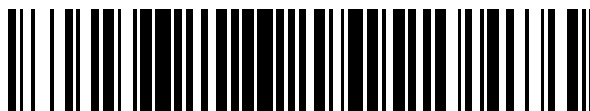


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 220**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09797415 .8**

96 Fecha de presentación: **23.06.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2303916**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2011**

54 Título: **Procedimiento de producción de intermedios para la producción de nuevos macrociclos que son inhibidores de la degradación proteasómica de P27, tales como arginina y derivados de la misma, y usos de dichos macrociclos**

30 Prioridad:
23.06.2008 EP 08011346

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2012

73 Titular/es:
**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG GMBH (33.3%)
Inhoffenstrasse 7
38124 Braunschweig, DE;
MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(33.3%) y
GOTTFRIED WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT
HANNOVER (33.3%)**

72 Inventor/es:
**KALESSE, MARKUS;
MALEK, NISAR;
FRANK, RONALD;
BRODMANN, TOBIAS;
BÜLOW, LEILA;
RENTSCH, ANDREAS;
GIRBIG, ANNA-KATHARINA y
EGGERT, ULRIKE**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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).

ES 2 391 220 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de intermedios para la producción de nuevos macrociclos que son inhibidores de la degradación proteasómica de P27, tales como argirina y derivados de la misma, y usos de dichos macrociclos

5 La presente invención se refiere a macrociclos de argirina que son inhibidores de la degradación proteasómica de p27, para uso en una diversidad de estados patológicos, tales como la inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como cánceres.

10 La reducción en los niveles celulares del inhibidor de cinasa dependiente de la ciclina p27^{kip1} se encuentra con frecuencia en muchos cánceres humanos y se relaciona directamente con el pronóstico en el paciente (Philipp-Staheli, J., Payne, S.R. and Kemp, C.J. p27(Kip1): regulation and function of a haplo-insufficient tumour suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 264, 148-68 (2001)). De forma específica, la renovación del proteasoma dependiente de ubiquitina ha mostrado ser la causa de una menor expresión de p27 en muchos cánceres humanos (Loda, M. et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3, 231-4 (1997)).

15 El documento US 6.355.774 divulga la proteína p27 así como un procedimiento para la producción de p27 en células cultivadas. También se proporcionan ensayos *in vitro* para descubrir agentes que afecten a la actividad de p27. Además, se proporcionan procedimientos de diagnóstico y tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

20 El documento WO 02/055665, en el Ejemplo 8 del mismo, describe ensayos que se han usado para identificar la interacción de Skp2 y p27 *in vitro*. Se describe que los ensayos son útiles para probar compuestos que inhiben la proliferación celular. Los ensayos se pueden llevar a cabo en presencia o no de moléculas, compuestos, péptidos y dichas moléculas identificadas por los ensayos son fármacos potencialmente útiles descritos como agentes terapéuticos contra el cáncer y trastornos proliferativos. Se describen moléculas específicas tal como se identifican.

El documento GB 2.367.553 divulga macrociclos farmacéuticamente activos ("argirinas") y preparaciones farmacéuticas respectivas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, la inducción de tolerancia inmunitaria o el tratamiento de infecciones bacterianas.

25 Sasse F et al. (en Sasse F, Steinmetz H, Schupp T, Petersen F, Memmert K, Hofmann H, Heusser C, Brinkmann V, von Matt P, Hofle G, Reichenbach H. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo). 2002 Jun;55(6):543-51) describen la producción de un grupo de péptidos cíclicos denominados argirinas, así como sus propiedades biológicas. Vollbrecht et al. (en Vollbrecht L, Steinmetz H, Hofle G, Oberer, L, Rihs G, Bovermann G, and von Matt P. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. II. Structure elucidation and stereochemistry. *J Antibiot* (Tokyo). 2002 Aug; 55(8):715-721) describen la estructura de dichos péptidos cíclicos.

30

De igual similar, Ley et al. (en Ley SV, Priour A, Heusser C. Total synthesis of the cyclic heptapeptide Argyrin B: a new potent inhibitor of T-cell independent antibody formation. *Org Lett*. 2002 Mar 7;4(5):711-4) describen la síntesis de argirina B y su función como inhibidor de la formación de anticuerpos.

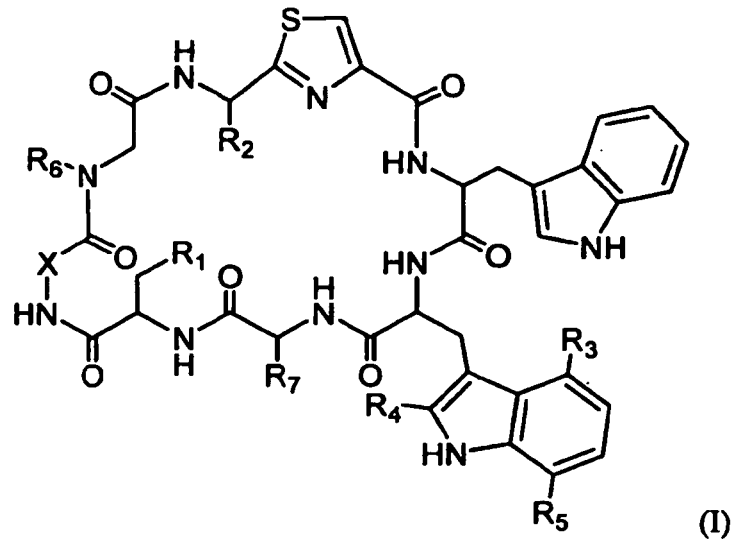
35 El documento EP 07004185.0 describe el uso de los macrociclos del documento GB 2.367.553 para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto.

40 Por tanto, la argirinas y los macrociclos relacionados son candidatos de interés para el posterior desarrollo de medicamentos para el tratamiento en una serie de estados patológicos, tales como la inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como cánceres.

No obstante, el aprovechamiento completo del potencial farmacéutico de las argirinas y sus derivados relacionados es difícil debido a su estructura química relativamente compleja, que requiere importantes esfuerzos para aislar cantidades suficientes de los compuestos (por ejemplo, a partir de microorganismos) y limita el número de compuestos eficaces de esta familia que están disponibles fácilmente para estudios y tratamiento.

45 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos mejorados para la producción de compuestos de la familia de las argirinas, e intermedios respectivos. Otro objeto de la presente invención es proporcionar además nuevos miembros de la familia de las argirinas que se puedan usar como agentes terapéuticos para el tratamiento en una diversidad de estados patológicos, tales como la inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como cánceres.

50 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, el objeto anterior se soluciona con un procedimiento para producir un compuesto macrociclo de acuerdo con la siguiente fórmula general (I)



en la que

R^1 y R^2 son de forma independiente hidrógeno, alquilo C_1-C_4 que no está sustituido o está sustituido con OH o alcoxi C_1-C_4 ;

5 R^3 es metoxi

R^4 es hidrógeno

R^5 es hidrógeno

R^6 es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 ;

R^7 es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 que no está sustituido o está sustituido con OH o alcoxi C_1-C_4 ; y

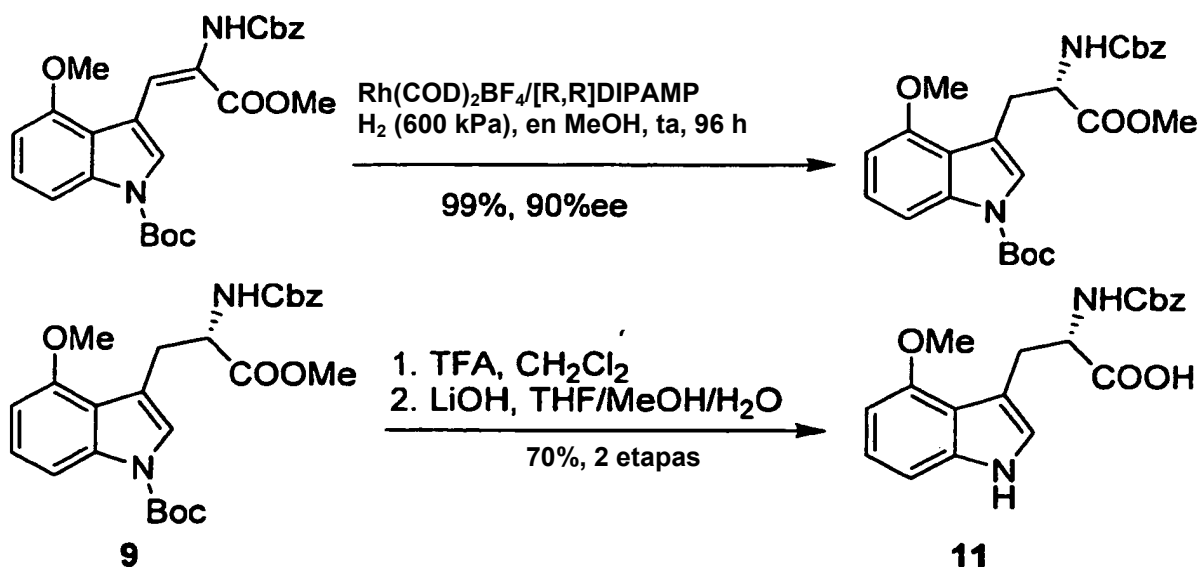
10 X es $C=CH_2$ o CHR^8 , en el que R^8 es alquilo C_1-C_4 que no está sustituido o está sustituido con -S-alquilo C_1-C_4 ,
y los estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Se prefiere adicionalmente un procedimiento para la producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la presente invención, en el que dicho compuesto macrociclo está seleccionado de una argirina, tal como argirina A-F, B/F, y Ala alfa y Ala beta, y los estereoisómeros aislados del mismo.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere además a un compuesto macrociclo como el producido de acuerdo con la presente invención, que está seleccionado del grupo de argirinas Ala-beta y Ala-alfa.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la presente invención que comprende el uso de 4-metoxi-L-triptófano, opcionalmente protegido, en el que dicho 4-metoxi-L-triptófano opcionalmente protegido se produce por medio de una ruta de hidrogenación catalítica estereoselectiva, que comprende las etapas de acuerdo con el esquema siguiente

20



Hasta ahora, el 4-metoxi-L-triptófano solo se podía producir por medio de una resolución enzimática (Ley, S. V.; Priour, A. *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 3995-4004; Ley, S. V.; Priour, A.; Heusser, C. *Org. Lett.* 2002, 4, 711-714). Los rendimientos que se pueden obtener en general nunca superan el 50%. En la práctica, solo se alcanzaron rendimientos de tan solo entre un 10 y un 40%.

Por tanto, una característica y ventaja particular de la presente invención es que la combinación de los grupos protectores divulgados en el presente documento, y una desprotección ácida final produce argirina, y en particular argirina F. No es trivial que los grupos protectores t-butilo (tBu) que se requieren para la argirina, y en particular para la argirina F, se puedan desproteger al final, sin comprometer el doble enlace.

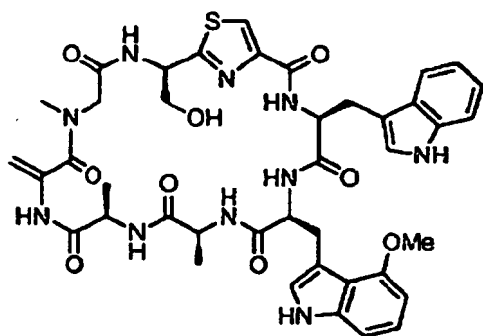
10 La invención incluye también el procedimiento mejorado para producir el aminoácido 4-metoxi-L-triptófano sin resolución enzimática, y usos del producto para la síntesis de macrociclos, tales como argirinas.

Se prefiere un procedimiento para la producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la presente invención o 4-metoxi-L-triptófano como antes, en el que el rendimiento de la síntesis se encuentra que es mayor de un 90%.

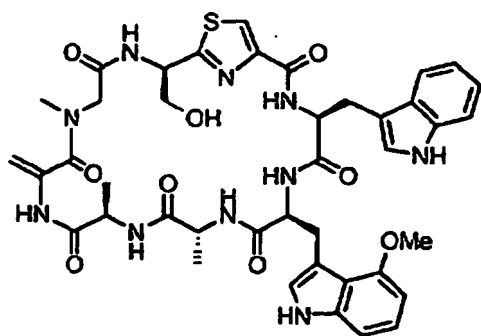
15 Se prefiere un procedimiento para la producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la presente invención o 4-metoxi-L-triptófano como antes, en el que la síntesis se lleva a cabo sin el uso de enzimas.

Otro aspecto de la presente invención es un macrociclo.

Nuevos compuestos preparados usando el procedimiento de la invención son:



Argirina Ala beta,



Argirina Ala alfa,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere además a un compuesto macrociclo de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de estados patológicos y enfermedades en un sujeto. De preferencia, dicho sujeto es un mamífero, en particular un ser humano.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica, que comprende formular un compuesto de acuerdo con la presente invención con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos, excipientes y estrategias para formular una composición farmacéutica, por ejemplo, que se va a administrar de forma sistémica u oral, por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo oral, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, por vía parenteral, por ejemplo en forma de soluciones o suspensiones inyectables, por vía tópica, por ejemplo, en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en forma nasal o como supositorio, son bien conocidos por los expertos en la técnica, como se describe en la bibliografía respectiva.

La administración de un agente, por ejemplo, un compuesto se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento que permita al agente alcanzar las células diana. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, inyección, deposición, implantación, supositorios, ingestión oral, inhalación, administración tópica, o cualquier otro procedimiento de administración con el que se obtiene el acceso del agente a las células diana. Las inyecciones pueden ser, por ejemplo, intravenosas, intradérmicas, subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales. La implantación incluye insertar sistemas de liberación de fármaco implantables, por ejemplo, microesferas, hidrogeles, depósitos poliméricos, matrices de colesterol, sistemas poliméricos, por ejemplo, sistemas de erosión y/o difusión de matriz y sistemas no poliméricos, por ejemplo, pellas comprimidas, fusionadas o parcialmente fusionadas. Los supositorios incluyen supositorios de glicerina. Las dosis para ingestión oral pueden estar recubiertas entéricamente. La inhalación incluye administrar el agente con un aerosol en un inhalador, bien solo o unido a un vehículo que puede ser absorbido. El agente puede estar suspendido en el líquido, por ejemplo, en forma disuelta o coloidal. El líquido puede ser un disolvente, un disolvente parcial o un medio no disolvente. En muchos casos, se puede usar agua o un líquido orgánico.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que se produce de acuerdo con el procedimiento anterior.

Experimentos preliminares en ratones que se han llevado a cabo por los autores de la presente invención muestran que la argirina ya presenta actividad a una concentración de 0,03 mg/kg peso corporal. Otro aspecto de la presente invención se refiere además a un uso de acuerdo con la presente invención, en el que el compuesto de acuerdo con la presente invención se administra en una dosis de 0,01 mg a 200 mg/kg, preferentemente en una dosis de 0,01 mg a 100 mg/kg, lo más preferentemente en una dosis de 0,02 mg a 10 mg/kg, de forma óptima administrados por día. Otro ejemplo es 0,15 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal inyectado por vía intraperitoneal cada tres días.

