

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 693**

51 Int. Cl.:

C07K 5/02 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 08758446 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2148886**

54 Título: **Derivados de tubulisina**

30 Prioridad:

10.05.2007 US 928781 P

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

29.05.2014

73 Titular/es:

**R & D BIOPHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)
AM KLOPFERSPITZ 19
82152 MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

RICHTER, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 463 693 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).

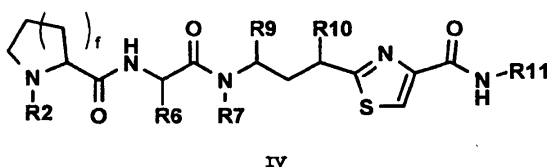
DESCRIPCIÓN

Derivados de tubulisina

5 La presente invención se refiere a nuevas moléculas citotóxicas y a su uso para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevas moléculas citotóxicas con una actividad muy potente contra líneas celulares de cáncer y propiedades físico-químicas ajustables, en particular la solubilidad en comparación con productos naturales citotóxicos tal como se describe, por ejemplo, en [documento W09813375; A. Dömling, W. Richter, Mol. Diversity 2005, 9, 141-147]. Además de ello, se proporcionan derivados que son los más adecuados para las estrategias selectivas y de conjugación para mejorar la selectividad de las moléculas citotóxicas y la ventana terapéutica de compuestos citotóxicos.

15 La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (IV):

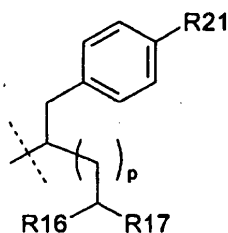


en donde R² es alquilo C₁-C₄, R⁶ es alquilo C₁-C₆, R⁷ es alquilo C₁-C₆, CH₂OR¹⁹ o CH₂OCOR²⁰, en donde R¹⁹ es alquilo, especialmente isopropilo, R²⁰ es alqueno C₂-C₆, fenilo o CH₂-fenilo, R⁹ es alquilo C₁-C₆, R¹⁰ es H, OH, O-alquilo u O-acetilo y f es 1 ó

2; y

en donde

R¹¹ tiene la siguiente estructura:



25 en donde R²¹ es H, OH, halógeno, NH₂, alquiloxi, fenilo, alquil-amino o dialquil-amino; R¹⁶ es H o un grupo alquilo C₁-C₆; R¹⁷ es CO₂H, CO₂R¹⁸, CONHNH₂, OH, NH₂, SH o un grupo alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, en donde R¹⁸ es un grupo alquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; y

p es 0, 1, 2 ó 3;

30 o una sal farmacológicamente aceptable, un solvato, un hidrato o una formulación farmacológicamente aceptable del mismo.

El término alquilo o alk se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, que contiene de uno a veinte átomos de carbono, preferiblemente de uno a doce átomos de carbono, de la manera más preferida de uno a seis átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, sec.-butilo, terc.-butilo, n-pentilo, 2,2-dimetilpropilo, 2-metilbutilo, n-hexilo, 2,2-dimetilbutilo o 2,3-dimetilbutilo.

Los términos alqueno y alquino se refieren a un grupo hidrocarbonado, al menos parcialmente insaturado, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, que contiene de dos a veinte átomos de carbono, preferiblemente de dos a doce átomos de carbono, de la manera más preferida de dos a seis átomos de carbono, por ejemplo etenilo, alilo, acetilenilo, propargilo, isoprenilo o hex-2-enilo. Preferentemente, los grupos alqueno contienen uno o dos, lo más preferido un doble enlace, y los grupos alquino contienen uno o dos, lo más preferido un triple enlace.

Opcionalmente los términos alquilo, alqueno y/o alquino se refieren a grupos en los que uno o varios, preferentemente uno, dos o tres átomos de hidrógeno están reemplazados por un átomo de halógeno, preferentemente flúor o cloro, o un grupo 2,2,2-tricloroetilo, o un grupo trifluorometilo.

El término heteroalquilo se refiere a un grupo alquilo, alqueno o alquino, en donde uno o más, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono están reemplazados por un átomo de O, N, P, B, Se, Si o S, preferentemente O, S o N. El término heteroalquilo se refiere también a un ácido carboxílico o un grupo derivado del mismo, por ejemplo acilo (alquil-CO), acilalquilo, alcocarbonilo, aciloxi, aciloxialquilo, carboxialquilamida o alcocarboniloxi.

Ejemplos de grupos heteroalquilo son grupos de la fórmula R^a-O-Y^a , R^a-S-Y^a , $R^a-N(R^b)-Y^a$, R^a-CO-Y^a , $R^a-O-CO-Y^a$, $R^a-CO-O-Y^a$, $R^a-CO-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CO-Y^a$, $R^a-O-CO-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CO-O-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CO-N(R^c)-Y^a$, $R^a-O-CO-O-Y^a$, $R^a-N(R^b)-C(=NR^d)-N(R^c)-Y^a$, R^a-CS-Y^a , $R^a-O-CS-Y^a$, $R^a-CS-O-Y^a$, $R^a-CS-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CS-Y^a$, $R^a-O-CS-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CS-O-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CS-N(R^c)-Y^a$, $R^a-O-CS-O-Y^a$, $R^a-S-CO-Y^a$, $R^a-CO-S-Y^a$, $R^a-S-CO-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CO-S-Y^a$, $R^a-S-CO-O-Y^a$, $R^a-O-CO-S-Y^a$, $R^a-S-CO-S-Y^a$, $R^a-S-CS-Y^a$, $R^a-CS-S-Y^a$, $R^a-S-CS-N(R^b)-Y^a$, $R^a-N(R^b)-CS-S-Y^a$, $R^a-S-CS-O-Y^a$, $R^a-O-CS-S-Y^a$, en donde R^a se refiere a un H, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_2-C_6 o un grupo alquino C_2-C_6 ; en donde R^b se refiere a un H, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_2-C_6 o un grupo alquino C_2-C_6 ; en donde R^c se refiere a un H, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_2-C_6 o un grupo alquino C_2-C_6 ; en donde R^d se refiere a un H, un grupo alquilo C_1-C_6 , un grupo alqueno C_2-C_6 o un grupo alquino C_2-C_6 ; e Y^a se refiere a un enlace directo, un grupo alqueno C_1-C_6 , un grupo alqueno C_2-C_6 o un grupo alquino C_2-C_6 , en donde cada uno de los grupos heteroalquilo puede estar reemplazado por un átomo de carbono, y uno o varios átomos de hidrógeno pueden estar reemplazados por átomos de flúor o cloro. Ejemplos de grupos heteroalquilo son metoxi, trifluorometoxi, etoxi, n-propiloxi, iso-propiloxi, terc.-butiloxi, metoximetilo, etoximetilo, metoxietilo, metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, isopropilamino, metil-aminometilo, etilaminometilo, diisopropilamino, enoléter, dimetilaminometilo, dimetilamino, acetilo, propionilo, butiriloxi, acetiloxi, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, N-etil-N-metilcarbamoilo o N-metilcarbamoilo. Otros ejemplos de grupos heteroalquilo son grupos nitrilo, isonitrilo, cianato, tiocianato, isocianato, isotiocianato y alquilnitrilo.

El término cicloalquilo se refiere a un grupo cíclico saturado o parcialmente insaturado (p. ej., cicloalqueno) opcionalmente sustituido, que comprende uno o varios anillos, preferentemente uno o dos anillos, que contiene de tres a catorce átomos de carbono en el anillo, preferentemente tres a diez, preferentemente tres, cuatro, cinco, seis o siete átomos de carbono en el anillo. Además de ello, el término cicloalquilo se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por F, Cl, Br, I, OH, =O, SH, =S, NH₂, =NH o NO₂, o cetonas cíclicas, por ejemplo ciclohexanona, 2-ciclohexanona o ciclohexanona. Ejemplos de grupos cicloalquilo son un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexenilo, espiro[4,5]-decanilo, norbornilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, decalinilo, cubanilo, biciclo[4.3.0]nonilo, tetralina, ciclohexilciclohexilo, fluorociclohexilo o ciclohex-2-enilo. El término heterocicloalquilo se refiere a un cicloalquilo tal como se define anteriormente, en donde uno o varios, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono del anillo están reemplazados por un O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S o N. Preferentemente, un grupo heterocicloalquilo está compuesto por uno o dos anillos que comprenden tres a diez, preferentemente tres, cuatro, cinco, seis o siete átomos en el anillo. Además de ello, el término heterocicloalquilo se refiere a grupos en los que uno o varios átomos de hidrógeno están reemplazados por F, Cl, Br, I, OH, =O, SH, =S, NH₂ o NO₂. Ejemplos de heterocicloalquilo son grupos piperidilo, morfolinilo, urotropinilo, pirrolidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidropirano, tetrahydro-furilo, oxaciclopropilo, azaciclopropilo o 2-pirazolinilo, así como lactamas, lactonas, imidas cíclicas y anhídridos cíclicos.

El término alquilocicloalquilo se refiere a grupos que contienen cicloalquilo, así como grupos alquilo, alqueno o alquino de acuerdo con la definición anterior, p. ej., grupos alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquilocicloalquilo y alquilocicloalquilo. Preferentemente, un grupo alquilocicloalquilo está compuesto de un grupo cicloalquilo, que comprende uno o más anillos, que comprenden tres a diez, preferentemente tres, cuatro, cinco, seis o siete átomos de carbono y uno o dos grupos alquilo, alqueno o alquino con uno o dos a seis átomos de carbono.

El término heteroalquilocicloalquilo se refiere a grupos alquilocicloalquilo de acuerdo con la definición anterior, en el que uno o varios, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono están reemplazados por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S o N. Preferentemente, se compone de uno o dos sistemas de anillo con tres a diez, preferentemente tres, cuatro, cinco, seis o siete átomos del anillo y uno o dos grupos alquilo, alqueno, alquino o heteroalquilo con uno o dos a seis átomos de carbono. Ejemplos de un grupo de este tipo son alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo y heteroalquilocicloalqueno, en donde el grupo cíclico está saturado o parcialmente (una vez, dos tres veces) insaturado.

El término arilo o ar se refiere a un grupo aromático opcionalmente sustituido, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de seis a catorce átomos de carbono, preferentemente de seis a diez, preferentemente seis átomos de carbono. El término arilo o ar también puede referirse a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H están sustituidos con F, Cl, Br o I, u OH, SH, NH₂ o NO₂. Ejemplos son fenil-, naftil-, bifenil-, 2-fluorofenilo, anilil-, 3-nitrofenilo o 4-hidroxi-fenilo.

5 El término heteroarilo se refiere a un grupo aromático compuesto de uno o varios anillos, que comprende cinco a catorce átomos del anillo, preferentemente cinco a diez, de los cuales uno o varios, preferentemente uno, dos, tres o cuatro son átomos del anillo de O, N, P o S, preferentemente O, S o N. El término heteroarilo también puede referirse a grupos, en donde uno o varios átomos de H están reemplazados por F, Cl, Br o I, u OH, SH, NH₂ o NO₂. Ejemplos son 4-piridilo, 2-imidazolilo, 3-fenilpirrolilo, tiazolilo, oxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, indazolilo, indolilo, bencimidazolilo, piridazinilo, quinolinilo, purinilo, carbazolilo, acridinilo, pirimidilo, 2,3'-bifurilo, 3-pirazolilo e isoquinolinilo.

10 El término aralquilo se refiere a grupos compuestos de arilo y alquilo, alquenilo, alquinilo y/o cicloalquilo, p. ej., arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, arilcicloalquilo, arilcicloalquenilo, alquilarilcicloalquilo y alquilarilcicloalquenilo. Ejemplos de aralquilos son tolueno, xileno, mesitileno, estireno, cloruro de bencilo, o-fluorotolueno, 1H-indeno, tetralina, dihidronaftalina, indanona, fenilciclopentilo, cumol, ciclohexilfenilo, fluoreno e indano. Preferentemente, un grupo aralquilo está compuesto de uno o dos anillos aromáticos, que comprenden seis a diez átomos de carbono en el anillo y uno o dos alquilos, alquenilos y/o alquinilos que comprenden uno o dos a seis átomos de carbono y/o un cicloalquilo que comprende cinco o seis átomos de carbono en el anillo.

15 El término heteroaralquilo se refiere a un grupo aralquilo tal como se define anteriormente, en donde uno o varios, preferentemente uno, dos, tres o cuatro átomos de carbono están reemplazados por O, N, Si, Se, P, B o S, preferentemente O, N o S, y a grupos que contienen arilo, heteroarilo y alquilo, alquenilo, alquinilo y/o heteroaralquilo y/o cicloalquilo y/o heterocicloalquilo.

20 Preferentemente un grupo heteroaralquilo está compuesto de uno o dos sistemas de anillo aromáticos que comprende cinco o seis a diez átomos de carbono y uno o dos alquilos, alquenilos y/o alquinilos que comprenden uno o dos a seis átomos de carbono y/o un cicloalquilo que comprende cinco o seis átomos de carbono del anillo, en donde uno, dos, tres o cuatro átomos de carbono pueden estar reemplazados por O, N o S.

