
							19	94,1	N/E
							20	2,8	N/E
II		SH			<i>trans</i>	RR	26	2,3	7,4
AA		H			<i>trans</i>	SR	33	21,5	*
AA					<i>trans</i>	SR	29	0,62	8,4
					<i>trans</i>	SR	25	0,73	3,0



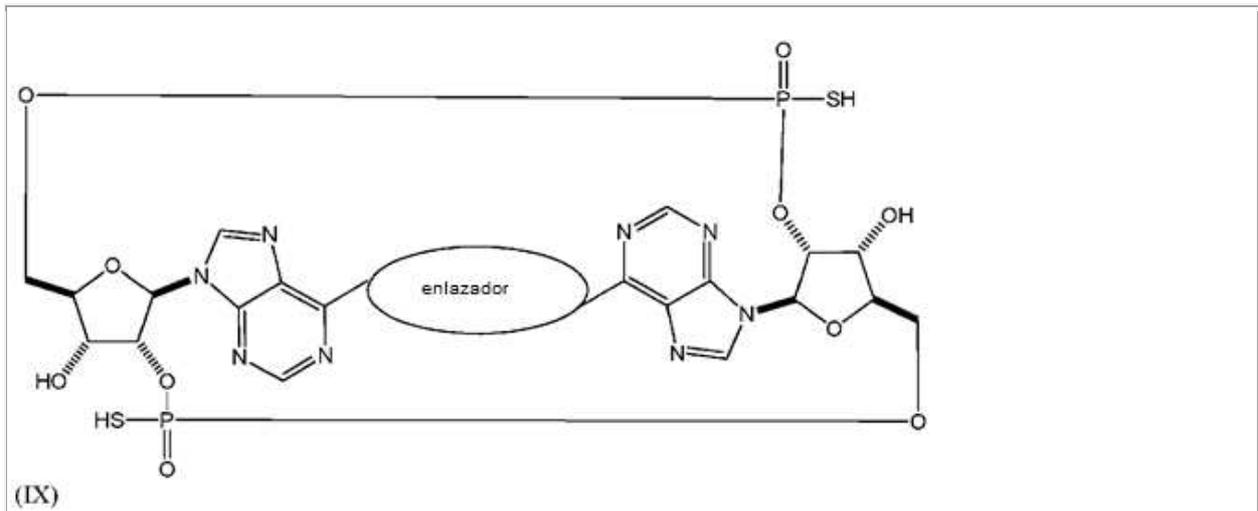
Par bases	de	Xc =	Y =	enlazador	geometría	Quiralidad de P	Número de Compuesto	CE50 de hSTING (µM)	
								HAQ	REF
			OH			S	27	9,8	27,6
						R	28	10,2	18,4

* Indica que la actividad no era mensurable en el intervalo experimental de concentraciones.

"N/E" indica "no evaluado." "N.D." indica "no determinado."

5 La CE50 de STING humano (µM) se midió utilizando la forma de sal de amonio de cada uno de los compuestos enumerados en la Tabla 6, con la excepción de Compuesto 26, Compuesto 31, Compuesto 33 y Compuesto 34, todos los cuales fueron testados como sales de bis-TEA.

TABLA 7



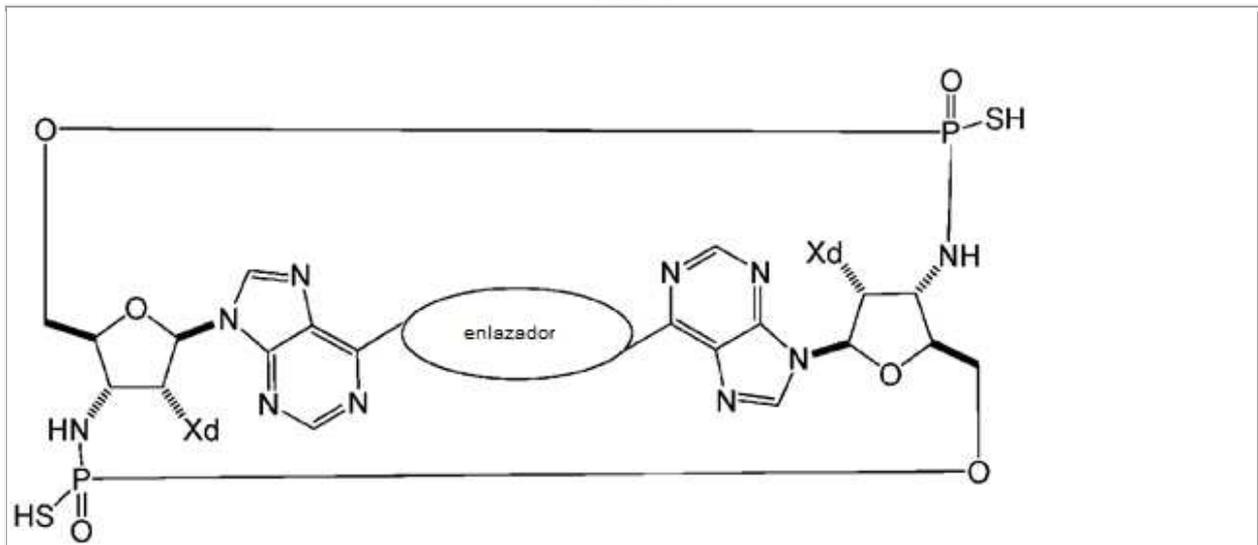
Par de bases	linker	geometría	Quiralidad de P	Número de Compuesto	CE50 de hSTING (μM)	
					HAQ	REF
AA		trans	SS o RR	251	*	*
			SS o RR	252	*	*
			RR	31	20,2	*

* Indica que la actividad no era mensurable en el intervalo experimental de concentraciones.

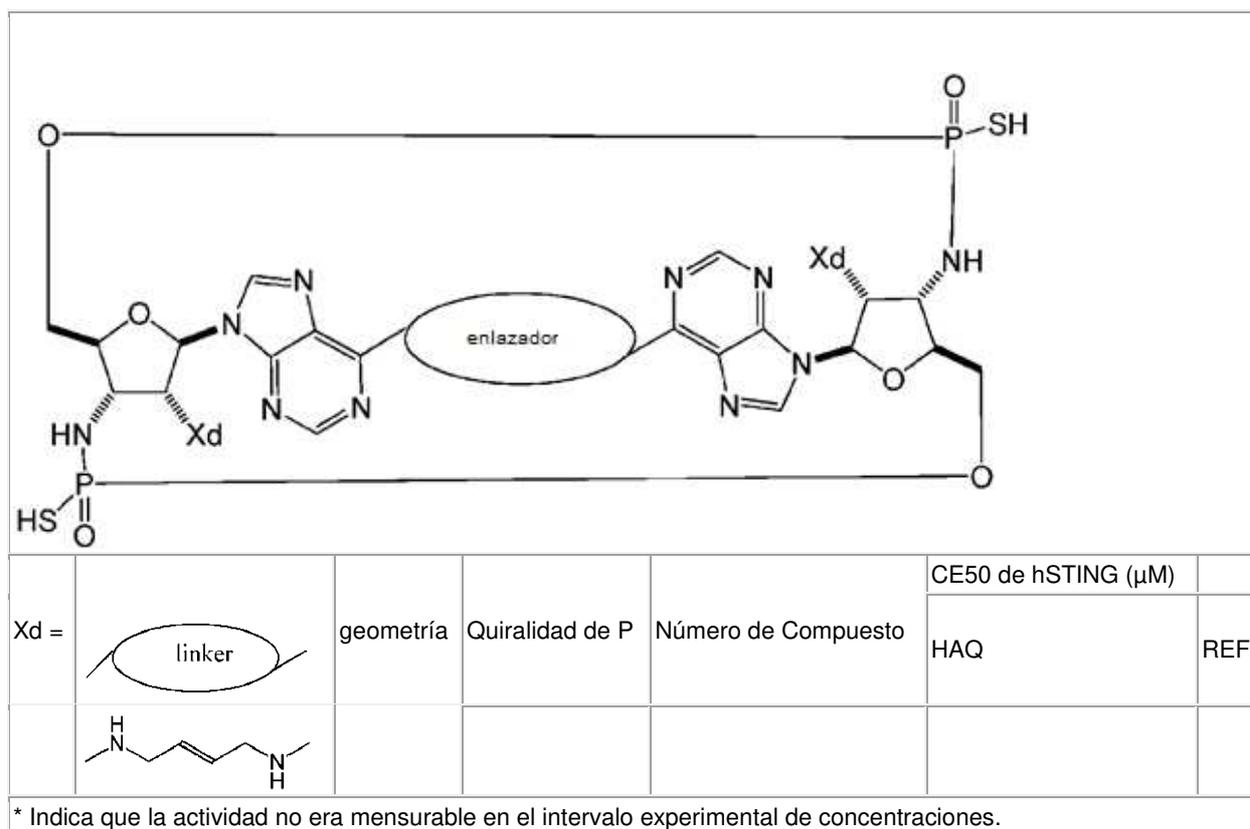
La CE50 de STING humano (μM) se midió utilizando la forma de sal de amonio de cada uno de los compuestos en la Tabla 7.

5

Tabla 8



Xd =	linker	geometría	Quiralidad de P	Número de Compuesto	CE50 de hSTING (μM)	
					HAQ	REF
OH		trans	SR	38	79,9	*
			SS o RR	39	29,6	*



La CE50 de STING humano (µM) se midió utilizando la forma de sal de amonio de cada uno de los compuestos en la Tabla 8.

5

Ejemplo 104 - Ensayo Informador Específico para Variante de STING

10

El STING humano tiene 4 variantes principales, incluyendo las variantes WT, HAQ, REF y AQ. REF-STING, a la que también se alude como R232H, por ejemplo, se produce en aproximadamente el 14 % de la población humana. En comparación con el alelo de tipo salvaje, R232H tiene una respuesta disminuida a dinucleótidos cíclicos de bacterias y metazoos. Yi G, et al., reseñan detalles de estas 4 variantes principales, así como otras variantes raras, "Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides" PLoS One 2013; 8:e77846. Las líneas celulares informadoras para la variante STING se establecieron utilizando células THP1-Dual™ KO-STING (InvivoGen, Cat nº thpd-kostg) y tres vectores de expresión de la proteína variante STING. El mapa del vector de expresión para WT STING se muestra en la FIG. 6. Para los otros dos vectores de expresión, se utilizaron diferentes secuencias variantes de STING en ese vector, con el WT STING reemplazado por la secuencia de nucleótidos apropiada.

15

20

Los vectores que expresan la variante STING para WT-STING, REF-STING y AQ-STING se prepararon y se transfecaron de manera estable en células THP1-Dual™ KO-STING para preparar ensayos informadores específicos para la variante STING para WT-STING, REF-STING y AQ -STING, respectivamente. Los valores CE₅₀ se determinaron como se describe arriba en el Ejemplo 103 para el ensayo informador de actividad agonista HAQ STING. Los resultados se muestran más adelante en la Tabla 9. Las secuencias de ADN utilizadas para estas variantes de STING se muestran en SEQ ID NO: 1 (Secuencia de nucleótidos de WT STING humano), SEQ ID NO: 2 (Secuencia de nucleótidos de REF STING humano), y SEQ ID NO: 3 (Secuencia de nucleótidos de AQ STING humano).

25

WT STING Humano:

atccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggftctgctgagtgccctgcc
tggtagccctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtagctgggtgctccacctagcctccctgacgtgggactgct
gttaaacgggggtctgagcctggctgaggagctgcccacatccactccaggtaccggggcagctactggaggactgtgcgggct
gcctgggtgccccctccgctggggccctgttctgctgtccatctattctactactccctcccaaatgcggctggccccgccctca
cttgatgcttgcctctgggctctgcagggcactgaacatctctgggctcaaggcctggccccagctgagatctctgcagt
tgtaaaaagggaalttcaacgtggccatgggctggcatggtcatattacatcgatctgcggctgatcctgcccagagctccaggc
ccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacggggtgagtgagccagcggctgfatattctctccattggactgtgg
ggctgctgataacctgagtagtggctgacccaacattcgcttctggataaactgccccagcagaccggtagccgggctggcatcaag
gatggggtttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggcagcggggggcacctgttctctggagtagccacccccctg
cagacttgttggcatgtcacaatacagtcaagctggctttagccgggagataggcttgagcaggccaaactctctgccggacact
gaggacatctggcagatgccctgagctcagaacaactgccctcattgctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctctgc
tgtcccaggaggttctccggcacctgcggcagggagaaaaggagaggttactgtggcagctgaagacctcagcgggtgccagt
acctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagccccctccctctccgcacggatttcttga (SEQ
ID NO: 1).

REF STING Humano:

atccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggftctgctgagtg
gcctgcctggtagccctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtagctgggtgctccacctagcctccctgacgtg
5 ggactgctgttaaacgggggtctgagcctggctgaggagctgcccacatccactccaggtaccggggcagctactggaggactgt
gcccggcctgctgggctgccccctccgctggggccctgttctgctgtccatctattctactactccctcccaaatgcggctggcc
cgcccttcacttggatgcttgcctctgggctctgcaggcactgaacatctctgggctcaaggcctggccccagctgagat
ctctgcagtgtgtgaaaaagggaalttcaacgtggccatgggctggcatggtcatattacatcgatctgcggctgatcctgcccaga
gctccagggccggtcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacggggtgagtgagccagcggctgfatattctctccatt
ggactgtggggtgctgataacctgagtagtggctgacccaacattcgcttctggataaactgccccagcagaccggtagcatgct
ggcatcaaggatcgggtttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggcagcggggggcacctgttctctggagtagc
cacccttgcagacttgttggcatgtcacaatacagtcaagctggctttagccgggagataggcttgagcaggccaaactctctg
ccggacacttggagacatctggcagatgccctgagctcagaacaactgccctcattgctaccaggaacctgcagatgacag
cagcttctgctgtcccaggaggttctccggcacctgcggcagggagaaaaggagaggttactgtggcagctgaagacctcagc
gggtcccagtagctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagccccctccctctccgcacggatttctt
ga (SEQ ID NO: 2)

AQ STING Humano:

10

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgccaggggctcacggggcccagaaggcagccttggttctgctgagtgccctgcc
 tggtagcccttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtagcctgggtgctccacctagcctccctgcagctgggactgct
 gftaaacggggctgcagcctggctgaggagctgcccacatccactccaggtaccggggcagctactggaggactgtgcccggcct
 gcctgggctgccccctccgcccgtggggcctgttctgctgctgctcatctatctactactcctcccaaatgcggtcggcccgccttca
 ctggatgcttgcctcctgggctctcgcaggcactgaacatcctcctgggctcaaggcctggccccagctgagatctctgcagtg
 tfgaaaaagggaattcaacgtggcccatgggctggcatggctatattacatcgatctgctggctgatcctgcccagagctccaggc
 ccggattcgaactfacaatcagcattacaacaacctgctacggggtgcatgagccagcggctgfatattctcctccattggactgtgg
 ggtgcctgataacctgagatggctgaccccaacctgcttctggataaactgccccagcagaccgctgaccgagctggcatcaag
 gatcgggtttacagcaacagcactatgagcttctggagaacgggcagcggggcggcacctgtctctggagtacgcccccttg
 cagactttgttccatgtcacaatacagtcaggctggctttagccgggaggtatggcttgagcaggccaaactcttctgccagacact
 gaggacatcctggcagatgccctgagctcagaacaactgccgcctcattgctaccaggaaacctgcagatgacagcagcttctgc
 tgtcccaggaggttctccggcactgcccagggagggaaaaggagaggtactgtggcagctgaagacctcagcgggtgccagat
 acctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctcctcctccgacggattctcttga (SEQ
 ID NO: 3)

Ejemplo 105 -- Ensayo informador de actividad agonista de STING de ratón

5 Se utilizaron células ISG RAW-Lucia™ (InvivoGen, Cat nº rawl-isg) para un ensayo informador de agonista de STING de ratón. Los valores CE₅₀ se determinaron como se describe arriba en el Ejemplo 103 para el ensayo informador de actividad agonista HAQ STING. Los resultados se muestran más adelante en la Tabla 9.

Ejemplo 106 - Ensayo de Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF)

10 Se empleó un ensayo DSF para medir la interacción física entre compuesto y proteína STING recombinante. La proteína STING recombinante truncada (a.a. 155-341) (SEQ ID NO: 4) se expresó en *E. coli* y se aisló para el ensayo, como se describe más adelante. La matriz de ensayo se preparó en placas de 384 pocillos hasta un volumen final de 10 µL por pocillo que consistía en proteína STING recombinante 1 µM (a.a. 155-341) (SEQ ID NO: 4), PBS 100 mM
 15 pH 7,4, complementado con KCl 100 mM, colorante naranja 5X SYPRO y compuesto 50 µM (concentración final de DMSO 0-1 %). Los ensayos se realizaron en un sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex utilizando un gradiente de temperaturas de 25 °C a 95 °C a una tasa de 0,05 °C/min, y filtros de excitación y emisión a 470 y 586 nm, respectivamente. De acuerdo con las curvas derivadas de fluorescencia asignadas por el software Applied Biosystems® Protein Thermal Shift (algoritmo versión 1.3.), se calculó la fusión térmica (T_m) de la proteína STING
 20 recombinante no unida y unida al ligando y la diferencia en la fusión térmica (dT_m D).

En general, se considera que los compuestos con valores de ΔT_m mayores que 0 tienen una interacción física con la proteína testada, y el valor de ΔT_m está asociado positivamente con la afinidad de unión del compuesto. Aquí, el Compuesto 1a mostró el ΔT_m de 17,6 (Tabla 9), lo que indica una interacción física con la proteína STING.

Tabla 9 Caracterización in vitro de Compuesto 1a

Compuesto	CE ₅₀ de STING humano (µM)				CE ₅₀ de STING de ratón (µM)	DSF WT STING ΔT _m (°C)
	WT	HAQ	REF	AQ		
1a	0,9	4,1	4,8	1,2	3,4	17,6

Ejemplo 107 - Ensayo de estimulación de PBMC humanas ex vivo

30 Se extrajo sangre humana de 5 donantes sanos utilizando tubos de heparina sódica BD Vacutainer de 10,0 mL (cat. nº 367874). El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó utilizando tubos SIGMA ACCUSPIN de 50 ml (cat nº A2055) y sigma ACCUSPIN System-HISTOPAQUE-1077 (cat nº A7054) utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. La capa de PBMC se recogió y se lavó con 1x Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) según lo sugerido por Sigma. Se contaron las PBMC y finalmente se suspendieron a 1x10⁶/ml
 35 en RPMI (Corning cat nº 10-041-CV) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (Gibco cat nº 20140.79). Se transfirió 1 ml de células (1 x 10⁶) a un tubo de ensayo de polipropileno de fondo redondo Falcon de 5 mL (cat nº 352063) y se estimularon con diferentes concentraciones (0, 0,1, 1, 10 uM) durante 24 horas en una incubadora de 5 % de CO₂ a 37 °C.

40 Después de 24 horas de incubación, los tubos se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes. El sobrenadante se almacenó a -80 °C para la posterior medición de IFNβ. La medición de IFNβ se realizó utilizando el kit de Base de IFN-β Humano (Meso Scale Diagnostics cat nº K151ADA) y se utilizó el protocolo proporcionado por el fabricante. La estimación de IFN-beta se realizó leyendo la placa de ensayo en el aparato MESO

SECTOR Imager 2400 y utilizando el programa MSD Discovery Workbench 4.0. Después de 24 horas, se analizó la proteína IFN β . Los resultados demostraron que compuesto 1a puede inducir la producción de proteína IFN β de PBMC humana primaria de una manera dependiente de la dosis.

- 5 Los resultados mostrados en la Tabla 10 reflejan un promedio de mediciones realizadas utilizando cinco donantes diferentes.

Tabla 10 Ensayo de estimulación de PBMC humanas ex vivo

	PBS (Control)	Compuesto 1a		
		0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
IFN β (pg/mL)	0	21,3 \pm 17,8	227,5 \pm 62,4	540,2 \pm 215,0

- 10 Para la cuantificación del ARNm de IFN β , se aisló el ARN total utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARNm de IFN β se cuantificó mediante un ensayo de qPCR. En resumen, el ARN total (400 ng a 1000 ng) se convirtió en ADNc en un volumen de reacción de 60 μ l utilizando SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies, EE.UU.). Los ADNc obtenidos (10 ng) se amplificaron posteriormente utilizando ensayos de expresión Applied Biosystems TaqMan utilizando cebadores específicos para ARN para IFNB1 (Hs01077958_s1) y GAPDH (Hs99999905_m1). Se realizó un análisis de qPCR con TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, EE.UU.) en el Sistema PCR en Tiempo Real de Applied Biosystems Quantstudio 12K Flex, con una etapa inicial de 2 min a 50 $^{\circ}$ C, seguido de 95 $^{\circ}$ C durante 2 s y 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 1 s y 60 $^{\circ}$ C durante 20 s. La expresión génica relativa se calculó después de la normalización frente al gen de referencia GAPDH utilizando el método 2- $\Delta\Delta$ CT. Los cálculos se realizaron utilizando el software Applied Biosystems Quantstudio 12K Flex v1.2.2. Los múltiplos de cambios del ARNm de IFN β frente a las muestras tratadas con vehículo se resumen en la Tabla 11. Los resultados demostraron que el compuesto 1a puede inducir el ARNm de IFN β en PBMC primarias de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. La Tabla 11 muestra un promedio calculado de cinco donantes diferentes.

- 25 Tabla 11 -- Ensayo de estimulación de PBMC humanas ex vivo de 3 h y 24 h (ARNm)

ARNm de IFN β (múltiplos de cambios frente a las muestras tratadas con vehículo)	Compuesto 1a		
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
tratamiento de 3 h	51,0 \pm 21,7	219,8 \pm 69,8	1973,3 \pm 1023,0
tratamiento de 24 h	28,1 \pm 28,9	10652,3 \pm 4992,4	24157,3 \pm 9224,2

Ejemplo 108 -- Efecto anti-canceroso de compuesto 1a en el modelo de tumor dual CT26

- 30 Compuesto 1a se testó en cuanto a su actividad anticancerígena en el modelo de tumor dual CT26, que es un modelo de cáncer de colon de ratón. Ratones Balb/cJ hembras de 5-6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) se implantaron por vía subcutánea con células tumorales CT26 en ambos lados de cada uno de los animales, 10⁵ células para cada lado. Para el estudio A, el tratamiento se inició 5 días (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg y 5 mg/kg) después de la implantación del tumor, cuando el promedio de los tumores alcanzó aproximadamente 100 mm³. Para el estudio B, el tratamiento se inició 8 días (0,6 mg/kg, y 10 mg/kg) después de la implantación del tumor, cuando el promedio de los tumores alcanzó aproximadamente 120 mm³. El esquema de tratamiento se describe en la Tabla 12 y la Tabla 13.