En determinadas realizaciones de la invención, la administración se puede diseñar de modo que de origen a exposiciones secuenciales al compuesto durante cierto período de tiempo, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años. Esto se puede llevar a cabo por medio de administraciones repetidas del compuesto, por ejemplo, por uno de los procedimientos descritos antes o, de forma alternativa, por un sistema de administración de liberación controlada en el que el compuesto se administra al sujeto durante un período prolongado de tiempo sin administraciones repetidas. Sistema de administración de liberación controlada hace referencia a que la liberación total del compuesto no se produce inmediatamente después de la administración, sino que se retrasa cierto tiempo. La liberación se puede producir de forma brusca o se puede producir de forma gradual y continua. La administración de dicho sistema puede ser, por ejemplo, por medio de formas de dosificación oral de acción prolongada, inyecciones de gran tamaño, parches transdérmicos o implantes subcutáneos. Ejemplos de sistemas en los que la liberación de produce de forma brusca incluyen, por ejemplo, sistemas en los que el compuesto está atrapado en liposomas que están encapsulados en una matriz polimérica, siendo los liposomas sensibles a un estímulo específico, por ejemplo, temperatura, pH, luz, campo magnético, o a una enzima degradante, y sistemas en los que

el compuesto está encapsulado por una microcápsula recubierta iónicamente con una enzima que degrada el núcleo de la microcápsula. Ejemplos de sistemas en los que la liberación del compuesto es gradual y continua incluyen, por ejemplo, sistemas de erosión en los que el compuesto está contenido en una forma en una matriz, y sistemas de difusión en los que el compuesto se filtra a una velocidad controlada, por ejemplo, a través de un polímero. Dichos sistemas de liberación sostenida pueden estar, por ejemplo, en forma de pellas o cápsulas.

El compuesto se puede administrar antes de, o después de la aparición de los síntomas de enfermedad. En ciertas realizaciones, el compuesto se administra a pacientes con historial familiar de la enfermedad, o que tienen fenotipos que pueden indicar una predisposición a la enfermedad, por ejemplo, cáncer de mama, o que han sido diagnosticados con un genotipo que predispone al paciente a la enfermedad, o que tienen otros factores de riesgo.

El compuesto de acuerdo con la invención se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad que puede, al menos en parte, prevenir o revertir la enfermedad o estado patológico. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar individualmente y se basará, al menos en parte, en la consideración de la especie del sujeto, el tamaño del sujeto, la edad del sujeto, la eficacia del compuesto particular usado, la longevidad del compuesto particular usado, el tipo de sistema de liberación usado, el tiempo de administración con respecto al inicio de los síntomas de enfermedad, y si se emplea una pauta de dosificación de liberación única, múltiple o controlada. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por un experto medio en la técnica empleando tales factores y usando sencillamente la experimentación de rutina.

En determinadas realizaciones preferentes, la concentración del compuesto de acuerdo con la presente invención está en una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal/día, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a 200 mg/kg, preferentemente en una dosis de aproximadamente 0,01 mg a 100 mg/kg, lo más preferentemente en una dosis de aproximadamente 0,02 mg a 10 mg/kg. Preferentemente, la forma de dosificación es tal que no afecta de forma adversa al sujeto.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar de una forma sistémica o tópica, por una vía convencional, en particular, por vía enteral, por ejemplo, oral, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, por vía parenteral, por ejemplo, en forma de soluciones o suspensiones inyectables, por vía tópica, por ejemplo, en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o por vía nasal o en forma de supositorio.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o estado patológico seleccionado de inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como psoriasis o cánceres, tal como cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, mieloma, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de pulmón y cáncer de colon. Otro aspecto más de la presente invención es el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o estado patológico seleccionado de inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como psoriasis o cánceres, tal como cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, mieloma, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de pulmón y cáncer de colon.

Las siguientes figuras, secuencias y ejemplos sirven únicamente para ilustrar la invención y no se interpretará que el alcance de la invención quede limitado a las realizaciones particulares de la invención descritas en los ejemplos.

Leyendas de la figura:

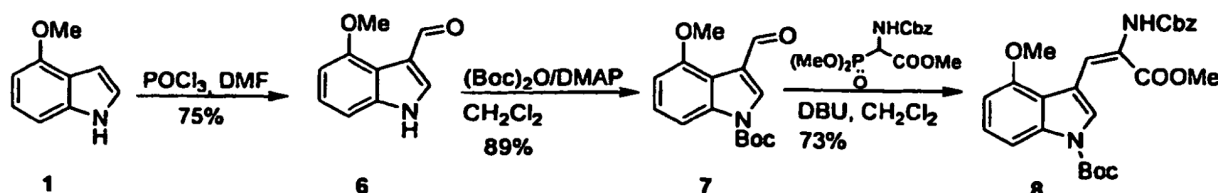
La Figura 1 muestra que argirina A induce estabilización de p27 a través de la inhibición de proteasoma 20S. a) Las líneas de células indicadas se trataron con Argirina A y se determinaron las fracciones G1 y sub-G1 por análisis de citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. Se determinaron los valores de CI_{50} por ensayos de proliferación celular MTT usando diferentes concentraciones de Argirina A. Los valores de CI_{50} se calcularon como la concentración semimáxima a la cual Argirina A ejerce un efecto. b) Se trataron células SW480, HCT116 y HeLa con Argirina A después de lo cual se lisaron las células en los momentos temporales indicados para determinar los niveles de expresión de p27kip1 por medio de análisis de transferencia Western. c) Se trataron células SW480 y HeLa con Argirina A o de dejaron sin tratar durante 12 horas, después de lo cual se añadió cicloheximida en una concentración de 25 μ g/ml. Se determinaron los niveles de expresión de p27kip1 en los momentos temporales indicados por medio de análisis de transferencia Western y se normalizaron frente a la expresión de actina que se usó como control interno. Las gráficas muestran una cuantificación de tres experimentos independientes. d) Se incubó proteasoma 20S derivado de eritrocitos humanos purificados con las cantidades indicadas de Argirina A o bortezomib y se midieron las actividades del proteasoma de tipo capsasa, quimi tripsina y tripsina usando sustratos peptídicos fluorogénicos específicos para las diferentes actividades catalíticas. e) Se incubaron líneas celulares SW480 y HCT116 con Argirina A. En los momentos temporales indicados se lisaron las células y se analizaron los niveles de expresión de p53, p21, Bax, NficB y actina por transferencia Western.

Ejemplos

Se apreciará que las siguientes síntesis se pueden modificar fácilmente por un experto en la técnica con el fin de sintetizar otros derivados de la presente invención tomando como base las estrategias que se proporcionan.

1. Síntesis de 4-Metoxi-L-triptófano (10)

Con el fin de evitar los problemas fundamentales en la síntesis (10) se estableció la hidrogenación catalítica estereoselectiva como procedimiento de síntesis nuevo, eficiente y económico. El sustrato **8**, que se puede sintetizar con muy buen rendimiento, sirve como material de partida.

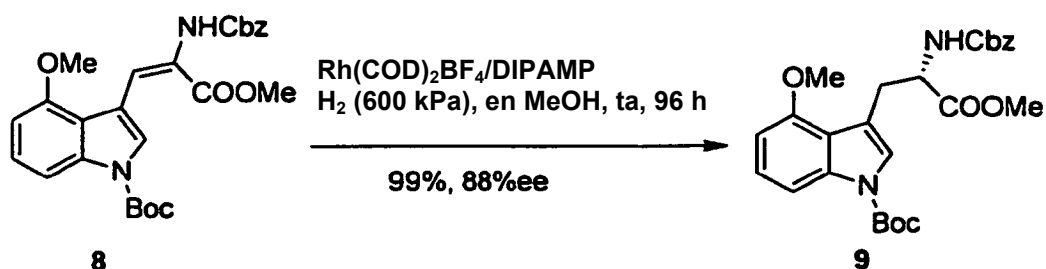


5

Esquema 2 Síntesis del fragmento 8

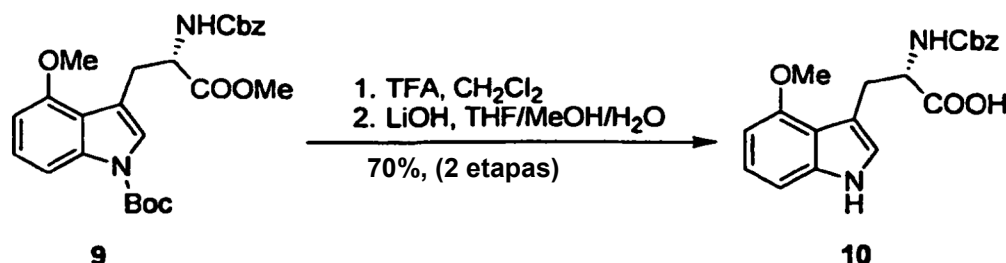
Como catalizador sirve un catalizador de bifosfina rodio quiral desarrollado por Knowles *et al.* *R,R*-DIPAMP se usa como ligando, que se podía convertir en el catalizador según se necesite de acuerdo con una fórmula sencilla con $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ y tetrafluoroborato sódico. (Refs 2, 3 y 4)

- 10 La hidrogenación se llevó a cabo en un autoclave a 600 kPa. El carácter enantioselectivo, así como la configuración absoluta se determinó con el procedimiento de Moscher seguido por desprotección Cbz.



Esquema 3 Hidrogenación del fragmento 8

- 15 El Compuesto **9** se podía convertir en una secuencia de reacción en dos etapas usando desprotección Boc con ácido trifluoroacético e hidrólisis del éster metílico con solución acuosa 0,5 N de LiOH en tetrahidrofurano/agua/metanol con muy buenos rendimientos en el 4-metoxi-L-triptófano **10** protegido con Cbz deseado.



20

Esquema 4 La desprotección Boc seguida por hidrólisis del éster conduce a 4-metoxi triptófano **10** protegido con Cbz

Usando esta nueva secuencia de reacción, se puede obtener 4-metoxi-L-triptófano (**10**) en la última y decisiva etapa con un 99% de rendimiento y un 90% de ee. Además, el exceso enantiomérico (ee) se puede mejorar hasta > 95% por medio de una posterior recristalización.

Síntesis del aldehído 6

- 25 Se añadió oxocloruro de fósforo (0,47 ml, 5,10 mmol) gota a gota a dimetilformamida seca (3 ml) a 0 °C. A esta temperatura, se añadió lentamente el metoxiindol **6** (500 mg, 3,40 mmol) en dimetilformamida seca (2 ml), por lo que se formó un precipitado amarillo brillante. La mezcla de reacción se calentó hasta 45 °C, y se agitó durante dos horas. La reacción se vertió sobre agua helada (8 ml), se extrajo dos veces con éter dietílico y se desecharon los

extractos de éter. La fase acuosa se trató entonces con hidróxido sódico acuoso hasta que la solución fue básica y se extrajo con éter dietílico. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró a presión reducida dando el producto bruto como un sólido cristalino amarillo pálido (440 mg, 2,51 mmol, 74 %).

5 **RMN de ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ = 10,50 (s, 1 H), 9,06 (s ancho, 1 H), 7,93 (d, J = 3,1 Hz, 1 H), 7,22 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,09 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 6,73 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 4,01 (s, 3 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 188,6, 154,6, 137,6, 128,1, 124,3, 119,6, 116,1, 105,1, 102,5, 55,4.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ($[\text{M}]^+$): 176,0712, encontrado: 176,0708.

Síntesis del aldehído 7

10 Se disolvió metoxiindol-3-carbaldehído **6** (440 mg, 2,51 mmol) en diclorometano (6 ml) y se trató a temperatura ambiente con DMAP (31 mg, 0,25 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (660 mg, 3,02 mmol). Después de agitar durante una hora, se añadió solución 1 N de KHSO_4 (4,4 ml) y se evaporó el diclorometano. La fase acuosa se extrajo con varias porciones de éter dietílico y los extractos orgánicos se lavaron con KHSO_4 1N y agua, NaHCO_3 1 N y salmuera. La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró a presión reducida dando el aldehído **7** (605 mg, 2,20 mmol, 87 %) como un sólido blanco.

15 **RMN de ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ = 10,55 (s, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 7,84 (d, J = 8,5 Hz, 1 H), 7,32 (t, J = 8,2 Hz, 1 H), 6,81 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 4,00 (s, 3 H), 1,67 (s, 9 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 189,1, 154,1, 149,0, 137,1, 128,7, 126,1, 121,4, 117,2, 108,6, 104,5, 85,4, 55,5, 28,0.

EMAR (IE) calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ ($[\text{M}]^+$): 275,1158, encontrado: 275,1159.

20 Síntesis del deshidroaminoácido 8

A una solución de fosfonato **9** (217 mg, 0,65 mmol) en diclorometano (0,6 ml) se añadió DBU (0,09 ml, 0,60 mmol). Después de 10 minutos de agitación, se añadió lentamente el aldehído **8** (150 mg, 0,55 mmol) en diclorometano (0,6 ml). Seguidamente se agitó la mezcla de reacción durante 5 horas, se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (18 ml), luego se lavó la solución orgánica con HCl 1 N (2 x 5 ml) y salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo/hexanos: 1/5) dando un sólido amarillo (191 mg, 0,40 mmol, 73%).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,32 (s, 1 H), 7,93 (s, 1 H), 7,77 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,40 - 7,30 (m, 5 H), 7,28 - 7,24 (m, 1 H), 6,73 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 6,14 (s ancho, 1 H), 5,20 (s, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 3,83 (s, 3 H), 1,63 (s, 9 H).

30 **RMN de ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3): δ = 154,7, 136,5, 136,2, 128,7, 128,3, 128,2, 127,9, 126,5, 126,0, 114,2, 108,4, 104,4, 84,7, 67,6, 55,6, 52,6, 28,2.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 503,1794, encontrado: 503,1760.

Síntesis del catalizador de rodio tetrafluorborato de ciclooctadien-1,5-[(R,R)-DIPAMP]rodio

35 Se añadió bis(ciclooctadieno-1,5)diclorodirodio $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ (97 mg, 0,2 mmol) a una solución de (R, R)-DIPAMP (180 mg, 0,39 mmol) en metanol (1,5 ml) y agua (0,5 ml). La suspensión se volvió naranja y después de agitar durante 1 hora dio una solución rojo-naranja. El complejo se precipitó añadiendo lentamente una solución de tetrafluorborato sódico (65 mg, 0,6 mmol) en agua (0,5 ml) durante 30 minutos. Después de agitar 2,5 horas a temperatura ambiente se filtraron los cristales finos, se lavó dos veces con pequeñas porciones de agua y se secó a alto vacío. Se obtuvieron 210 mg (71%) del catalizador tetrafluorborato de ciclooctadien-1,5-[(R,R)-DIPAMP]rodio. El catalizador se usó sin purificación posterior.