25 Ejemplos son arilheteroaralquilo, arilheterocicloalquilo, arilheterocicloalquenilo, arilalquilheterocicloalquilo, arilalquenilheterocicloalquilo, arilalquinilheterocicloalquilo, arilalquilheterocicloalquenilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heteroarilheteroaralquilo, heteroarilcicloalquilo, heteroarilcicloalquenilo, heteroarilheterocicloalquilo, heteroarilheterocicloalquenilo, heteroarilalquilcicloalquilo, heteroarilalquilheterocicloalquenilo, heteroarilheteroaralquilcicloalquilo, heteroarilheteroaralquilcicloalquenilo y heteroarilheteroaralquil-heterocicloalquilo, en donde los grupos cíclicos pueden estar saturados o una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces insaturados. Ejemplos son tetrahidroisoquinolinilo, benzoilo, 2- o 3-etil-indolilo, 4-metilpiridino, 2-, 3- o 4-metoxifenilo, 4-etoxifenilo, 2-, 3- o 4-carboxifenilalquilo.

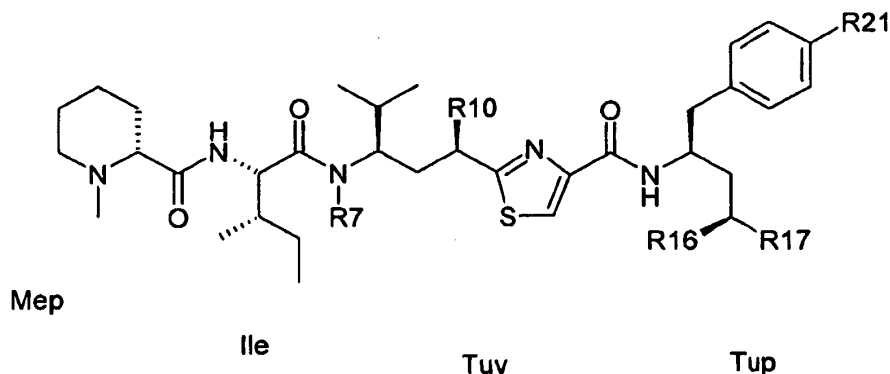
30 Los términos cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquilcicloalquilo, heteroaralquilcicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo y heteroaralquilo se refieren también a grupos, en donde uno o varios átomos de H están reemplazados por F, Cl, Br o I, u OH, SH, NH₂, NO₂.

35 La expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a grupos, en donde uno o varios átomos de H pueden estar reemplazados por F, Cl, Br o I, u OH, SH, NH₂, NO₂. Esta expresión se refiere, además, a grupos que pueden estar sustituidos exclusiva o adicionalmente con alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, heteroaralquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₂-C₉, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo C₁-C₉, aralquilo C₇-C₁₂ o heteroaralquilo C₂-C₁₁ no sustituido.

40 Los grupos protectores son conocidos por una persona experta en la técnica y se describen en P. J. Kocienski, Protecting Groups, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994 y en T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999. Grupos protectores de amino comunes son, p. ej., *t*-butiloxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz, Z), bencilo (Bn), benzoilo (Bz), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), aliloxicarbonilo (Alloc), tricloroetiloxicarbonilo (Troc), acetilo o trifluoroacetilo.

45 Compuestos de Fórmula (IV) pueden comprender varios centros quirales dependiendo de su patrón de sustitución. La presente invención se refiere a todos los enantioisómeros y diastereoisómeros definidos, así como a sus mezclas en todas las relaciones. Además de ello, la presente invención se refiere a todos los isómeros cis/trans de compuestos de la Fórmula general (IV), así como a sus mezclas. Además de ello, la presente invención se refiere a todas las formas tautómeras de los compuestos de la Fórmula general (IV).

50 Especialmente preferidos son los compuestos de la siguiente fórmula:



- 5 en donde: R^1 = alquilo C_1 - C_6 , especialmente CH_3 , etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, n-pentilo, n-hexilo, $CH_2OCH_2CH(CH_3)_2$, CH_2OCOCH_2Ph o CH_2OCOPh R^{10} = H, OH, OAc
 R^{16} = CH_3 , H
 R^{17} = $COOH$, $CONHNH_2$, OH, NH_2 , CH_2OH , CH_2NH_2 , CH_2SH
 R^{21} = H, F, OH, OMe, Ph

- 10 Ejemplos de sales farmacológicamente aceptables de compuestos de Fórmula (IV) son ácidos minerales fisiológicamente aceptables, p. ej. ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o sales de ácidos orgánicos, p. ej. ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido salicílico. Compuestos de Fórmula (IV) pueden estar solvatados, especialmente hidratados. La hidratación puede ocurrir durante el proceso de síntesis o puede ser una consecuencia de la naturaleza higroscópica del compuesto originalmente deshidratado de Fórmula (IV). Compuestos de Fórmula (IV),
 15 que contienen átomos de carbono asimétricos pueden existir como mezclas de diastereoisómeros, en forma de mezclas de enantiómeros o como compuestos ópticamente puros.

- 20 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención está compuesto de al menos un compuesto de Fórmula (IV) y, opcionalmente, soportes y/o adyuvantes.

- También se describen profármacos y éstos se componen de un compuesto de Fórmula (IV) y al menos un grupo protector farmacológicamente aceptable, que se escinde bajo condiciones fisiológicas, p. ej. alcoxi, aralquilo, acilo o aciloxi, más precisamente etoxi, benciloxi, acetilo o acetiloxi.

- 25 Además de ello, la presente descripción se refiere a conjugados que comprenden al menos un compuesto de Fórmula (IV) y una molécula biológica, p. ej. oligosacáridos y polisacáridos, anticuerpo monoclonal, lectina, PSA (antígeno específico de la próstata) o vectores peptídicos, hormonas (somatostatina), vitaminas (p. ej. ácido fólico y sus análogos), lípidos o un polímero sintético y, si es necesario, también un enlazador adecuado, respectivamente. La expresión enlazador se refiere a un grupo químico que une los compuestos de Fórmula (IV) con una macro-molécula biológica de este tipo. Ejemplos de enlazadores son enlazadores alquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, aralquilo o heteroaralquilo.

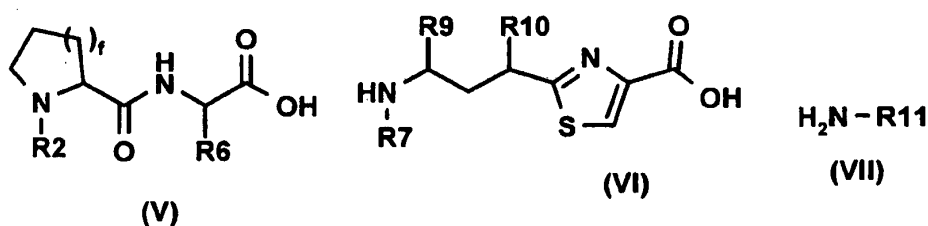
- 35 El uso terapéutico de compuestos de Fórmula (IV), sus sales y/o solvatos e hidratos aceptables farmacológicos, así como las correspondientes formulaciones y composiciones farmacológicas son también objeto de la presente invención.

- 40 El uso de los agentes activos para la preparación de fármacos para el tratamiento de cáncer también es objeto de la presente invención. Además de ello, los presentes compuestos son de interés para la prevención y/o el tratamiento de la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas (p. ej. diabetes de tipo I), enfermedades autoinmunes, enfermedades de los ojos, p. ej. AMD (siglas inglesas de "enfermedad macular relacionada con la edad") o retinopatía diabética, otras enfermedades tumorales, así como para el tratamiento en superficie (impregnación) de implantes de plástico y de metal, p. ej. stents. En general, compuestos de Fórmula (IV) se pueden administrar en forma de un tratamiento único o como tratamientos múltiples, ya sea solo o en combinación con una sustancia terapéutica arbitraria de acuerdo con modos conocidos y aceptados, o en forma de un tratamiento continuo, en el que el principio activo puede ser embebido en una matriz tal como, p. ej., un hidrogel implantable. Composiciones de acuerdo con la
 45 invención se pueden administrar en una de las siguientes formas: por vía oral, incluyendo grageas, comprimidos

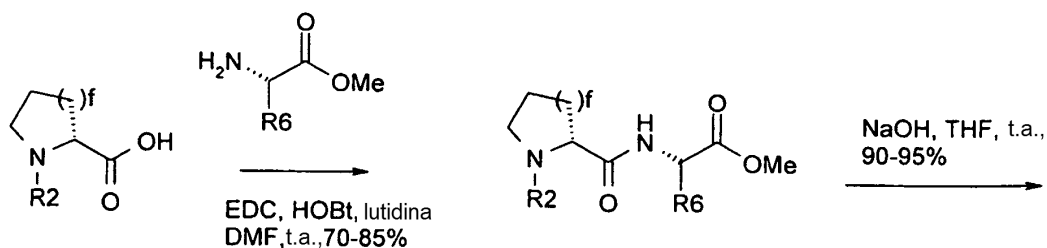
recubiertos, píldoras, productos semi-sólidos, cápsulas blandas o duras, disoluciones, emulsiones o suspensiones; parenteral, incluyendo disoluciones inyectables; rectal en forma de supositorios; por inhalación, incluida la formulación en polvo o como un spray, transdérmica o intranasal. Para la producción de tales comprimidos, píldoras, productos semi-sólidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura, el producto utilizado terapéuticamente se mezcla con soportes inorgánicos u orgánicos farmacológicamente inertes, p. ej. con lactosa, sacarosa, glucosa, gelatina, malta, gel de sílice, almidón o derivados de los mismos, talco, ácido esteárico o sus sales, leche desnatada en polvo y similares. Para la producción de cápsulas blandas se pueden utilizar soportes tales como aceites vegetales, petróleo, aceites animales o sintéticos, cera, grasas, polioles. Para la producción de disoluciones líquidas y jarabes se pueden utilizar soportes, por ejemplo agua, alcoholes, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, polioles, glicerol, aceites vegetales, petróleo, aceites animales o sintéticos. Para la producción de supositorios se pueden utilizar excipientes tales como, p. ej., aceites vegetales, del petróleo, animales o sintéticos, cera, grasa y polioles. Para formulaciones en aerosol se pueden utilizar gases comprimidos adecuados para su propósito tales como, p. ej., oxígeno, nitrógeno, gas noble y dióxido de carbono. Los agentes farmacéuticamente útiles pueden contener también aditivos para la conservación, estabilización, p. ej., estabilizador UV, emulsionante, edulcorante, aromatizante, sales para cambiar la presión osmótica, tampones, aditivos de revestimiento y antioxidantes.

Combinaciones con otros agentes terapéuticos pueden incluir agentes adicionales, que comúnmente se utilizan para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente, especialmente cáncer.

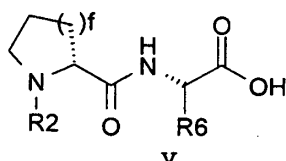
Los compuestos de Fórmulas (V), (VI) y (VII), opcionalmente provistos de grupos protectores adecuados, se producen como bloques de construcción para la producción de compuestos de Fórmula (IV) y ejemplos de referencia. Éstos pueden ser unidos a través de métodos de acoplamiento de los péptidos utilizando reactivos de acoplamiento conocidos, p. ej. hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropilcarbodiimida (DIC) o diciclohexilcarbodiimida (DCC). A menos que se defina de otro modo, todos los residuos se definen como anteriormente en esta memoria.



El bloque de construcción (V) se puede producir a través de acoplamiento de péptidos de aminoácidos comercialmente disponibles y conocidos.