Tabla 12 Esquema de dosificación para el estudio A

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Ruta y Programa
A	6	Vehículo (1 x PBS)	I.T.*; dosis única
B	6	5 mg/kg de compuesto 1a	I.T.; dosis única
C	6	2,5 mg/kg de compuesto 1a	I.T.; dosis única
D	6	1,25 mg/kg de compuesto 1a	I.T.; dosis única

*I.T. es intratumoral.

- 40 Tabla 13 Esquema de dosificación para el estudio B

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Ruta y Programa
A	5	Vehículo (1 x PBS)	I.T.*; dosis única

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Ruta y Programa
B	5	10 mg/kg de compuesto 1a	I.T.; dosis única
C	5	0,6 mg/kg de compuesto 1a	I.T.; dosis única
*I.T. es intratumoral.			

5 Todos los ratones del estudio tienen dos tumores CT26 subcutáneos. El "tumor tratado" indica el tumor con administración directa del compuesto, mientras que "tumor no tratado" indica el tumor sin administración directa del compuesto. Se siguió el volumen del tumor durante todo el experimento. El volumen del tumor se mide dos veces por semana después del inicio del tratamiento. La carga tumoral se calcula a partir de mediciones del calibre mediante la fórmula para el volumen de un elipsoide alargado $(L \times W^2)/2$, en que L y W son las respectivas mediciones ortogonales de longitud y anchura (mm).

10 El compuesto 1a mostró una actividad potente y curativa en el modelo de tumor dual CT26 (FIG. 7 y FIG. 8). Para los tumores tratados, se detectó una tasa de curación del 20 %, incluso con la dosis más baja testada en el estudio (Figura 8, dosis de 0,6 mg/kg). Al mismo tiempo, la dosis más alta (10 mg/kg) curó al 100 % de los animales de ese tumor al final del estudio. Para los tumores no tratados, también fue evidente un efecto antitumoral dependiente de la dosis. El grupo de dosis máxima (10 mg/kg) mostró un 80 % de efectos curativos; todas las dosis más bajas también mostraron actividad inhibidora del crecimiento del tumor. Por lo tanto, se observó una ventana terapéutica de 0,6 mg/kg a 10 mg/kg para el compuesto 1a, con actividad anti-tumoral observada no solo localmente, sino también sistémicamente, basándose en los efectos en el sitio del tumor distal no inyectado. En conclusión, estos resultados indican que la administración local de compuesto 1a puede inducir una actividad anticancerígena tanto local como sistémica (abscopal).

20 **Ejemplo 109 -- Efecto anti-canceroso de compuesto 1a en el modelo metastásico de hígado CT26**

25 Compuesto 1a se testó para determinar su actividad anti-cancerígena en un modelo metastásico de hígado CT26. Ratones BALB/cJ hembras de 5-6 semanas de edad, anestesiados (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) se implantaron intra-esplénicamente con células tumorales CT26 que expresan luciferasa (5×10^5 células por ratón). Un período de espera de diez minutos posterior permitió que las células tumorales circularan en los hígados de los animales. A continuación, se extrajeron los bazo y se suturó a los animales y se dejó que se recuperaran. Tres días más tarde, células tumorales CT26 (10^5 células por ratón) fueron implantadas de nuevo, esta vez por vía subcutánea (sc) bajo el área de la extremidad anterior derecha, para permitir el desarrollo de una masa de tumor para la administración del compuesto. Nueve días después de la inyección intra-esplénica, se administró el compuesto (10 mg/kg) por vía intratumoral, una sola vez, en el tumor sc.

35 El efecto anticanceroso local del compuesto se midió a través de su efecto sobre el tumor sc, mientras que el efecto abscopal del compuesto se evaluó mediante la supervivencia global de los ratones tratados en comparación con los ratones de control tratados con vehículo, basándose en el efecto perjudicial de la masa de tumor en crecimiento en cada uno de los hígados de los ratones. El compuesto 1a mostró tanto una potente actividad hacia los tumores sc locales como también una actividad curativa sistémica en 9 de 10 animales tratados (FIG. 9). Estos resultados indican que la administración local de compuesto 1a puede inducir una actividad anticancerígena tanto local como sistémica (abscopal), incluyendo una lesión profunda, tal como en el hígado.

40 **Ejemplo 110 -- Efecto anti-canceroso de compuesto 1a en el modelo ortóptico de cerebro GL261**

45 Compuesto 1a se testó para determinar su actividad anti-cancerígena en un modelo ortóptico de cerebro GL261. GL261 es una línea celular de glioma murino. Células de glioma GL261 de ratón que expresan luciferasa (2×10^4 células/ratón) fueron implantadas por vía intra-craneal en ratones albinos B6 hembras de 5-6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine). Tres a 4 días más tarde, células GL261 se implantaron por vía subcutánea (10^6 células/ratón) en la zona de la extremidad delantera derecha para permitir el desarrollo de una masa de tumor para la administración del compuesto. Diez días después de la implantación intracraneal de las células tumorales, se administró el compuesto (10 mg/kg) por vía intratumoral, una sola vez, en el tumor sc. El efecto anti-canceroso local del compuesto se midió a través de su efecto sobre el tumor sc, mientras que el efecto abscopal del compuesto se evaluó mediante la supervivencia global de los ratones tratados en comparación con los ratones de control tratados con vehículo, basándose en el efecto perjudicial de la masa de tumor en crecimiento en cada uno de los cerebros de los ratones. Compuesto 1a mostró tanto una potente actividad hacia los tumores sc locales como una actividad curativa sistémica en 5 de 8 animales tratados (FIG. 10). Estos resultados indican que la administración local de compuesto 1a puede inducir una actividad anticancerígena tanto local como sistémica (abscopal), incluyendo una lesión profunda, tal como en el cerebro.

Ejemplo 111 - Complejo Confirmatorio de la Estructura de Rayos X con WT STING

Para comprender mejor el mecanismo de unión a la diana de los nuevos compuestos de la solicitante, se determinó la estructura cristalina de rayos X de WT STING en complejo con los compuestos.

A. Expresión y purificación del Dominio C-terminal de WT STING (residuos 155-341)

La secuencia de ADN que codifica la proteína WT STING humana del aminoácido 155 al 341 (SEQ ID NO: 4) se clonó en el vector pET21b, siguiendo una etiqueta His-TEV-Sumo en su extremo N (SEQ ID NO: 5). La secuencia del pET21b se ha depositado en addgene y está disponible aquí: addgene.org/vector-database/2550/; esa secuencia se incorpora en esta memoria como referencia.

Se transformaron células codon plus *E. coli* BL21 (DE3) con este plásmido, y se indujo la expresión de proteína recombinante con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM. La proteína se purificó a partir de la fracción soluble de lisado celular mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. La etiqueta His-TEV-Sumo se eliminó mediante sumo proteasa y se separó de WT STING 155-341 libre de etiqueta, utilizando una segunda columna de afinidad Ni-NTA. La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño, y se almacenó en tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y NaCl 150 mM a una concentración de 35 mg/ml.

B. Cristalización y determinación de la estructura del Dominio C-terminal de WT STING en complejo con Compuesto 1

Para co-cristalizar WT STING 155-341, con Compuesto 1, la proteína WT STING se diluyó a 10 mg/ml utilizando el tampón de almacenamiento (Tris HCl 20 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM) y se mezcló con Compuesto 1 (material 100 mM en DMSO) en la relación molar 1:5. La mezcla se incubó durante 4 horas a 4 °C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min antes de la cristalización. Se instalaron bandejas de pantalla de cristalización utilizando el método de difusión de vapor de gota colgante a 18 °C. Los cristales se cultivaron mezclando 1 μ L de solución WT STING/Compuesto 1 con un volumen igual de solución de pocillo, que contenía HEPES 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 200 mM y PEG 8000 al 15 % (peso/volumen). Se utilizó PEG 400 al 20 % (peso/volumen) como reactivo crioprotector cuando los cristales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los conjuntos de datos de difracción se recopilaron con un detector Pilatus en la línea de luz SSRF BL19U1 y se procesaron con HKL3000 y el programa SCALEPACK2MTZ en el paquete de software CCP4.

La estructura de WT STING 155-341 unido a Compuesto 1 se determinó mediante reemplazo molecular utilizando el programa PHASER (Reemplazo Molecular de Máxima Probabilidad), con PDB ID 4F9E como modelo de búsqueda inicial. La presencia de Compuesto 1 entre la interfaz dímera de WT STING se confirmó en un mapa de diferencias Fo-Fc calculado con fases del modelo. El modelo se construyó y completó manualmente con el programa Coot y se perfeccionó con el programa Refmac5 en el paquete de software CCP4. La estructura perfeccionada final se reseñó a una resolución de 2,38 Å en el grupo espacial P212121 con celda unitaria medida en a = 33,820, b = 78,110, c = 132,212, α = 90,00, β = 90,00, y γ = 90,00. Se identificaron dos copias de WT STING 155-341 en cada una de las unidades asimétricas que se unen a una molécula de Compuesto 1 en la interfaz del dímero.

C. Interacción de Compuesto 1 con WT STING observada en la estructura cristalina de rayos X

La FIG. 11 muestra una imagen de la estructura cristalina de rayos X de WT de STING humano en complejo con el Compuesto 1. Los autores de la invención examinaron la estructura cristalina por rayos X de WT STING humano en complejo con Compuesto 1, que se co-cristalizó a partir de una muestra de Compuesto 1a. El compuesto se une a una bolsa de interfaz formada por un dímero de la proteína WT STING. Las dos caras de la base de adenina del compuesto forman una interacción de apilamiento π - π con Tyr240 y el grupo guanidina de Arg238, respectivamente. El enlazador de trans olefinas forma la interacción de van der Waals con la porción alifática de la cadena lateral de Arg 238. El sustituyente flúor en la posición C2' del grupo ribosa del compuesto anida en un agujero hidrófobo definido por Thr263, Pro264 y Tyr163. El grupo tiofosfato cargado negativamente del compuesto forma un puente salino con Arg238 y las interacciones del enlace H con Ser162 y Thr267, respectivamente. Además, el grupo tiofosfato también forma interacción electrostática con el grupo guanidina de Arg 232. La región del bucle LID de WT STING, que consiste en los residuos 226 a 243, envuelve los dos grupos de bases y el enlazador trans-olefínico.

Ejemplo 112 - Determinación de la estructura cristalina de rayos X de REF STING en complejo con Compuesto 1.

A. Expresión y purificación del Dominio C-terminal de REF STING (residuos 155-341, SEQ ID NO: 6)

La secuencia de ADN que codifica la proteína REF STING humana del aminoácido 155 al 341 (SEQ ID NO: 6) se clonó en el vector pET21b, siguiendo una etiqueta His-TEV-Sumo en su extremo N (SEQ ID NO: 7). La secuencia del pET21b ha sido depositada en addgene y está disponible aquí: addgene.org/vector-database/2550/; esa secuencia se incorpora como referencia en esta memoria.

Se transformaron células codon plus *E. coli* BL21 (DE3) con este plásmido, y se indujo la expresión de proteína recombinante con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM. La proteína se purificó a partir de la fracción

soluble de lisado celular mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. La etiqueta His-TEV-Sumo se eliminó mediante sumo proteasa y se separó de REF STING₁₅₅₋₃₄₁ libre de etiqueta, utilizando una segunda columna de afinidad Ni-NTA. La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño, y se almacenó en tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y NaCl 150 mM a una concentración de 24 mg/ml.

B. Cristalización y determinación de la estructura del Dominio C-terminal de REF STING en complejo con Compuesto 1

Para co-cristalizar REF STING₁₅₅₋₃₄₁ con Compuesto 1, la proteína REF STING se diluyó a 10 mg/ml utilizando el tampón de almacenamiento (Tris HCl 20 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM) y se mezcló con Compuesto 1 (material 100 mM en DMSO) en la relación molar 1:5. La mezcla se incubó durante 4 horas a 4 °C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min antes de la cristalización. Se instalaron bandejas de pantalla de cristalización utilizando el método de difusión de vapor de gota colgante a 18 °C. Los cristales se cultivaron mezclando 1 µL de solución REF STING/Compuesto 1 con un volumen igual de solución de pocillo, que contenía HEPES 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 200 mM y PEG 8000 al 15 % (peso/volumen). Se utilizó PEG 400 al 20 % (peso/volumen) como reactivo crioprotector cuando los cristales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los conjuntos de datos de difracción se recopilaron con un detector Pilatus en la línea de luz SSRF BL18U1 y se procesaron con HKL3000 y el programa SCALEPACK2MTZ en el paquete de software CCP4. Esta estructura se muestra en la FIG. 12.

La estructura de REF STING₁₅₅₋₃₄₁ unido a Compuesto 1 se determinó mediante reemplazo molecular utilizando el programa PHASER (Reemplazo Molecular de Máxima Probabilidad), utilizando la estructura WT STING₁₅₅₋₃₄₁ previamente determinada (como se describe arriba) como el modelo de búsqueda inicial. La presencia de Compuesto 1 entre la interfaz dímera de REF STING se confirmó en un mapa de diferencias Fo-Fc calculado con fases del modelo. El modelo se construyó y completó manualmente con el programa Coot y se perfeccionó con el programa Refmac5 en el paquete de software CCP4. La estructura perfeccionada final se reseñó a una resolución de 2,76 Å en el grupo espacial P212121 con celda unitaria medida en a = 33,733, b = 77,831, c = 131,689, α = 90,00, β = 90,00, y = 90,00. Se identificaron dos copias de REF STING₁₅₅₋₃₄₁ en cada una de las unidades asimétricas que se unen a una molécula de Compuesto 1 en la interfaz del dímero.

C. Interacción de Compuesto 1 con REF STING Observada en la Estructura Cristalina de rayos X

La FIG. 12 muestra la estructura cristalina por rayos X de REF STING humano en complejo con Compuesto 1, que se co-cristalizó a partir de una muestra de Compuesto 1a. El compuesto se une a una bolsa de interfaz formada por un dímero de la proteína STING. Las dos caras de la base de adenina del compuesto forman una interacción de apilamiento π-π con Tyr240 y el grupo guanidina de Arg238, respectivamente. El enlazador de trans olefinas forma la interacción de van der Waals con la porción alifática de la cadena lateral de Arg238, mientras que la porción de guanidina de la cadena lateral de Arg238 forma una interacción de apilamiento π-π con el grupo imidazol de la cadena lateral de His232 desde el exterior. El enlazador de olefinas está en contacto con el par que interactúa de las cadenas laterales de Arg238 e His232. El sustituyente flúor en la posición C2' del grupo ribosa del compuesto anida en un agujero hidrófobo definido por Thr263, Pro264 y Tyr163. El grupo tiofosfato cargado negativamente del compuesto forma un puente salino con Arg238 y las interacciones del enlace H con Ser162 y Thr267, respectivamente. La región del bucle LID de REF STING, que consiste en los residuos 226 a 243, envuelve los dos grupos de bases y el enlazador trans-olefínico.

Ejemplo 13 - Comparaciones

Los valores de CE₅₀ se calcularon para ensayos STING humanos de WT STING, HAQ STING, AQ STING y REF STING, en comparaciones directas utilizando Compuesto 1a de la presente divulgación, un ligando STING natural (2'3'cGAMP), y el supuesto agonista de STING ML RR-S2 CDA, como se reseña en Corrales, et al., "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity," *Cell Reports* (2015) 11:1018-1030, que se incorpora en esta memoria como referencia. Los ensayos se realizaron como se describe en los ejemplos arriba recogidos. Téngase en cuenta que los valores de ensayo reseñados en la Tabla 14 se limitaron a los ensayos realizados en las comparaciones directas y puede que no reflejen los valores promediados determinados en un mayor número de ensayos como se informa en la Tabla 5 o en otra parte. Téngase en cuenta, además, que "2'3' cGAMP" es lo mismo que "ML cGAMP" como se informa en la publicación *Cell Reports*

Tabla 14

Compuesto	Kd (WT) (µM)	CE ₅₀ humana (mM) (ensayo de 20 h)			
		WT	HAQ	AQ	REF
2'3' cGAMP	0,07	61,7	57,9	56,5	33-100
ML RR-S2 CDA	0,4	5,9	8,4	5,5	>100
Compuesto 1a	0,04	0,6	1,9	1,0	3,9

5 La Tabla 14 también reseña las constantes de unión por disociación (K_d) para la unión de WT STING humano a cada uno de los tres compuestos testados, según se mide mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC). ITC es una técnica de titulación microcalorimétrica que mide las propiedades termodinámicas asociadas con las interacciones intermoleculares. Según estos tests, Compuesto 1a parece formar el enlace más fuerte con WT STING de los compuestos testados.

10 **Materiales**

La proteína STING humana recombinante de tipo salvaje (aa. 139-379, H232R) se generó expresando una construcción en *E. coli* que codifica un dominio citosólico de WT STING humana que comprende los aminoácidos 139-379.

15 **Reactivos**

Fuentes de reactivos utilizados en este estudio se muestran a continuación:

Reactivo	Fuente	Catálogo Nº
IX PBS sin Calcio o Magnesio	Corning	21-040-CV
Agua Desionizada MilliQ	MilliQ	Z000Q0V0T0
Liquinox	Alconox	1201
NaOH	EM	SXO593-1
Metanol	EMD Millipore	MX0475-1
Compuestos:		
Compuesto 1a		
2'3' cGAMP		
ML RR-S2 CDA		

20

Preparación de Tampón de Proteínas

25 La proteína STING se almacenó a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en partes alícuotas de $90\text{ }\mu\text{L}$ y $100\text{ }\mu\text{L}$ cada una a una concentración de $3,0\text{ mg/mL}$ y 20 mg/mL , respectivamente, en PBS, pH 7,5 que contenía glicerol al 5 %. El día del análisis, se descongelaron partes alícuotas de la proteína, se diluyeron a $400\text{ }\mu\text{L}$ y se intercambiaron con tampón en PBS utilizando una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultra (corte de 10 k MW , $0,5\text{ mL}$) con al menos cuatro centrifugaciones de 10 min a $14000 \times g$ con una microcentrífuga Eppendorf y luego finalmente se diluyó a $20\text{ }\mu\text{M}$ hasta $30\text{ }\mu\text{M}$ (dependiendo del experimento) con IX PBS. La concentración de proteínas se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y un coeficiente de extinción de proteínas de $22140\text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$.

30

Preparación de la Muestra

35 Se suministraron $200\text{ }\mu\text{L}$ de soluciones madre 1 mM de Compuesto 1a, 2'3' cGAMP y ML RR-S2CDA mediante tubos de microcentrífuga de $1,5\text{ mL}$. Antes de cada uno de los experimentos, las muestras se diluyeron a concentraciones de $200\text{ }\mu\text{M}$ a $500\text{ }\mu\text{M}$ (dependiendo del experimento).

Métodos

40 Los ensayos se realizaron en una unidad Affinity ITC (TA Instruments nº 609003.901) equipada con el accesorio de limpieza ITC (TA Instruments nº 601800.901). La solución de proteína STING, aproximadamente $400\text{ }\mu\text{L}$ que contenía proteína STING de $20\text{ }\mu\text{M}$ a $30\text{ }\mu\text{M}$, se pipeteó en la celda del calorímetro de $185\text{ }\mu\text{L}$, permitiendo una sobrecarga aceptable. La celda de referencia contenía una cantidad equivalente de agua Milli-Q. La incubación se llevó a cabo a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con inyecciones de $20 \times 2,5\text{ }\mu\text{L}$ de compuestos de $100\text{ }\mu\text{M}$ a $300\text{ }\mu\text{M}$. El software de control fue ITC Run Ver. Se utilizó 3.3.0.0 (TA Instruments) para obtener los termogramas que consistían en múltiples picos de calor bruto ($\mu\text{cal/s}$) que representan la tasa de calor en cada inyección. Se utilizó el software de análisis Nano Analyze Ver. 3.70 (TA Instruments) para corregir el valor de referencia, corregir el blanco o el calor de dilución de la muestra (en saturación) y para integrar los picos de la tasa de calor que producen valores "Q" graficados. Las isotermas resultantes se ajustaron a un modelo independiente para derivar los parámetros termodinámicos.

50 Los valores de K_d y n (relaciones molares en los puntos de inflexión de la curva) se derivaron y reseñaron. Las condiciones óptimas para las concentraciones de proteína y ligando se derivaron de experimentos preliminares.

Resultados

Se determinaron los termogramas de tasa de calor y sus isotermas resultantes para la unión de los compuestos testados a STING de tipo salvaje humano recombinante (aa, 139-379, H232R). La unión de cada uno de los compuestos a STING fue endotérmica como se indica por las tasas de calor negativas con calores de dilución exotérmicos (dirección positiva) (observado después de que el compuesto ha alcanzado la saturación de la proteína). Se ha demostrado que 2',3' cGAMP produce una respuesta endotérmica similar a diversas variantes de STING. Compuesto 1a proporcionó el Kd más bajo de 0,04 μ M, seguido de 2'3' cGAMP con una Kd de 0,07 μ M y luego ML RR-S2 CDA con una Kd de 0,40 μ M. Todos los compuestos proporcionaron valores de n cercanos a 0,5, lo que sugiere que la proteína STING estaba presente como un dímero y se unió a 1 mol de compuesto por cada 2 moles de STING.

Ejemplo 114 - Identificación de Metabolitos Potenciales

Compuesto 1a se incubó en hepatocitos de ratón CD-1, rata Sprague Dawley, perro Beagle, mono Cynomolgus y ser humano, para evaluar la formación de metabolitos principales.

Materiales

Los hepatocitos agrupados crioconservados se adquirieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA), Xenotech, LLC (Kansas City, KS) e In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD), y los medios apropiados se adquirieron de In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD) y Life Technologies (Carlsbad, CA). La solución de tinción AOPI y el tampón fosfato se obtuvieron de Corning Life Sciences (Tewksbury, MA) y Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA), respectivamente. Todos los productos químicos, reactivos y disolventes utilizados en el análisis eran de calidad analítica o HPLC.

Diseños y Procedimientos Experimentales**Incubaciones de Hepatocitos**

Compuesto 1a se pesó y se disolvió en HPLC-agua que contenía PBS de ácido fórmico al 0,12 % para obtener 1020 mmol/L. Luego, la solución se diluyó 2.5 veces individualmente a 4 mmol/L y luego se diluyó 21000 veces más con el medio E de Williams que contenía albúmina de suero humano al 0,1 % y 2 mmol/L de L-glutamina para preparar la solución madre de trabajo con una concentración de 20 μ mol/L.