40 Hidrogenación del deshidroaminoácido 8

45 Se cargó un autoclave con catalizador tetrafluorborato de ciclooctadien-1,5-[(R,R)-DIPAMP]rodio (29 mg, 0,040 mmol), deshidroaminoácido **8** (500 mg, 1,04 mmol) y metanol (20 ml). Después de tres ciclos de vacío/hidrógeno, se presurizó el autoclave hasta una presión inicial de 600 kPa. Se dejó transcurrir la reacción durante 4 días. Después de evaporar el disolvente, el producto bruto se purificó por cromatografía en columna dando el triptófano **9** (497 mg, 1,03 mmol, 99%, 90%ee) como un aceite incoloro.

R_f = 0,17 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:3).

$[\alpha]_{589}^{20} = + 3,0$ (11 mg, c = 1,1, CHCl_3)

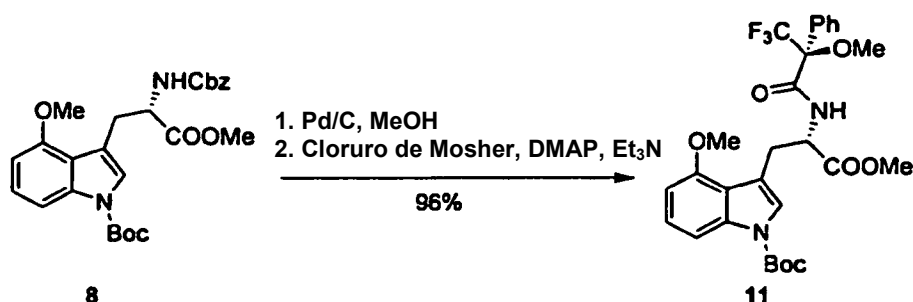
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,78 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,38 - 7,19 (m, 7 H), 6,66 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 5,77 (d, J = 7,5 Hz, 1 H), 5,04 (s, 2 H), 4,66 (ddd, J = 8,0, 8,0, 5,1 Hz, 1 H), 3,92 (s, 3 H), 3,73 (s, 3H), 3,43 - 3,33 (m, 1 H),

3,19 (dd, $J = 14,3, 8,9$ Hz, 1 H), 1,65 (s, 9 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172,8; 156,0, 153,7, 149,6, 137,2, 136,5, 128,6, 128,1, 128,0, 127,8, 125,5, 123,5, 119,7, 115,4, 108,7, 83,8, 66,8, 55,6, 55,3, 52,3, 29,3, 28,3$.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$ ($[M]^+$): 483,2131, encontrado: 483,2133.

5 Síntesis de la amida de Mosher 11



Se añadió paladio sobre carbón (100 mg, 10% en peso) a una solución de N^t -Cbz- N^{nd} -Boc-L-Trp-OMe **8** (20 mg, 0,04 mmol) en metanol (1 ml). La mezcla de reacción se purgó con hidrógeno tres veces y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un tapón de Celite®, se lavó con metanol (2 x 3 ml) y se concentró. La amina se usó directamente en la etapa siguiente.

A una solución de la amina (5 mg, 14 μmol) en diclorometano (1 ml) se añadieron a temperatura ambiente, de forma sucesiva, trietilamina (16 μl , 115 μmol), DMAP (3,2 mg, 26 μmol), cloruro de (*S*)-Mosher (11 μl , 58 μmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se inactivó con acetato de etilo (10 ml). La mezcla se lavó sucesivamente con NaHSO_4 acuoso saturado (5 ml), NaOH 1 N (5 ml) y NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 5 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida proporcionando el éster de Mosher **11** correspondiente (8 mg, 14 μmol , 96 %).

Rf = 0,18 (Acetato de etilo/*n*-hexano 1:3);

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,83$ (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H), 7,79 (d, 8,5 Hz, 1 H), 7,60 - 7,53 (m, 2 H), 7,43 - 7,36 (m, 3 H), 7,33 (s, 1 H), 7,25 - 7,21 (m, 1 H), 6,67 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 4,78 - 4,70 (m, 1 H), 3,77 (s, 3 H), 3,75 (s, 3 H), 3,43 - 3,35 (m, 1 H), 3,28 (dd, $J = 14,3, 9,9$ Hz, 1 H), 2,92 (d, $J = 1,4$ Hz, 3 H), 1,66 (s, 9 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,8, 166,9, 153,5, 149,5, 133,0, 129,7, 129,6, 128,6, 128,3, 128,2, 125,6, 125,2, 123,6, 119,6, 115,3, 108,9, 103,3, 84,0, 77,4, 55,2, 54,9, 52,4, 28,3, 28,0$.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7\text{F}_3\text{Na}$ ($[M+\text{Na}]^+$): 587,1981, encontrado: 587,1982.

Síntesis de metoxitriptófano protegido con Cbz 10

Se añadió ácido trifluoroacético (0,5 ml), gota a gota, a una solución de metoxitriptófano **9** (95 mg, 0,20 mmol) en diclorometano (4 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3,5 horas a temperatura ambiente. La solución se concentró evaporando junto con tolueno (3 x 5 ml) y el triptófano desprotegido resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (0,8 ml, 0,4 mmol) a una solución del triptófano desprotegido en tetrahidrofurano/metano/agua (7:1,3:4 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (15 ml) y diclorometano (15 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 15 ml) y se reunieron las fases orgánicas, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con un gradiente de 1 a 5% de metanol) dando 51 mg de metoxitriptófano protegido con Cbz **10** como un sólido blanco (0,14 mmol, 70%, 2 etapas).

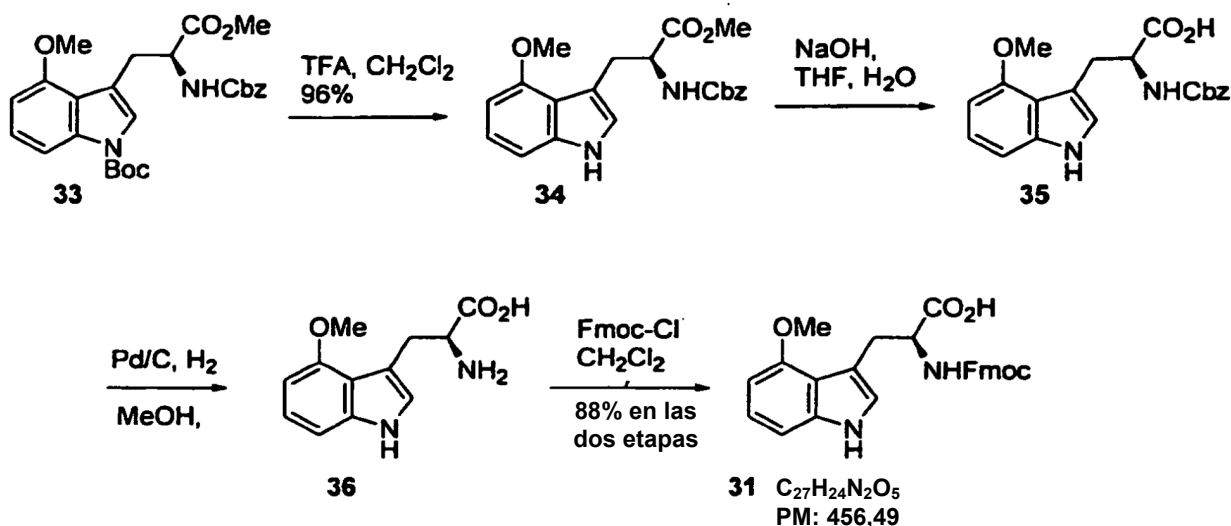
Rf = 0,27 (Acetato de etilo/*n*-hexano 3:1, con 1% de ácido acético);

$[\alpha]_{589}^{20} = -44,3$ ($c = 0,3$, MeOH)

RMN de ^1H (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 60 °C): $\delta = 10,75$ (s ancho, 1H), 7,41 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,24 - 7,34 (m, 5H), 6,9 - 7,2 (m, 3H), 6,44 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 4,95 (m, 2H), 4,30 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,35 (dd, $J = 14, 4$ Hz, 1H), 2,95 (dd, $J = 14, 10$ Hz, 1H).

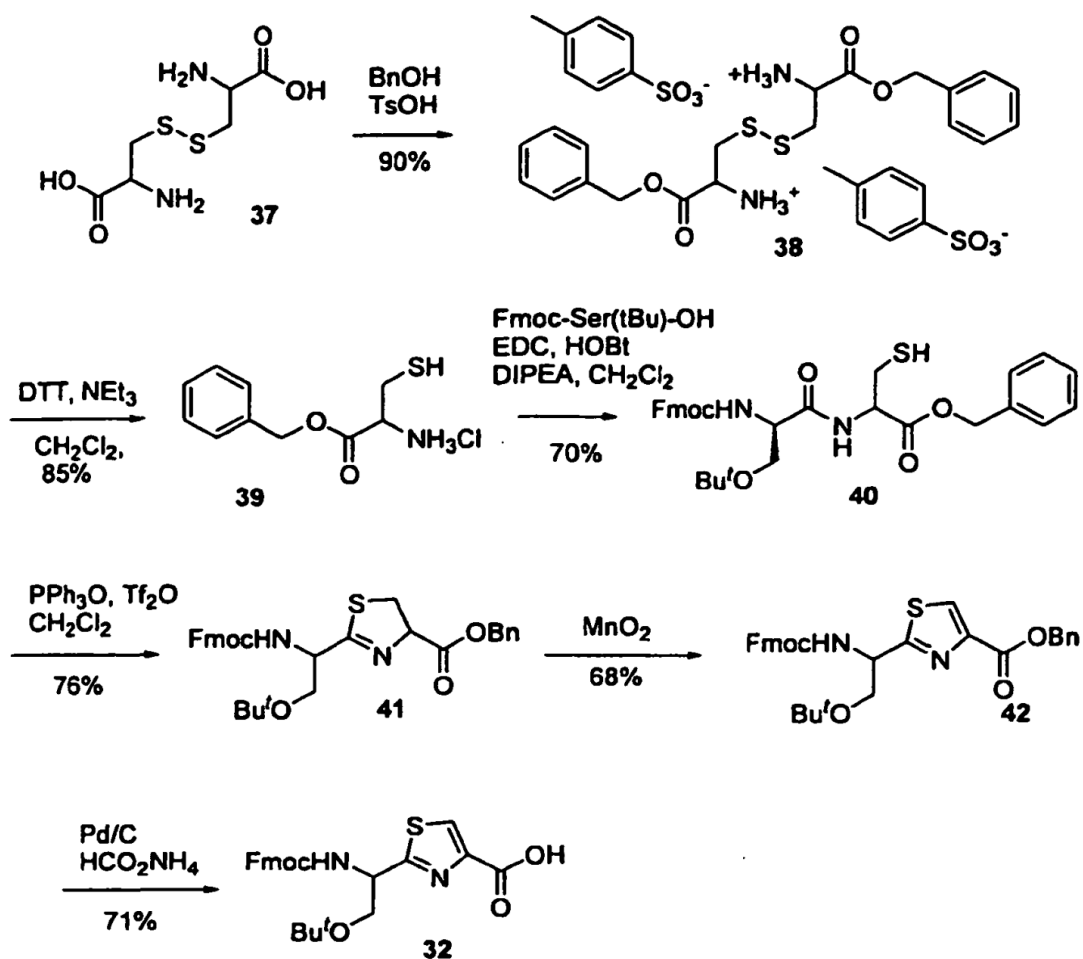
2. Síntesis de aminoácidos protegidos con Fmoc (31 y 32) para uso en síntesis en fase sólida de argininas.

La síntesis de péptidos en fase sólida es una técnica que permite el ensamblaje rápido y eficaz de péptidos de forma automatizada. La estrategia de protección más común usada en ella es la estrategia de Fmoc para la retirada de grupos protectores de nitrógeno en condiciones básicas. En la presente invención, los autores describen una síntesis que permite el ensamblaje de los aminoácidos pivote (metoxitriptófano y el aminoácido que contiene tiazol) como sus derivados Fmoc. El enfoque particular en estas síntesis ha sido a) el carácter lábil del grupo Fmoc que requiere una ruta de síntesis y una estrategia diferentes, en particular para el tiazol aminoácido, comparada con las rutas publicadas y, b) desarrollar una ruta que evite la epimerización de los centros quirales. La última estaba particularmente enfocada para el tiazol aminoácido.

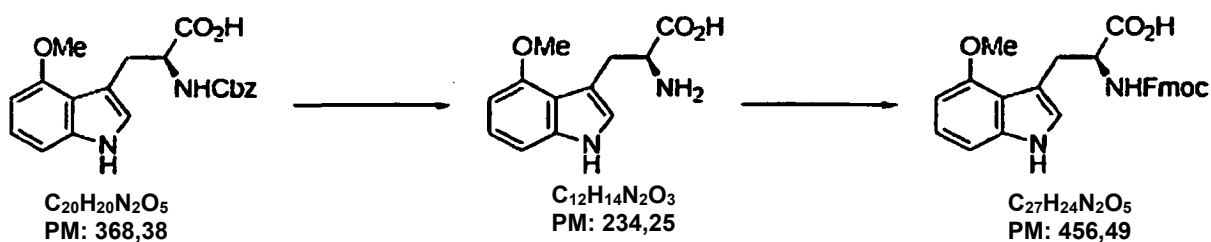


La síntesis del aminoácido triptófano usó intermedio **32** que se usó en la síntesis del aminoácido protegido con Boc. La retirada del grupo protector Boc llevó al compuesto **33** que se saponificó proporcionando el aminoácido **34**. Después de hidrogenolisis, se protegió el resto alfa amino proporcionando el aminoácido protegido con Fmoc requerido para la síntesis en fase sólida.

- 15 La síntesis del aminoácido que contiene un resto tiazol comienza con cistina (**37**) y el tratamiento con alcohol bencílico en condiciones ácidas proporciona el éster bencílico **38**. El enlace disulfuro se puede romper con DTT y se acopla la serina protegida con t-Butilo en condiciones convencionales. El cierre del anillo pivote que puede causar una significativa epimerización se puede llevar a cabo con TfO₂ y O=PPh₃ produciendo la tiazolina **41** con un rendimiento de un 76% y sin epimerización detectable (ee > 90%). La aromatización se consigue con MnO₂ y la hidrogenación final proporciona el aminoácido protegido con Fmoc **32**.
- 20



Síntesis de fragmentos protegidos con Fmoc

**31**

5 Se sometió a hidrogenación durante 3 horas una solución de metoxitriptófano protegido con Cbz **35** (368 mg, 1 mmol) y Pd/C (10%, 50 mg) en MeOH. La mezcla se filtró y se evaporó. El ácido bruto en dioxano (5 ml) y solución acuosa de Na_2CO_3 (10%, 10 ml) se trató con Fmoc-Cl (259 mg, 1 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C. A continuación se añadió agua (100 ml) y la fase acuosa se lavó con MTBE. La fase acuosa se acidificó con HCl (1M) y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó (MgSO_4) y el disolvente se eliminó proporcionando metoxitriptófano protegido con Fmoc **31** (402 mg, 88%).