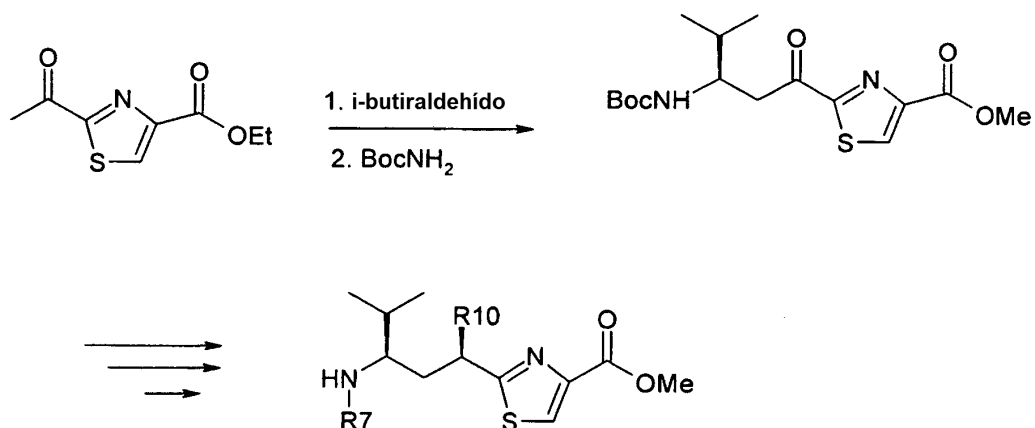


Especialmente:
 f = 1,2
 R² = Me, Et, Ph
 R⁶ = isopropilo, etilo, ciclopropilo, (R)-CH(CH₃)CH₂CH₃, (S)-CH(CH₃)CH₂CH₃, Ph



Los compuestos de fórmulas (VI) y (VII) se pueden preparar de una manera conocida para una persona experta en la técnica, compárese, por ejemplo también descrito en parte en la bibliografía (D. Neri, G. Fossati, M. Zanda, ChemMedChem **2006**, 1, 175-180; A. Dömling et al., Angew Chem. Int. Ed. **2006**, 45, 7235-7239; H. M. Peltier et al., J. Am. Chem. Soc. 128, 16018-16019, **2006**);

5

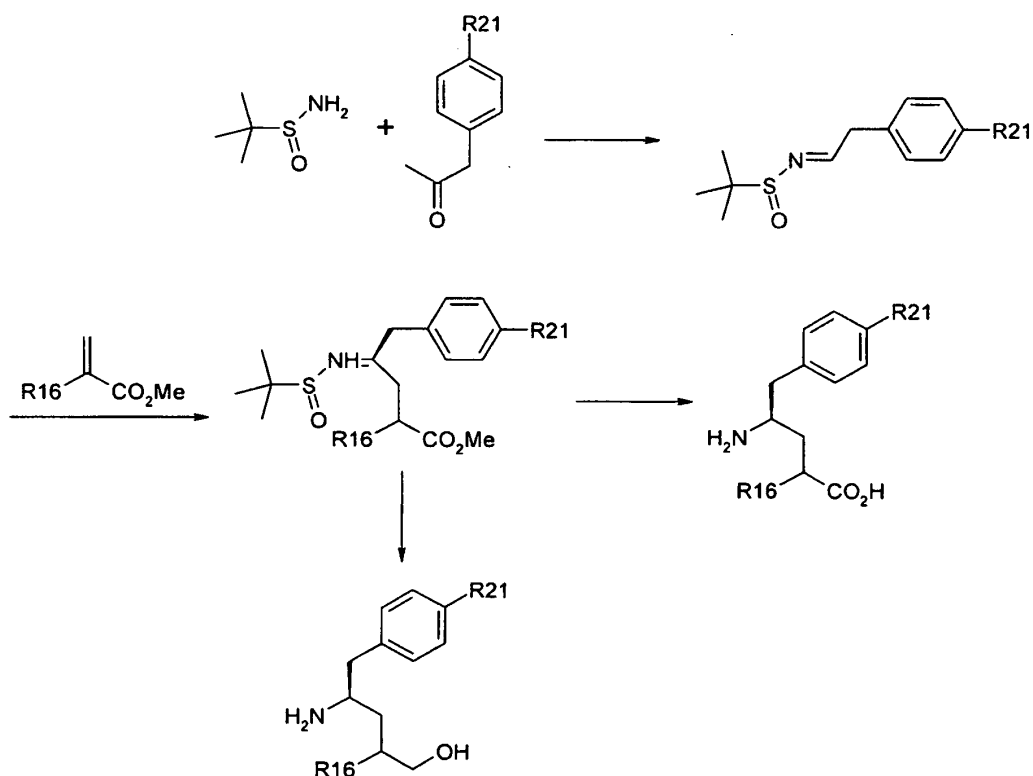


Especialmente:

R⁷ = CH₃, etilo, propilo, isopropilo, n-pentilo, n-hexilo, CH₂OCOCH₂CH(CH₃)₂, CH₂OCOCH₂CH₃, CH₂OCOCH₂CH₂CH₃, CH₂Ph, CH₂OCH₂CH(CH₃)₂, CH₂OCOCH₂Ph o CH₂OCOPh

R¹⁰ = H, OH, Oac

10



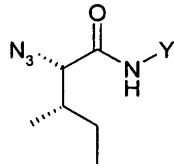
Especialmente:

R¹⁶ = CH₃, H, Ph

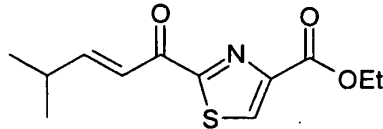
R²¹ = H, F, OH, OMe, Ph, ciclohexilo

15

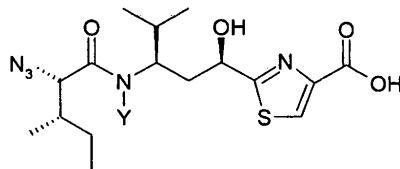
Especialmente, se pueden utilizar los siguientes bloques de construcción para la preparación de compuestos de acuerdo con la presente invención.



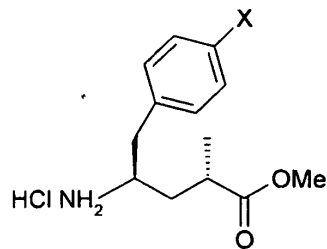
Y se define como R⁷ anteriormente.



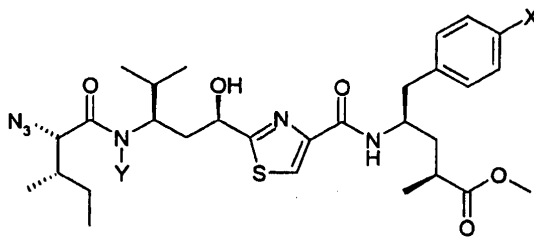
5



Y se define como R⁷ anteriormente.



10 X se define como R²¹ anteriormente.



X se define como R²¹ anteriormente.

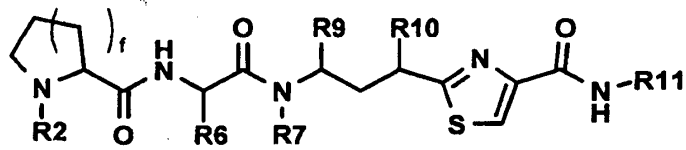
Y se define como R⁷ anteriormente.

15

Ejemplos y ejemplos de referencia

De acuerdo con los procesos de síntesis descritos en esta memoria de los bloques de construcción, se sintetizaron los siguientes derivados de acuerdo con los métodos de acoplamiento de péptidos habituales conocidos para un experto en la técnica:

20



Los siguientes residuos, cuando se utilicen:

f = 1, 2;

R² = metilo, etilo;

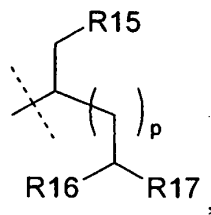
5 R⁶ = isopropilo, etilo, ciclopropilo, (R)-CH(CH₃)CH₂CH₃, (S)-CH(CH₃)CH₂CH₃;

R⁷ = metilo, etilo, propilo, isobutilo, CH₂OCOPh;

R⁹ = isopropilo, trifluorometilo, clorometilo, isobutilo, etilo, ciclopropilo, CH₂-ciclopropilo, CH(CH₃)CH₂CH₃, ciclopentilo, ciclohexilo;

R¹⁰ = H, OH, OAc

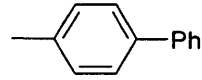
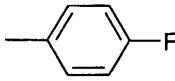
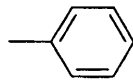
10 R¹¹ =



en donde

p = 1, 2;

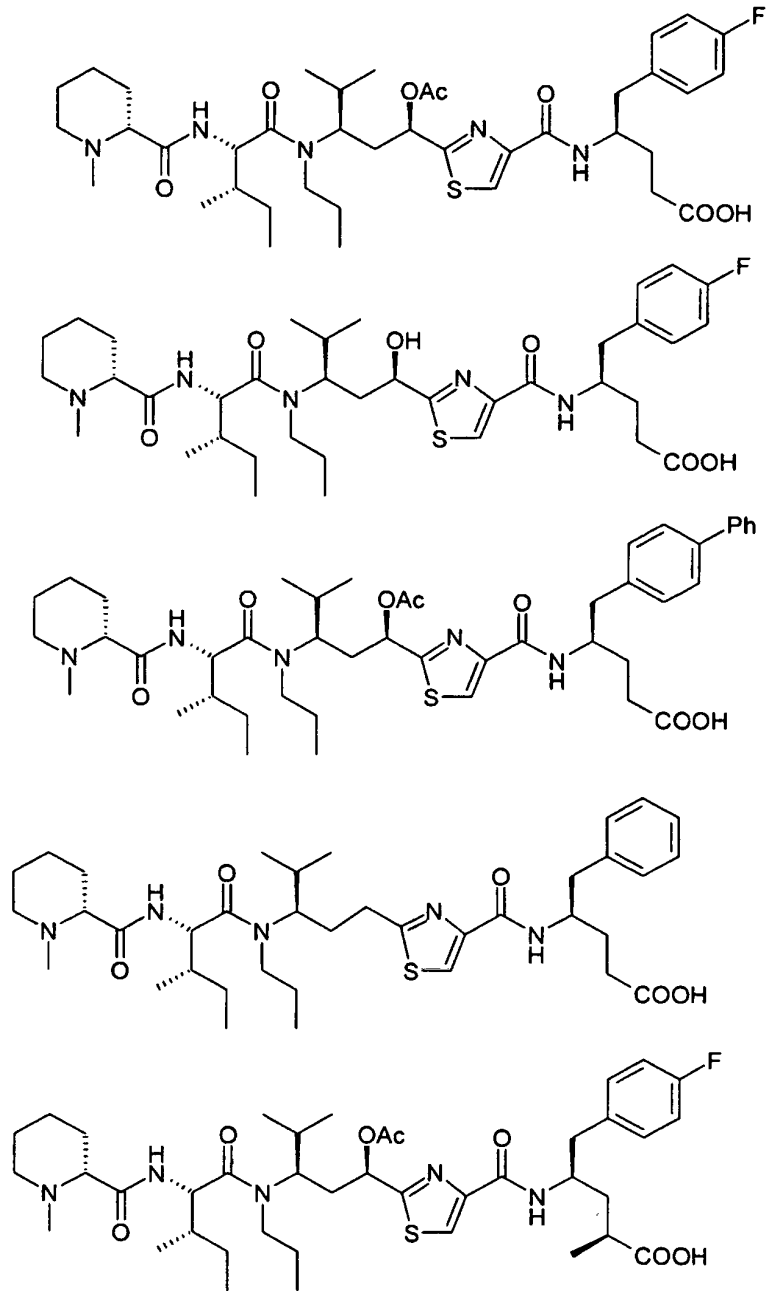
15 R¹⁵ =

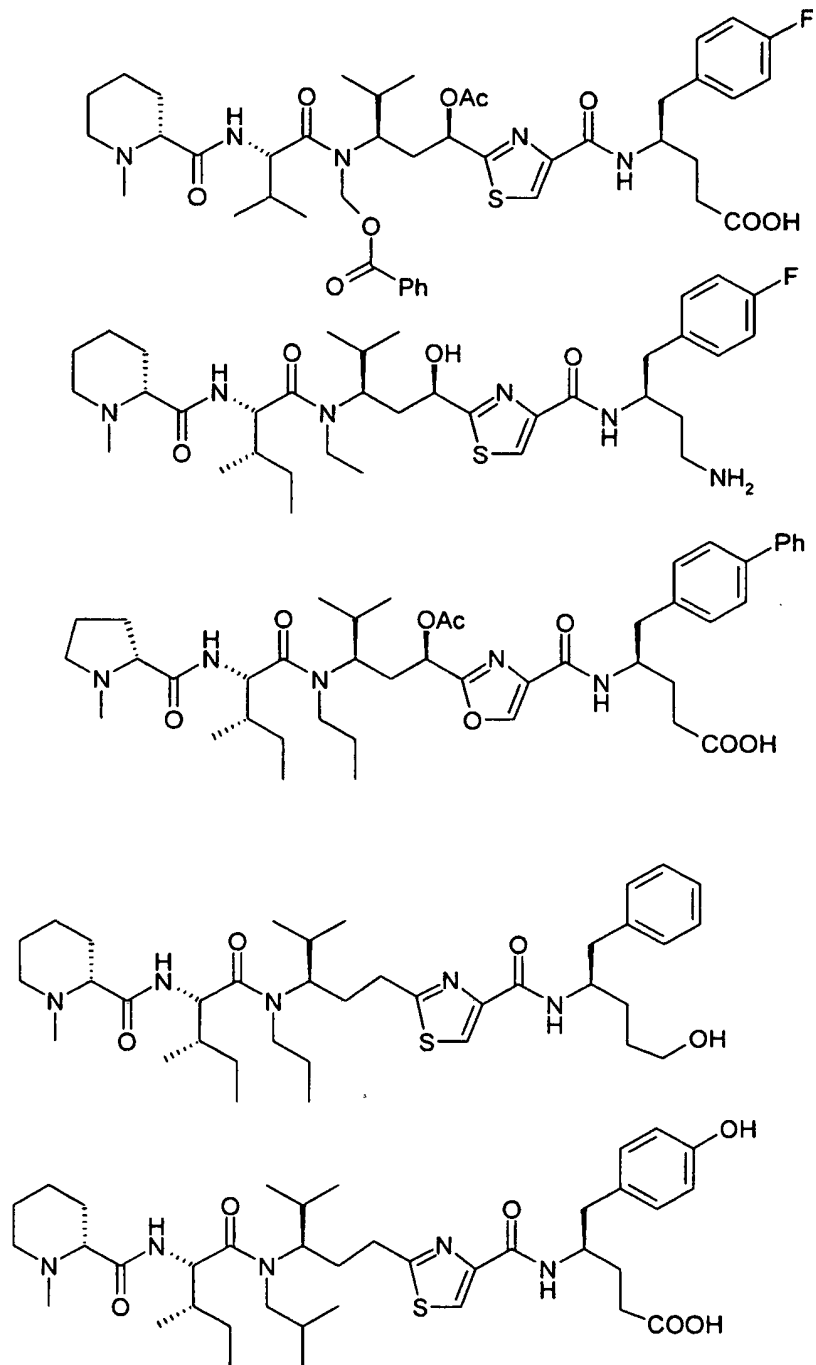


R¹⁶ = H, CH₃

R¹⁷ = COOH, CH₂OH, CH₂NH₂, CONHNH₂, CH₂SH

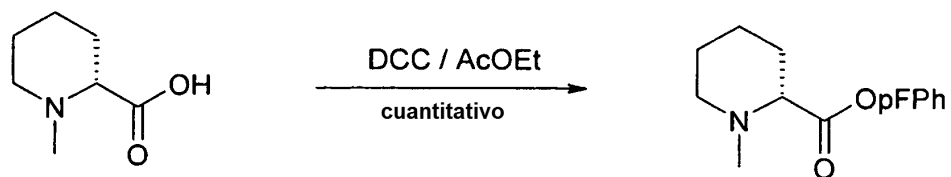
20 Estructuras representativas de compuestos de acuerdo con la presente invención se presentan a continuación:



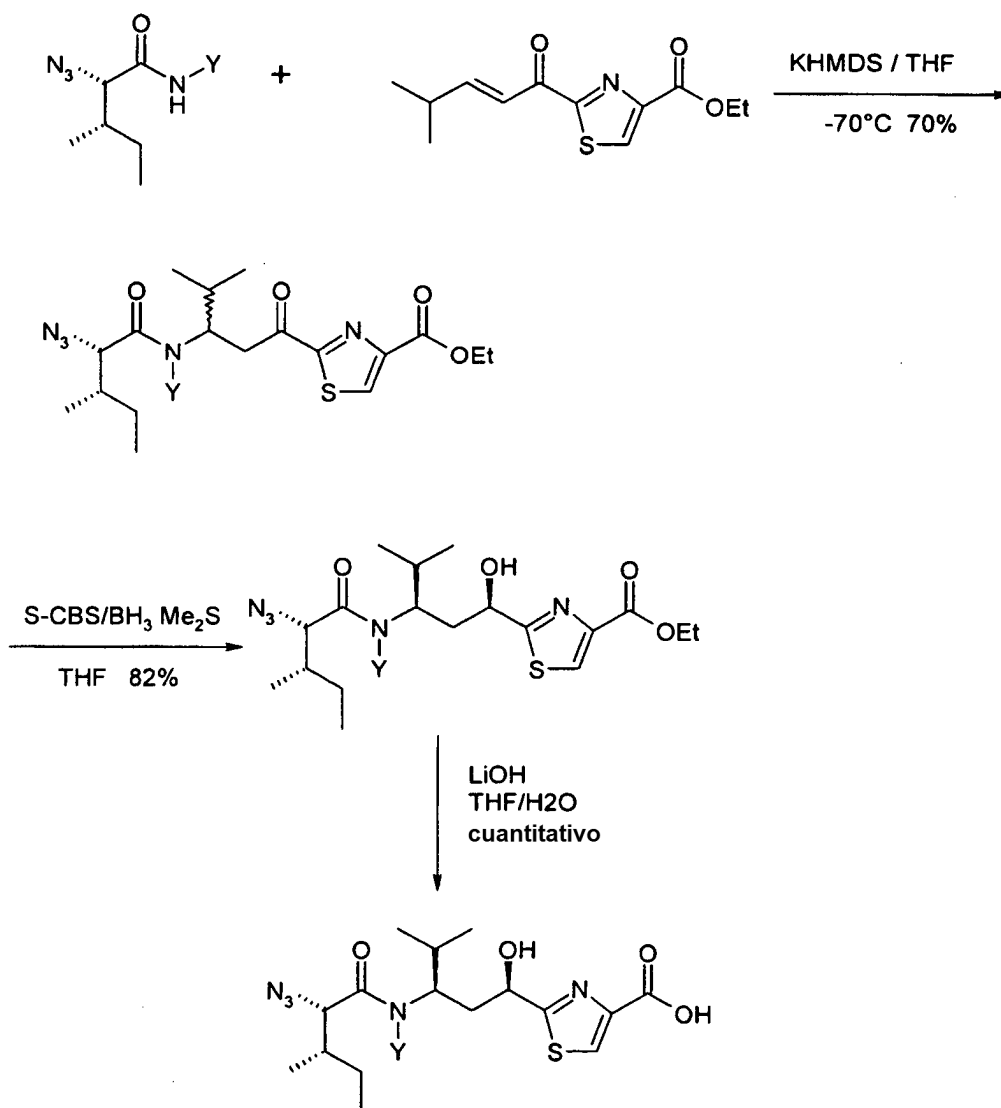


Esquemas de Síntesis y Procesos Detallados:

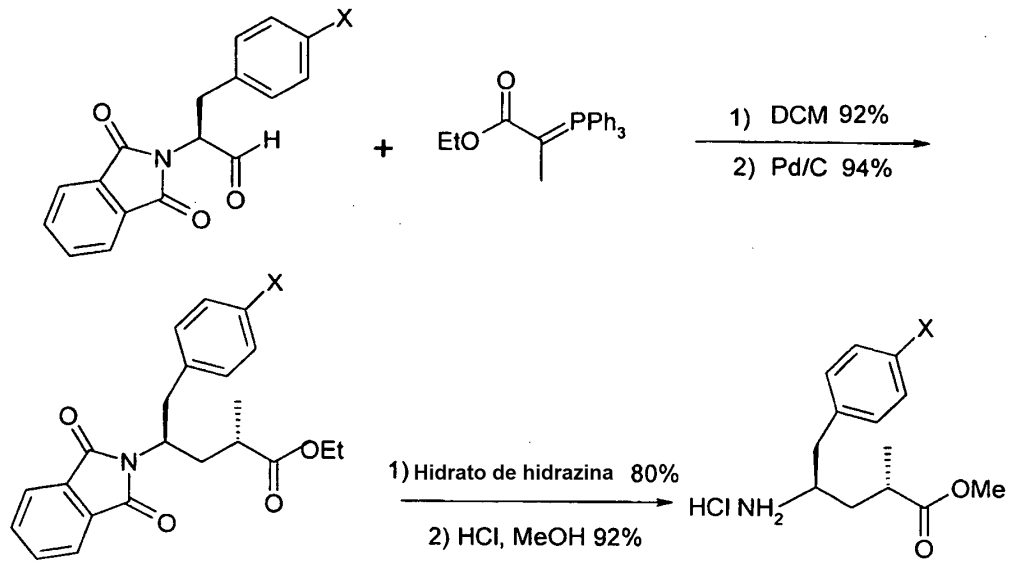
- 5 1) Precursor Mep y activación:



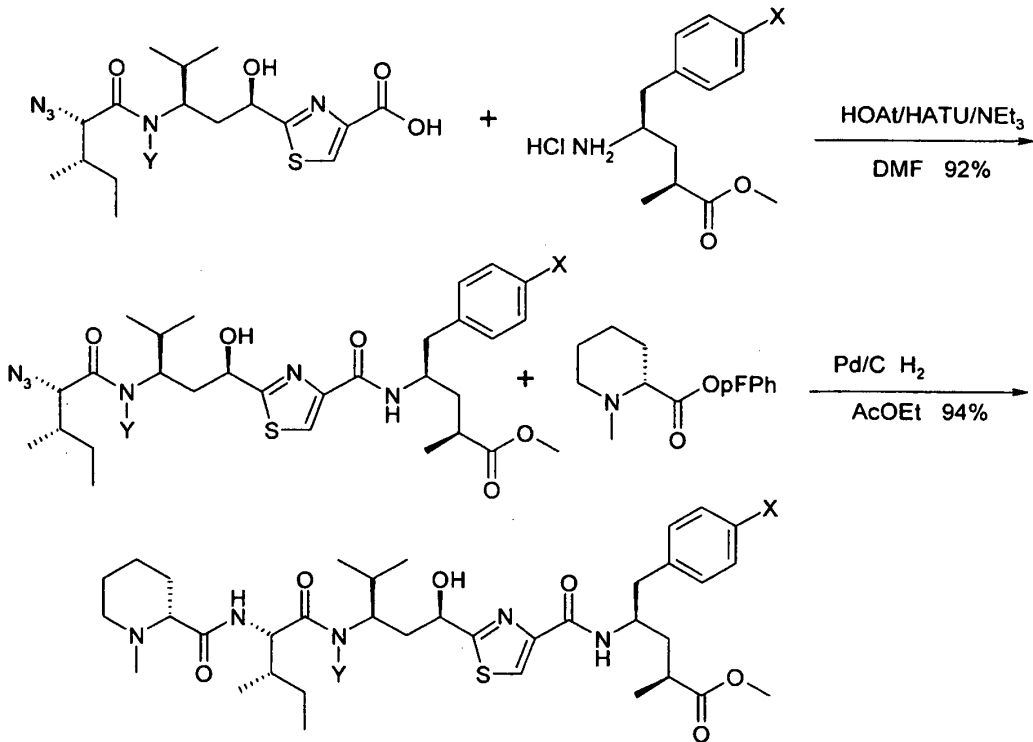
2) Síntesis de la parte Ile-Tuv de RD242:



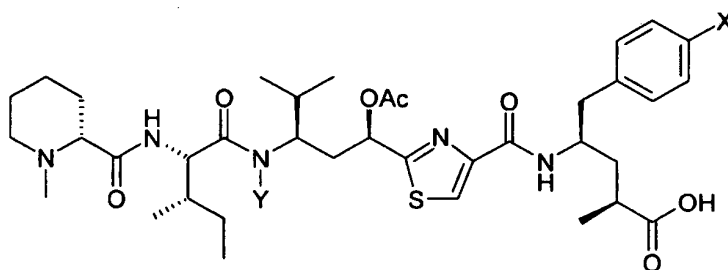
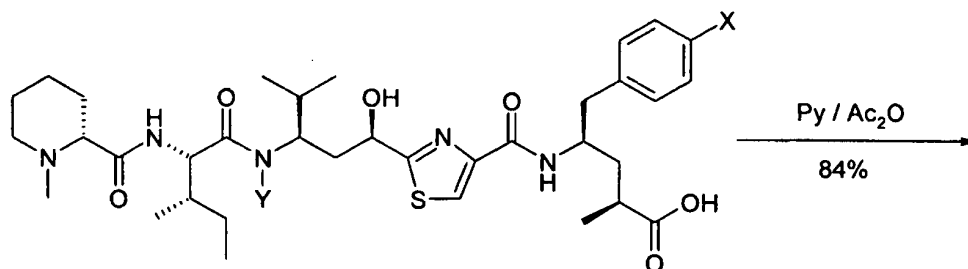
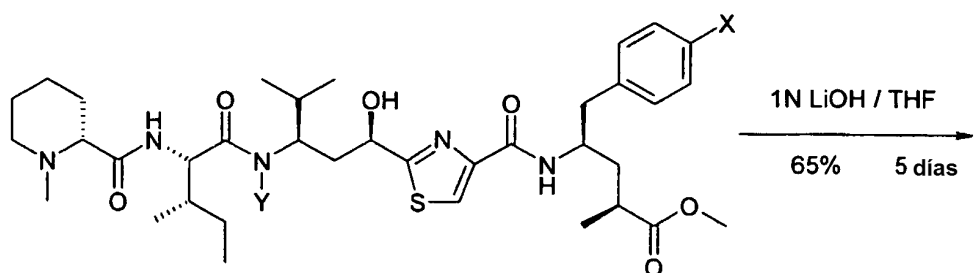
3) Síntesis de la parte X-Tup de RD119:



4) Ensamblaje de bloques de construcción azido-Ile-(NY)-Tuv(COOH), X-Tup y Mep activado:

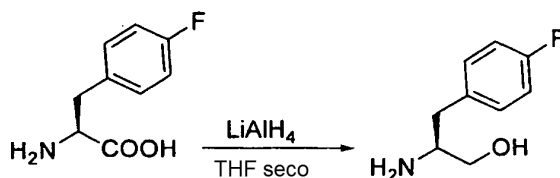


5) Síntesis de moléculas diana:



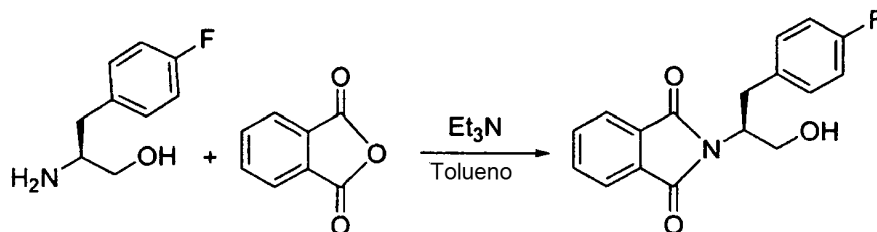
Síntesis de *p*-Fluoroubufenilalanina (FTup)

RD 5



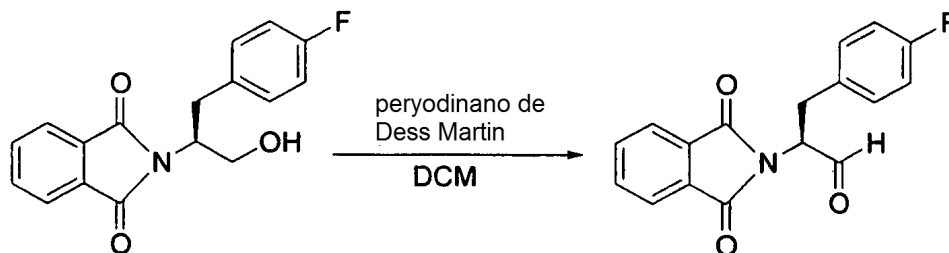
- 5 A una disolución de *p*-fluoro-fenilalanina (2,5 g, 13,7 mmol) en THF seco (60 mL), enfriada a 0°C y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió LiAlH₄ (1,013 g, 27,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h y después se vertió en una mezcla de H₂O/hielo (200 ml). Se añadió AcOEt (100 mL) y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo una vez con AcOEt (100 mL) y las fases orgánicas recogidas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron y concentraron en vacío para dar 1,9 g (rendimiento del 82% de RD 5 puro en forma de un sólido amarillo.
R_f = 0,4 (CHCl₃/MeOH/Et₃N 6:4:0,2)

RD 7



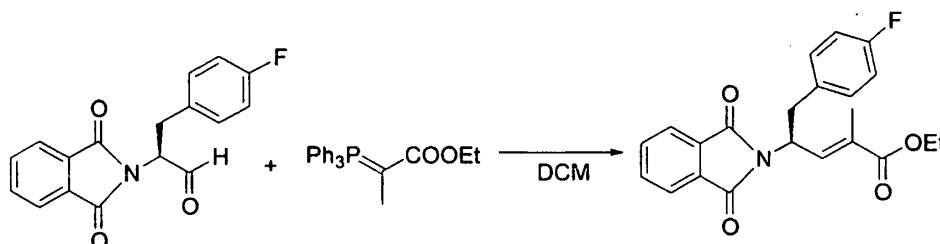
- 5 A una suspensión de F-fenilalaninol (2,6 g, 15,3 mmol) en tolueno (6 mL) se añadieron anhídrido ftálico (2,2 g, 15,3 mmol) y Et₃N (200 μL, 1,53 mmol). El matraz de reacción estaba equipado con un aparato Dean-Stark y la reacción se sometió a reflujo a 140°C durante 8 h. El disolvente se separó en vacío y el residuo se disolvió con AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1N de HCl (1 x 50 mL), una disolución acuosa al 5% de NaHCO₃ (1 x 50 mL) y con salmuera (1 x 50 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro y de la filtración, el disolvente se evaporó para dar 3,87 g (rendimiento del 84%) del RD 7 puro en forma de un sólido blanco.
Rf = 0,8 (CHCl₃/MeOH/Et₃N 6:4:0,2)

RD 8



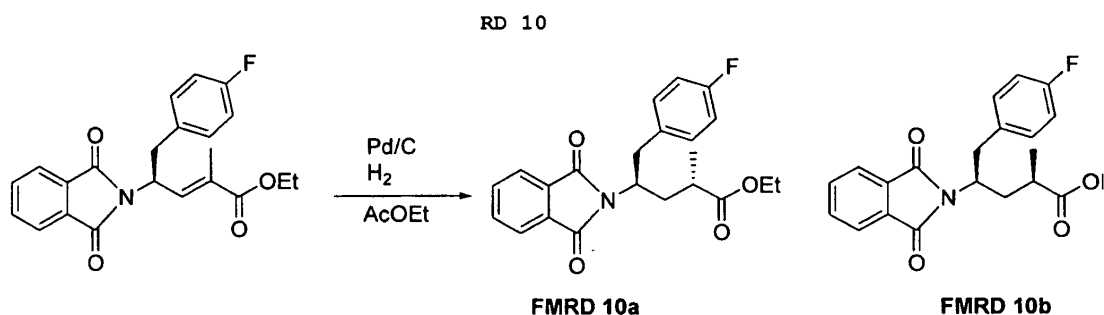
- 10 A una disolución de RD 7 (3,87 g, 12,9 mmol) en DCM (120 mL) se añadieron NaHCO₃ (21,6 g, 257 mmol) y peryodinano de Dess-Martin (8,75 g, 20,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, se diluyó con Et₂O (100 mL), se agitó durante 10 min y se vertió en una disolución acuosa saturada de NaHCO₃/Na₂S₂O₃ (100 mL). La agitación se continuó hasta la neutralización completa del ácido liberado. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró en vacío para dar 3,7 g (rendimiento del 96%) de FMRD 8 puro en forma de un sólido blanco.
15 Rf = 0,45 (Hex / AcOEt 6:4)

RD 9

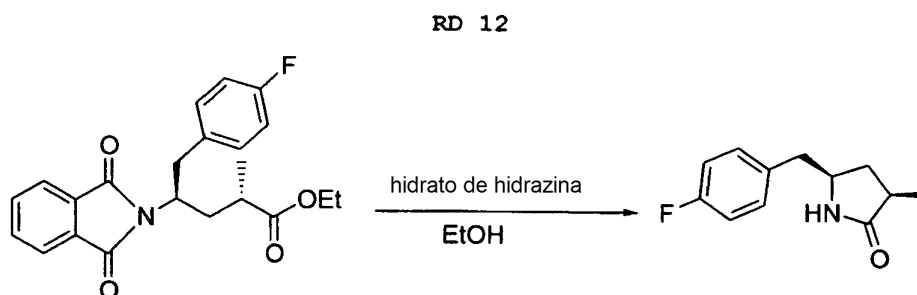


- 20 A una disolución de 1-etoxi-carboniletiliden-trifenilfosforano (5,9 g, 16,3 mmol) en DCM (100 mL), enfriada a 5°C, se añadió gota a gota N-ftaloil-aldehído FMRD8 (3,95 g, 13,3 mmol) disuelto en DCM (40 mL) a lo largo de un período de 30 min. La reacción se agitó durante 10 min adicionales a 5°C y, a continuación, se dejó que la temperatura ascendiera hasta la temperatura ambiente (t. a.). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y después se enfrió bruscamente con una disolución acuosa 1N de NaHSO₄ (80 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (1X 40 mL), se secó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró en vacío. El producto bruto se purificó mediante FC (Hex: AcOEt 8:2)

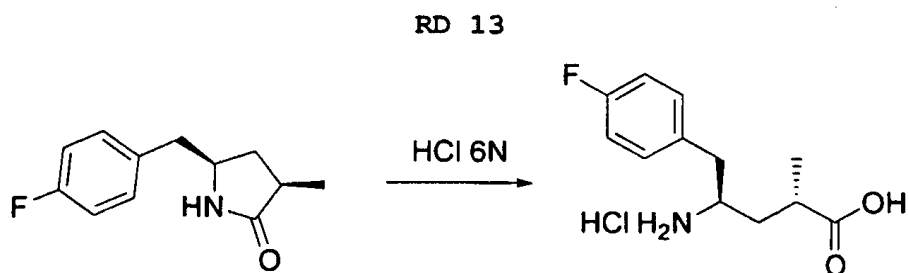
para dar 4,35 g de RD 9 (rendimiento del 92%) en forma de un aceite incoloro.
R_f = 0,5 (Hex / AcOEt 6:4)



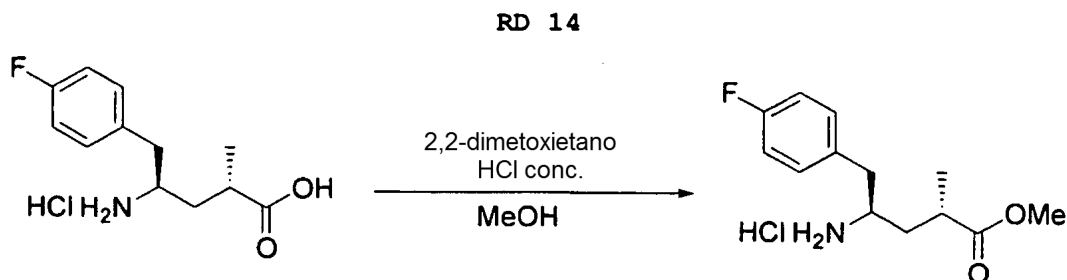
- 5 A una disolución de RD 9 (4,3 g, 11,3 mmol) en AcOEt (60 mL) se añadió una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante una noche y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el producto bruto se purificó mediante FC (iPrO₂: Ex 1:1) para dar 2,2 g de RD 10a (*R_f* >) y 1,9 g de RD 10b (*R_f* <) en forma de aceites incoloros (rendimiento total de 94%). *R_f* = 0,4 (Hex/iPrO₂ 1:1)



- 10 A una disolución de RD 10a (2,7 g, 7,0 mmol) en EtOH (70 mL) se añadió hidrato de hidrazina (disolución al 50% p/p en agua) (3,4 mL, 35 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 30 min hasta que se formó un precipitado blanco y después se calentó durante 3 h adicionales. El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (DCM: MeOH 95:5) para dar 1,3 g de RD 12 (rendimiento del 92%) en forma de un sólido blanco. *R_f* = 0,5 (CHCl₃/MeOH 95:5)



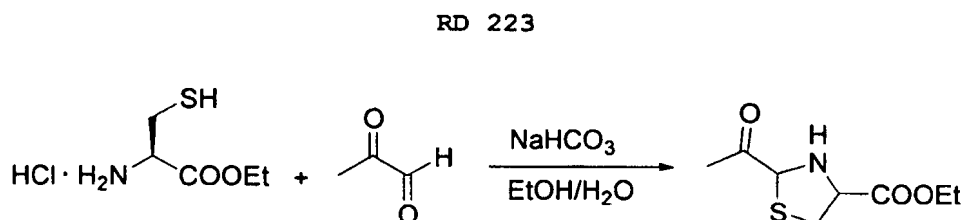
- 15 RD 12 (1,3 g, 6,3 mmol) se disolvió en HCl 6N y se sometió a reflujo durante 3 h. El disolvente se separó en vacío para dar 1,64 g de RD 13 puro (rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido blanco.



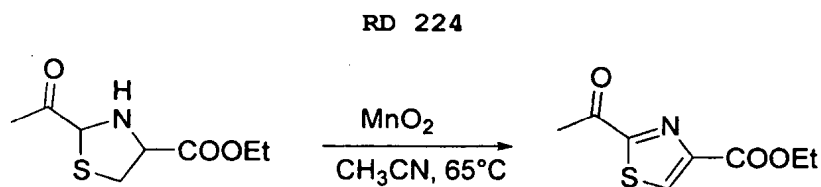
A una disolución de RD 13 (1,6 g, 6,1 mmol) en MeOH (30 mL) se añadieron 2,2-dimetoxipropano (1,5 mL, 12,2 mmol) y HCl conc. (18 μ L, 0,6 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante una noche. El disolvente se separó en vacío para dar 1,35 g de RD 14 puro (rendimiento del 92%) en forma de un sólido blanco.

5 $R_f = 0,3$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

Síntesis del análogo N-Me-Tuv de F-tubulisina D



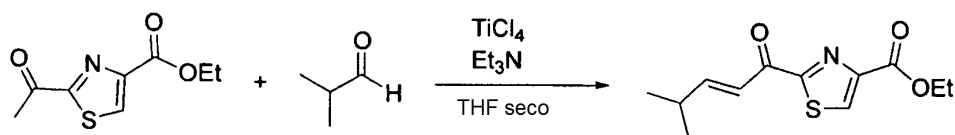
10 A una disolución de cisteína (30 g, 161,6 mmol) en una mezcla 1:1 de EtOH/H₂O (3 L) se añadieron NaHCO₃ (13,6 g, 161,6 mmol) y aldehído pirúvico (al 35% p/p en H₂O, 40 mL, 228 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t. a. durante 14 h y después se concentró a la mitad de su volumen original a presión reducida. Se añadió NaCl para saturar la fase acuosa. La capa acuosa se extrajo con CHCl₃ (2 x 500 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron en vacío para dar el producto en forma de un aceite rojo. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional alguna.