Antes de las incubaciones, los hepatocitos crioconservados se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Se añadió un tubo de hepatocitos crioconservados a cada uno de los tubos cónicos de 50 mL de medio de recuperación de hepatocitos crioconservados (UCRM) obtenido de In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD). Las células se centrifugaron en una centrífuga Beckman (Brea, CA) con un rotor GH 3.8 a 740 rpm durante 10 minutos a una temperatura ambiente de 4 °C. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en medio de cultivo en placa para el recuento. Después de resuspender las células en medio de cultivo en placa, se transfirieron 20 μ L de la re-suspensión y se mezclaron con 20 μ L de solución de tinción AOPI. La solución se mezcló suavemente y las células se contaron utilizando un Cellometer (Nexcelom, Lawrence, MA). Después del recuento, las células se resuspendieron a 1 o 2 millones de células viables/mL en medio E de Williams que contenía 2 mmol/L de L-glutamina (pH 7,4).

La suspensión de hepatocitos (50 μ L/pocillo) se añadió a una placa de 48 pocillos. Se añadieron cincuenta microlitros de solución madre de trabajo que contenía Compuesto 1a (20 μ mol/L) para iniciar la reacción. La placa se colocó en una incubadora de cultivo de tejidos (5 % de CO₂/95 % de atmósfera humidificada con aire y 37 °C), y las reacciones se terminaron con 200 μ L de solución de parada que consistía en 100 % de metanol/acetonitrilo (1/1, v/v) con 2010 ng/mL de furosemida y 0,2 μ mol/L de (R)-propranolol a los 5, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos. La mezcla se centrifugó y filtró y el sobrenadante se recogió para su análisis. Las concentraciones finales de hepatocitos crioconservados fueron 1 x 10⁶ células/mL. La concentración de incubación final de Compuesto 1a fue de 10 μ mol/L.

Condiciones de LC-MS/MS para la Identificación de Metabolitos

El sistema LC-MS/MS estaba compuesto por un HPLC Shimadzu y un cuadrupolo híbrido AB-SCIEX TripleTOF 5600 y un espectrómetro de masas TOF (Framingham, MA). El HPLC Shimadzu (Kyoto, Japón) consistía en un módulo de bus de comunicaciones (CBM-20A), un muestreador automático (SIL-30AC) con un cambiador de bastidor adjunto (Rack Changer II), dos bombas (LC-30AD) y un horno de columna (CTO-30A). El espectrómetro de masas se calibró utilizando las Soluciones de Calibración AB-SCIEX APCI tanto Negativas como Positivas (Framingham, MA). Las muestras obtenidas de incubaciones con hepatocitos se analizaron en modos de exploración tanto negativos como positivos. El método analítico básico y las condiciones instrumentales se resumen más adelante. La modificación de los ajustes del espectrómetro dependía de la necesidad del analito.

Condiciones de LC-MS/MS:

Cromatografía	Shimadzu LC30AD
Ajustes:	
Tipo de Columna	Agilent Eclipse XDB-C8, 5 μ , 2,1 x 150 mm, pieza n ^o 993700-906, n ^o de serie USSN002817
Fases Móviles	A: agua/metanol = 95/5 (v/v) con acetato de amonio 5 mM B: metanol/agua = 95/5 (v/v) con acetato de amonio 5 mM
Gradientes	0-1 min a 1 % de B; 1-5 min lineal a 10 % de B; 5-13 min lineal a 95 % de B; 13-19,9 min a 95 % de B; 19,9-20 min lineal a 1 % de B; 20-24 min a 1 % de B
Caudal	0,4 mL/min
Tiempo de Análisis	24 min
Bandeja de Muestra	4 °C
Temperatura	
Volumen de Inyección	15 μ L
Espectrómetro de Masas	Cuadrupolo AB Sciex Hybrid-TOF LC-MS/MS Triple TOF 5600
Ajustes:	
Fuente de Iones	Fuente de Iones DuoSpray
Polaridad	Negativa o Positiva
Tensión de Pulverización de Iones (ISVF)	4500 V o 5500 V
Temperatura (TEM)	550 °C
Gas de Cortina (CUR)	30
GS1	50
GS2	50
Ajustes TOF-MS:	CE -5,000 o 5,000 DP -100,000 o 100,000 intervalo de barrido: 120,0- 1000,0
Ajustes TOF MS ² :	CE -60,000 o 60,000 CES 5,000 DP -100,000 o 100,000 Intervalo de barrido: 100,0- 1000,0

Análisis de Datos de Datos de Actividad

Los datos de espectrometría de masas se adquirieron utilizando AB-Sciex Analyst TF (Versión 1.5.1; Framingham, MA). Los cromatogramas y espectros se obtuvieron utilizando AB-Sciex PeakView (Versión 2.2.0.1; Framingham, MA). La comparación de las áreas de los picos relativas para los cromatogramas de iones extraídos se basó en \pm 0,0002 Da de la relación masa-carga exacta esperada (m/z) para cada uno de los analitos de interés.

Resultados

No se detectó metabolito en las incubaciones con hepatocitos. En las condiciones analíticas presentadas, Compuesto 1a mostró un tiempo de retención de aproximadamente 7,8 minutos. En el modo de barrido negativo, Compuesto 1a mostró el ion molecular desprotonado m/z 745 ($C_{24}H_{25}F_2N_{10}O_8P_2S_2^-$) y el ion molecular doblemente desprotonado m/z 372 ($C_{24}H_{24}F_2N_{10}O_8P_2S_2^{2-}$). Se observaron los principales iones del producto MS/MS con m/z 533 ($C_{19}H_{19}FN_{10}O_4PS^-$) y m/z 186 ($C_9H_8N_5^-$). En el modo de barrido positivo, Compuesto 1a mostró el ion molecular protonado m/z 747 ($C_{24}H_{27}F_2N_{10}O_8P_2S_2^+$) y los principales iones del producto MS/MS con m/z 651 ($C_{24}H_{26}F_2N_{10}O_6PS^+$), m/z 252 ($C_{10}H_{11}FN_5O_2^+$), y m/z 188 ($C_9H_{10}N_5^+$). Los datos de MS y MS/MS confirman la estructura de Compuesto 1a.

Compuesto 1a fue estable en las incubaciones con hepatocitos de ratón, rata, perro, mono y ser humano. En este estudio no se identificó metabolito aparente alguno de Compuesto 1a. En las muestras obtenidas de incubaciones con hepatocitos, solo el propio Compuesto 1a pudo ser detectado y confirmado por los fragmentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Todos los documentos a los que se hace referencia en esta divulgación se incorporan en esta memoria como referencia, aunque si algún documento incorporado contradice esta memoria descriptiva escrita, prevalecerá esta memoria descriptiva escrita. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en el material proporcionado en esta memoria, y que ese material está dentro del alcance y espíritu de la divulgación.

LISTADOS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (WT STING Humano):

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggttctgctgagtgccctgcc
 tggtagccctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtaacctggtgctccacctagcctccctgcagctgggactgct
 gftaaacgggggtctgcagcctggtgtagggagctgcgccacatccactccaggtaaccggggcagctactggaggactgtgcgggct
 gcctgggctgccccctccgctggggccctgttctgctgtccatctatttctactctcctcccaaatgcggtcggcccgccttca
 cttggatgcttgcctctctgggctctcgcaggcactgaacatcctcctgggctcaaggcctggccccagctgagatctctgcagtg
 tgtgaaaaagggaattcaacgtggccatgggctggcatggtcatattacatcgatctgcggctgatcctgccagagctccaggc
 ccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacggggtgcagtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtgg
 ggtgctgataacctgagatggtgacctgacccaacattcctctggataaactgcccagcagaccggtgacctgggctggcatcaag
 gatcggggttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggcagcggggcggcacctgtctctggagtacgcaaccccttg
 cagacttgtttgccatgtcacaatacagtaagctggctttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactcttctgccggacactt
 gaggacatcctggcagatgccctgagctcagaacaactgccgctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgc
 tgtcccaggaggttctccggcacctgcggcaggggaaaaggagaggttactgtgggcagcttgaagacctcagcgggtgccagt
 acctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctcctctccgcacggatttctcttga

SEQ ID NO: 2 (REF STING Humano):

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggttctgctgagtgccctgcc
 tggtagccctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtaacctggtgctccacctagcctccctgcagctgggactgct
 gftaaacgggggtctgcagcctggtgtagggagctgcgccacatccactccaggtaaccggggcagctactggaggactgtgcgggct
 gcctgggctgccccctccgctggggccctgttctgctgtccatctatttctactctcctcccaaatgcggtcggcccgccttca
 cttggatgcttgcctctctgggctctcgcaggcactgaacatcctcctgggctcaaggcctggccccagctgagatctctgcagtg
 tgtgaaaaagggaattcaacgtggccatgggctggcatggtcatattacatcgatctgcggctgatcctgccagagctccaggc
 ccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacggggtgcagtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtgg
 ggtgctgataacctgagatggtgacctgacccaacattcctctggataaactgcccagcagaccggtgacctgctggcatcaag
 gatcggggttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggcagcggggcggcacctgtctctggagtacgcaaccccttg
 cagacttgtttgccatgtcacaatacagtaagctggctttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactcttctgccggacactt
 gaggacatcctggcagatgccctgagctcagaacaactgccgctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgc
 tgtcccaggaggttctccggcacctgcggcaggggaaaaggagaggttactgtgggcagcttgaagacctcagcgggtgccagt
 acctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctcctctccgcacggatttctcttga

SEQ ID NO: 3 (AQ STING Humano):

atccccactccagcctgcatccatccatcccgtgccaggggtcacgggcccagaaggcagcctfggttctgctgagtgccctgcc
tggtgaccctttgggggctagggagagccaccagagcacactctccggfacctgggtgctccacctaagcctccctgacagctgggactgct
gtfaaacgggggtctgagcctggctgaggagctgcccacatccactccaggtaccggggcagctactggaggactgtgcccggcct
gcctgggctgccccctccgcccgtggggccctgtgctgctgctccatctattctactactcctcccaaatgcggctggcccgccttca
ctggatgcttgcctcctgggctctgcagggcactgaacatcctcctgggctcaagggctggccccagctgagatctctgacagtg
tgtgaaaaagggaattcaacgtggccatgggctggcatggcatattacatcggatatctgaggctgatcctgccagagctccaggc
ccggattcgaactfacaatcagcattacaacaacctgctacgggggtgacgtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtgg
ggtgctgataacctgagatggctgacccaacattcgttctggataaactgcccagcagaccgctgaccgagctggcatcaag
gatcggggttacgcaacagcatctatgagcttctggagaacgggcagcggggggcacctgtgctctggagtagccacccccctg
cagactttgttggcatgtcacaatacagcaagctggcttagccgggagataggcttgagcaggccaaactctctgccagacact
gaggacatcctggcagatgccctgagctcagaacaactgccctcattgctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgc
tgcccaggaggttctccggcacctgcggcagggagaaaaggaggttactgtggcagcttgaagacctcagcgggtgccagt
acctccacgatgtcccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctcctctccgcacggatttctctga

SEQ ID NO: 4 (WT STING residuos 155-341):

VAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDN
LSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLF
AMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADSSFSLSQ
5 EVLRHLRQEEKEEV

SEQ ID NO: 5 (His-TEV-Sumo-WT STING 155-341)

MHHHHHHSSGVDLGTENLYFQSNAMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGS
SEIFFKIKKTTPLRRLMEAF AKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEA
HREQIGGGSVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLP
LDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLE
YATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEP
ADSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEV
10

SEQ ID NO: 6 (REF STING residuos 155-341):

VAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDN
LSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTL
FAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADSSFSLS
QEVLRHLRQEEKEEV

SEQ ID NO: 7 (His-TEV-Sumo REF STING 155-341)

MHHHHHHSSGVDLGTENLYFQSNAMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGS
SEIFFKIKKTTPLRRLMEAF AKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEA
HREQIGGGSVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLP
LDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLE
YATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEP
ADSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEV
15

LISTA DE SECUENCIAS

[0389]

5 <110> Eisai R&D Management Co., Ltd.
Kim, Dae-Shik
Fang, Frank
Endo, Atsushi
Choi, Hyeong-Wook

10 Hao, Ming-Hong
Bao, Xingfeng
Huang, Kuan-Chun
<120> Compuestos para el Tratamiento del Cáncer
<130> 0080171-000371

15 <150> 62/460562
<151> 2017-02-17
<150> 62/479169
<151> 2017-03-30
<150> 62/551645

20 <151> 2017-08-29
<150> 62/551647
<151> 2017-08-29
<150> 62/551668
<151> 2017-08-29

25 <160> 7
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 1140
<212> ADN

30 <213> Homo sapiens
<400> 1

atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtocca ggggtcacgg ggcccagaag	60
gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca	120
gagcacactc tccggtacct ggtgctccac cttagcctccc tgcagctggg actgctgtta	180
aacgggggtct gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggta cgggggcagc	240
tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg	300
ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggctg gcccgccctt cacttgatg	360
cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc	420
ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa gggaatttca acgtggcca tgggctggca	480
tggtcatatt acatcggata tctgcggtg atcctgccag agctccaggc ccggattcga	540
acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt	600
ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgacct caacattcgc	660
ttcctggata aactgcccc aacagaccgt gaccgggctg gcatcaagga tcgggtttac	720
agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag	780
tacgccacc ccttgagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc	840
cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca	900
gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcatcct accaggaacc tgcagatgac	960
agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag	1020
gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag	1080
cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctcttga	1140