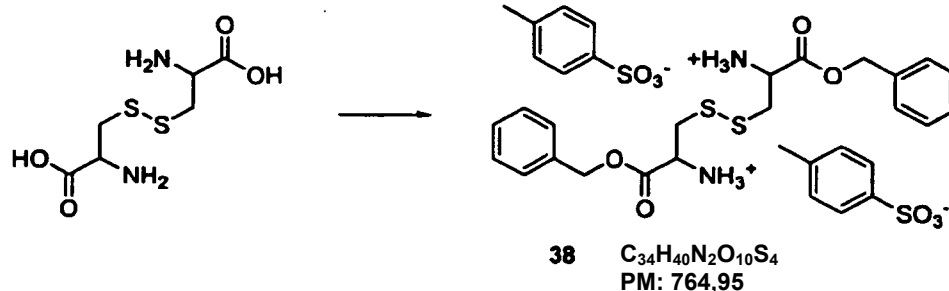
10 $[\alpha]_{589}^{20} = -31,8$ (c = 0,34, MeOH).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 12,50$ (s ancho, 1H), 10,81 (s, 1H), 7,87 (d, $J = 7,85$ Hz, 2H), 7,65 (d, $J = 7,51$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 7,51$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 8,19$ Hz, 1H), 7,42 (d, $J = 7,17$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 7,17$ Hz, 1H), 7,31 (t, $J = 7,51$ Hz, 1H), 7,25 (t, $J = 7,51$ Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,00 - 6,90 (m, 2H), 6,45 (d, $J = 7,17$ Hz, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,18 (m, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,00 (m, 1H).

15 **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 155,8, 154,0, 143,9, 143,8, 140,7, 137,8, 128,9, 128,3, 127,6, 127,5, 127,3,$

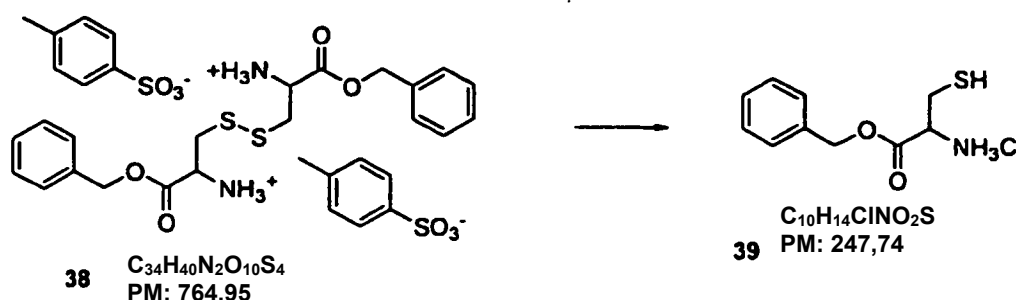
127,1, 125,2, 122,5, 121,7, 121,4, 120,1, 116,9, 110,7, 109,8, 105,0, 98,8, 66,4, 55,9, 55,0, 48,6, 46,6.

EMAR (IEP): $C_{27}H_{25}N_2O_5$ ($[M]^+$) requiere 457,1763, encontrado 457,1769.

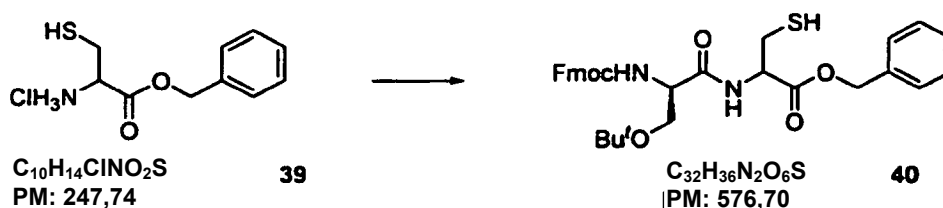


Bibliografía: *JACS* **2005**, 12263 (éster alílico)

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo equipado con un separador de Dean Stark con *L*-cistina (20 g, 20,8 mmol), alcohol bencilico (100 ml, 249,6 mmol) y *p*-TsOH·H₂O (63,3 g, 83,2 mmol) en benceno (500 ml). La mezcla se calentó hasta reflujo hasta que se separó la cantidad calculada de agua (3-5 h). Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el producto precipitado se filtró con succión, se lavó con acetato de etilo y se secó proporcionando **38** (60 g, 94%).
- 10 **RMN de ¹H de 38-TsOH** (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,40 - 7,30 (m, 10H), 5,15 (s, 4H), 3,85 (dd, *J* = 7,9, 4,8 Hz, 2H), 3,13 (dd, *J* = 13,7, 4,4 Hz, 2H), 2,92 (dd, *J* = 13,7, 7,5 Hz, 2H), 2,09 (s ancho, 4H).



- 15 Se evaporó un matraz de fondo redondo cargado con el éster bencilico **38** (76,5 g, 100 mmol) en CH₂Cl₂ (800 ml) y se volvió a llenar con nitrógeno varias veces. Se añadieron ditriortreitol (38,6 g, 250 mmol) y NEt₃ (35 ml, 250 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h. La fase orgánica se lavó con agua (3x) y se secó (MgSO₄). Se eliminó el disolvente y el residuo se disolvió en éter dietílico. El clorhidrato precipitó por adición de una solución de HCl-éter dietílico. Después de filtrar, el producto bruto se purificó por cristalización en acetato de etilo proporcionando **39** (44,6 g, 90%).
- 20 **RMN de ¹H de 39-HCl** (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,40 - 7,30 (m, 5H), 5,20 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 5,15 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J* = 5,5, 5,1 Hz, 1H), 2,88 (dd, *J* = 13,7, 5,8 Hz, 1H), 2,83 (dd, *J* = 13,5, 4,3 Hz, 2H), 1,75 (s ancho, 2H).



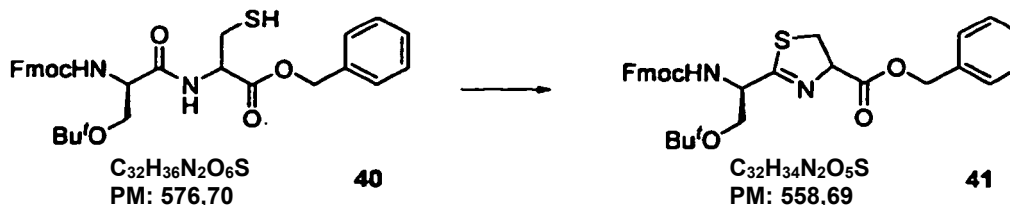
- 25 A una solución del clorhidrato del éster de cisteína (3,10 g, 12,5 mmol) y Fmoc-D-Ser(tBu)-OH (3,83 g, 10 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) se añadieron HOBT (2,03 g, 15 mmol), EDC·HCl (2,88 g, 15 mmol) y DIPEA (2,2 ml, 12,5 mmol) sucesivamente. La mezcla se agitó durante 16 h, luego se añadió solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se lavó con agua (2x), se secó (MgSO₄) y se evaporó. El producto bruto se purificó por cromatografía (gel de sílice,

DCM) proporcionando **40** (4,05 g, 70%).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,77 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,60 (dd, J = 7,5, 2,0 Hz, 2H), 7,56 (s ancho, 1H), 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,35 (s, 5H), 7,32 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 5,75 (s ancho, 1H), 5,26 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 5,20 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,91 (dt, J = 7,5, 3,8 Hz, 1H), 4,40 (m, 2H), 4,30 (s ancho, 1H), 4,24 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 3,83 (s ancho, 1H), 3,43 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 3,09 - 2,96 (m, 2H), 1,23 (s, 9H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,4, 170,0, 169,5, 156,0, 143,7, 141,3 (2C), 135,0, 128,7 (2C), 128,4, 127,7, 127,1, 125,1, 120,0, 75,8, 74,4, 67,6, 67,3, 67,2, 65,3, 64,4, 61,6, 54,7, 53,9, 47,1, 40,2, 32,6, 30,9, 30,4, 27,9, 26,7.

EMAR (IEP): $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ ($[M+\text{Na}]^+$) requiere 599,2192, encontrado 599,2192.



- 10 A una solución de PPh_3PO (1,085 g, 3,9 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) se añadió anhídrido trifílico (0,32 ml, 1,95 mmol) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos a 0 °C y luego se enfrió hasta -20 °C. Se añadió el dipéptido (750 mg, 1,3 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos y luego se inactivó mediante adición de solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se lavó con agua (2x), se secó (MgSO_4) y se evaporó. El producto bruto se purificó por cromatografía (CH_2Cl_2 /acetona, 98:2) proporcionando **41** (555 mg, 76%).

15 $[\alpha]_{589}^{20} = 30,3$ (c = 1,18, CHCl_3).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,77 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,62 (m, 3H), 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,44 - 7,28 (m, 9H), 5,82 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 5,29 - 5,12 (m, 3H), 4,73 (s ancho, 1H), 4,45 (dd, J = 9,6, 7,5 Hz, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,66 - 3,46 (m, 3H), 1,16 (s, 9H).

EMAR (IEP): $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaS}$ ($[M+\text{Na}]^+$) requiere 581,2086, encontrado 581,2089.



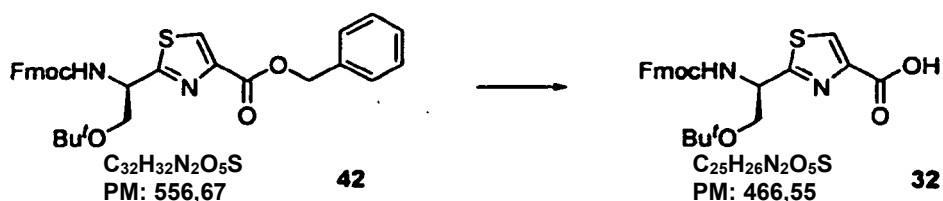
- 20 A una solución de tiazolina (519 mg, 0,93 mmol) en CH_2Cl_2 (9,3 ml) se añadió MnO_2 (1,61 g, 18,6 mmol). La mezcla se agitó durante 24 horas a t.a. Después de filtrar a través de Celite, el producto bruto se purificó por cromatografía (CH_2Cl_2 / acetona, 97:3) proporcionando el tiazol (352 mg, 68%).

$[\alpha]_{589}^{20} = -0,88$ (c = 1,13, CHCl_3).

- 25 **RMN de ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,10 (s, 1H), 7,76 (s ancho, 2H), 7,62 (s ancho, 2H), 7,50 - 7,27 (m, 9H), 5,95 (s ancho, 1H), 5,40 (m, 2H), 5,21 (s ancho, 1H), 4,55 - 4,37 (m, 2H), 4,25 (s ancho, 1H), 3,90 (s ancho, 1H), 3,69 (dd, J = 8,5, 4,8 Hz, 1H), 1,12 (s, 9H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 172,1, 161,1, 158,8, 146,5, 143,8, 141,3, 135,7, 128,6, 128,4 (2C), 127,9, 127,7, 127,0, 125,0, 120,0, 77,2, 73,9, 67,1, 66,9, 63,5, 54,0, 47,2, 27,3.

- 30 **EMAR** (IEP): $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaS}$ ($[M+\text{Na}]^+$) requiere 579,1930, encontrado 579,1909.



A una solución de tiazol (151 mg, 0,27 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) se añadió HCO_2NH_4 (81 mg, 0,3 g/mmol) y Pd/C (10%, 81 mg, 0,3 g/mmol). La mezcla se agitó durante 8 h a t.a. Después de filtrar a través de Celite el producto bruto se purificó por cromatografía ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1) proporcionando el ácido (90, 71%).

5 $[\alpha]_{589}^{20} = 13$ (c = 1,05, MeOH).

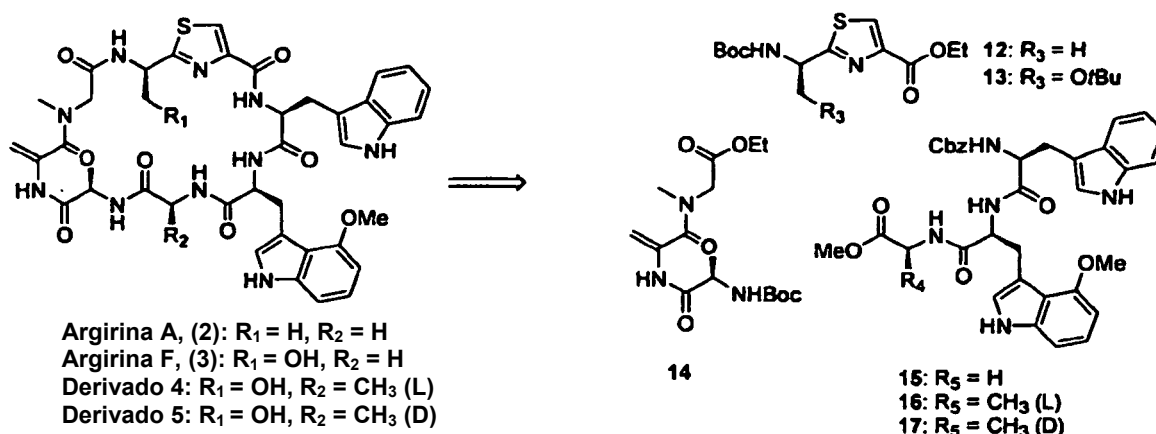
RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,10 (s, 1H), 7,76 (s ancho, 2H), 7,62 (s ancho, 2H), 7,50 - 7,27 (m, 9H), 5,95 (s ancho, 1H), 5,40 (m, 2H), 5,21 (s ancho, 1H), 4,55 - 4,37 (m, 2H), 4,25 (s ancho, 1H), 3,90 (s ancho, 1H), 3,69 (dd, J = 8,5, 4,8 Hz, 1H), 1,12 (s, 9H).

10 **RMN de ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 172,1, 161,1, 158,8, 146,5, 143,8, 141,3, 135,7, 128,6, 128,4 (2x), 127,9, 127,7, 127,0, 125,0, 120,0, 77,2, 73,9, 67,1, 66,9, 63,5, 54,0, 47,2, 27,3.

EMAR (IEP): $C_{32}H_{31}N_2O_5NaS$ ($[M+Na]^+$) requiere 489,1460, encontrado 489,1465.

3. Síntesis de argirina y los respectivos derivados

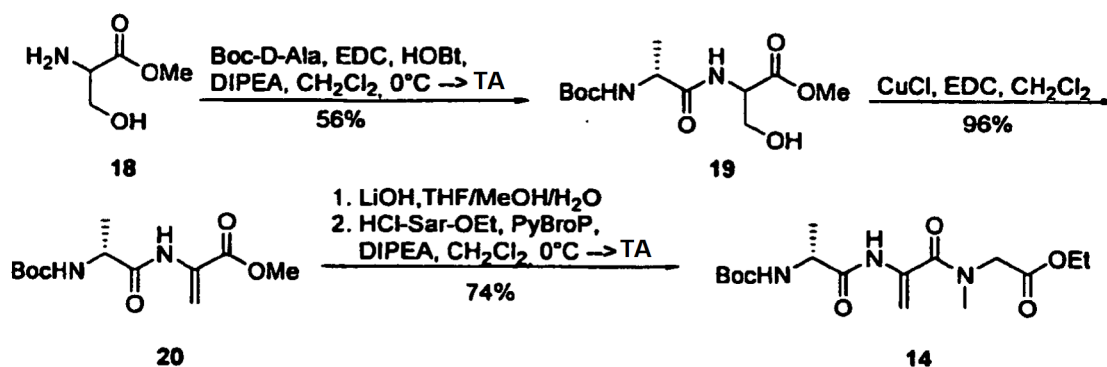
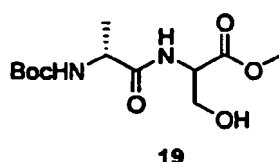
En la nueva ruta de acuerdo con la invención, el doble enlace se establece pronto en la síntesis. La unidad deshidroalanina se instala después del acoplamiento de los aminoácidos D-alanina y D/L-serina. El tratamiento con CuCl y EDC proporciona el dipéptido **20** con alto rendimiento, que se puede convertir después de acoplar con etil sarcosina al tripéptido **14**.