15 A una disolución de RD 223 (160 mmol) en CH₃CN (1 L) se añadió MnO₂ activado (270 g, 3,1 mol). La mezcla de reacción se calentó a 65°C durante 14 h, después se filtró (celite) y el residuo se lavó con AcOEt (2 x 200 mL). El filtrado se concentró en vacío (sólido de color pardo). Se añadió DCM (60 mL) y el sólido blanco se separó por filtración. El filtrado se concentró y se purificó mediante FC (Hex:AcOEt 75:25) para dar 17,75 g de RD 224 (rendimiento a lo largo de dos etapas, 54%) en forma de un sólido amarillo. $R_f = 0,52$ (Hex/AcOEt 7:3)

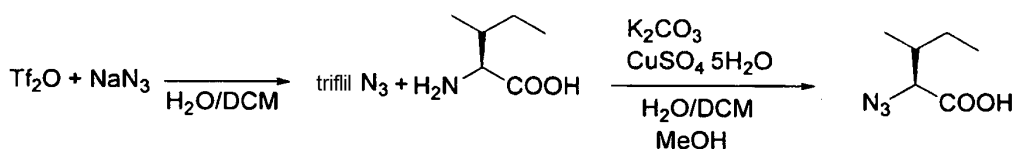
20

RD 225



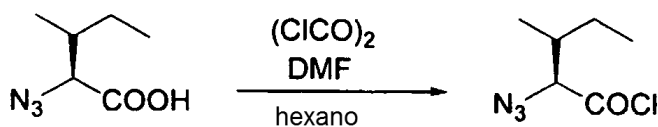
5 A una disolución de RD 224 (4,09 g, 20,6 mmol) en THF seco (50 mL), enfiada a 0°C y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió una disolución 1N de TiCl₄ en tolueno (45,3 mL, 45,3 mmol). La disolución se agitó durante 15 min a 0°C y, después de enfriar a -70°C, se añadió Et₃N puro (6,3 mL, 45,3 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 10 min a -70°C, y después se añadió gota a gota isobutiraldehído (2,44 mL, 26,8 mmol). La reacción se agitó durante 1 h a -70°C, y después se dejó calentar hasta t. a. La reacción se enfrió bruscamente con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (50 mL). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (1 x 50 mL). Las fases orgánicas recogidas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (*n*-Hex/AcOEt 9:1), proporcionando 2,75 g de MSDR 225 (rendimiento del 52%) en forma de un aceite incoloro. R_f = 0,5 (Hex / AcOEt 8:2)

RD 1

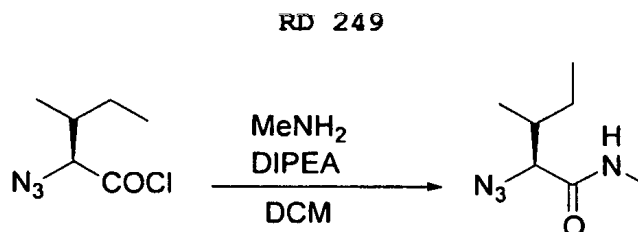


15 A una disolución de NaN₃ (5,34 g, 82,35 mmol) en una mezcla de H₂O (13,5 mL)/DCM (22,5 mL), se enfrió a 0°C, se añadió Tf₂O (2,79 mL, 16,65 mmol) a lo largo de un período de 5 min al tiempo que se continuó la agitación durante 2 h. La mezcla se colocó en un embudo de decantación y se separó la fase orgánica. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 10 mL). Las fases orgánicas recogidas, que contiene la trifil azida, se lavaron una vez con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se utilizaron sin purificación adicional. Ie (1,098 g, 8,37 mmol) se combinó con K₂CO₃ (1,732 g, 12,57 mmol), CuSO₄ 5 H₂O (21 mg, 83,7 μmol), H₂O destilada (27 mL) y MeOH (54 mL). Se añadió la trifil azida en DCM y la mezcla se agitó durante una noche. Los disolventes orgánicos se separaron en vacío y la fase acuosa se diluyó con H₂O (100 mL). Esta mezcla acuosa se acidificó a pH 6 con HCl concentrado y se diluyó con tampón fosfato 0,25 M, pH 6,2 (100 mL) y se extrajo con AcOEt (4 x 100 mL) para separar el sub-producto sulfonamida. La fase acuosa se acidificó hasta pH 2 con HCl concentrado. El producto se obtuvo por extracción con AcOEt (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos se reunieron, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se separó en vacío para dar 1,170 g de RD 1 puro (rendimiento del 89%) en forma de un aceite pálido.

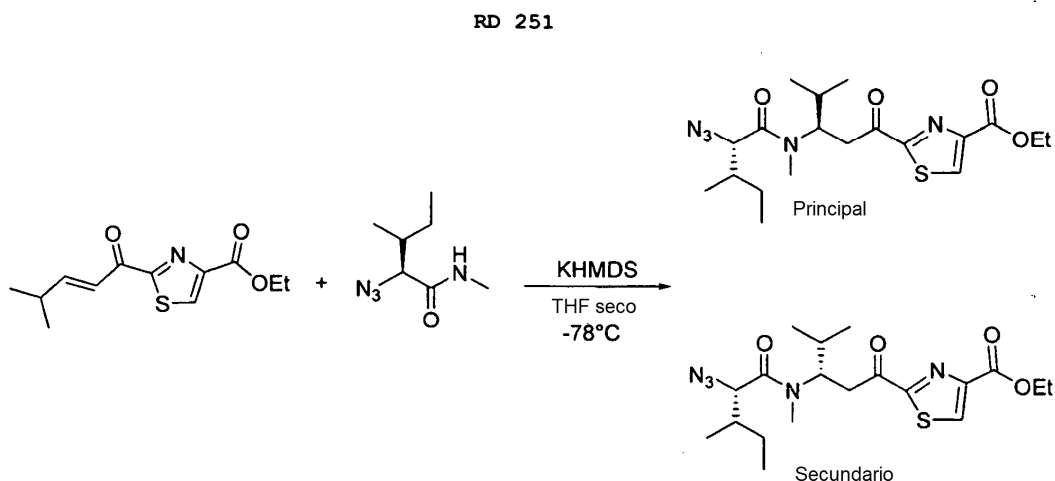
RD 248



A una disolución de azida (2,52 g, 16 mmol) en hexano (250 mL) se añadieron cloruro de oxalilo (6,3 mL, 72 mmol) y DMF (1,2 mL, 16 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y el disolvente se separó en vacío para dar RD 248 puro en un rendimiento cuantitativo.

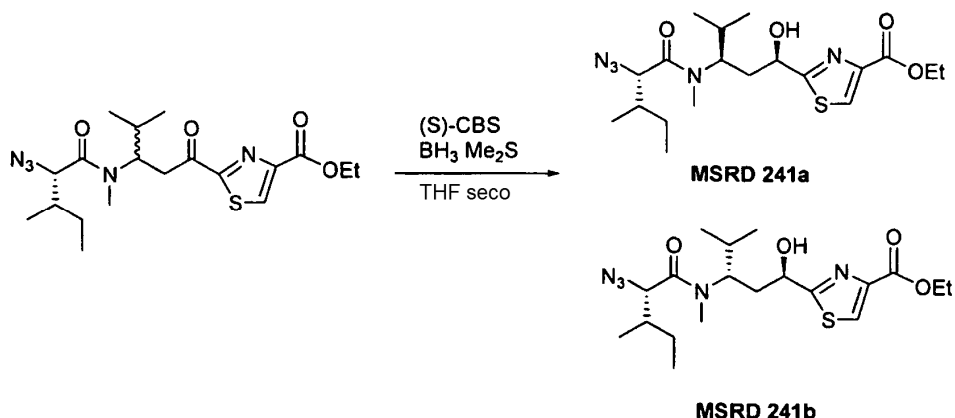


- 5 A una disolución de MeNH₂ (disolución 8 M en EtOH, 10 mL, 80 mmol) y DIPEA (8,2 mL, 48 mmol) en DCM (100 ml), enfriada a 0°C, se añadió una disolución de 1le azida (16 mmol) en DCM (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se enfrió bruscamente con H₂O (50 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex:AcOEt 6:4) para dar 1,951 g de RD 249 (rendimiento del 73%) en forma de un aceite amarillo. R_f = 0,27 (Hex / AcOEt 7:3)



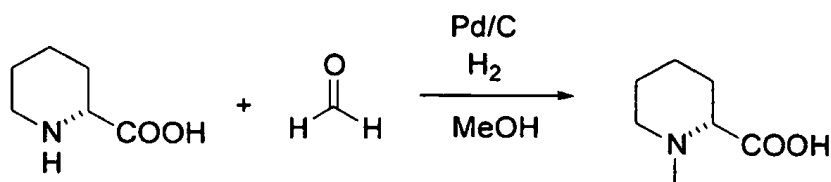
- 10 A una disolución de azida RD 249 (1,752 g, 10,29 mmol) en THF seco (120 mL), enfriada a -78°C y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió una disolución de KHMDS 0,5 M en tolueno (20,6 mL, 10,29 mmol). La mezcla de reacción se convirtió en un gel de color rojo. Después de agitar a la misma temperatura durante 5 min, se añadió una disolución de enona RD225 (1,3 g, 5,14 mmol) en THF (10 mL) (disolución de color púrpura). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 h y después se enfrió bruscamente con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (100 mL). Se añadió AcOEt (50 mL) y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (n-Hex/AcOEt 8:2), proporcionando 1,5 g de MSR 251 (rendimiento del 61%, los dos diastereoisómeros tienen el mismo R_f) en forma de un aceite incoloro. R_f = 0,33 (Hex / AcOEt 7:3)
- 15

RD 241



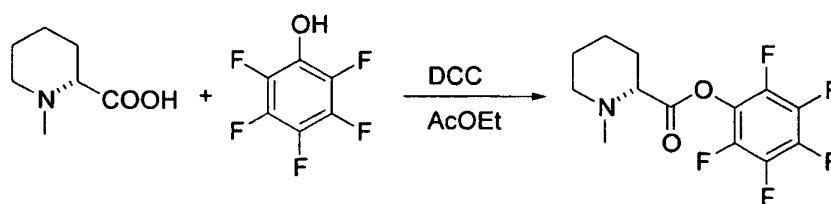
5 A una disolución 1 M de (S)-CBS comercial en tolueno (290 μL , 0,29 mmol) en THF seco (25 mL) se añadió una disolución 10 M de $\text{BH}_3\text{Me}_2\text{S}$ en THF (266 μL , 2,66 mmol). La disolución se agitó durante 10 min a t. a. y después se enfrió a 0°C . Se añadió una disolución de dipéptido (1,152 g, 2,66 mmol) en THF seco (5 mL). La reacción se agitó durante 4 h a la misma temperatura y luego se enfrió bruscamente con MeOH (2 mL). El disolvente se separó en vacío y el residuo se purificó mediante FC (n-Hex/AcOEt 7:3), proporcionando 620 mg de RD 241a y 312 mg de RD 241b (rendimiento total del 82%) en forma de aceites amarillos. R_f de RD 241a = 0,26 (Hex / AcOEt 7:3)

RD 199



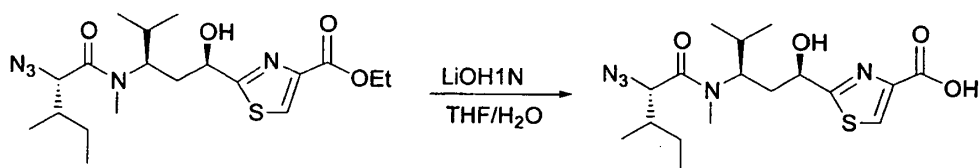
10 A una suspensión de ácido pipercolínico (500 mg, 3,87 mmol) en MeOH (5 mL) se añadieron una disolución acuosa al 37% de paraformaldehído (1,16 mL, 15,5 mmol) y una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida para producir 491 mg de MSRD 199 (rendimiento del 89%) en forma de un sólido blanco.

RD 202



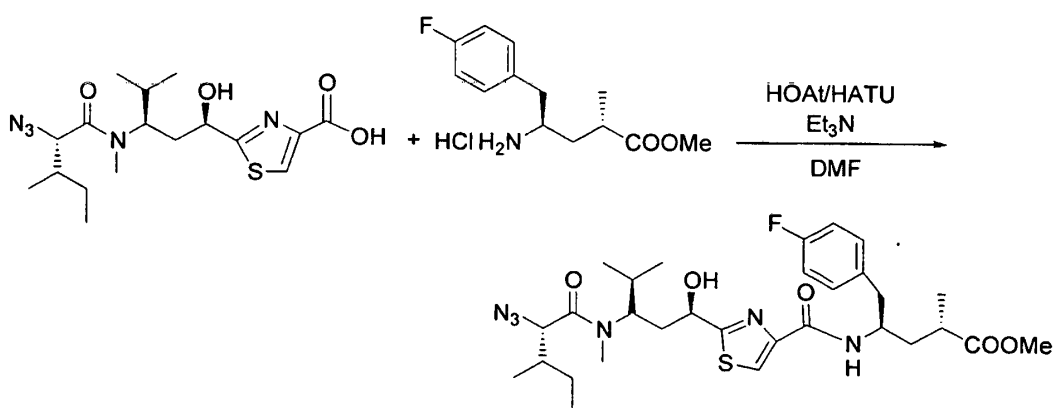
15 A una suspensión de Mep RD199 (70 mg, 0,49 mmol) en AcOEt (2 mL) se añadieron pentafluorofenol (99 mg, 0,54 mmol) y DCC (85 μL , 0,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y se filtró (Celite). El éster activado se utilizó inmediatamente sin purificación ni concentración adicional.