35 <210> 2

ES 2 906 299 T3

<211> 1140

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag      60
gcagccttgg ttctgctgag tgctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca      120
gagcacactc tccggtagct ggtgctccac ctagcctccc tgcagctggg actgctgtta      180
aacggggctc gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggtg ccggggcagc      240
tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg      300
ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggctg gccgccctt cacttgatg      360
cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc      420
ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa ggaatttca acgtggccca tgggctggca      480
tggatcatatt acatcgata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga      540
acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt      600
ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgacct caacattcgc      660
ttcctggata aactgcccc gacagccggt gaccatgctg gcatcaagga tcgggtttac      720
agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag      780
tacgccacc cctgcagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc      840
cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca      900
gatgcccttg agtctcagaa caactgccgc ctcatcctc accaggaacc tgcagatgac      960
agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggaggagga aaaggaagag     1020
gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtccaagag     1080
5  cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctcttga     1140

```

<210> 3

<211> 1140

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

10

ES 2 906 299 T3

atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag 60
gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca 120
gagcacactc tccggtacct ggtgctccac cttagcctccc tgcagctggg actgctgtta 180
aacggggctc gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggtc cgggggcagc 240
tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg 300
ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggtcg gcccgccctt cacttgggatg 360
cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc 420
ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa ggaatttca acgtggccca tgggctggca 480
tggatcatatt acatcggata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga 540
acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt 600
ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgacct caacattcgc 660
ttcctggata aactgcccc gcagaccgct gaccgagctg gcatcaagga tcgggtttac 720
agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag 780
tacgccacc ccttgagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc 840
cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccaga cacttgagga catcctggca 900
gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcatcgcct accaggaacc tgcagatgac 960
agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag 1020
gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag 1080
cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag ccctccctc tccgcacgga tttctcttga 1140

<210> 4
<211> 187
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 4

Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu
1 5 10 15
Ile Leu Pro Glu Leu Gln Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr
20 25 30
Asn Asn Leu Leu Arg Gly Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu
35 40 45
Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn

ES 2 906 299 T3

50

55

60

Ile Arg Phe Leu Asp Lys Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly
65 70 75 80

Ile Lys Asp Arg Val Tyr Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn
85 90 95

Gly Gln Arg Ala Gly Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln
100 105 110

Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu
115 120 125

Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile
130 135 140

Leu Ala Asp Ala Pro Glu Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr
145 150 155 160

Gln Glu Pro Ala Asp Asp Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu
165 170 175

Arg His Leu Arg Gln Glu Glu Lys Glu Glu Val
180 185

<210> 5

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción His-TEV-Sumo-WT STING

<400> 5

Met His His His His His His Ser Ser Gly Val Asp Leu Gly Thr Glu
1 5 10 15

Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asn Ala Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
20 25 30

Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
35 40 45

Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
50 55 60

Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
65 70 75 80

10

ES 2 906 299 T3

Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
 85 90 95

Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
 100 105 110

Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Gly Ser Val Ala His Gly
 115 120 125

Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu
 130 135 140

Leu Gln Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Arg Gly Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys
 165 170 175

Gly Val Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu
 180 185 190

Asp Lys Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg
 195 200 205

Val Tyr Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala
 210 215 220

Gly Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala
 225 230 235 240

Met Ser Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu
 245 250 255

Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala
 260 265 270

Pro Glu Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala
 275 280 285

Asp Asp Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg
 290 295 300

Gln Glu Glu Lys Glu Glu Val
 305 310

<210> 6

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 906 299 T3

Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu
1 5 10 15

Ile Leu Pro Glu Leu Gln Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr
20 25 30

Asn Asn Leu Leu Arg Gly Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu
35 40 45

Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn
50 55 60

Ile Arg Phe Leu Asp Lys Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly
65 70 75 80

Ile Lys Asp Arg Val Tyr Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn
85 90 95

Gly Gln Arg Ala Gly Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln
100 105 110

Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu
115 120 125

Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile
130 135 140

Leu Ala Asp Ala Pro Glu Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr
145 150 155 160

Gln Glu Pro Ala Asp Asp Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu
165 170 175

Arg His Leu Arg Gln Glu Glu Lys Glu Glu Val
180 185

<210> 7

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción His-TEV-Sumo-REF STING 155-341

<400> 7

ES 2 906 299 T3

Met His His His His His His Ser Ser Gly Val Asp Leu Gly Thr Glu
1 5 10 15

Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asn Ala Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
20 25 30

Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
35 40 45

Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
50 55 60

Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
65 70 75 80

Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
85 90 95

Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
100 105 110

Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Gly Ser Val Ala His Gly
115 120 125

Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu
130 135 140

Leu Gln Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu
145 150 155 160

Arg Gly Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys
165 170 175

Gly Val Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu
180 185 190

Asp Lys Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg
195 200 205

Val Tyr Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala
210 215 220

Gly Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala
225 230 235 240

Met Ser Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu
245 250 255

ES 2 906 299 T3

Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala
260 265 270

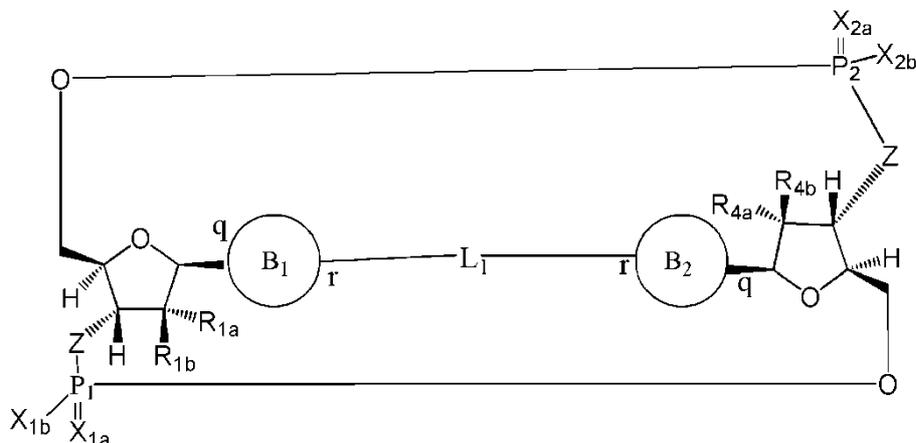
Pro Glu Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala
275 280 285

Asp Asp Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg
290 295 300

Gln Glu Glu Lys Glu Glu Val
305 310

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

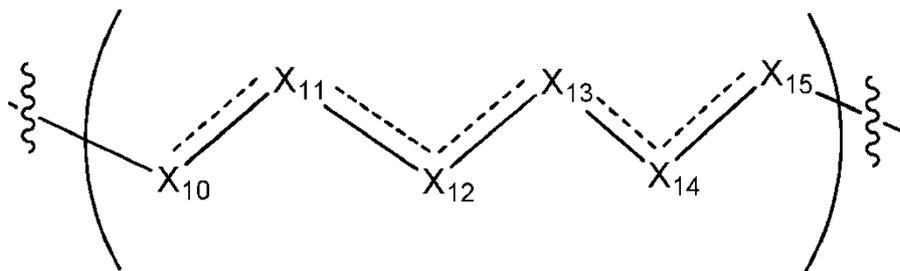
Z es -O- o -NH-;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)Oalquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (III) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es



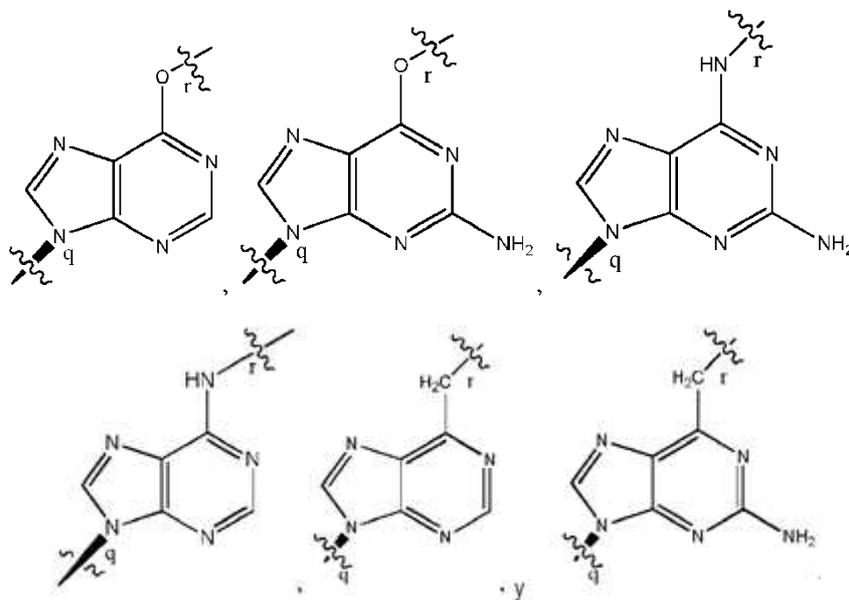
en la que indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de en L₁ indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de en L₁ indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de en L₁ indica un triple enlace, 0 apariciones de en L₁ indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de en L₁ indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;

en donde X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH₂- o -CH-, en donde el -CH₂- o -CH- está no sustituido o está sustituido con (i) -OH, (ii) -F, (iii) -Cl, (iv) -NH₂ o (v) -D, y cuando X₁₀ o X₁₅ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;