20 El Fragmento **12** se sintetiza siguiendo procedimientos conocidos en la bibliografía de acuerdo con Ley. El procedimiento de síntesis nuevo, eficiente y económico de los autores de la invención para 4-metoxitriptófano nos permite la síntesis en una escala multigramo. Los acoplamientos de péptidos con L-triptófano y glicina o alanina proporcionaron los tripéptidos **15-17**.

3.1 Síntesis de los fragmentos (12-17)

3.1.1 Síntesis del fragmento 14

**N-Boc-D-Ala-Ser-OMe (19)** $C_{12}H_{22}N_2O_6$

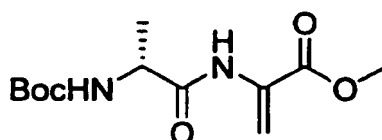
[290,31]

5

Se añadieron sucesivamente 1-hidroxibenzotriazol (1,30 g, 9,6 mmol), EDC (1,66 g, 8,7 mmol) y diisopropiletilamina (1,21 ml, 7,1 mmol) a una suspensión de D/L-Ser-OMeHCl (1,00 g, 6,4 mmol) y Boc-D-Ala-OH (1,46 g, 7,7 mmol) en diclorometano (5 ml) a 0°C bajo argón. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. La suspensión se repartió entre KHSO₄ acuoso 1 N (10 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NH₄Cl acuoso saturado y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida y posterior purificación por cromatografía en columna (diclorometano con un gradiente de 3 a 5% de metanol) dio **19** como un sólido pegajoso incoloro (1,05 g, 3,6 mmol, 56%).

 $R_f = 0,28$ (acetato de etilo)

15 **RMN de ¹H** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,25 - 7,17$ (m, 1 H), 5,43 - 5,23 (m, 1 H), 4,69 - 4,55 (m, 1 H), 4,25 - 4,13 (m, 1 H), 3,98 - 3,89 (m, 2 H), 3,76 (s, 3 H), 1,44 - 1,40 (m, 9 H), 1,36 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

EMAR (IEP) calculado para $C_{12}H_{22}N_2O_6$ ($[M+Na]^+$): 313,1376, encontrado: 313,1376.**N-Boc-D-Ala-DHA-OMe (20)****20** $C_{12}H_{20}N_2O_5$

[272,30]

20

Se añadieron CuCl (31 mg, 0,31 mmol) y EDC (1,19 g, 6,18 mmol) a una solución de *N*-Boc-D-Ala-Ser-OMe **19** (897 mg, 3,09 mmol) en diclorometano (40 ml) a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas, se filtró a través de Celite® y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida y posterior purificación por cromatografía en columna (diclorometano con 3% de metanol) dio **20** como un sólido amarillo (808 mg, 2,97 mmol, 96%).

 $R_f = 0,57$ (Diclorometano con 4% de metanol).

25

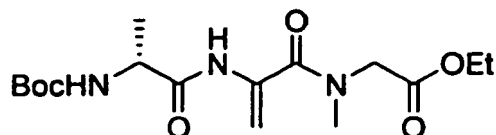
$$[\alpha]_D^{20} = 55,9 \text{ (c = 1,17, CHCl}_3\text{)}.$$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,45 (s ancho, 1 H), 6,57 (s, 1 H), 5,88 (m, 1 H), 5,11 - 5,01 (m, 1 H), 4,31 - 4,18 (m, 1 H), 3,82 (s, 3 H), 1,43 (s, 9 H), 1,38 (d, J = 6,8 Hz, 3 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,68, 164,36, 155,58, 130,96, 109,32, 80,56, 53,04, 51,04, 28,37, 18,05.

5 **EMAR** (IEP) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 295,1270, encontrado: 295,1273.

***N*-Boc-D-Ala-DHA-Sar-OEt (14)**



14

$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$

[357,40]

10 A una solución acuosa 0,5 N de LiOH (1,04 ml, 0,52 mmol) se añadió gota a gota a una solución de *N*-Boc-D-Ala-DHA-Sar-OEt (**20**) (129 mg, 0,47 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (4:1:2 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La suspensión se repartió entre KHSO_4 0,1 N (10 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente a presión reducida.

15 A una solución del residuo en diclorometano (5 ml) a 0°C bajo argón se añadieron sucesivamente HCl-Sar-OEt (109 mg, 0,71 mmol), PyBroP (331 mg, 0,71 mmol) y diisopropiletilamina gota a gota (24,3 μl , 1,42 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 19 horas. La suspensión se repartió entre NH_4Cl acuoso saturado (10 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml) y las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 . La eliminación del disolvente y posterior purificación por cromatografía

20 en columna (acetato de etilo) dio **14** como un sólido pegajoso incoloro (124 mg, 0,35 mmol, 74%).

R_f = 0,38 (acetato de etilo).

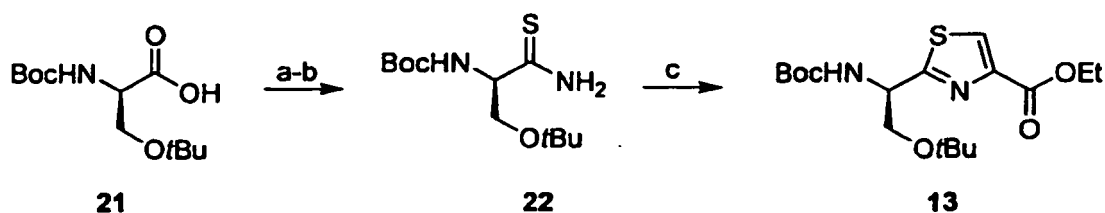
$$[\alpha]_D^{20} = 16,8 \text{ (c = 1, acetona)}.$$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,34 (s ancho, 1 H), 6,10 - 5,58 (m, 1 H), 5,23 - 4,86 (m, 2 H), 4,29 - 4,09 (m, 5 H), 3,28 - 2,92 (m, 3 H), 1,43 (s, 9 H), 1,36 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

25 **RMN de ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,7, 168,9, 168,0, 155,7, 134,6, 105,0, 80,5, 61,5, 50,6, 49,5, 39,0, 28,4, 18,2, 14,3 ppm.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 380,1789, encontrado: 380,1789.

3.1.2 Síntesis del tiazol 13



30 Tioamida 22

Se añadió DCC (59 mg, 0,29 mmol) a una suspensión de *N*-Boc-(*O*-*t* Bu)-D-serina (100 mg, 0,23 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (31 mg, 0,23 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0°C. La solución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La solución se enfrió hasta 0°C y se añadió amoníaco (0,06 ml) en diclorometano (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y luego se filtró. Las aguas madres se concentraron y se purificó por cromatografía en columna (diclorometano/acetona, 4:1) dando la amida como un

35

sólido blanco (41 mg, 70%).

$$[\alpha]_{589}^{20} = -51,47 \text{ (c = 1,02, CHCl}_3\text{)}.$$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 6,59 (s ancho, 1 H), 6,07 (s ancho, 1 H), 5,43 (s ancho, 1 H), 4,19 - 4,04 (m, 1 H), 3,77 - 3,67 (m, 1 H), 3,34 (t, J = 7,7 Hz, 1 H), 1,40 (s, 9 H), 1,15 (s, 9 H).

5 **RMN de ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3): δ = 173,4, 155,4, 79,8, 73,9, 61,7, 54,0, 28,2, 27,3.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$): 324,1899, encontrado 324,1895.

10 Se añadió reactivo de Belleau (5,3 g, 10,1 mmol) a una solución de la amida (4,4 g, 16,8 mmol) en tetrahidrofurano (250 ml) a 0 °C. La solución se calentó hasta temperatura ambiente, se agitó durante 90 minutos y se repartió entre hielo (250 ml) y NaHCO_3 acuoso saturado (250 ml). Este se extrajo con éter metil *terc*-butílico (3 x 250 ml), se reunieron las fases orgánicas, se lavó con salmuera (250 ml), se secó (MgSO_4) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano/acetato de etilo, 5:1) dando la tioamida **22** como un aceite incoloro (3,8 g, 82%).

$$[\alpha]_{589}^{20} = -74,50 \text{ (c = 1,03, CHCl}_3\text{)}.$$

15 **RMN de ^1H** (400 MHz, EDCl_3): δ = 7,93 (s ancho, 1 H), 7,53 (s ancho, 1 H), 5,65 (s ancho, 1 H), 4,40 (dt, J = 6,8, 3,9 Hz, 1 H), 3,82 (dd, J = 8,8, 3,9 Hz, 1 H), 3,44 (s ancho, 1 H), 1,44 (s, 9 H), 1,17 (s, 9 H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 207,0, 155,1, 80,3, 74,1, 63,9, 59,6, 28,3, 27,4.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}]^+$): 276,1508, encontrado 276,1506.

Tiazol 13

20 Se añadió bromopiruvato de etilo (4,5 ml, 37,9 mmol) a una suspensión de KHCO_3 (10,3 g, 102,9 mmol) y tioamida **22** (3,6 g, 12,8 mmol) que se había agitado en 1,2-dimetoxietano (30 ml) a -15 °C durante 5 minutos. Después de 1 minuto, se trató la mezcla con una solución de 2,6-lutidina (12,7 ml, 109,1 mmol) y anhídrido trifluoroacético (2,7 g, 12,7 mmol) en 1,2-dimetoxietano (20 ml) a -15 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, se vertió en agua (90 ml) y se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas se reunieron, se secó (MgSO_4) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano/acetato de etilo, 8:1) dando el tiazol **13** como un sólido amarillo (3,7 g, 77%).

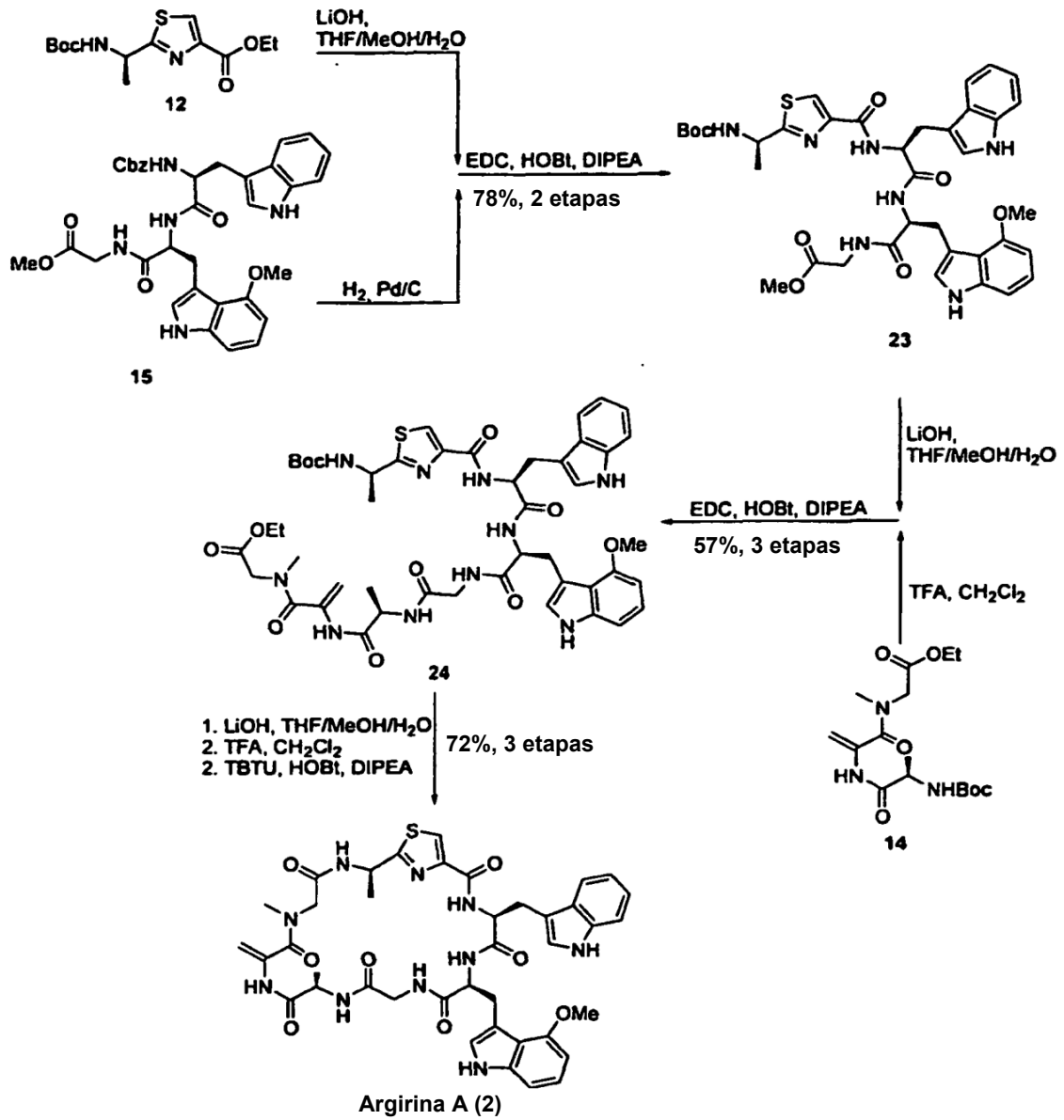
$$[\alpha]_{589}^{20} = 14,21 \text{ (c = 1,10, CHCl}_3\text{)}.$$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,06 (s, 1 H), 5,67 (s ancho, 1 H), 5,10 (s ancho, 1 H), 4,41 - 4,26 (m, 2 H), 3,88 - 3,85 (m, 1 H), 3,69 - 3,61 (m, 1 H), 1,44 (s, 9 H), 1,37 (t, J = 7,0 Hz, 3 H), 1,07 (s, 9 H).

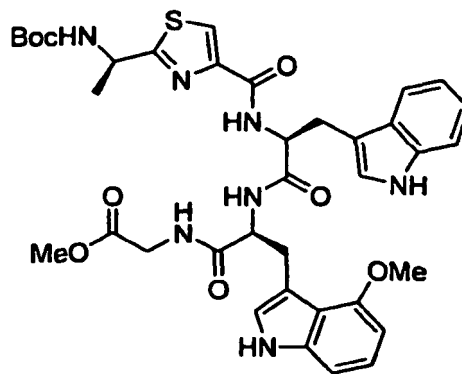
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 161,4, 155,2, 146,8, 127,4, 80,2, 73,8, 63,5, 61,3, 55,1, 53,6, 28,3, 27,3, 14,3.