RD 242



5 A una disolución de RD 241a (459 mg, 1,08 mmol) en una mezcla 4:1 de THF/H₂O (10 mL) se añadió LiOH·H₂O (68 mg, 1,62 mmol). La reacción se agitó durante 5 h y después se añadieron H₂O (10 mL) y AcOEt (20 mL). Las capas se separaron y a la fase acuosa se añadió una disolución 1 M de HCl hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío para dar 428 mg de RD 242 puro en forma de un sólido blanco. R_f = 0,22 (DCM / MeOH 9:1).

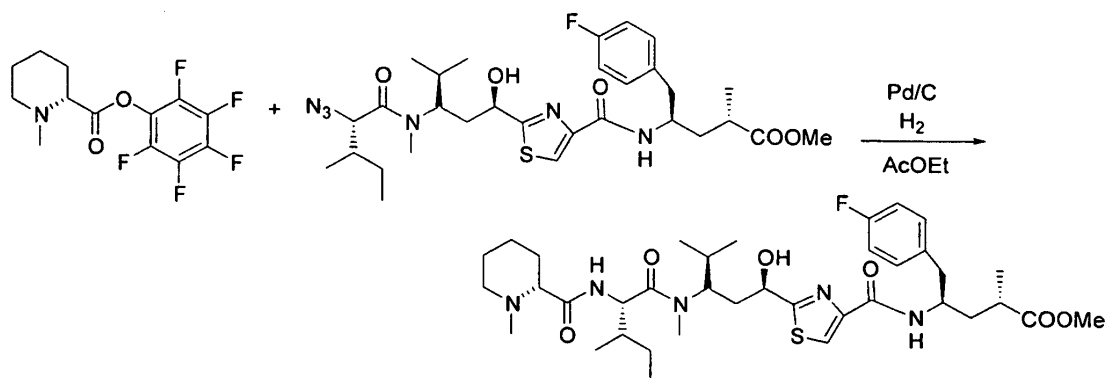
RD 243



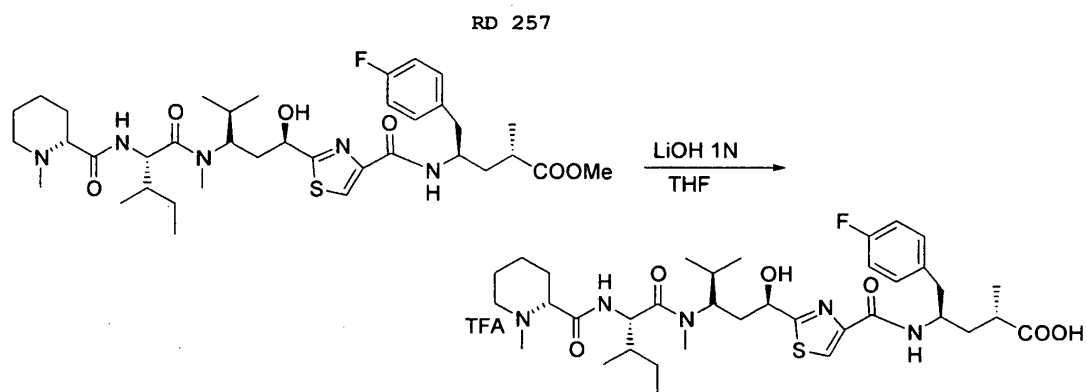
10 A una disolución de RD 242 (349 mg, 0,88 mmol) en DMF (10 mL) se añadieron HOAt (132 mg, 0,97 mmol), HATU (369 mg, 0,97 mmol) y Et₃N (270 μL, 1,9 mmol). Después de agitar durante 5 min se añadió una disolución de F-Tup RD14 (242 mg, 0,88 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó con H₂O (10 mL) y se extrajo con Et₂O (1 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1 N de HCl (1 x 15 mL), con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1 x 15 mL) y con salmuera (2 x 15 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío para dar 451 mg de RD 243 puro (rendimiento del 82%) en forma de una espuma blanca.

15 R_f = 0,39 (Hex / AcOEt 1:1)

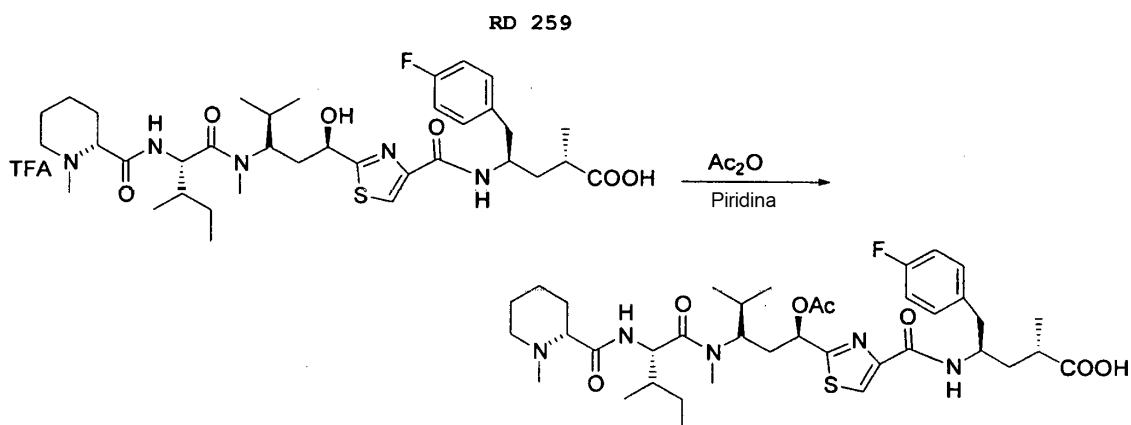
RD 253



- 5 A la disolución de éster Mep pentafluorofenílico bruto RD202 (1,05 mmol) se añadieron RD 243 (258 mg, 0,42 mmol) y una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de Celite, y el filtrado se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1 x 15 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica, tras el secado sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante FC (DCM/AcOEt 1:1, DCM:MeOH 9:1) para dar 291 mg de RD 253 (rendimiento del 96%) en forma de un sólido blanco. R_f = 0,24 (DCM/MeOH 9:1)



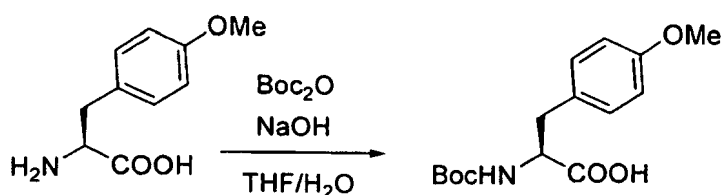
- 10 A una disolución de RD 253 (290 mg, 0,39 mmol) en THE (5 mL) se añadió una disolución acuosa 1 N de LiOH (1,16 mL, 1,16 mmol). La reacción se agitó durante 5 días a t. a. y después se acidificó con TFA hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se lavó con H₂O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purifica mediante FC (DCM / MeOH 8:2), proporcionando 310 mg de MSDR 257 (rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido blanco. R_f = 0,5 (DCM / MeOH 8:2).



- 15 A una disolución de RD 257 (310 mg, 0,39 mmol) en piridina (4 mL) se añadió Ac₂O (2 mL) y la disolución se agitó durante una noche. Los disolventes se separaron en vacío. El producto bruto se disolvió con AcOEt (20 mL) y se lavó con H₂O (2x10 mL). La fase orgánica se concentró en vacío y el residuo bruto se purificó mediante FC (DCM: MeOH 9:1) para dar 240 mg de RD 259 (rendimiento del 84%) en forma de un sólido blanco. R_f = 0,11 (DCM / MeOH 9:1)

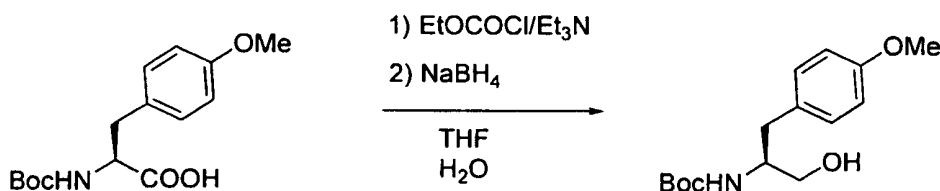
Otros bloques de construcción utilizados para la síntesis de los nuevos derivados de citolisina:

RD 33



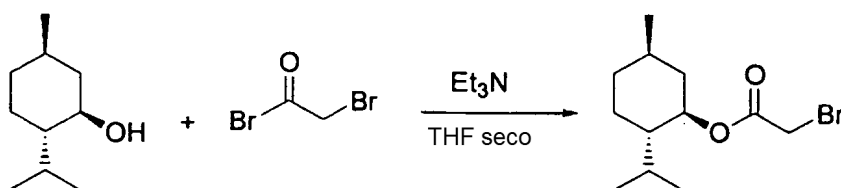
5 A una disolución de *p*-metoxi-fenilalanina (1,3 g, 6,6 mmol) y Boc_2O (1,74 g, 7,9 mmol) en una mezcla 1:1 de $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (30 mL), se añadió NaOH (586 mg, 14,6 mmol). La disolución de color amarillo-pardo resultante se agitó durante 5 h y después se añadió AcOEt (30 mL). Las capas se separaron, la fase acuosa se acidificó con una disolución acuosa 1 N de HCl hasta pH 4 y se extrajo dos veces con AcOEt (100 mL). Las fases orgánicas recogidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron en vacío para dar 1,8 g (rendimiento del 92%) del RD 33 puro en forma de un aceite pardo. $R_f = 0,37$ ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$ 9:1)

RD 34



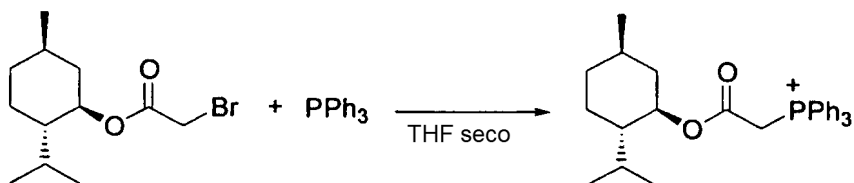
10 A una disolución de RD 33 (1,8 g, 6,1 mmol) en THF (20 mL), enfriada a 0°C , se añadieron cloroformiato de etilo (700 μL , 7,3 mmol) y Et_3N (1,1 mL, 7,3 mmol). La reacción se agitó a 0°C durante 1 h (se formó un precipitado blanco). El precipitado se separó por filtración y el filtrado se añadió a una disolución de NaBH_4 (340 mg, 9,15 mmol) en H_2O (10 mL), enfriada a 0°C . Se dejó que la temperatura ascendiera hasta t. a. y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La reacción se enfrió bruscamente con una disolución acuosa 1 N de HCl y se extrajo con AcOEt (30 mL). Después de secar sobre Na_2SO_4 anhidro y de la filtración, el disolvente se evaporó. El producto bruto se purificó mediante FC (Hex: AcOEt 1:1) para dar 1,7 g (rendimiento del 99%) de RD 34 en forma de un sólido blanco. $R_f = 0,47$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)

RD 35



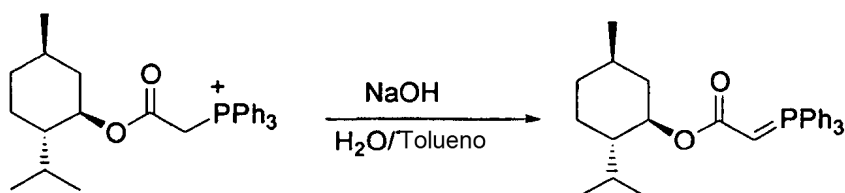
20 A una disolución de mentol (5 g, 32 mmol) en THF seco (30 mL) se añadió Et_3N (4,8 mL, 35 mmol). Después de enfriar a 0°C , se añadió gota a gota bromo-bromuro de acetilo (3 mL, 35 mmol). La temperatura se dejó calentar hasta la t. a. y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. Después de enfriar a 0°C , la reacción se enfrió bruscamente con una disolución acuosa 1 N de HCl (5 mL) y se añadió AcOEt (30 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró en vacío. El producto bruto se purificó mediante FC (Hex: AcOEt 97:3) para dar 6,4 g de RD 35 (rendimiento del 72%) en forma de un aceite incoloro. $R_f = 0,5$ (Hex / AcOEt 98:2)

RD 36



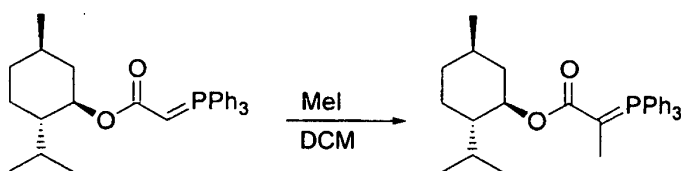
5 A una disolución de RD 35 (6,4 g, 23 mmol) en THF seco (30 mL), bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió PPh₃ (6 g, 23 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2,5 h y se concentró en vacío. El sólido resultante se lavó con una mezcla 7:3 de hexane/Et₂O y se filtró para dar 11 g de RD 36 (rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido blanco. R_f = 0,87 (CHCl₃ / MeOH 7:3)

RD 37



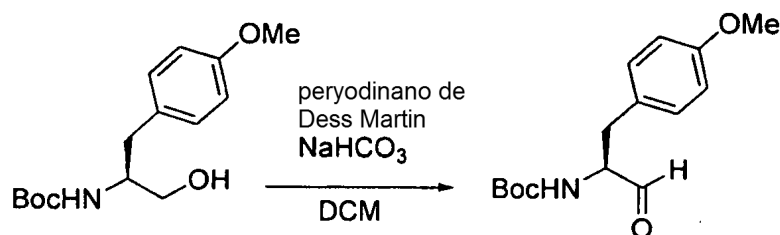
10 A una suspensión de RD 36 (11 g, 23 mmol) en tolueno (150 mL) se añadió gota a gota una disolución acuosa 0,38 N de NaOH (25 mL) a lo largo de un período de 5 min. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró en vacío para dar 11 g de RD 37 (rendimiento cuantitativo) en forma una espuma blanca.