y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C₃ o un heterocicloalquilo C₃, incluyendo dicho heterocicloalquilo C₃ un átomo de N u O;

5

en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



10

en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (III).

2. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, en donde:

15

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos -F;

20

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos -F;

25

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

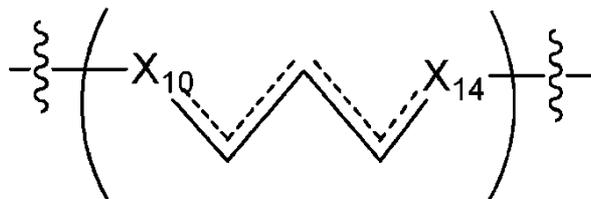
X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

30

en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (III) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es



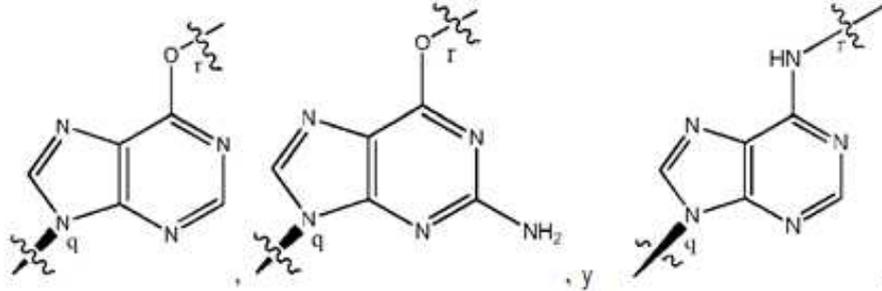
35

en la que indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de en L₁ indica un doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

40

en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

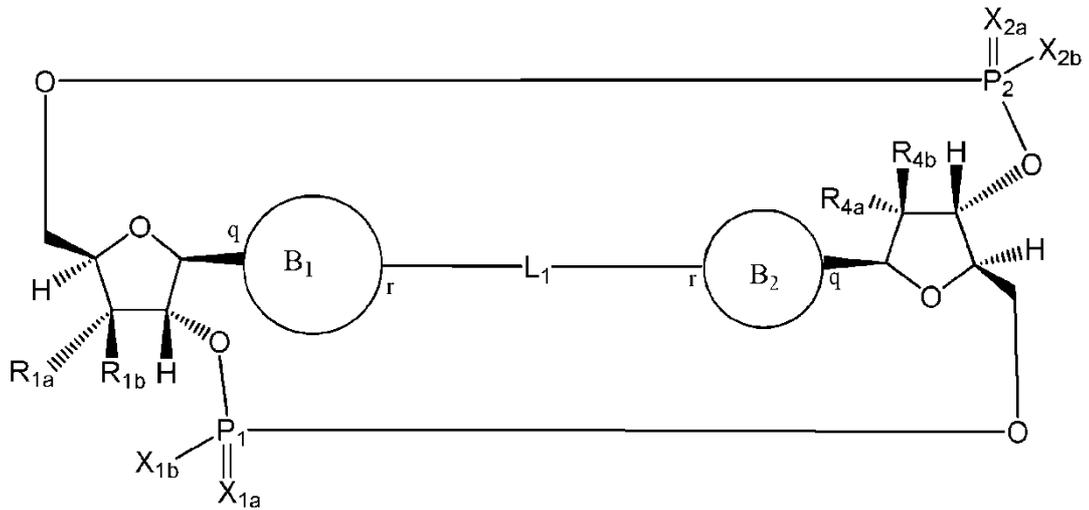
en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



5

en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (III).

3. Un compuesto de Fórmula (IV):



10

(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

15

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

20

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

25

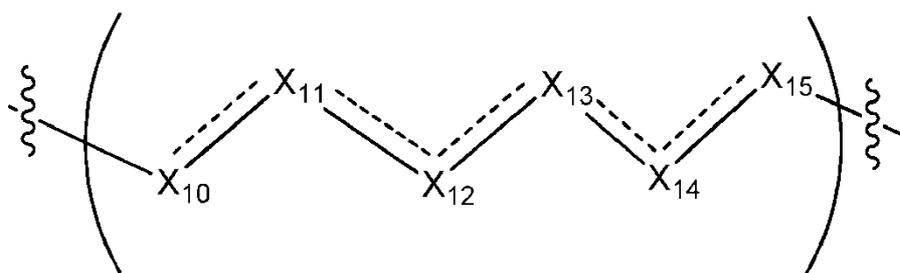
X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)Oalquilo C₁₋₆;

30

L₁ en la fórmula (IV) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es

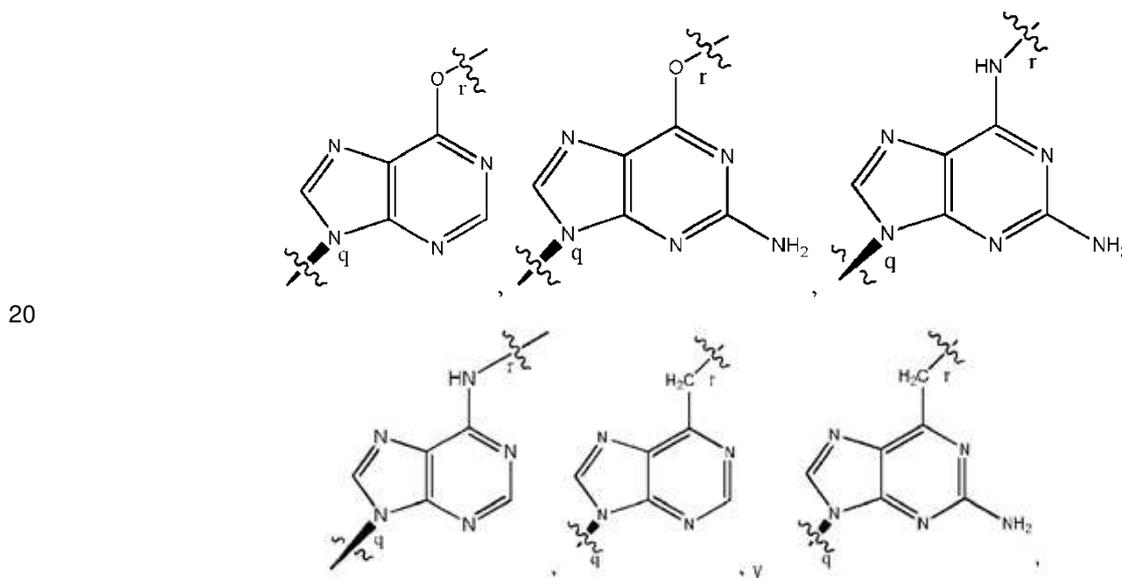


5 en la que ----- indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de ----- en L_1 indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de ----- en L_1 indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de ----- en L_1 indica un triple enlace, 0 apariciones de ----- en L_1 indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de ----- en L_1 indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;

10 en donde X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} y X_{15} se seleccionan independientemente de un enlace, $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}-$, en donde el $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}-$ está no sustituido o está sustituido con (i) $-\text{OH}$, (ii) $-\text{F}$, (iii) $-\text{Cl}$, (iv) $-\text{NH}_2$ o (v) $-\text{D}$, y cuando X_{10} o X_{15} es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;

15 y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} y X_{15} pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C_3 o un heterocicloalquilo C_3 , incluyendo dicho heterocicloalquilo C_3 un átomo de N u O;

en donde B_1 y B_2 se seleccionan independientemente de:



en que los enlaces en los puntos q y r en B_1 y B_2 están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (IV),

25 o en donde

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en $-\text{H}$ y $-\text{F}$;

30 R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en $-\text{H}$ y $-\text{F}$, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos $-\text{F}$;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en $-\text{H}$ y $-\text{F}$;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en $-\text{H}$ y $-\text{F}$, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos $-\text{F}$;

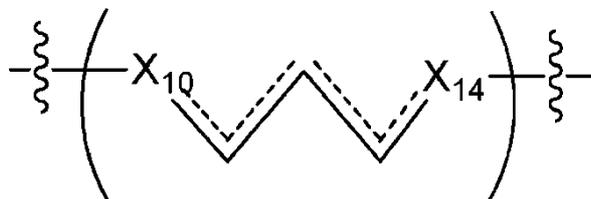
35 P_1 y P_2 , cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de $=\text{O}$ o $=\text{S}$;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅; en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

L₁ en la fórmula (IV) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es

5



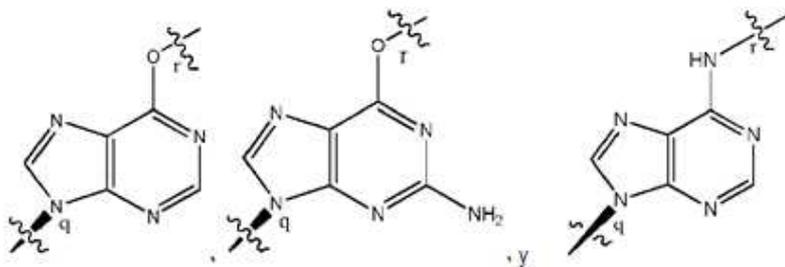
en la que ----- indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de ----- en L₁ indica un doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

10

en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

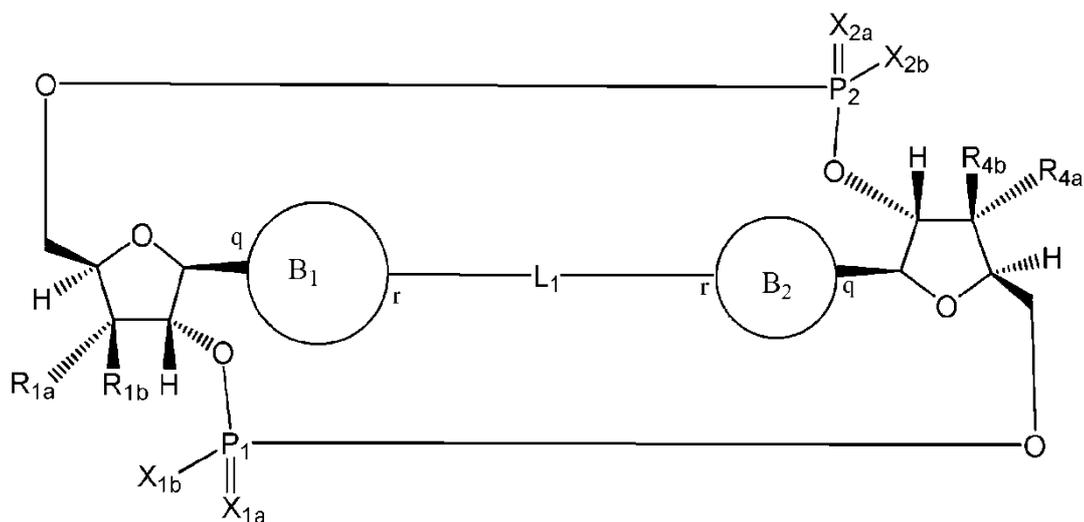
en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:

15



en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (IV).

20 4. Un compuesto de Fórmula (V):



(V)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

25

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{1a} y R_{1b} es -H;

30

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F;

R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH y -F, en donde al menos uno de R_{4a} y R_{4b} es -H;

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

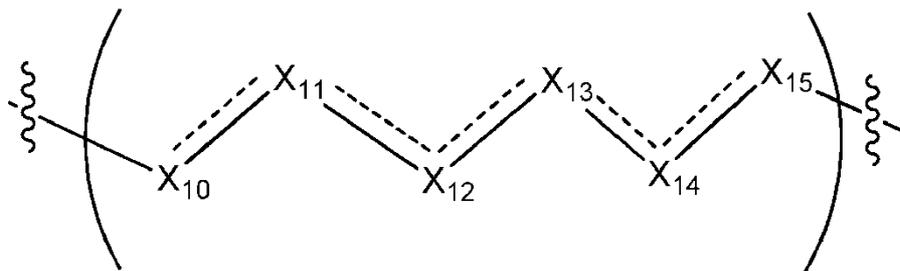