30 **EMAR** (IEP): $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{M}]^+$) requiere 372,1719, encontrado 372,1720.

3.2 Síntesis modificada de Argirina A (2)



N^α -Boc-D-AlaThz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-OMe (23):



$\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}$

[745,84]

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (1,5 ml, 0,74 mmol) a una solución de tiazol **12** (183 mg, 0,61 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (7,4:1,8:3,7 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (20 ml) y diclorometano (40 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadió paladio sobre carbón (30 mg, 10% en peso) a una solución de N^α-Cbz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-OMe **15** (300 mg, 0,48 mmol) en metanol (30 ml). La mezcla de reacción se purgó con hidrógeno tres veces y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un tapón de Celite®, se lavó con metanol (2 x 20 ml) y se concentró por evaporación junto con tolueno (2 x 20 ml). La amina se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadió EDC (113 mg, 0,59 mmol) sucesivamente a una suspensión del ácido carboxílico, la amina y 1-hidroxibenzotriazol (97 mg, 0,72 mmol) en diclorometano (20 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La suspensión se repartió entre agua (10 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 6% de metanol) dando el pentapéptido **23** como un sólido incoloro (280 mg, 0,38 mmol, 78%).

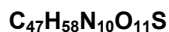
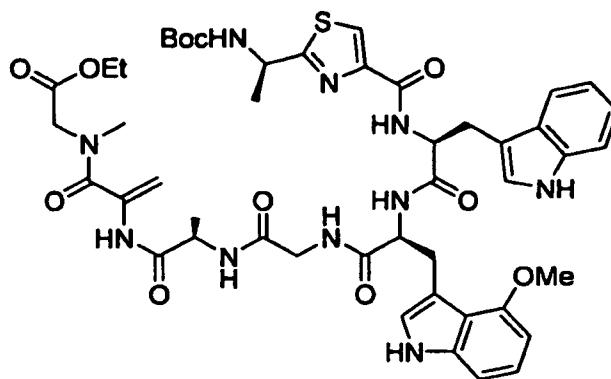
$$[\alpha]_{589}^{20} = -47,39 \text{ (c = 1,11, CHCl}_3\text{)}.$$

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,81 (ancho, 1 H), 7,92 (s, 1 H), 7,79 (ancho, 1 H), 7,66 - 7,59 (m, 1 H), 7,55 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,28 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,15 (t, J = 7,5 Hz, 1 H), 7,09 - 7,03 (m, 2 H), 6,98 - 6,90 (m, 3 H), 6,62 - 6,52 (m, 2 H), 6,40 (d, J = 7,5 Hz, 1 H), 5,15 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 4,93 - 4,85 (m, 2 H), 4,05 (dd, J = 17,9, 6,0 Hz, 1 H), 3,88 - 3,79 (m, 1 H), 3,71 (s, 3 H), 3,68 (s, 3 H), 3,46 (dd, J = 14,7, 4,4 Hz, 1 H), 3,17 - 3,07 (m, 3 H), 1,51 - 1,43 (m, 12 H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 175,0, 172,1, 171,7, 170,3, 161,6, 155,2, 154,0, 148,9, 138,2, 136,2, 127,4, 123,7, 123,2, 122,7, 122,6, 122,2, 119,7, 118,7, 117,5, 111,5, 110,2, 109,7, 105,4, 99,8, 81,0, 55,5, 55,4, 54,9, 52,3, 49,3, 41,2, 28,5, 28,1, 26,7, 21,9.

EMAR (IEP) calculado para C₃₇H₄₃N₇O₈NaS ([M+Na]⁺): 768,2792, encontrado: 768,2798.

N-Boc-D-AlaThz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-D-Ala-DHA-Sar-OEt (24)



[971,09]

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (0,22 ml, 0,10 mmol) a una solución del éster **23** (69 mg, 0,09 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (2,9:0,7:1,4 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (2,2 ml) y diclorometano (4,3 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 3 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadió ácido trifluoroacético (1,4 ml) gota a gota a una solución del carbamato **14** (57 mg, 0,16 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. La solución se concentró por evaporación junto con tolueno (3 x 3 ml) y la sal de amonio resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

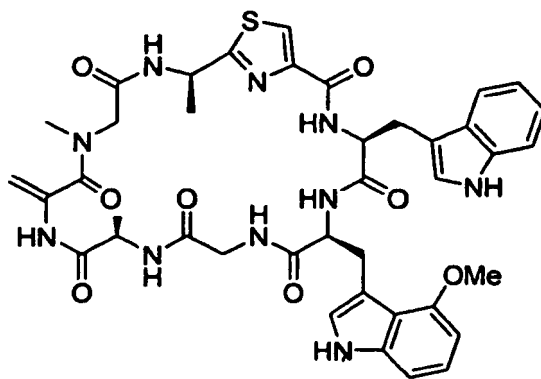
Se añadieron sucesivamente diisopropiletamina (30 µl, 0,15 mmol) y EDC (32 mg, 0,17 mmol) a una suspensión del ácido carboxílico, la amina y 1-hidroxibenzotriazol (29 mg, 0,21 mmol) en diclorometano (10 ml) a 0 °C. La mezcla de

reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (6 ml) y diclorometano (12 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 5 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se lavó con cloruro amónico acuoso saturado (10 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 5% de metanol) dando el octapéptido **24** como un sólido pegajoso (105 mg, 0,11 mmol, 81%).

$$[\alpha]_{589}^{20} = 49,7 \text{ (c = 2,09, CHCl}_3\text{)}.$$

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{NaS}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 993,3905, encontrado: 993,3907.

Argirina A (2)



[824,90]

10

15

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (0,27 ml, 0,11 mmol) a una solución del éster **24** (100 mg, 0,10 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (3,7:0,7:2 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (7 ml) y diclorometano (14 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

20

Se añadió ácido trifluoroacético (7,3 ml) gota a gota a una solución del ácido carboxílico en diclorometano (5 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La solución se concentró por evaporación junto con tolueno (3 x 10 ml) y la sal de amonio resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

25

Se añadieron sucesivamente diisopropiletilamina (70 μl , 0,21 mmol) y TBTU (66 mg, 0,40 mmol) a una solución del péptido lineal y 1-hidroxibenzotriazol (28 mg, 0,21 mmol) en diclorometano (170 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 4% metanol) dando Argirina **A** (**2**) como un sólido pegajoso (47 mg, 0,06 mmol, 57%).

$$[\alpha]_{589}^{20} = 145,2 \text{ (c = 0,91, CHCl}_3\text{)}.$$

30

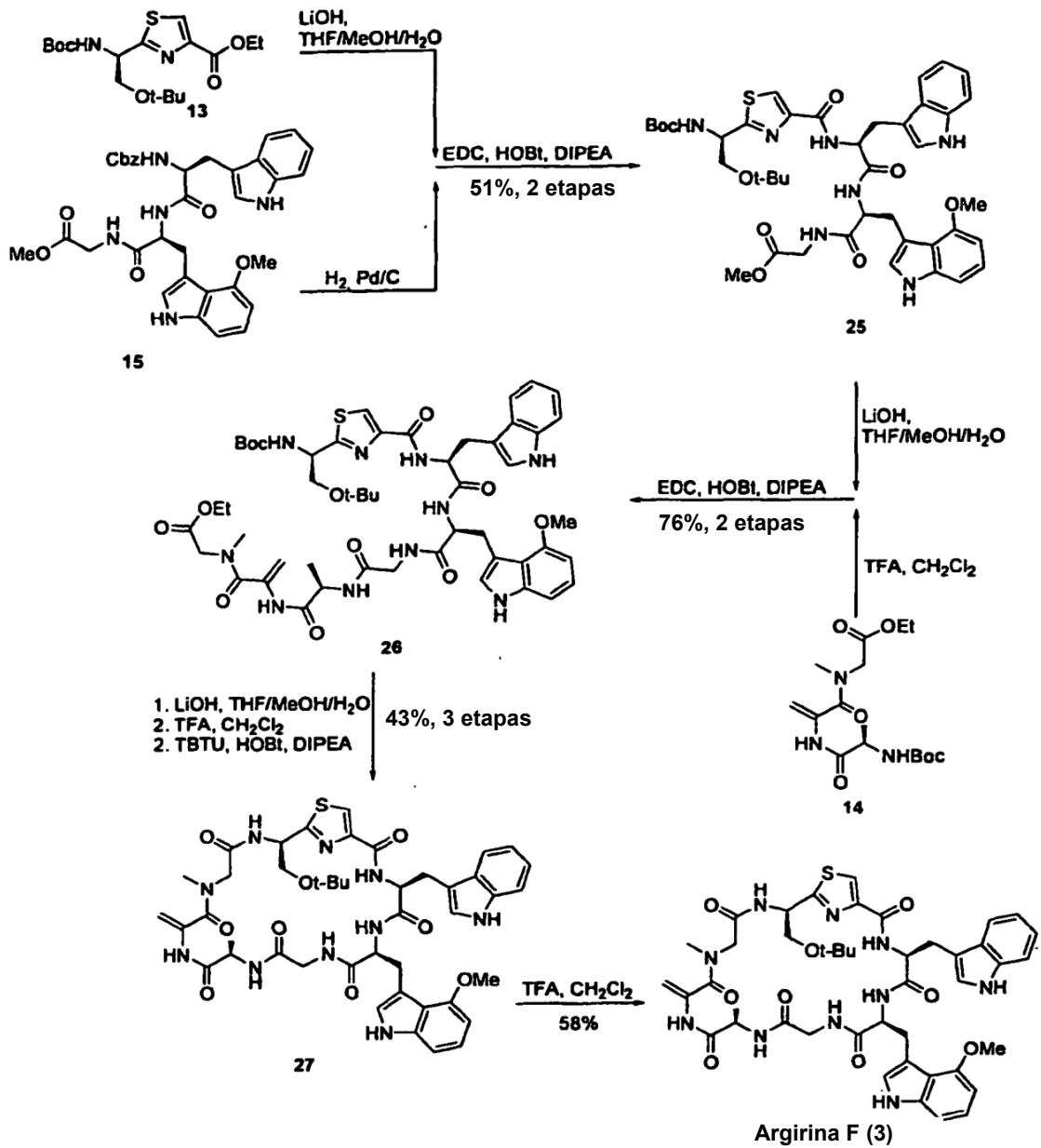
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 10,69 (s, 1 H), 9,49 (s, 1 H), 8,84 (d, J = 8,5 Hz, 1 H), 8,78 (d, 1,2 Hz, 1 H), 8,57 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 8,38 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 8,06 (s, 1 H), 7,36 - 7,32 (m, 2 H), 7,05 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 6,96 (d, J = 2,4 Hz, 1 H), 6,92 - 6,89 (m, 1 H), 6,89 - 6,85 (m, 2 H), 6,83 (d, J = 2,2 Hz, 1 H), 6,33 (t, J = 7,4 Hz, 1 H), 5,51 - 5,44 (m, 1 H), 5,37 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 5,09 - 5,04 (m, 1 H), 5,01 (d, J = 1,4 Hz, 1 H), 4,95 (d, J = 16,9 Hz, 1 H), 4,72 (d, J = 1,0 Hz, 1 H), 4,54 - 4,49 (m, 1 H), 4,34 (s, 3 H), 4,26 - 4,20 (m, 2 H), 3,57 - 3,46 (m, 3 H), 3,40 (d, J = 16,9 Hz, 1 H), 3,32 (dd, J = 14,9, 4,0 Hz, 1 H), 3,11 (s, 3 H), 2,84 (dd, J = 15,2, 3,1 Hz, 1 H), 1,73 (d, J = 7,2 Hz, 3 H), 1,42 (d, J = 7,0 Hz, 3 H), 1,05 (dd, J = 17,4, 5,1 Hz, 1 H).

35

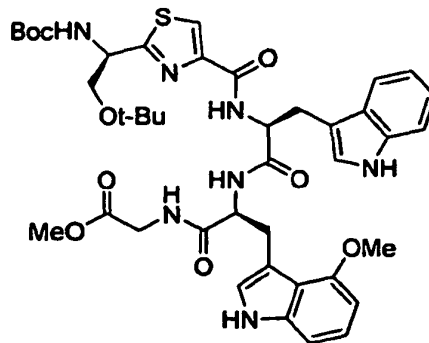
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ = 172,9, 171,0, 170,8, 170,0, 169,8, 168,3, 166,8, 159,8, 152,3, 150,4, 138,3, 136,7, 134,7, 126,5, 125,5, 123,7, 123,6, 122,9, 121,2, 119,2, 117,3, 115,9, 111,3, 108,3, 106,6, 105,7, 101,2, 99,7, 57,7, 56,1, 52,1, 51,0, 48,3, 45,2, 40,4, 37,4, 26,9, 26,6, 20,3, 13,9.

EMAR (IEP) calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}$ ($[\text{M}]^+$): 825,3143, encontrado: 825,3141.

3.3 Síntesis modificada para Argirina F (3)



N^o-Boc-D-SerThz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-OMe (25)



C₄₁H₅₁N₇O₉S
[817,95]

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (0,3 ml, 0,15 mmol) a una solución del tiazol **13** (46 mg, 0,13 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (1,6:0,4:0,8 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (5 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 5 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadió paladio sobre carbón (6 mg, 10% en peso) a una solución de N^α-Cbz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-OMe **15** (60 mg, 0,10 mmol) en metanol (3 ml). La mezcla de reacción se purgó con hidrógeno tres veces y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un tapón de Celite[®], se lavó con metanol (2 x 5 ml) y se concentró por evaporación junto con tolueno (2 x 5 ml). La amina se usó directamente en la etapa siguiente.

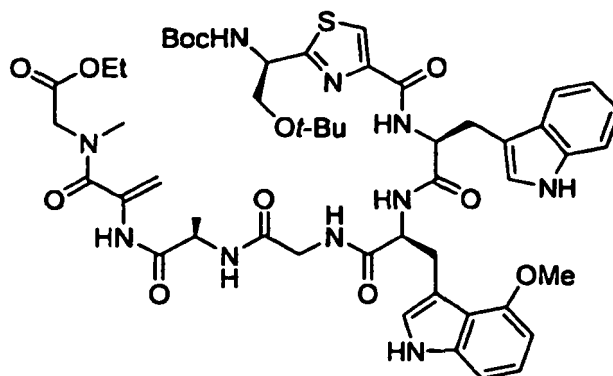
Se añadió EDC (23 mg, 0,12 mmol) sucesivamente a una suspensión del ácido carboxílico, la amina y 1-hidroxibenzotriazol (19 mg, 0,14 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. La suspensión se repartió entre agua (5 ml) y diclorometano (5 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 5 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se lavó con cloruro amónico acuoso saturado (10 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 4,5% de metanol) dando el pentapéptido **25** como un sólido incoloro (40 mg, 0,05 mmol, 78%).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 9,03 (ancho, 1 H), 8,09 (ancho, 1 H), 7,93 (s, 1 H), 7,54 (m, 1 H), 7,52 (m, 1 H), 7,27 (m, 1 H), 7,13 (m, 1 H), 7,10 (m, 2 H), 6,95 (m, 2 H), 6,59 (m, 2 H), 6,36 (m, 1 H), 5,65 (d, J = 7,0 Hz, 1 H), 4,84 (m, 1 H), 4,66 (m, 2 H), 4,08 (dd, J = 18,0, 6,0 Hz, 1 H), 3,85 (dd, J = 18,0, 5,0 Hz, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,64 (s, 3 H), 3,44 (m, 1 H), 3,00 - 3,20 (m, 3 H), 1,77 (s, 3 H), 1,53 (s, 2 H), 1,47 (s, 9 H), 1,46 (m, 3 H), 1,11 (s, 9 H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 173,3, 172,1, 171,7, 171,5, 170,3, 161,6, 157,9, 154,4, 148,4, 137,5, 136,5, 127,6, 124,1, 122,9, 122,7, 122,5, 122,1, 119,5, 118,6, 117,4, 111,4, 110,0, 109,6, 105,4, 99,5, 81,0, 74,2, 63,4, 55,4, 54,8, 53,8, 52,3, 41,2, 34,9, 32,9, 28,5, 28,3, 27,4.

EMAR (IEP) calculado para C₄₁H₅₁N₇O₉NaS ([M+Na]⁺): 840,3368, encontrado 840,3367.

25 N-Boc-D-SerThz-Trp-(4-OMe)Trp-Gly-D-Ala-DHA-Sar-OEt (26)



C₅₁H₆₆N₁₀O₁₂S

[1043,19]

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (0,5 ml, 0,23 mmol) a una solución del éster **25** (120 mg, 0,15 mmol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (19,5:4,5:9,5 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (40 ml) y diclorometano (100 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 3 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

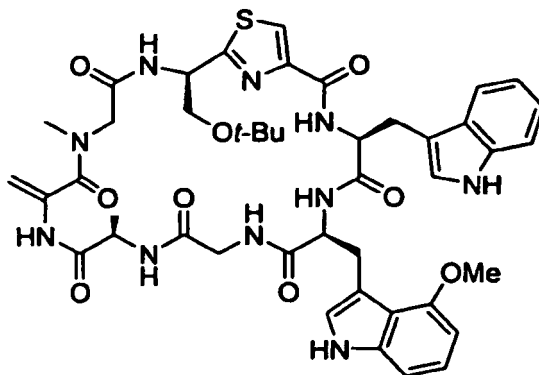
Se añadió ácido trifluoroacético (1,7 ml) gota a gota a una solución del carbamato **14** (68 mg, 0,19 mmol) en diclorometano (2,4 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La solución se concentró por evaporación junto con tolueno (3 x 5 ml) y la sal de amonio resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

Se añadieron sucesivamente diisopropiletilamina (27 µl, 0,16 mmol) y EDC (35 mg, 0,18 mmol) a una suspensión del ácido carboxílico, la amina y 1-hidroxibenzotriazol (32 mg, 0,23 mmol) en diclorometano (12 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (10 ml) y diclorometano (20 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se lavó con cloruro amónico acuoso saturado (20 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El

residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 5% de metanol) dando el octapéptido **26** como un sólido pegajoso (119 mg, 0,11 mmol, 76%).

EMAR (IEP) calculado para $C_{51}H_{66}N_{10}O_{12}NaS$ ($[M+Na]^+$): 1065,4480, encontrado 1065,4470.

Macrociclo (**27**)



$C_{44}H_{52}N_{10}O_9S$

[897,01]

5

Se añadió una solución acuosa 0,5 N de LiOH (2,5 ml, 0,13 mmol) a una solución del éster **26** (98 mg, 94 μ mol) en tetrahidrofurano/metanol/agua (4:1:2 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La suspensión se repartió entre HCl acuoso 0,1 N (5 ml) y diclorometano (10 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml) y las fases orgánicas se reunieron, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El ácido carboxílico resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

10

Se añadió ácido trifluoroacético (6,4 ml) gota a gota a una solución del ácido carboxílico en diclorometano (4,2 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La solución se concentró por evaporación junto con tolueno (3 x 5 ml) y la sal de amonio resultante se usó directamente en la etapa siguiente.

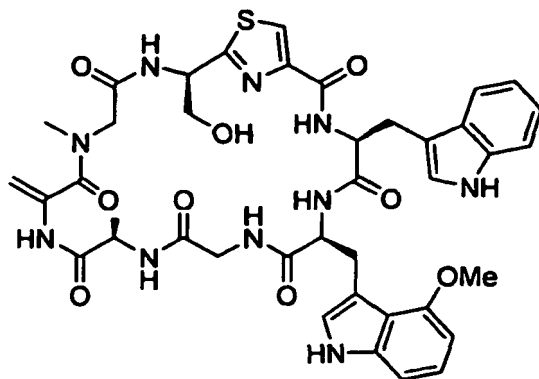
15

Se añadieron sucesivamente diisopropiletilamina (62 μ l, 0,37 mmol) y TBTU (60 mg, 0,19 mmol) a una solución del péptido lineal y 1-hidroxibenzotriazol (25 mg, 0,19 mmol) en diclorometano (145 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (diclorometano con 0,5 a 4% de metanol) dando el macrociclo **27** como un sólido pegajoso (36 mg, 40 μ mol, 43%).

20

EMAR (IEP) calculado para $C_{44}H_{52}N_{10}O_9S$ ($[M]^+$): 897,3718, encontrado 897,3719.

Argirina F (**3**)



$C_{40}H_{44}N_{10}O_8S$

[840,90]

25

Se añadió ácido trifluoroacético (0,5 ml) gota a gota a una solución del péptido cíclico **27** (5 mg, 5,6 μ mol, 1 eq.) en

CH₂Cl₂ (1 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 días. La solución se concentró por evaporación junto con tolueno (3 x 5 ml). El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂ con 0,5-10% de MeOH) dando Argirina F (**3**) como un sólido pegajoso (2,7 mg, 3 µmol, 58% de rendimiento).

5 **RMN de ¹H** (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,07 (dd, J = 17,5 y 5,17 Hz, 1 H), 1,40 (d, J = 7 Hz, 3 H), 2,85 (dd, J = 15,3 y 3,18 Hz, 1 H), 3,16 (s, 3 H), 3,31 (dd, J = 14,9 y 3,8 Hz, 1 H), 3,43 (d, J = 16,5, 1 H), 3,54 - 3,47 (m, 3 H), 4,09 - 4,03 (m, 1 H), 4,21 - 4,18 (m, 1 H), 4,33 - 4,24 (m, 3 H), 4,34 (s, 3 H), 4,49 - 4,44 (m, 1 H), 4,79 (d, J = 1,19 Hz, 1 H), 4,99 (d, J = 16,5 Hz, 1 H), 5,08 - 5,04 (m, 1 H), 5,09 (d, J = 1,6 Hz, 1 H), 5,38 (d, J = 7,95 Hz, 1 H), 5,55 - 5,50 (m, 1 H), 6,33 (t, J = 7,05 Hz, 1 H), 6,81 (d, J = 2,38 Hz, 1 H), 6,91 - 6,84 (m, 1 H), 6,92 (d, J = 4,37 Hz, 1 H), 7,05 (d, J = 8,15 Hz, 2 H), 7,35 - 7,28 (m, 2 H), 8,10 (s, 1 H), 8,33 (d, J = 1,99 Hz, 1 H), 8,36 (d, J = 8,74 Hz, 1 H), 8,54 (d, J = 7,35 Hz, 1 H), 8,77 (d, J = 1,59 Hz, 1 H), 9,72 (s, 1 H), 10,67 (s, 1 H) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 13,8, 14,2, 22,8, 26,9, 27,0, 37,8, 40,6, 48,7, 51,4, 51,5, 52,1, 56,2, 57,7, 64,0, 101,4, 101,4, 106,0, 106,7, 108,4, 111,4, 116,2, 117,4, 119,4, 121,4, 123,6, 123,7, 123,8, 125,3, 126,6, 129,7, 133,4, 134,7, 136,3, 138,4, 150,6, 152,4, 159,7, 167,2, 167,9, 168,5, 170,1 ppm.

15 **EMAR** (IEP) calculado para C₄₀H₄₄N₁₀O₉S ([M]⁺): 841,3092, encontrado 841,3087.

4. Nuevos derivados de argirina - ensayos funcionales

Cultivo de células y tejidos

20 Se cultivaron fibroblastos humanos primarios (HK1); HCT116 (cáncer de colon), MCF7 (cáncer de mama), CaCo (cáncer de colon), A549 (cáncer de pulmón), HeLa (cáncer de cuello de útero) y MEF inmortalizadas en DMEM suplementado con FCS al 5% y 2 mg/ml de penicilina/estreptomocina. Se cultivaron células SW480 (cáncer de colon) en medio MC de Coy suplementado con FCS al 5% y 2 mg/ml de penicilina/estreptomocina.

Anticuerpos, transferencia Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica

25 Se realizaron la tinción inmunohistoquímica de tejido tumoral de ratón, la transferencia Western y experimentos de inmunofluorescencia como se ha descrito previamente (Timmerbeul, I. et al. Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14009-14 (2006). Kossatz, U. et al. C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kipl. *Embo J* 25, 5159-70 (2006).). Se usaron los siguientes anticuerpos: p27 (n° catálogo K25020-150; Transduction Labs), p21 (N20; Santa Cruz), p53 (FL-393; Santa Cruz), NfκB (C-20; Santa Cruz), Bax (P-19; Santa Cruz), Alexa fluor 488 (n° A11001; Invitrogen), subunidad beta 2(Z) de proteasoma 20S (PW9300; Biomol, para células humanas), subunidad beta 2(Z) de proteasoma 20S (PW8145; BIO TREND, para células de ratón); subunidad beta 1(Y) de proteasoma 20S (PW8140; BIO TREND), subunidad beta 5 de proteasoma 20S (PW8895; BIO TREND); clon MEC 13.3 de anticuerpo PECAM (n° 550274; BD Pharmingen).

Ensayos MTT, Apoptosis, Citometría de flujo

35 Los ensayos MTT se realizaron como se ha descrito previamente (Sasse, F. et al. Argirins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo) 55, 543-51 (2002)). Se llevó a cabo la tinción TUNEL de secciones de tejido en secciones de 10 micrómetros que se desparafinaron y trataron como se recomienda por el fabricante. (Kit In Situ Cell Death Detection, Fluorescein; ROCHE, n° catálogo 11 684 795 910). El análisis de citometría de flujo de células cultivadas se realizó usando un citómetro de fluorescencia Becton Dickinson como se ha descrito previamente (Malek, N.P. et al. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kipl in G1 y S phase. *Nature* 413, 323-7 (2001)). El análisis de la distribución de células en el ciclo celular y la fracción sub-G1 se realizaron usando un programa Cell Quest. Se usó ELISA para fragmentos asociados a histona para determinar el número de células apoptóticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche n° 11 774425001).

Purificación del proteosoma, Ensayos de proteosoma

45 Se llevaron a cabo ensayos del proteosoma con proteosoma 20S purificado como se ha descrito previamente (Lightcap, E.S. et al. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 46, 673-83 (2000)) usando proteosoma 20S derivado de eritrocitos (Biomol International, LP PW8720) y sustratos fluorométricos Succ-LLVY-AMC, BZ-VGR-AMC y Z-LLe-AMC (Biomol International, LP PW9905) como sondas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La extracción de proteosoma de las células y secciones tumorales se realizó como se ha descrito previamente (Crawford, L.J. et al. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res* 66, 6379-86 (2006)). De forma resumida, se resuspenden células (MEF o MCF-7) u homogeneizado de muestras de tejido (secciones tumorales) en 1 ml de tampón de lisis ATP/DTT (10 mmol/l de Tris-HCl (pH7,8), 5 mmol/l de ATP, 0,5 mmol/l de DTT, 5 mmol/l de MgCl₂) y se incuba en hielo durante 10 minutos, seguido por tratamiento con ultrasonidos durante 15 segundos. Los lisados se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C, y los proteosomas que contenían el líquido sobrenadante resultante fueron estables a -80 °C con la adición de glicerol al 20% durante al menos 1 mes. La concentración de proteína de las muestras se midió usando

un ensayo de proteínas de Coomassie (Pierce, Rockford, IL).

5 Para la extracción del proteosoma de sangre completa, se descongelaron sedimentos celulares de sangre completa congelada y se lisaron en 2-3 volúmenes de sedimentos de tampón de lisis frío (EDTA 5 mM, pH 8,0). Los lisados se centrifugaron a 4 °C y el líquido sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se extrajeron 5 µl para la determinación de la concentración de proteína usando un ensayo de proteínas de Coomassie (Pierce, Rockford, IL).

10 Los ensayos de proteosoma usando proteosoma purificado de células o tejidos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 100 µl que contenía 20 µg de extracto de proteosoma, 50 mmol/l de EDTA y 60 µmol/l de sustrato fluorogénico (tipo quimiotripsina (CT-L), tipo tripsina (T-L) o tipo caspasa (C-L)) en tampón de lisis de ATP/DTT a 37 °C. El tampón de ensayo se suplementó con una concentración final de SDS al 0,05% para la evaluación de la actividad de tipo quimiotripsina y de la actividad de tipo caspasa. Se determinó la tasa de rotura de los sustratos peptídicos fluorogénicos controlando la fluorescencia de amonometilcumarina liberada usando un contador Víctor 1420 Multilabel (Wallac) a una longitud de onda de excitación de 395 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm durante un período de 60 min.

Cultivo de HMVEC, ensayo de formación de estructuras tubulares tipo capilar e inmunofluorescencia

15 Se aislaron células del endotelio microvascular primario (HMVEC) de prepucio humano. Las células se mantuvieron a 37 °C y 10% de CO₂ en EGM-2 MV de Cambrex que incluía el medio basal (EBM-2), FBS, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF, ácido ascórbico, hEGF, gentamicina y anfotericina. Se determinó el efecto de argirina A o bortezomib sobre la angiogénesis *in vitro* por ensayo de formación de estructuras tubulares tipo capilar en matrigel. Para examinar el efecto de los diferentes compuestos sobre la angiogénesis *in vitro*, se sembraron HMVEC en placas de cultivo de 96 pocillos previamente recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, nº 354248) y se expusieron a argirina A o bortezomib. Las redes incluidas de estructuras tubulares de tres campos elegidos al azar se valoraron al microscopio (Leica, Cambridge, Reino Unido). Se tomaron fotografías con una cámara Axio Vision 3.1 Zeiss y se puntuaron determinando la longitud del tubo y la formación de estructuras cerradas de tipo vasija.