5 X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅;

en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆ y -CH₂OC(O)alquilo C₁₋₆;

10

L₁ en la fórmula (V) es de cuatro, cinco o seis carbonos de longitud y es

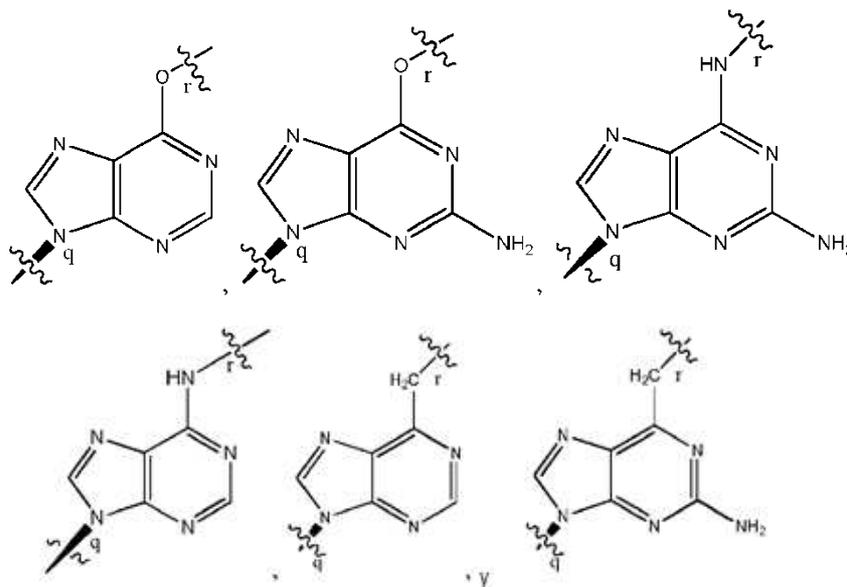


15 en la que ----- indica un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace y en donde (i) 0 o 1 aparición de ----- en L₁ indica un triple enlace; o (ii) 0, 1 o 2 apariciones de ----- en L₁ indican a doble enlace, en donde la geometría en torno a cada uno de los dobles enlaces es cis o trans; y (iii) en donde cuando 1 aparición de ----- en L₁ indica un triple enlace, 0 apariciones de ----- en L₁ indica un doble enlace; o (iv) en donde 2 apariciones de ----- en L₁ indica un doble enlace, esos dobles enlaces son enlaces adyacentes o enlaces alternos;

20 en donde X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH₂- o -CH-, en donde el -CH₂- o -CH- está no sustituido o está sustituido con (i) -OH, (ii) -F, (iii) -Cl, (iv) -NH₂ o (v) -D, y cuando X₁₀ o X₁₅ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace o triple enlace;

25 y en donde dos miembros adyacentes del grupo que incluyen X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄ y X₁₅ pueden formar opcionalmente, con átomos adicionales, un cicloalquilo C₃ o un heterocicloalquilo C₃, incluyendo dicho heterocicloalquilo C₃ un átomo de N u O;

30 en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



35 en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (V), o en donde

R_{1a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

R_{1b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{1a} y R_{1b} pueden no ser ambos -F;

R_{4a} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F;

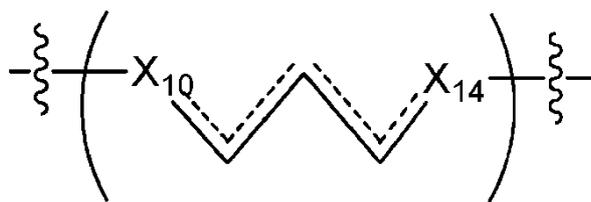
5 R_{4b} se selecciona del grupo que consiste en -H y -F, en donde R_{4a} y R_{4b} pueden no ser ambos -F;

P₁ y P₂, cada uno independientemente, tiene una configuración estereoquímica S o R;

X_{1a} y X_{2a} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de =O o =S;

10 X_{1b} y X_{2b} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -OR₅ y -SR₅; en donde R₅ se selecciona del grupo que consiste en -H, alquilo C₁₋₆ y -C(O)alquilo C₁₋₆;

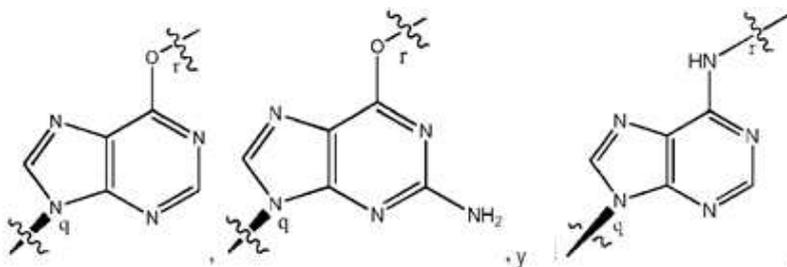
15 L₁ en la fórmula (V) es de cuatro o cinco carbonos de longitud y es



20 en la que ----- indica un enlace sencillo o un doble enlace, y en donde 0 o 1 aparición de ----- en L₁ indica un doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es cis o trans;

20 en donde X₁₀ y X₁₄ se seleccionan independientemente de un enlace, -CH- o -CH₂-, y en donde, cuando X₁₀ o X₁₄ es un enlace, ese enlace no es un doble enlace;

25 en donde B₁ y B₂ se seleccionan independientemente de:



en que los enlaces en los puntos q y r en B₁ y B₂ están fijados en los puntos q y r en la Fórmula (V).

30 5. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, en donde

(i) la configuración estereoquímica de P₁ y P₂ son ambos R, la configuración estereoquímica de P₁ es R y de P₂ es S, o la configuración estereoquímica de P₁ es S y de P₂ es R;

35 (ii) una aparición de ----- en L₁ indica un doble enlace, en donde la geometría en torno al doble enlace es trans; y

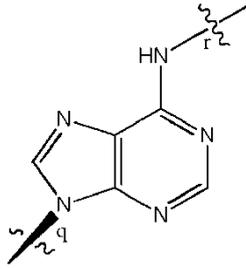
(iii) Z es -O-

40 y, preferiblemente, en donde

R_{1a} y R_{4a} son cada uno -F o

R_{1b} y R_{4b} son cada uno -F.

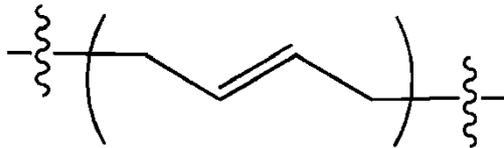
45 6. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde B₁ y B₂ son cada uno



y, preferiblemente, en donde

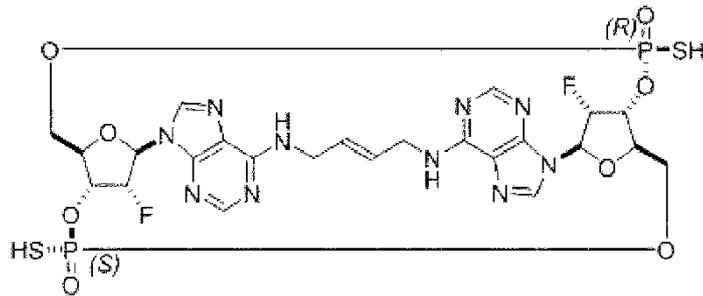
5 X_{1a} y X_{2a} son ambos =O, y X_{1b} y X_{2b} son ambos -SH.

7. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde L_1 es de cuatro o cinco carbonos de longitud y, preferiblemente, en donde L_1 es

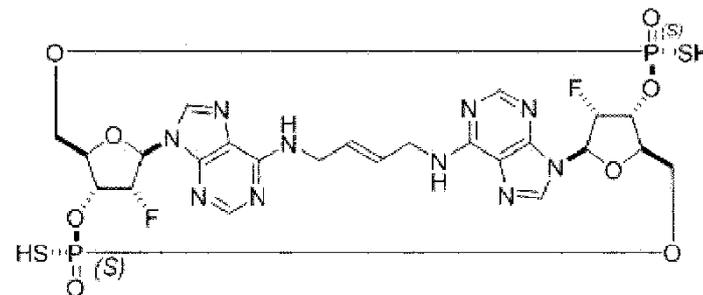
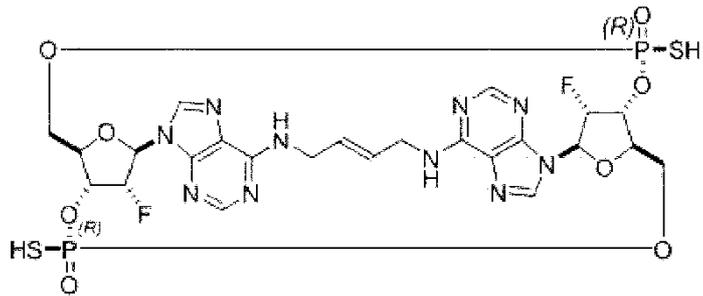


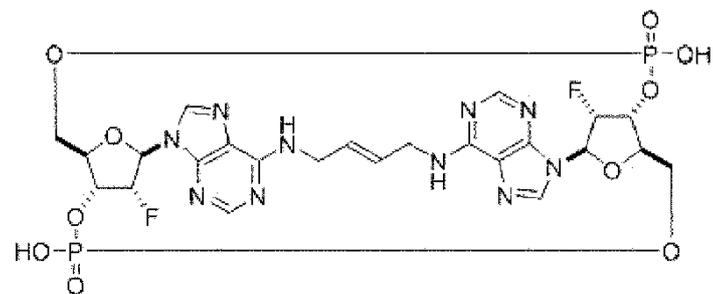
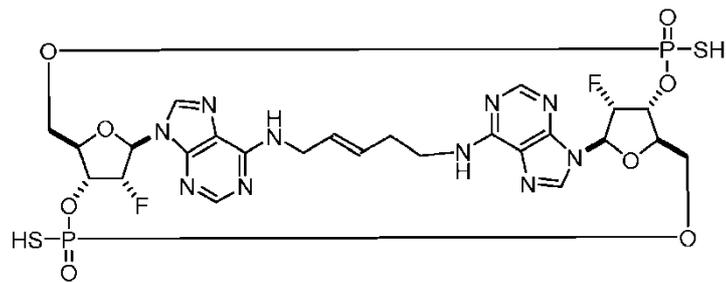
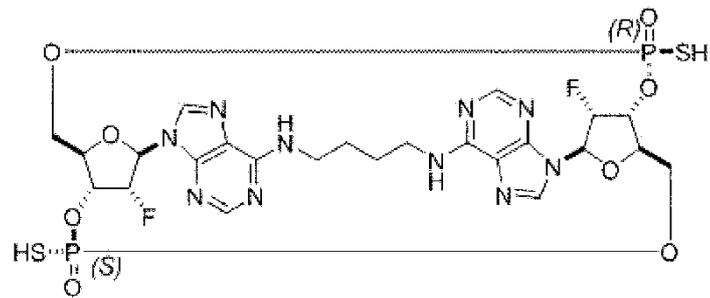
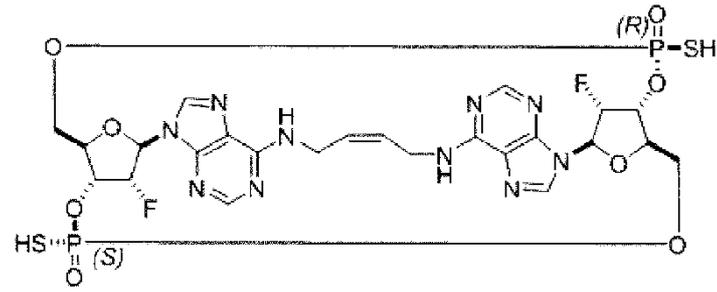
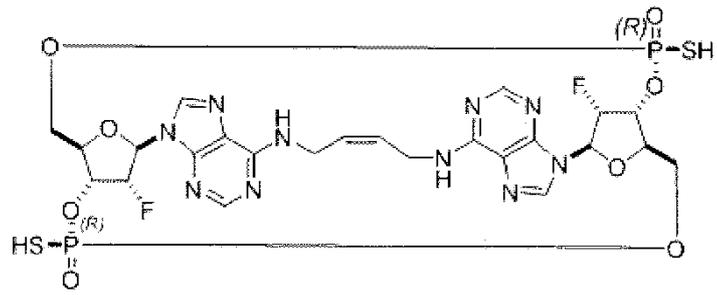
10

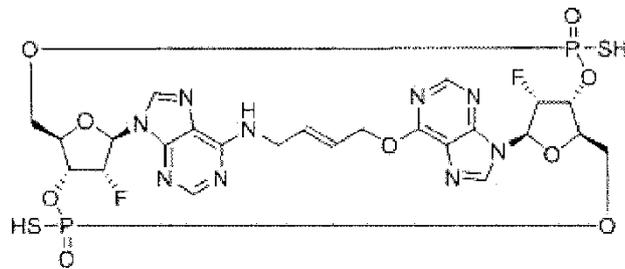
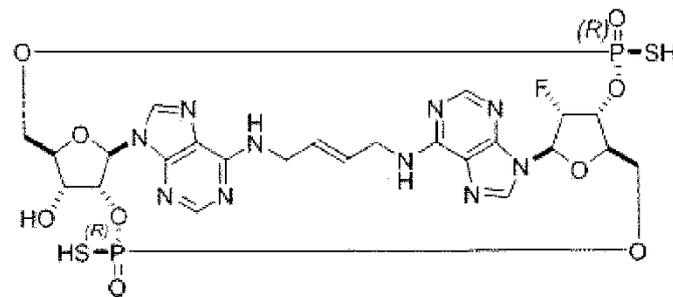
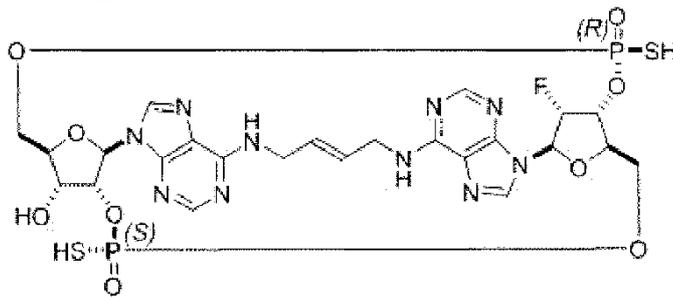
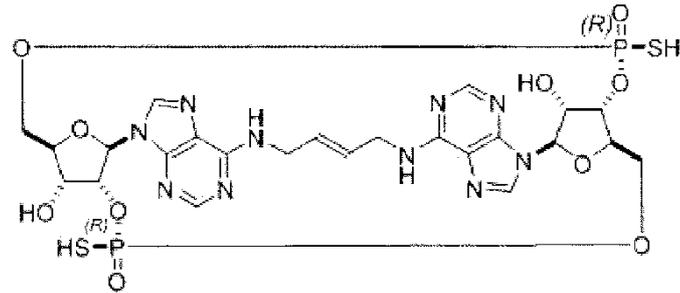
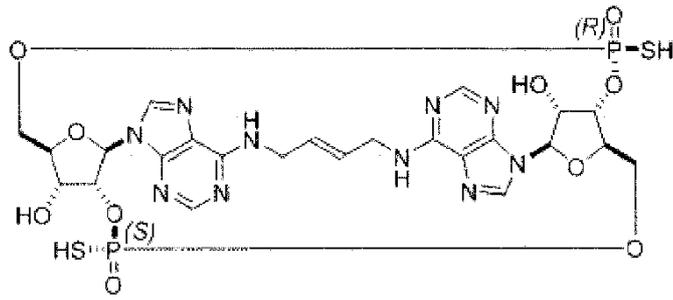
8. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado del grupo que consiste en:

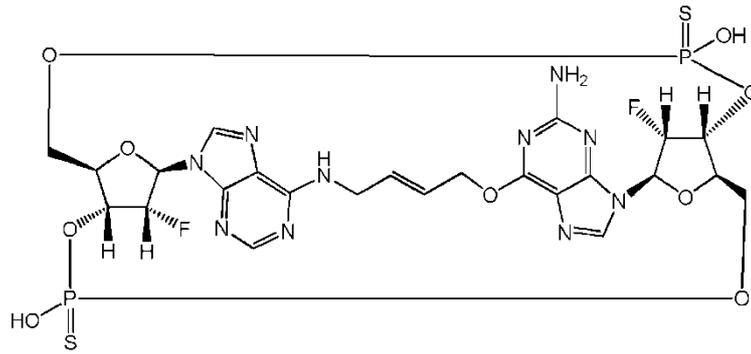


15

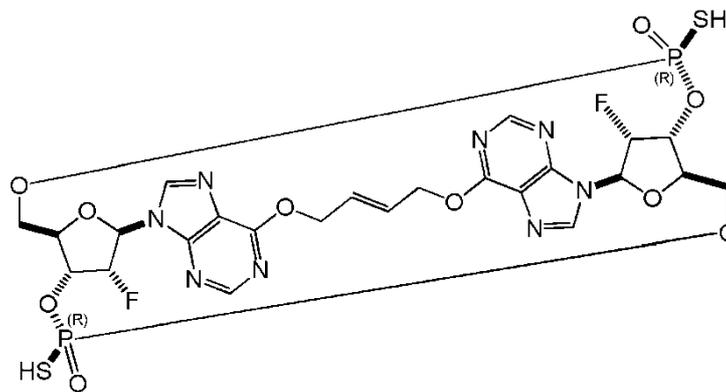
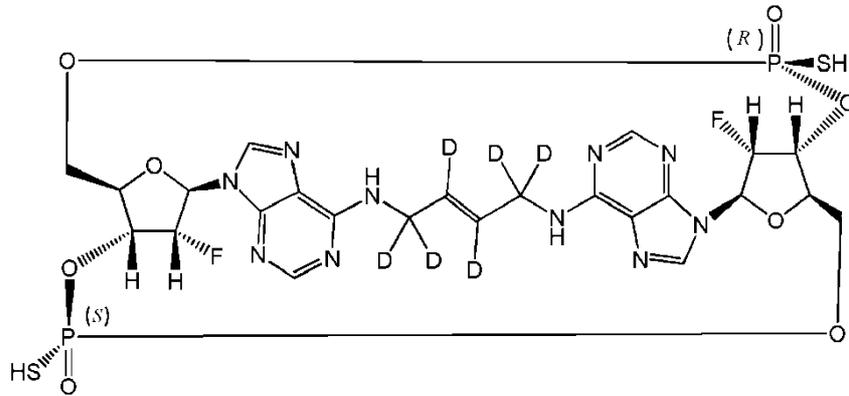
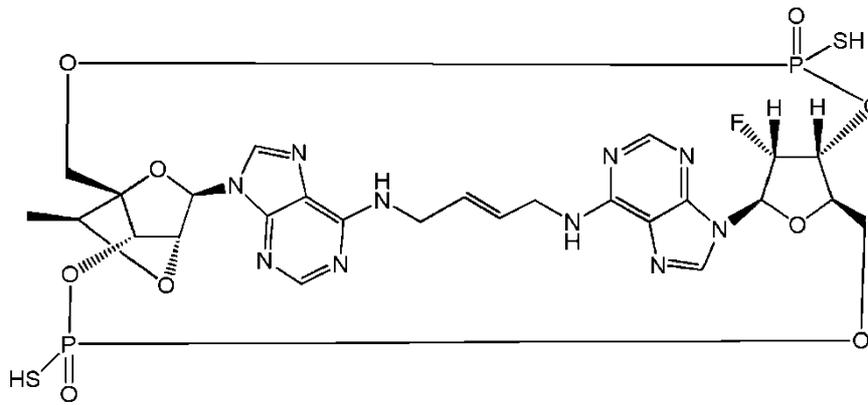


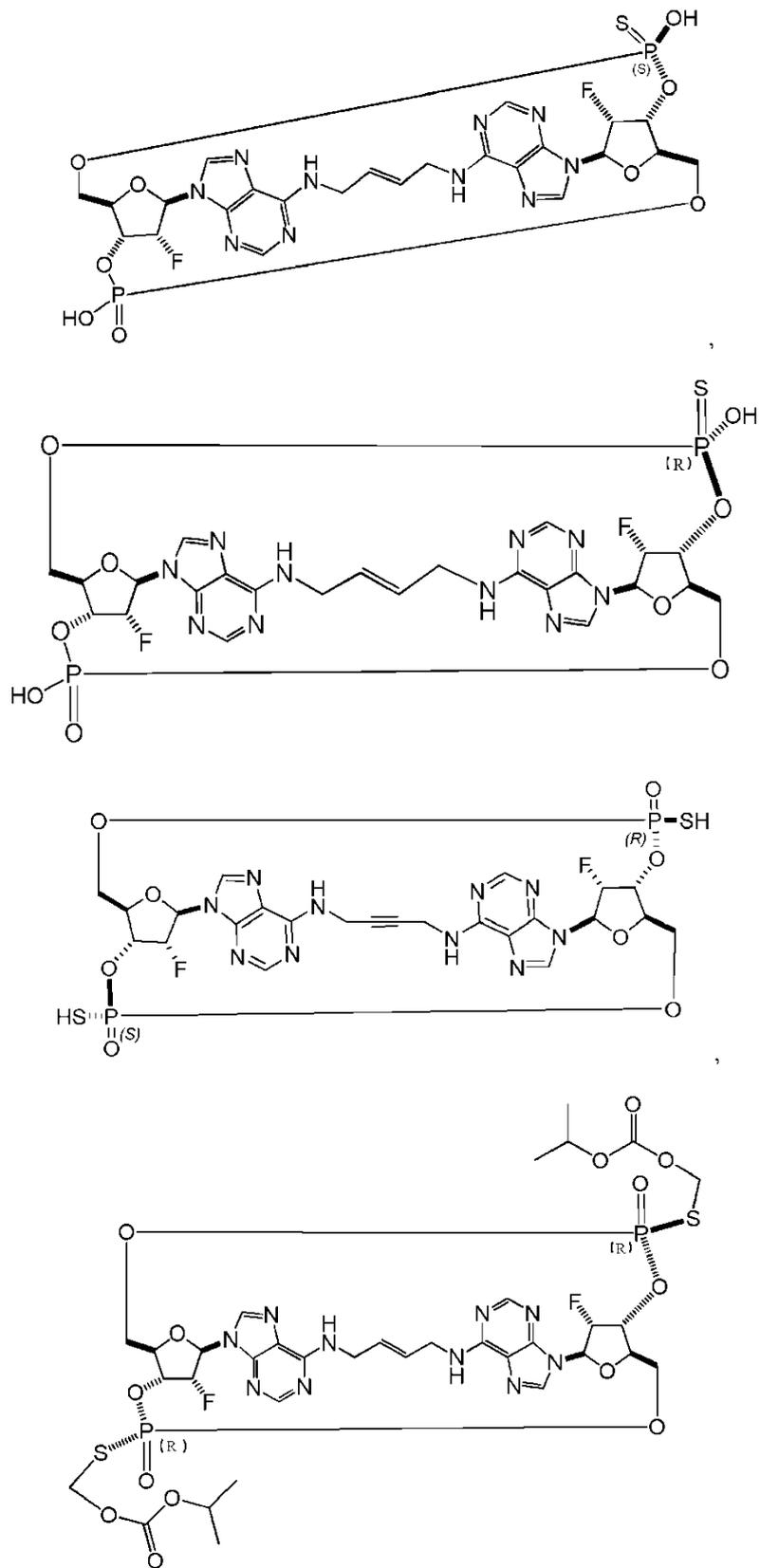