Estudios de xenoinjertos

25 Se inyectaron 1×10^7 células SW480 o células HCT116 (en 100 microlitros de medio DMEM y 100 microlitros de matrigel) en los costados de ratones NMRI nu/nu. Los tumores crecieron durante aproximadamente 18 días hasta que alcanzaron el tamaño apropiado (200 mm³). El tamaño del tumor se midió con un calibre digital y se calculó con la ayuda de la siguiente fórmula: $(\text{Longitud} \times \text{anchura}^2) \times \pi/6$. Todos los experimentos se realizaron después de revisión y de acuerdo con los derechos de los animales y las agencias de protección de animales de Baja Sajonia, Alemania.

EM

35 Se fijaron pequeñas muestras de tumor en glutaraldehído al 2,5% (Polysciences, Warrenton, PA, USA) en cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,3 y se fijaron posteriormente con tetraóxido de osmio al 2% (Polysciences) en el mismo tampón. Después de deshidratar en alcoholes graduados, se embebieron en Epon (Serva, Heidelberg, Alemania). A continuación se examinaron las secciones teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo en un microscopio electrónico Philips EM 301. Las microfotografías electrónicas se seleccionaron, digitalizaron y procesaron usando Adobe Photoshop 6.0.

Efecto de los diferentes derivados de argirina

40 La tabla siguiente resumen los efectos de los derivados de argirina B y F sobre dos líneas de células de cáncer, H15 (carcinoma de cuello de útero) y SW-480 (cáncer de colon). Con el fin de valorar la eficacia, se usó un clon p27-GFP.

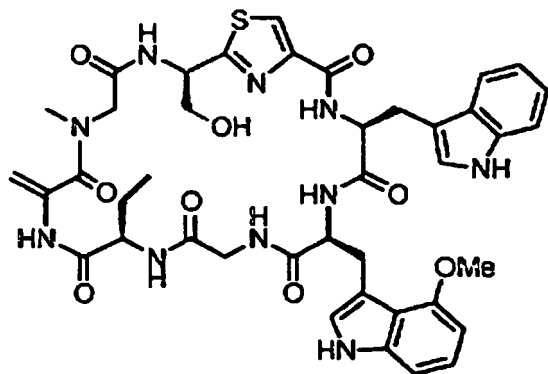
	Media de FSC-H	CIM (visual)**	CIM (visual)**	CI ₅₀ ***
	(Log)*	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
	clon H15 p27-GFP	H15	SW-480	SW-480
Argirina				
B	7,60	12	12	Aprox. 0,05
F	11,24	0,5	0,2	0,05

*La fluorescencia GFP se determinó por FACS después de una incubación de 24 horas del clon H15 GFP-p27 (línea de células HeLa; carcinoma de cuello de útero) con los diferentes derivados de argirina (500 ng/ml).

**Concentración mínima de una dilución en serie que presenta un efecto visual.

***Inhibición semimáxima de la proliferación de SW-480 (línea de células de cáncer de color; análisis después de un ensayo MTT). Se puede apreciar que tanto argirina B como F son eficaces.

Se han preparado los siguientes derivados:

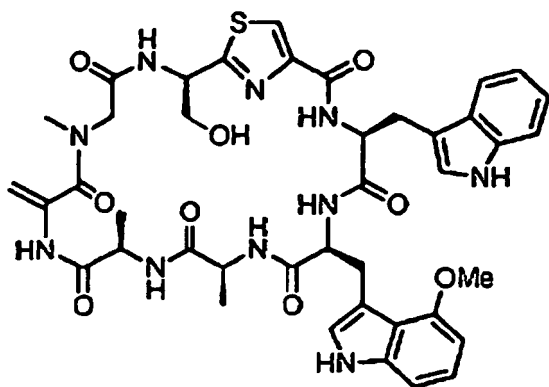


Argirina B/F (30)

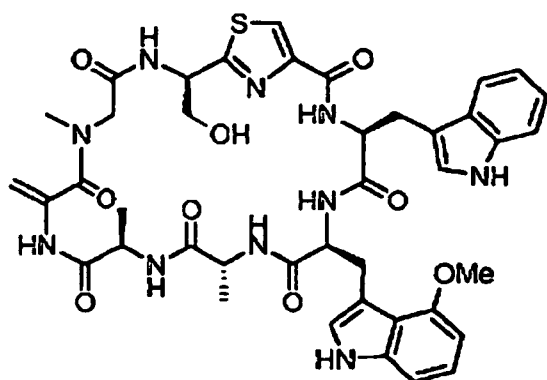
- 5 Este derivado es un "híbrido" de las estructuras de argirina B y F (para un ejemplo de la síntesis véase anteriormente), y por tanto es de esperar que comparta las características farmacéuticas con el grupo de argirinas, incluyendo un efecto terapéutico sobre estados patológicos, tales como la inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas tales como cánceres.

Otros experimentos preliminares indican que, por otro lado, las propiedades farmacocinéticas de las argirinas se pueden modificar eligiendo un derivado de argirina que presente las configuraciones que se indican a continuación.

- 10 Es de esperar que una estabilización de la conformación global de la molécula también mejore la biodisponibilidad de la molécula para el paciente que se va a tratar.



Argirina Ala beta



Argirina Ala alfa

Purificación de proteosoma, ensayos de proteosoma

Los ensayos de proteosoma con proteosoma 20S purificado se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Lightcap et al., 2000) usando proteosoma 20S derivado de eritrocitos (Biomol International, n° LP PW8720) y sustratos fluorométricos Succ-LLVY-AMC, BZ-VGR-AMC y Z-Lle-AMC (Biomol International, LP PW9905). La extracción del proteosoma de células y secciones tumorales se realizó como se ha descrito previamente (Crawford et al., 2006). Para la extracción de proteosoma de sangre completa, se descongelaron sedimentos de células de sangre completa congeladas y se lisaron en 2-3 volúmenes de sedimentos de tampón de lisis frío (EDTA 5 mM, pH 8,0). Los lisados se centrifugaron a 4 °C y el líquido sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se extrajeron 5 µl para la determinación de la concentración de proteína usando un ensayo de proteínas de Coomassie (Pierce, Rockford, IL). Los ensayos de proteosoma usando proteosoma purificado de células o tejidos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 100 µl que contenía 20 µg de extracto de proteosoma, 50 mmol/l de EDTA y 60 µmol/l de sustrato fluorogénico (tipo quimi tripsina (CT-L), tipo tripsina (T-L) o tipo caspasa (C-L)) en tampón de lisis de ATP/DTT a 37 °C. El tampón de ensayo se suplementó con una concentración final de SDS al 0,05% para la evaluación de la actividad de tipo quimi tripsina y de la actividad de tipo caspasa. Se determinó la tasa de rotura de los sustratos peptídicos fluorogénicos controlando la fluorescencia de amonometilcumarina liberada usando un contador Victor 1420 Multilabel (Wallac) a una longitud de onda de excitación de 395 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm durante un periodo de 60 min.

Ensayo de apoptosis

La fragmentación de ADN asociado con histona se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche n° 11 774425001).

Se obtuvieron los siguientes resultados con los compuestos indicados:

Ensayo de Proteosoma 20S (manual):					
Sustancia	Placa	Sustrato	Solución madre usada µg/ml	Conc. en ensayo µmol/l	Activ. relativa en % después de 20 min.
Argirina F	019	tipo quimi tripsina	1000	200	15
Argirina ala beta		tipo quimi tripsina	1000	100	8
Argirina ala alfa		tipo quimi tripsina	1000	100	17
Sustancia	Placa	Sustrato	Solución madre usada µg/ml	Conc. en ensayo µmol/l	Activ. relativa en % después de 20 min.
Argirina F	020	tipo tripsina	1000	200	32
Argirina ala beta		tipo tripsina	1000	100	26
Argirina ala alfa		tipo tripsina	1000	100	72
Sustancia	Placa	Sustrato	Solución madre usada µg/ml	Conc. en ensayo µmol/l	Activ. relativa en % después de 20 min.
Argirina F	021	tipo caspasa	1000	200	17

ES 2 391 220 T3

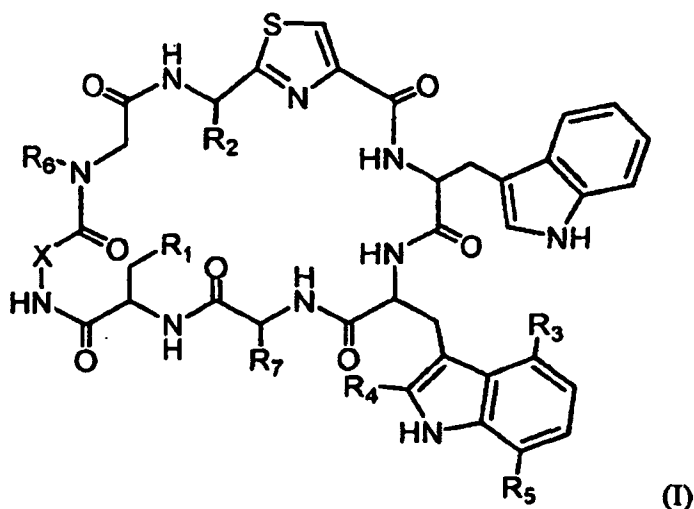
Argirina ala beta		tipo caspasa	1000	100	7
Argirina ala alfa		tipo caspasa	1000	100	11

Se puede apreciar que los derivados preferidos Argirina ala alfa y en particular Argirina ala beta tienen mayores actividades que Argirina F. Así, tanto las porciones modificadas como las conformaciones desempeñan un papel fundamental para la actividad de estos compuestos y las argirinas en general.

5

REIVINDICACIONES

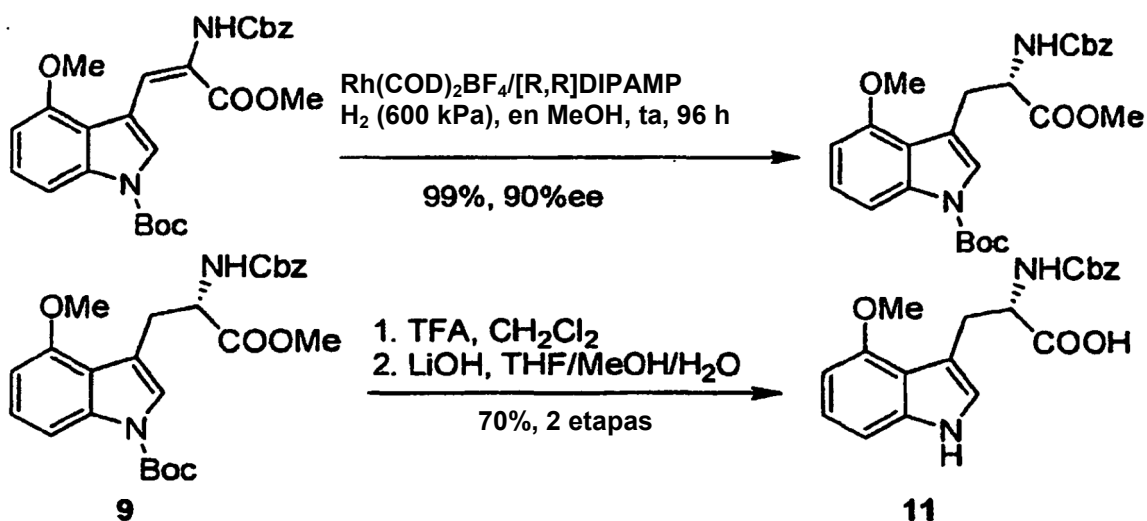
1. Un procedimiento de producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la fórmula general (I) siguiente



en la que

- 5 R^1 y R^2 son de forma independiente hidrógeno, alquilo C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con OH o alcoxi C₁-C₄;
- R^3 es metoxi
- R^4 es hidrógeno
- R^5 es hidrógeno
- 10 R^6 es hidrógeno o alquilo C₁-C₄;
- R^7 es hidrógeno o alquilo C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con OH o alcoxi C₁-C₄; y
- X es C=CH₂ o CHR⁸, en el que R⁸ es alquilo C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con -S-alquilo C₁-C₄,

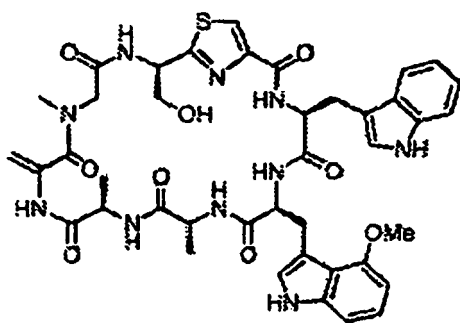
y los estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que comprende la síntesis de 4-metoxi-L-triptófano, opcionalmente protegido, en el que dicho 4-metoxi-L-triptófano opcionalmente protegido se produce por medio de una ruta de hidrogenación catalítica estereoselectiva, que comprende las etapas de acuerdo con el esquema siguiente



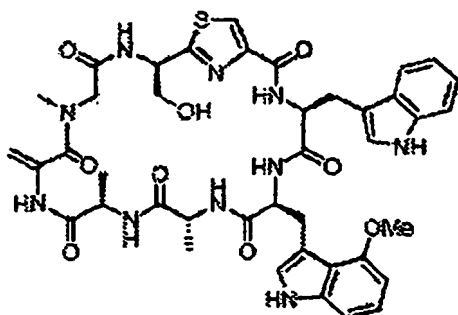
2. El procedimiento de producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

una etapa final de desprotección ácida del grupo protector t-butilo (tBu) que es requerida para argirina, y en particular argirina F.

3. El procedimiento de producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho compuesto macrociclo a preparar se selecciona de una argirina, tal como argirina A-F, B/F, y Ala-alfa y Ala-beta, y los estereoisómeros aislados de las mismas.
4. El procedimiento de producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la síntesis se lleva a cabo sin el uso de enzimas.
5. El procedimiento de producción de un compuesto macrociclo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la síntesis comprende síntesis de péptidos en fase sólida.
6. Un compuesto macrociclo que está seleccionado de las siguientes fórmulas:



Argirina Ala beta,



Argirina Ala alfa,

y estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto macrociclo de acuerdo con la reivindicación 6, junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. El compuesto macrociclo de acuerdo con la reivindicación 6 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para el tratamiento de estados patológicos y enfermedades en un sujeto, en el que dicha enfermedad o afección está seleccionado preferentemente de inducción de tolerancia inmunitaria, enfermedades autoinmunitarias, infecciones bacterianas y enfermedades proliferativas, tales como psoriasis o cánceres, tal como cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, mieloma, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de pulmón y cáncer de colon.

Figura 1

a

		Tratamiento con argirina				CI ₅₀
		-	+	-	+	
detención de G1	Línea celular	% G1		% Sub-G1		
	Fibroblasto humano	68	99	0	0	n. d.
	HCT116 (cáncer colon)	66	96	0	0	2,7 nmol
	A 549 (cáncer pulmón)	55	77	0	0	1,1 nmol
	CaCo (cáncer colon)	45	43	5	50	5,6 nmol
apoptosis	MCF7 (cáncer mama)	56	45	4	40	0,7 nmol
	SW 480 (cáncer colon)	59	0	0	95	4,1 nmol
	HeLa (cáncer cuello útero)	63	51	0	49	22,6 nmol

b