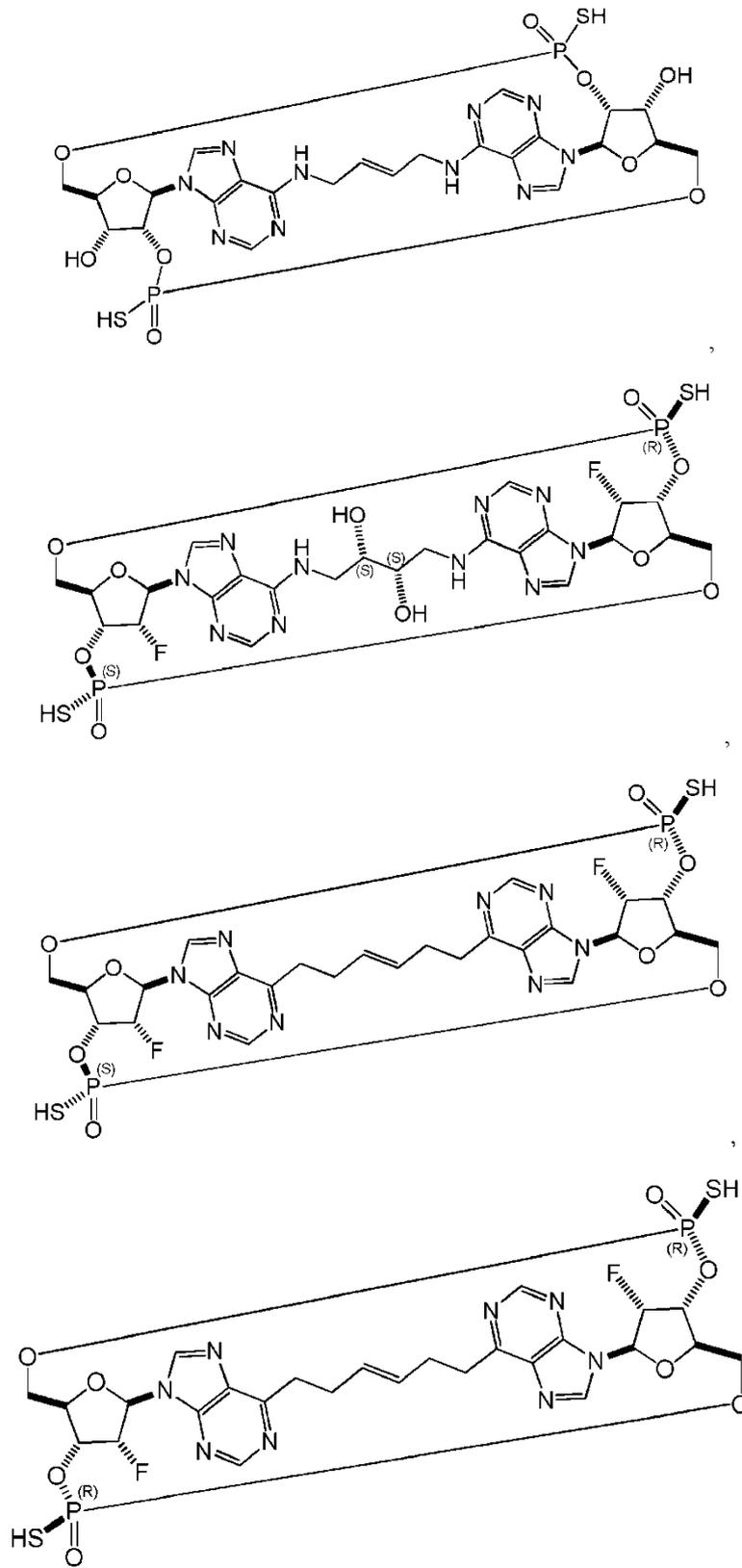


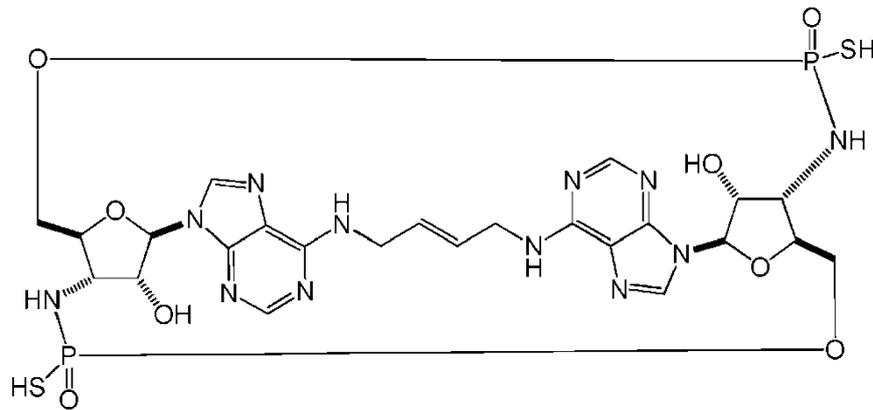
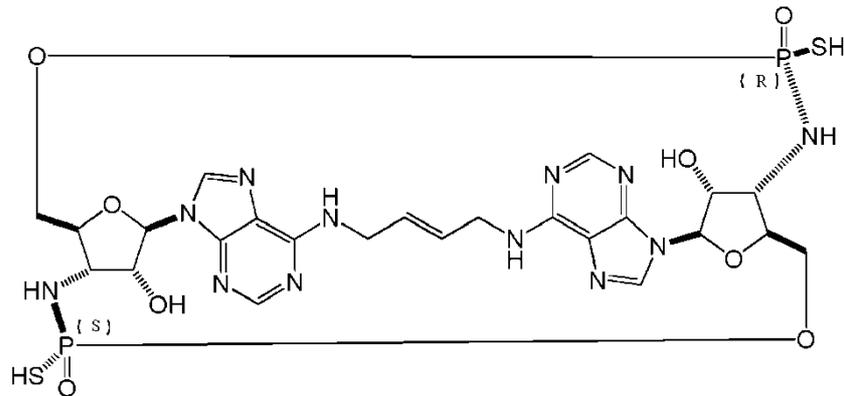
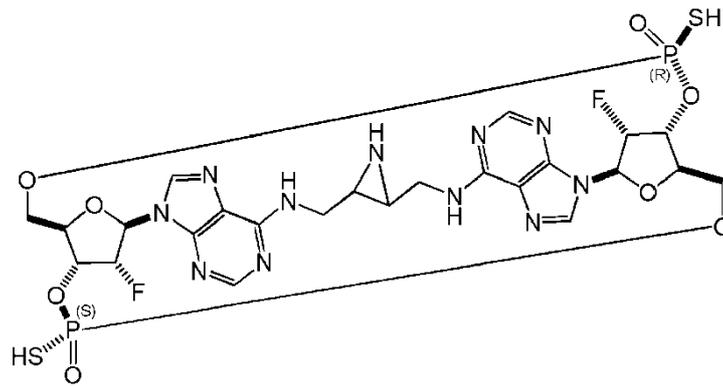


y

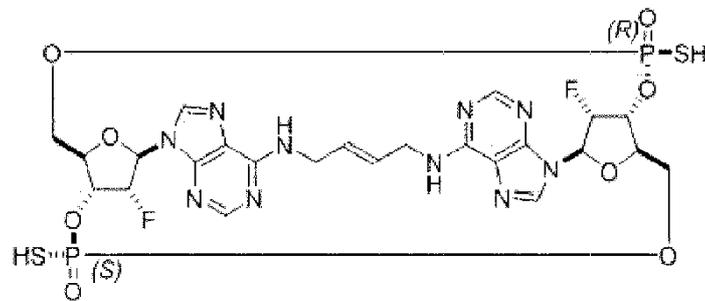


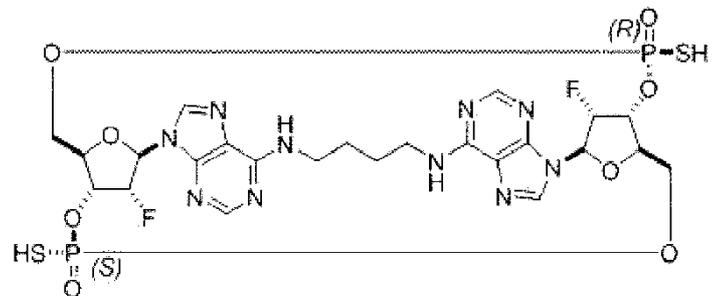
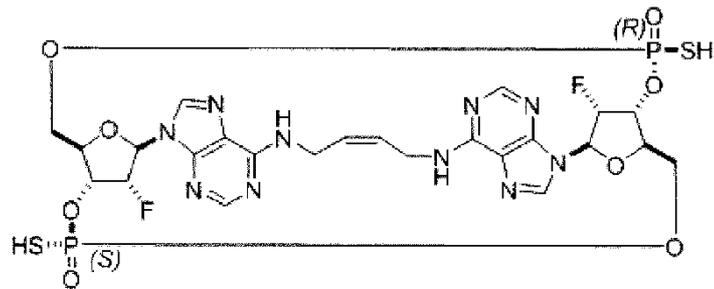
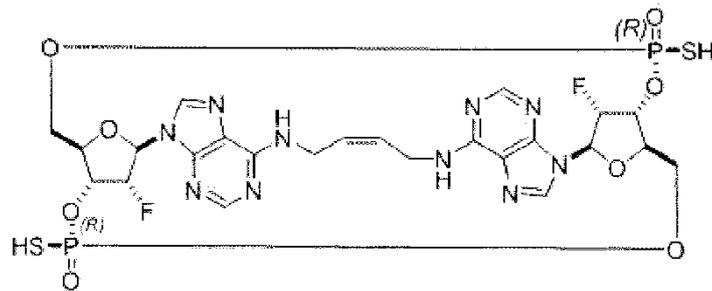
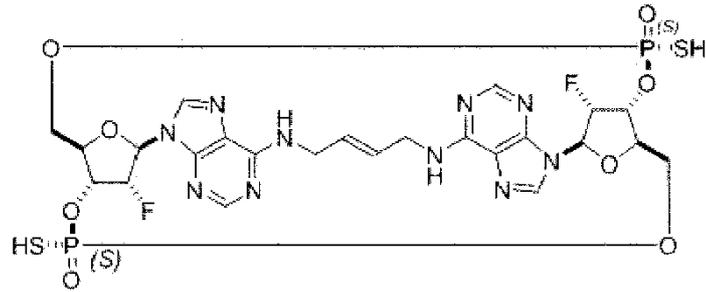
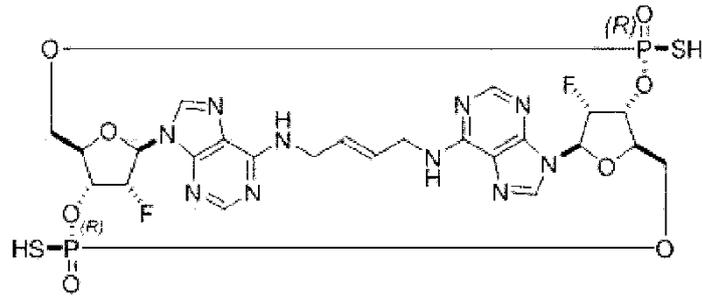


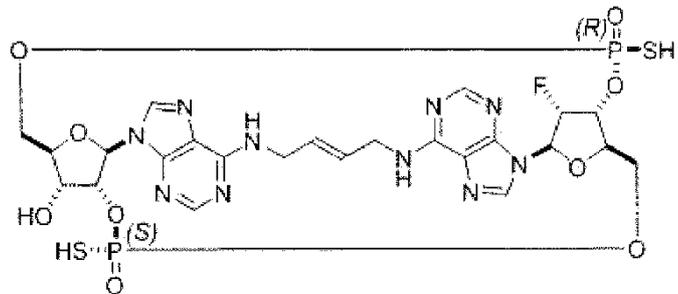
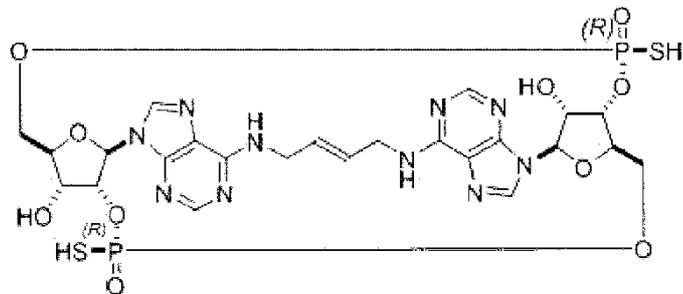
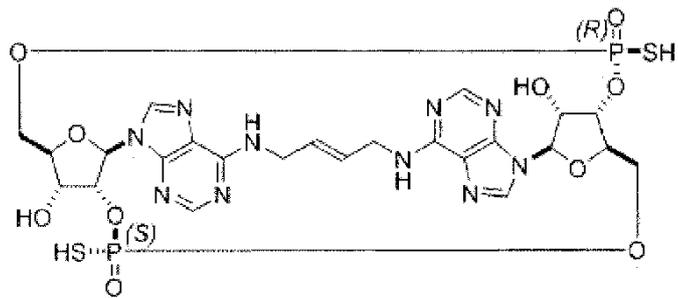
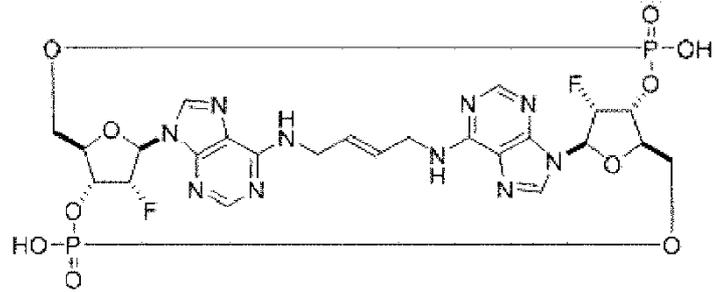
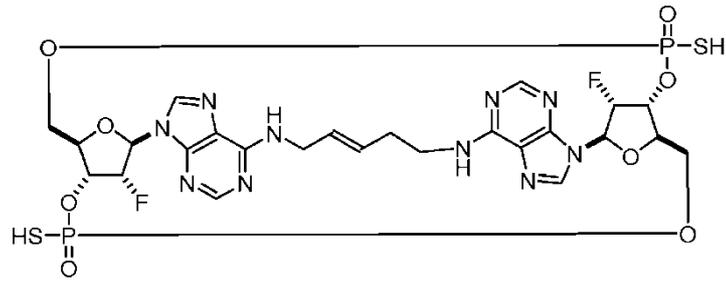


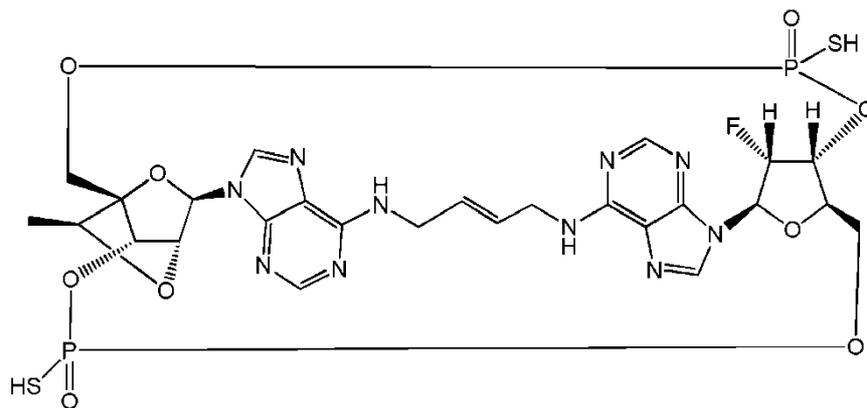
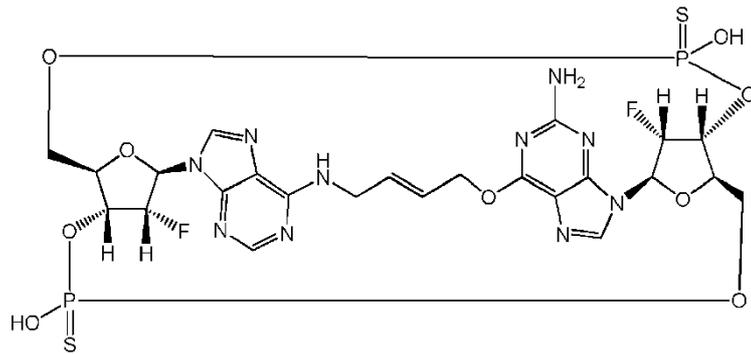
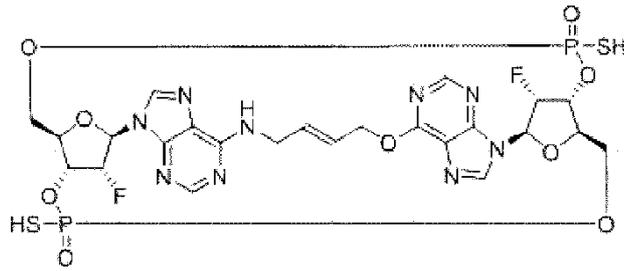
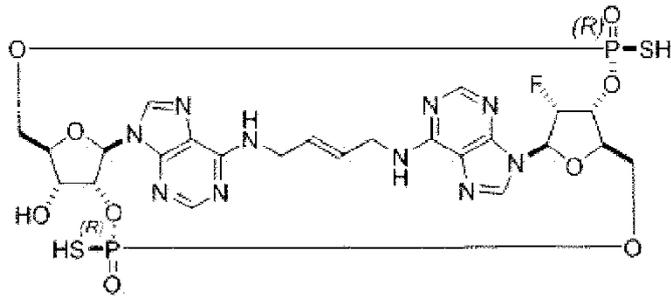


en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se selecciona del grupo que consiste en:









5

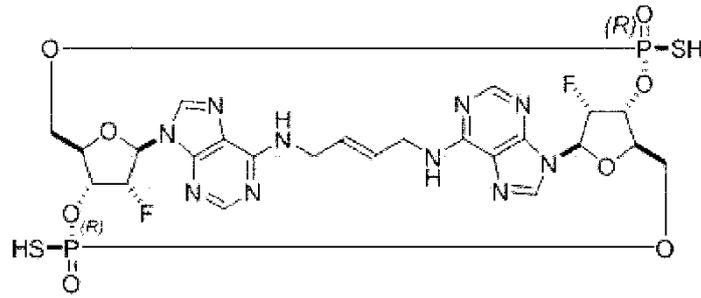
y

10

15

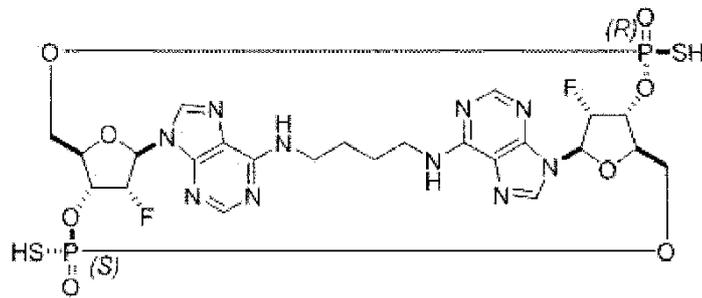
9. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable tiene (i) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan la variante AQ STING humana; (ii) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan la variante WT STING humana; o (iv) un valor CE_{50} por debajo de 100 micromolar en células informadoras que expresan la variante REF STING humana.

10. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 8, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

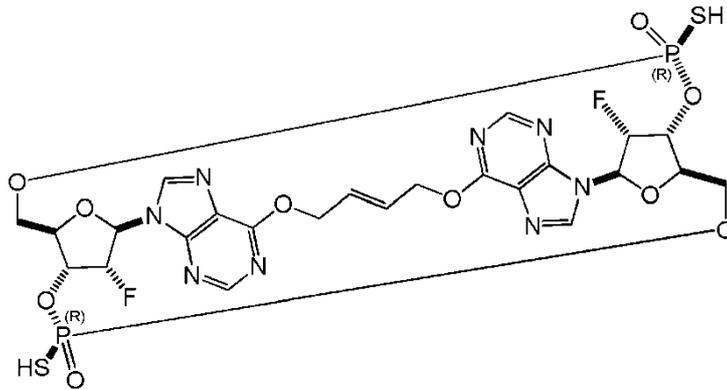
5 11. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 8, en donde el compuesto es:



, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

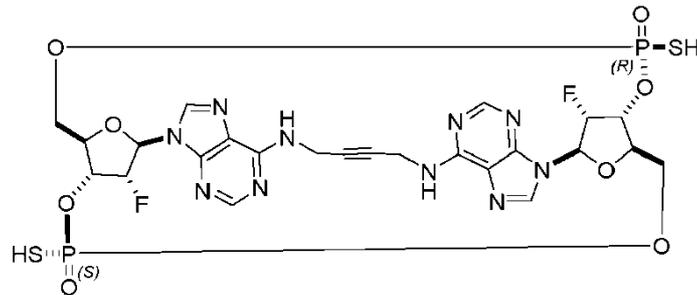
10

12. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 8, en donde el compuesto es:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

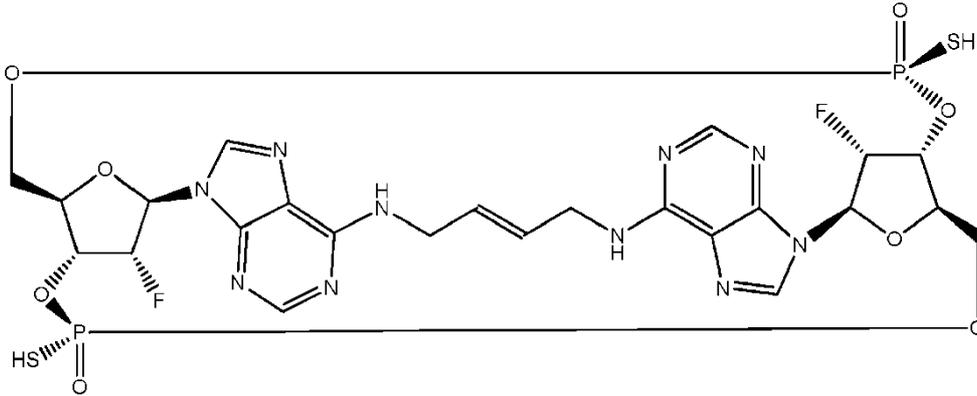
13. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 8, en donde el compuesto es:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es:



- 5 15. Una sal farmacéuticamente aceptable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la sal es una sal de diamonio.
16. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14.
- 10 17. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 18. Un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y 17, para uso en el tratamiento del cáncer, en donde el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en linfoma, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de riñón y glioma.
- 20 19. Un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y 17 o 18, para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, que tiene
- alelo REF STING o
 - alelo WT STING o
- 25 • alelo AQ STING o
- alelo HAQ STING.
- 30 20. Un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica de la reivindicación 18, para uso en el tratamiento de cáncer, en donde dicho cáncer es metastásico.

FIG. 1

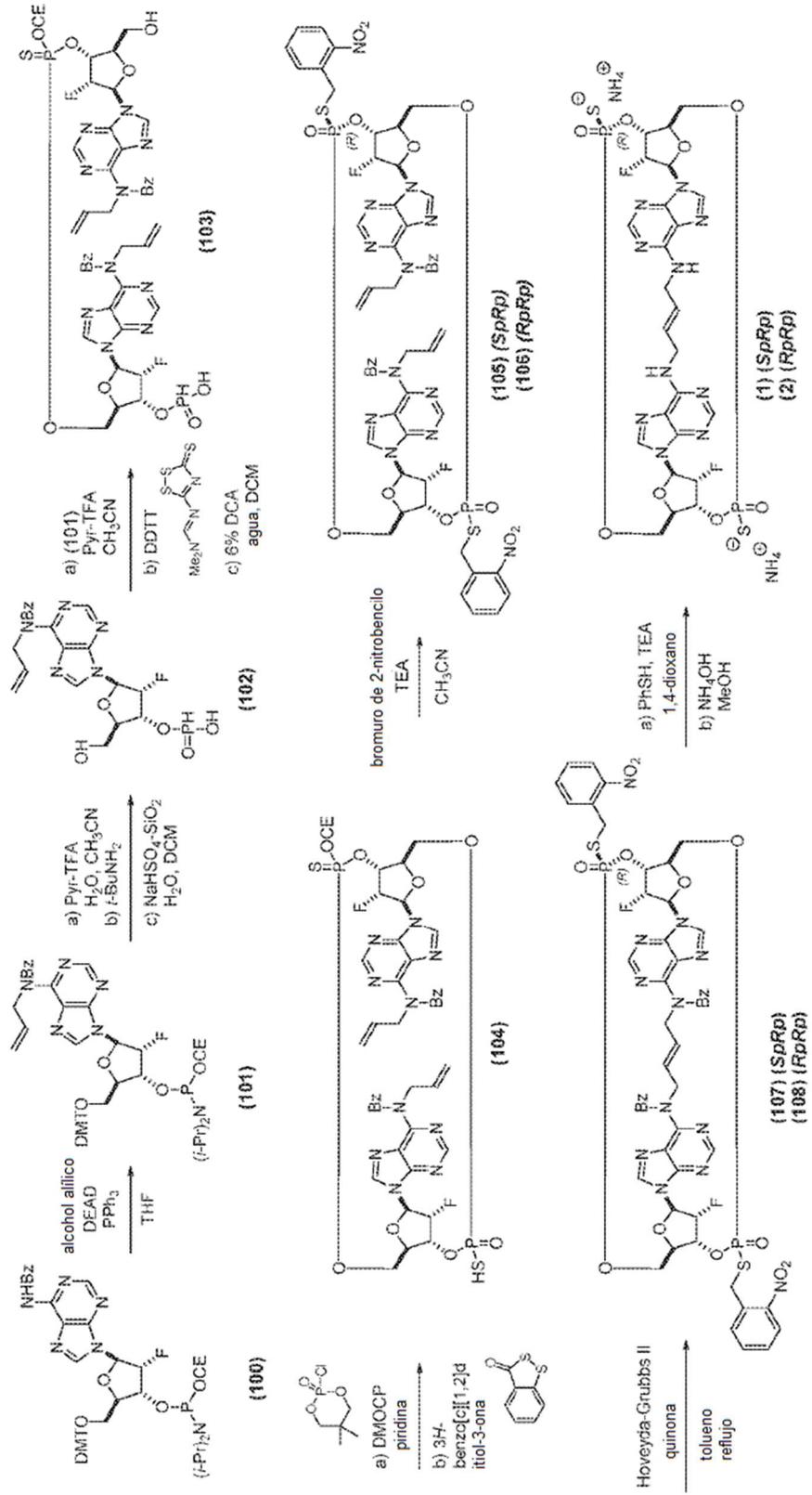


FIG. 2A

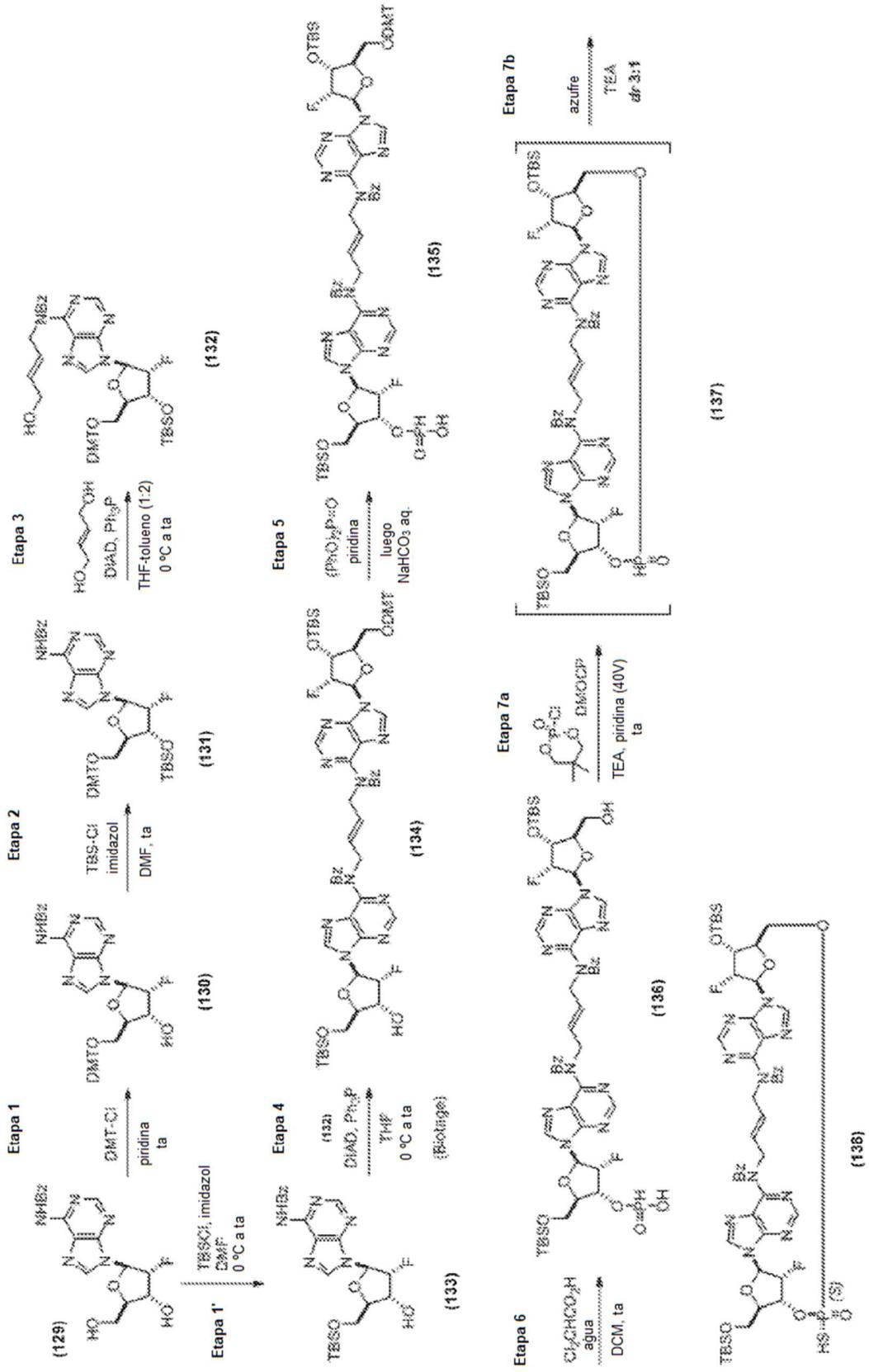


FIG. 2C

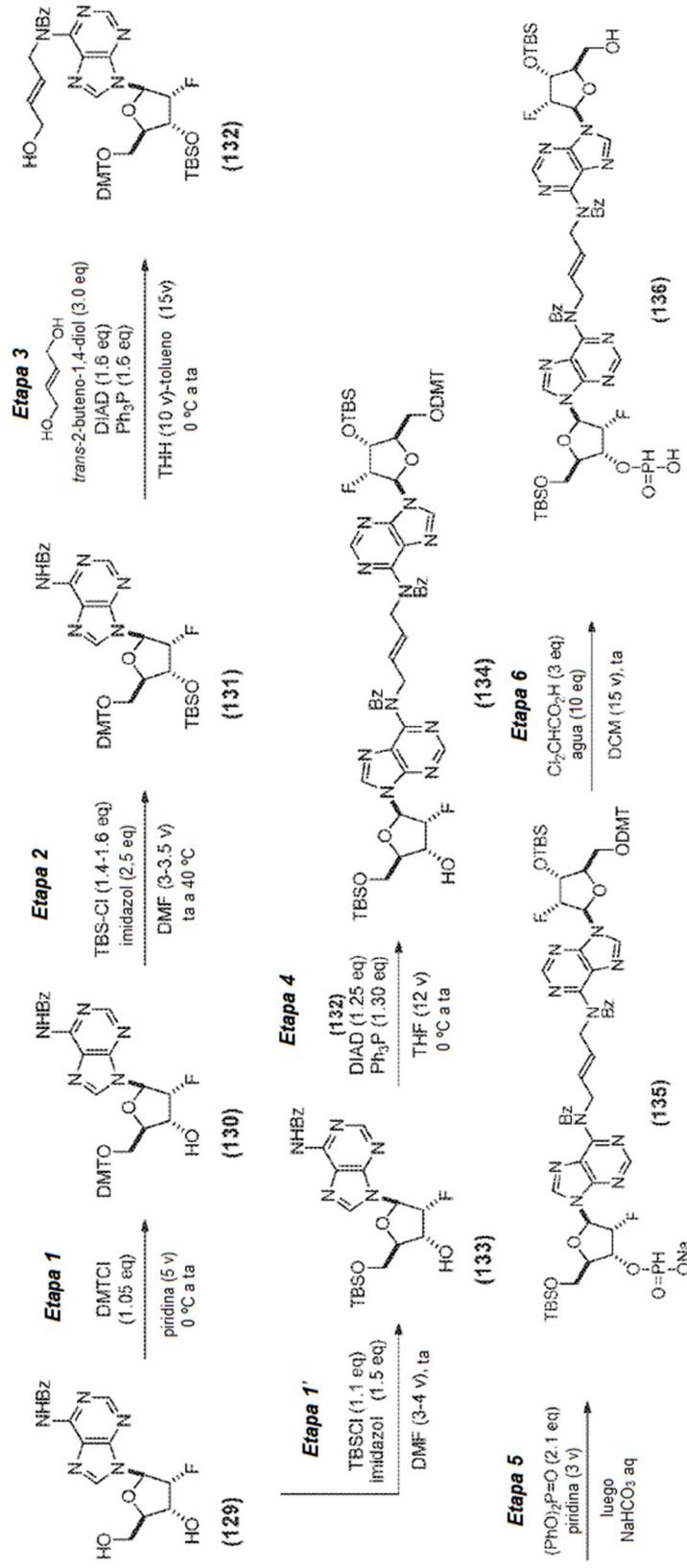
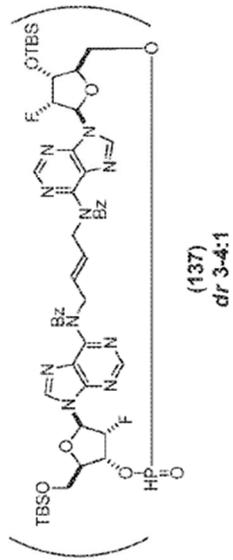
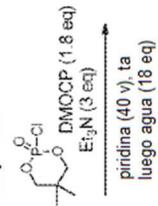
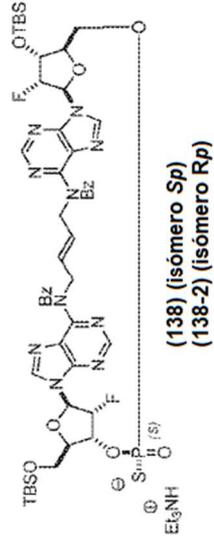
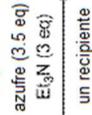


FIG. 2D

Etapa 7a



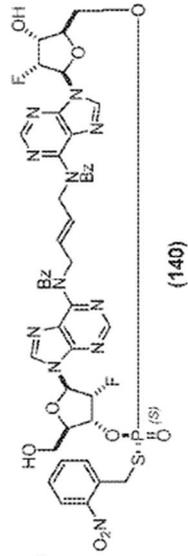
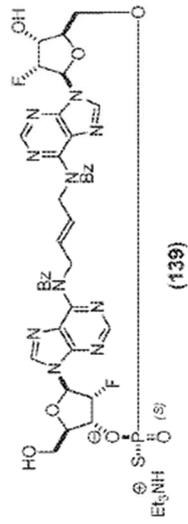
Etapa 7b



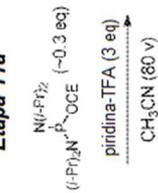
Etapa 9



Etapa 8



Etapa 10



Etapa 11a

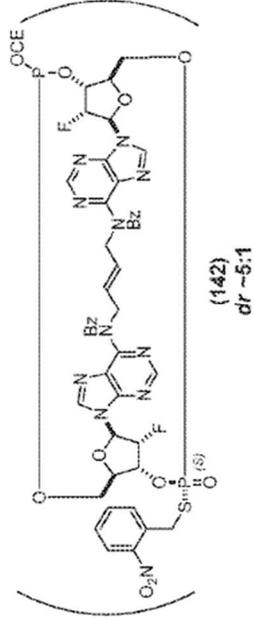


FIG. 2E

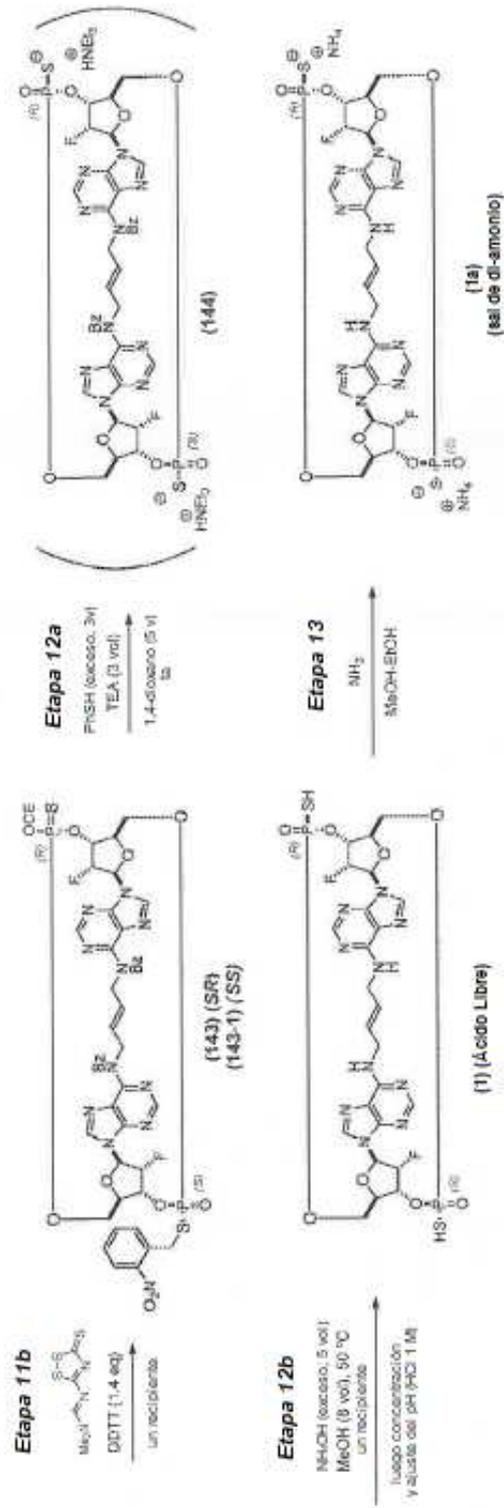
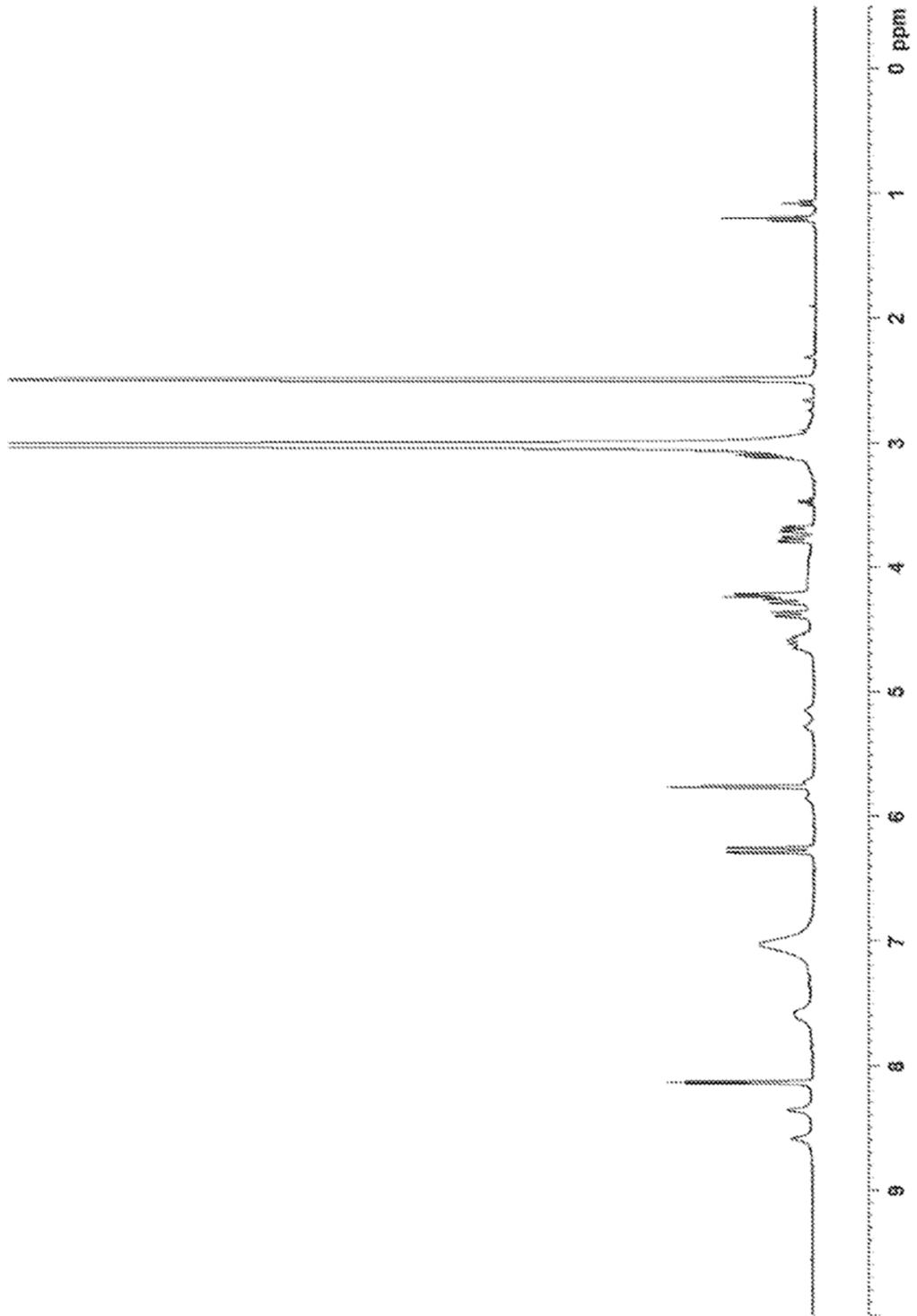


FIG. 3



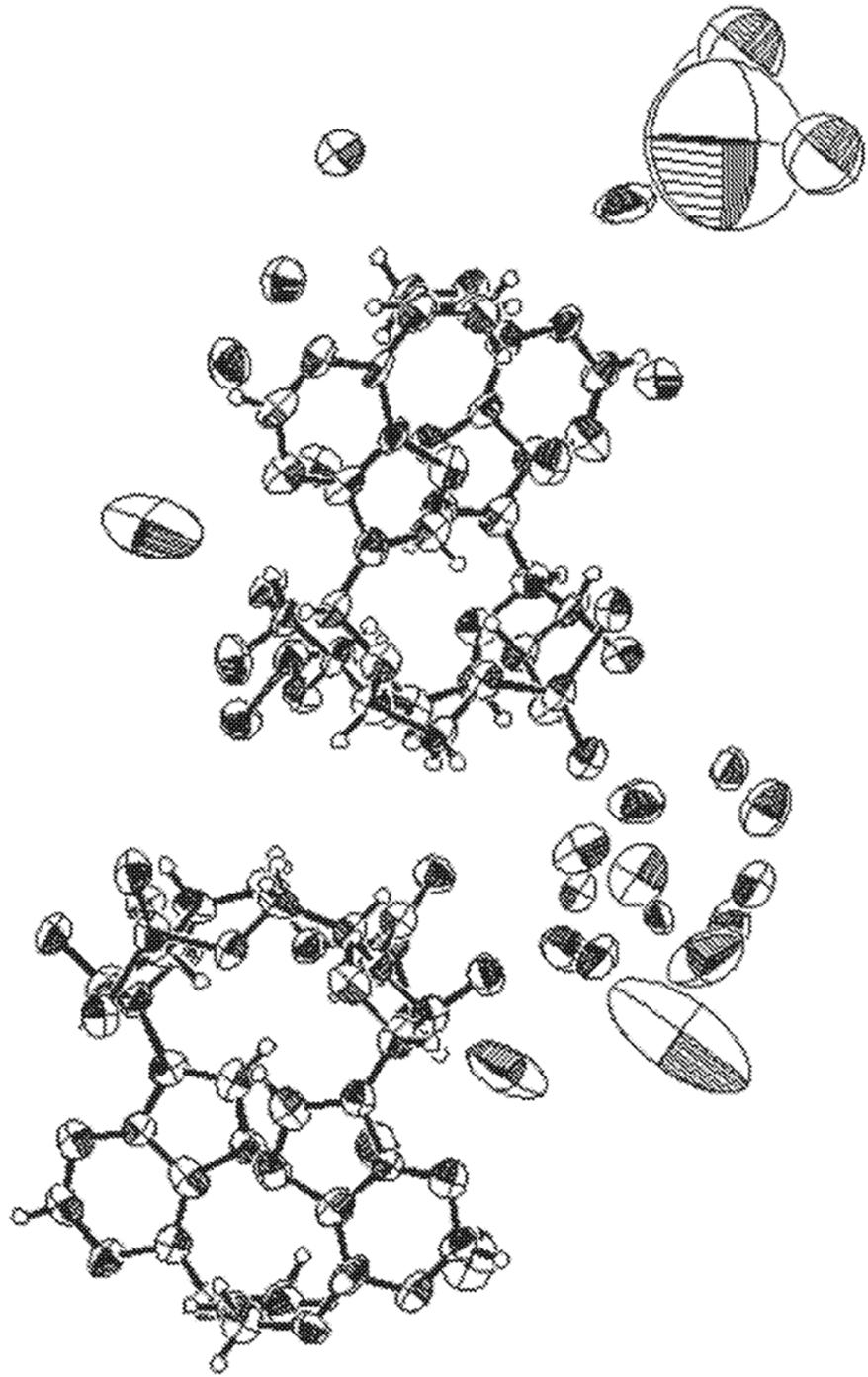


FIG. 4A

FIG. 4B

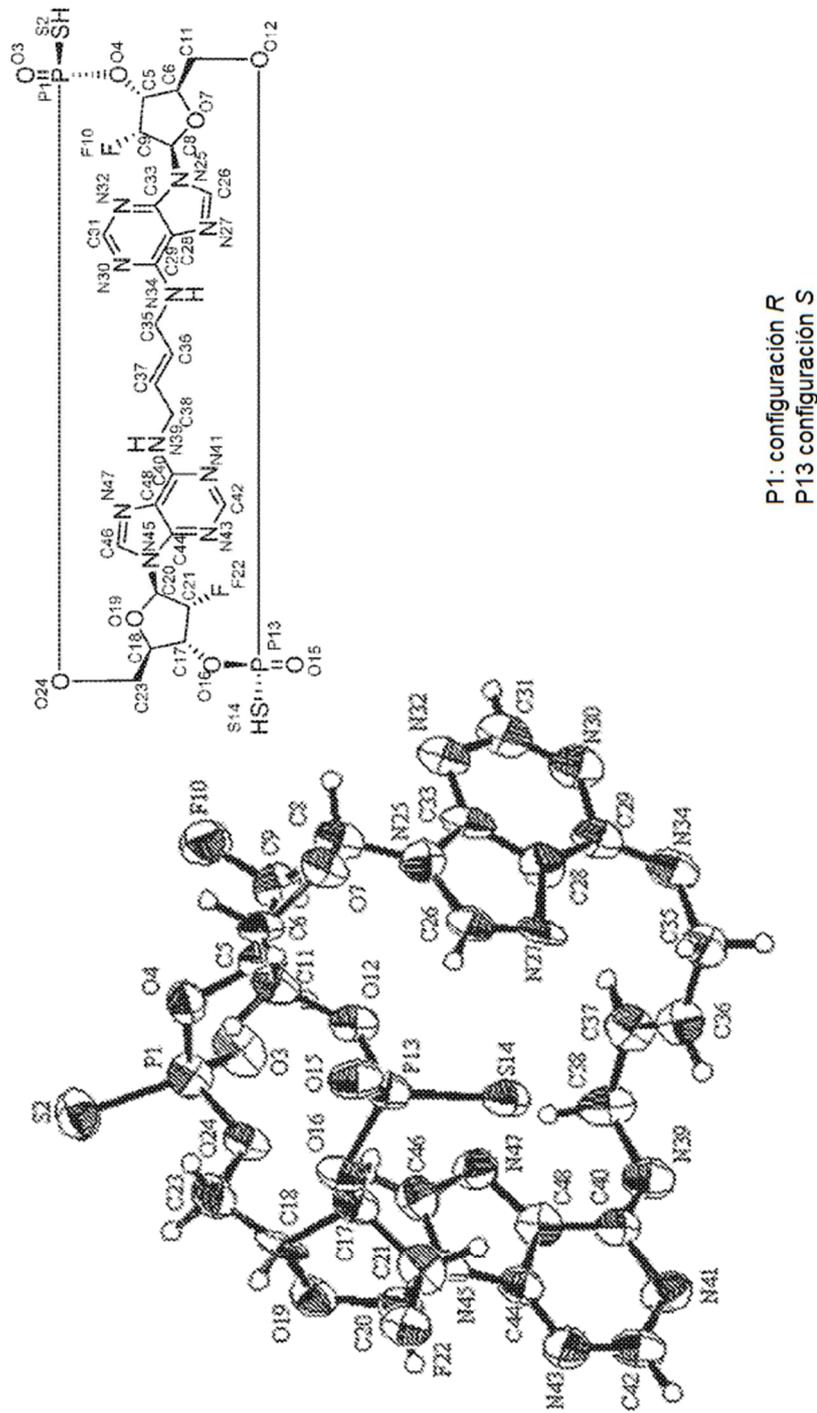
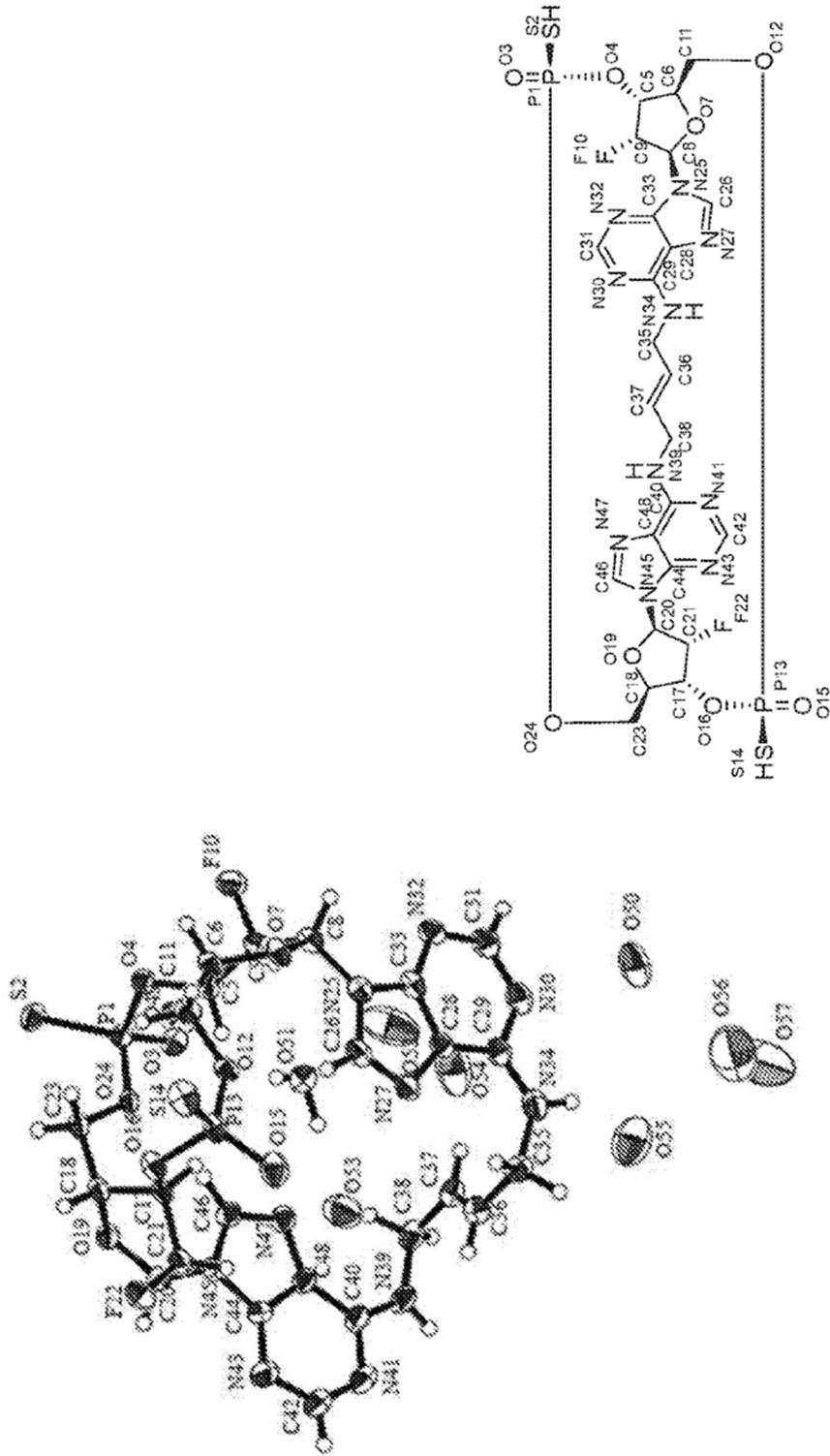


FIG. 4D



P1: Configuración R
P13: Configuración R

FIG. 5A

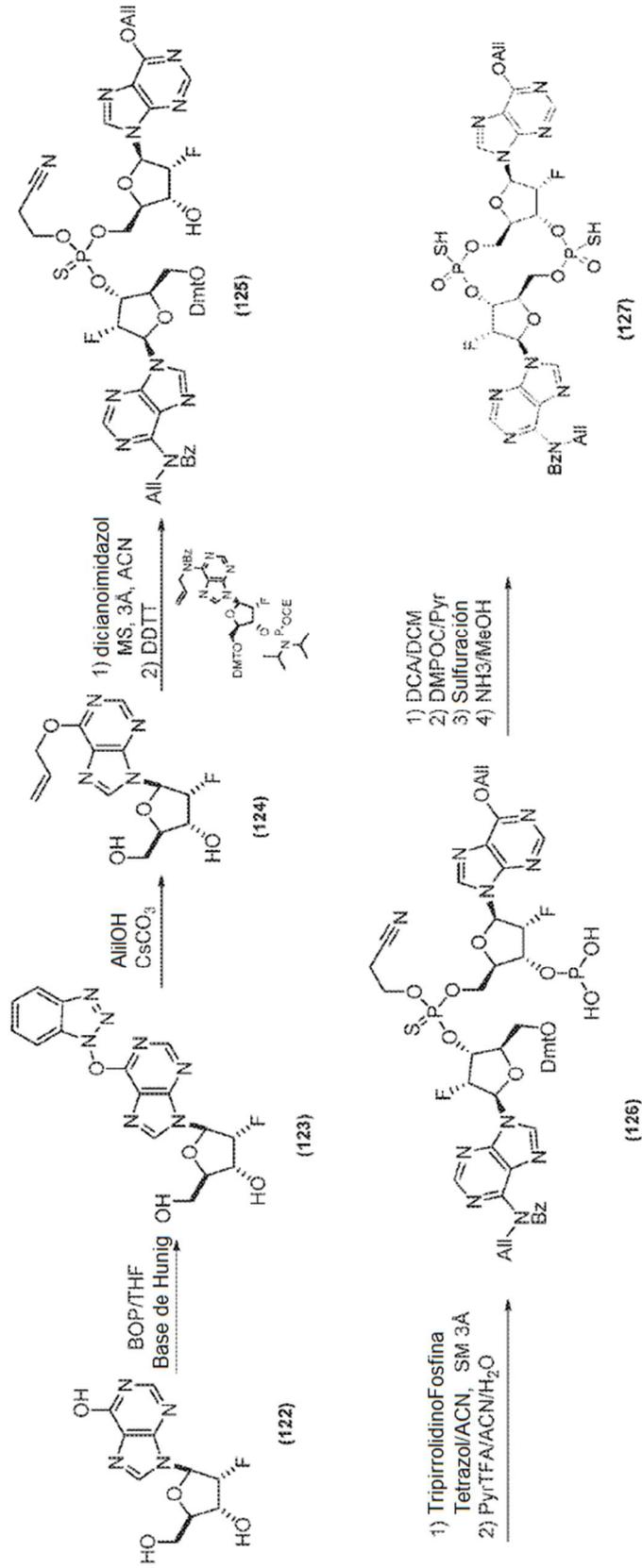


FIG. 5B

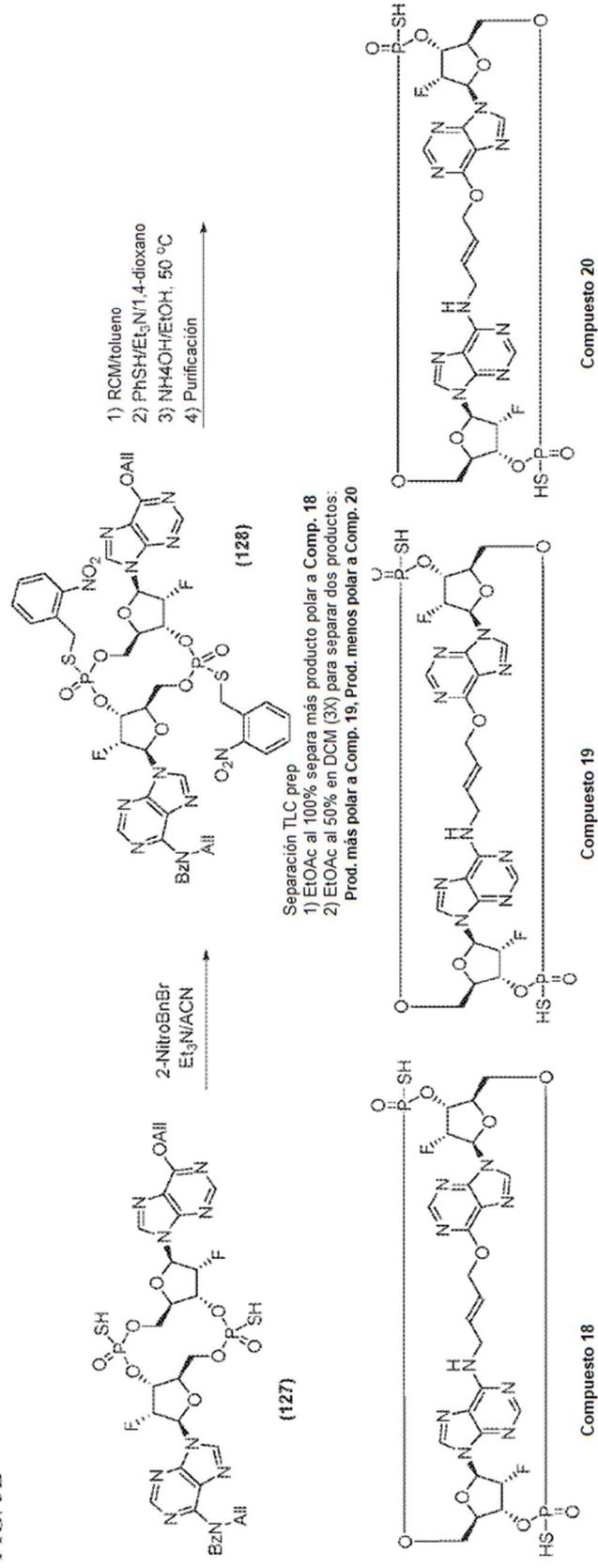
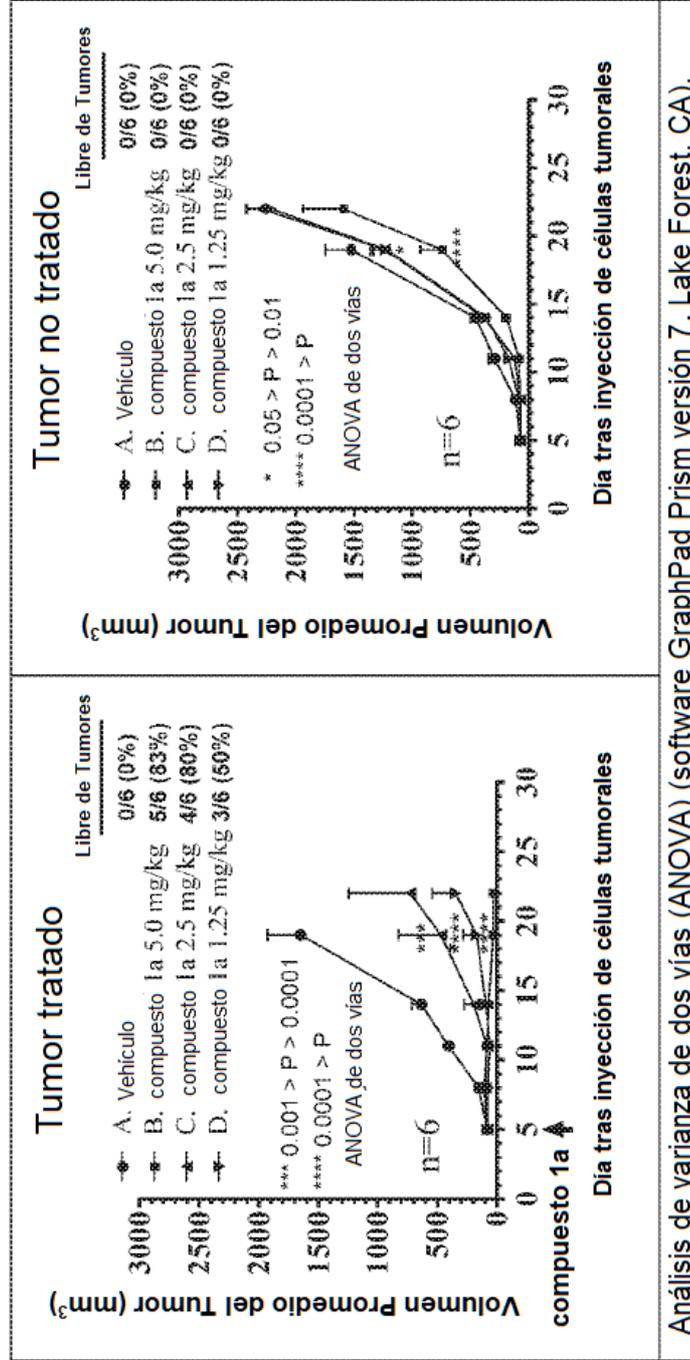


FIG. 7: Estudio A gráficas del volumen del tumor para tumores tratados y no tratados



Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) (software GraphPad Prism versión 7, Lake Forest, CA).

FIG. 8 Estudio B gráficas del volumen del tumor para tumores tratado y no tratados

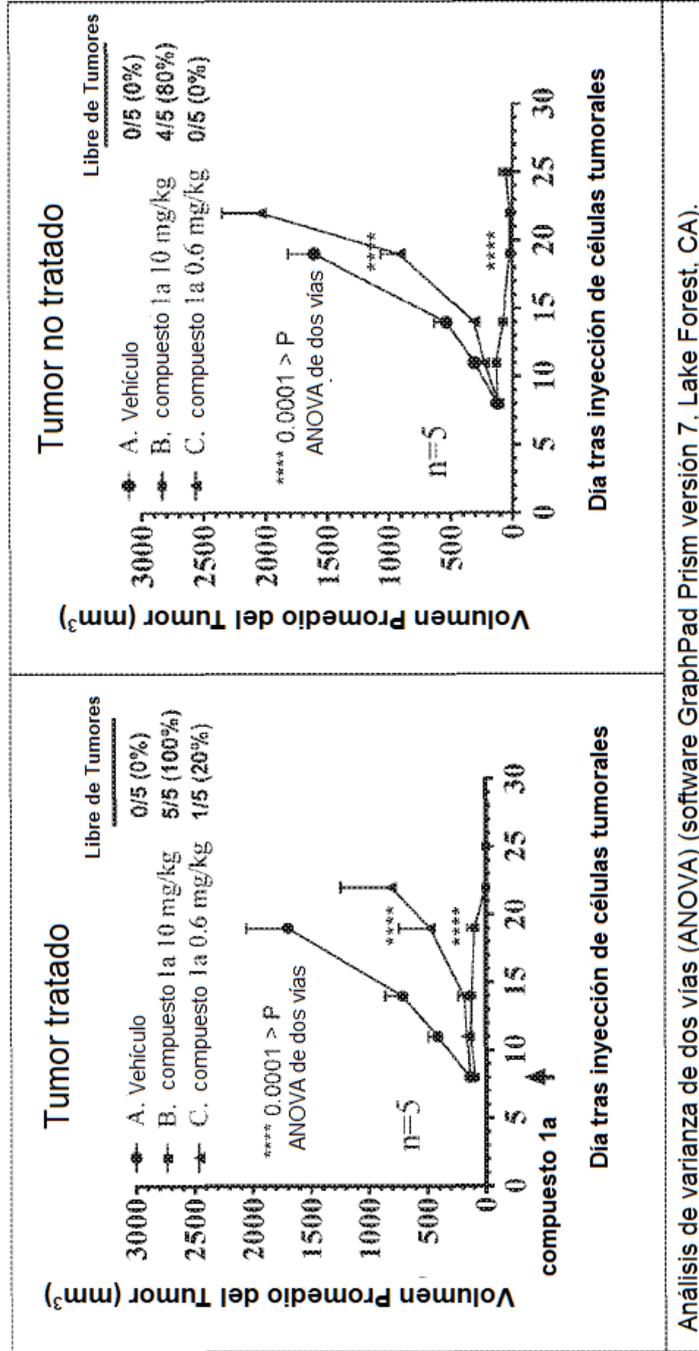


FIG. 9 Gráfica del volumen del tumor para tumores tratados sc y curva de supervivencia

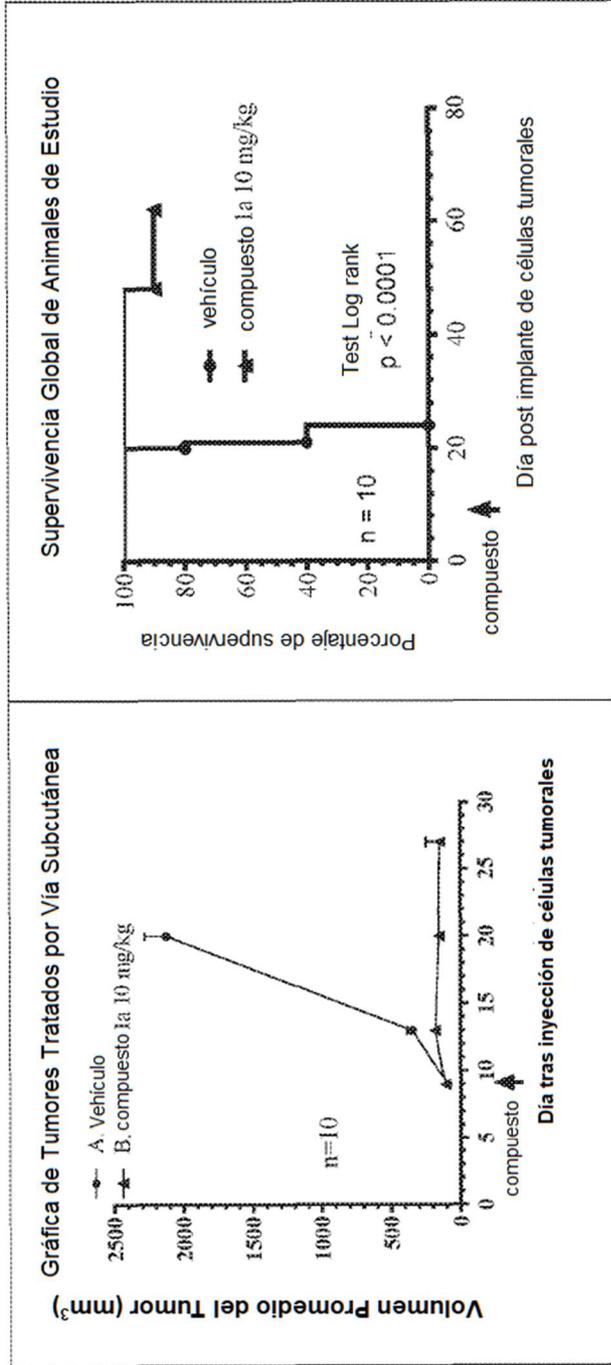
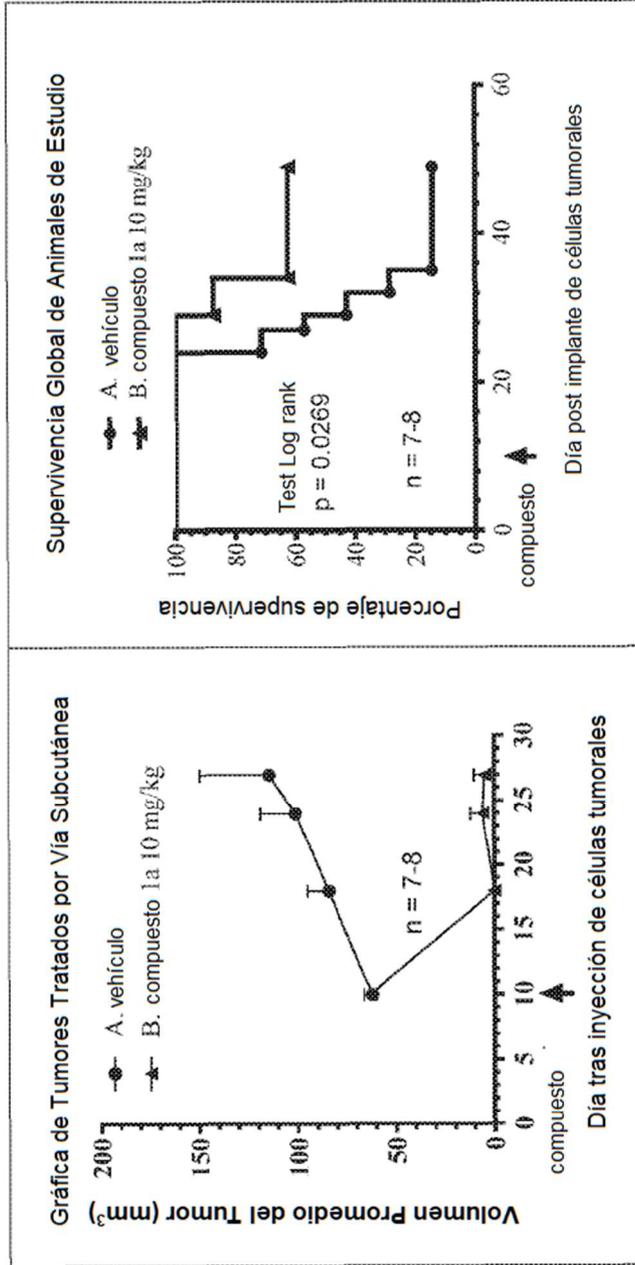


FIG. 10 Gráfica del volumen del tumor para tumores tratados sc y curva de supervivencia



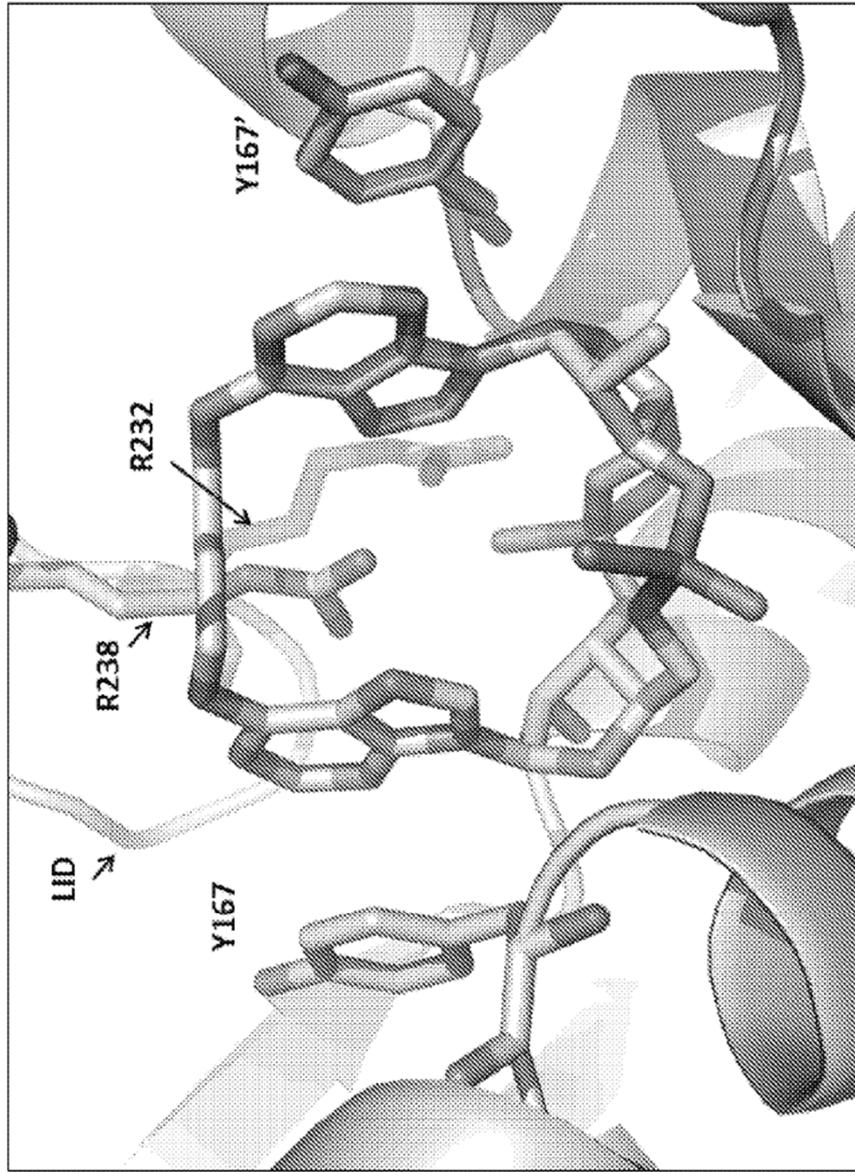


FIG. 11

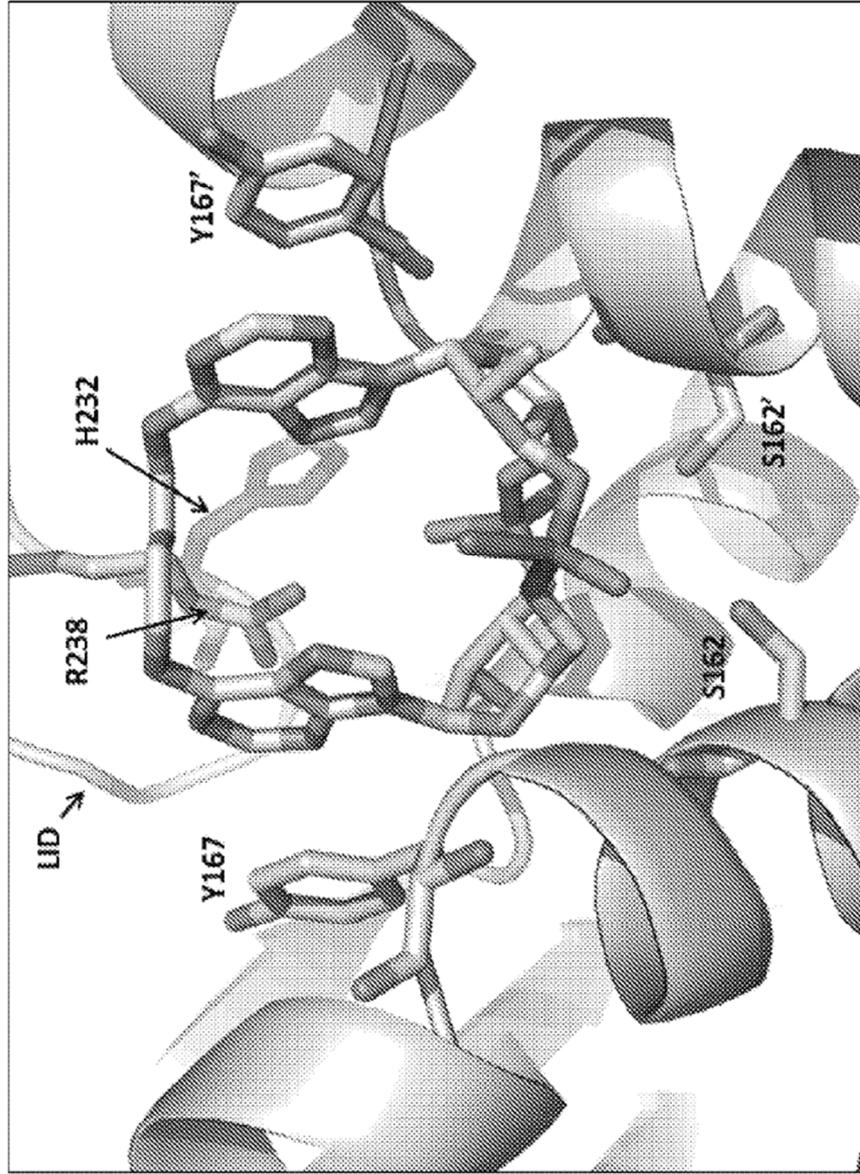


FIG. 12

FIG. 13