RD 38



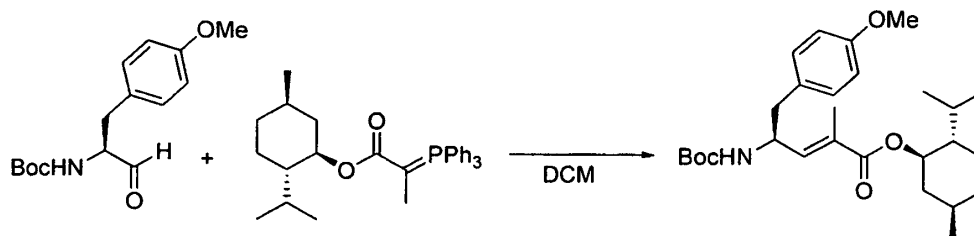
15 A una disolución de RD 37 (11 g, 23 mmol) en DCM (60 mL), enfriada a 0°C, se añadió gota a gota (2,1 mL, 34 mmol) MeI. Después de agitar durante 10 min, se dejó que la temperatura ascendiera hasta t. a. La mezcla de reacción se agitó durante una noche y el disolvente se evaporó. El producto bruto se disolvió en tolueno (100 mL) y se añadió una disolución acuosa 0,38 N de NaOH. La mezcla se agitó durante 2 h y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar 10,4 g de RD 38 (rendimiento del 96%) en forma de un aceite amarillo. R_f = 0,6 (CHCl₃ / MeOH 8:2).

RD 39



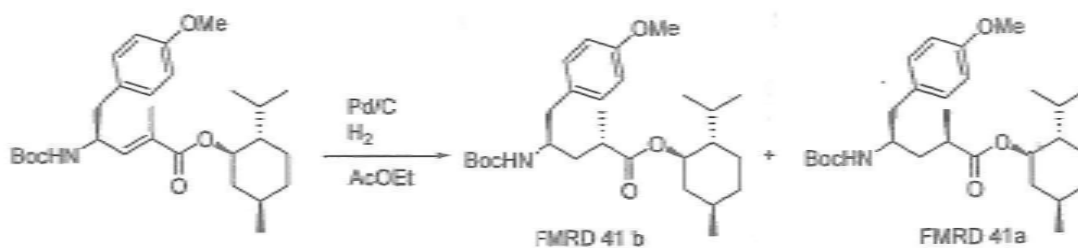
5 A una disolución de RD 34 (1,85 g, 6,4 mmol) en DCM (100 mL) se añadieron NaHCO₃ (11 g, 127 mmol) y peryodinano de Dess-Martin (4,5 g, 10,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, se diluyó con Et₂O (100 mL), se agitó durante 10 min y se vertió en una disolución acuosa saturada de NaHCO₃/Na₂S₂O₃ (100 mL). La agitación se continuó hasta la neutralización completa del ácido liberado. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró en vacío para dar 1,8 g (rendimiento cuantitativo) de RD 39 puro en forma de un sólido blanco. R_f = 0,6 (Hex / AcOEt 6:4)

RD 40



10 A una disolución de iluro de mentol (4,53 g, 9,6 mmol) en DCM seco (80 mL), enfriada a 0°C, se añadió RD 39 (1,8 g, 6,4 mmol). Después de agitar durante 15 min a 0°C, se dejó que la temperatura ascendiera hasta la t. a. La mezcla de reacción se agitó durante 8 horas, se enfrió bruscamente con una disolución acuosa 1N de NaHSO₄ (50 mL) y se extrajo con DCM (2x 50 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (1x 50 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró en vacío. El producto bruto se purificó mediante FC (Hex:AcOEt 8:2) para dar 2,3 g de FMRD 40 (rendimiento del 78%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,5 (Hex / AcOEt 7:3)

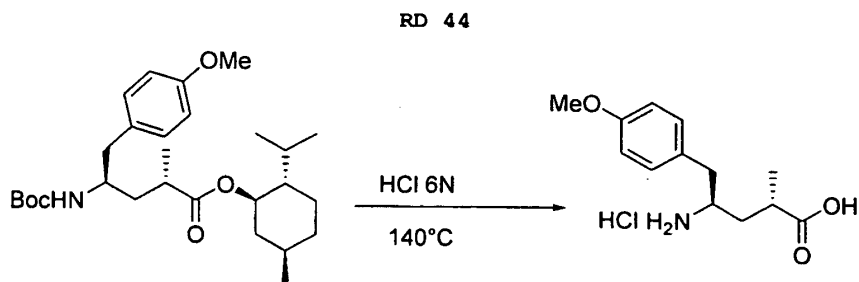
RD 41



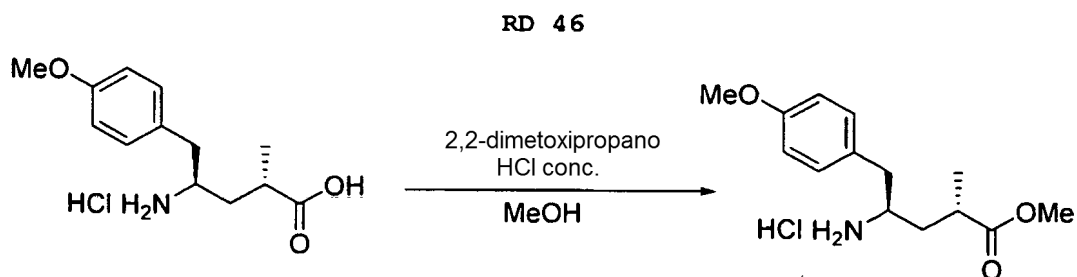
15

mezcla 2:1

20 A una disolución de RD 40 (2,3 mg, 4,85 mmol) en AcOEt (20 mL) se añadió una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante una noche y se filtró a través de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/iPrO₂ 55:45) para dar 600 mg de FMRD 41a y 1,38 g de RD 41b (rendimiento del 85%) en forma de sólidos blancos. RD 41b R_f = 0,32 (Hex/iPrO₂ 55:45)



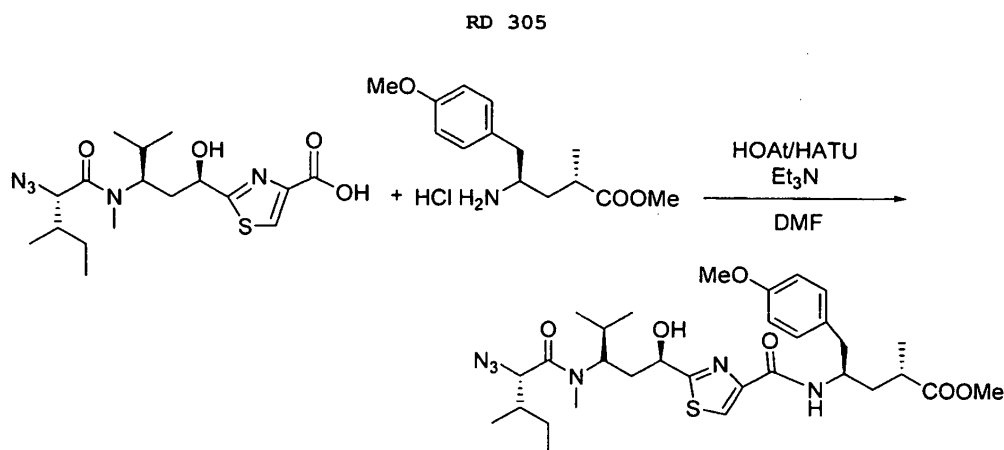
Una suspensión de RD 41b (500 mg, 0,42 mmol) en una disolución acuosa 6 N de HCl (4 mL) se calentó a 140°C durante 1,5 h. Después de enfriar a t. a. se añadió AcOEt (10 mL) y se separaron las capas. La fase acuosa se concentró en vacío para dar 256 mg de RD 44 puro (rendimiento del 89%). Rf = 0,2 (CHCl₃ / MeOH 7: 3)



5

A una disolución de RD 44 (150 mg, 0,55 mmol) en MeOH (5 mL) se añadieron 2,2-dimetoxipropano (134 μ L, 1,09 mmol) y HCl conc. (1,6 μ L, 0,005 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante una noche. El disolvente se separó en vacío para dar 125 mg de RD 46 puro (rendimiento del 91%) en forma de un sólido blanco. Rf = 0,54 (CHCl₃ / MeOH 8:2).

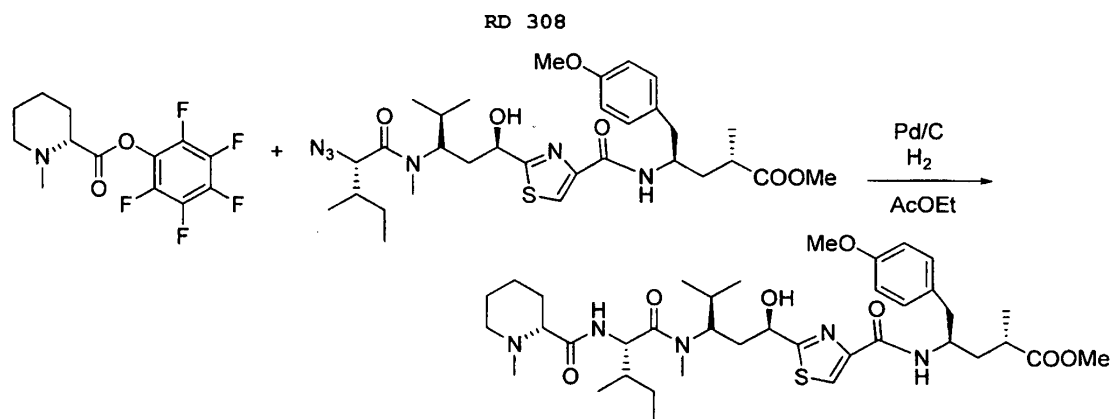
10 Síntesis del análogo N-Me-Tuv de OMe-tubulisina D



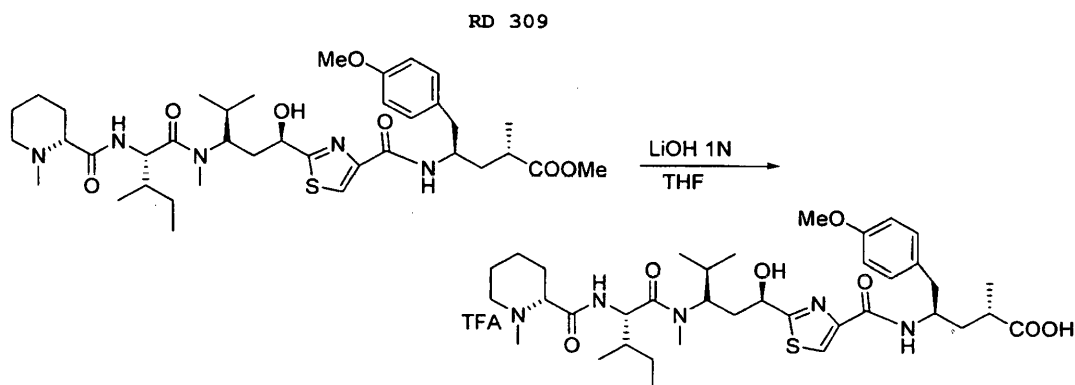
A una disolución de ácido (178 mg, 0,45 mmol) en DMF (5 mL) se añadieron HOAt (66 mg, 0,49 mmol), HATU (186 mg, 0,49 mmol) y Et₃N (132 μ L, 0,94 mmol). Después de agitar durante 5 min, se añadió una disolución de OMe-Tup (125 mg, 0,45 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó con H₂O (10 mL) y se extrajo con Et₂O (1 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1 N de HCl (1 x 15 mL), con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1x 15 mL) y con salmuera (2 x 15 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄

15

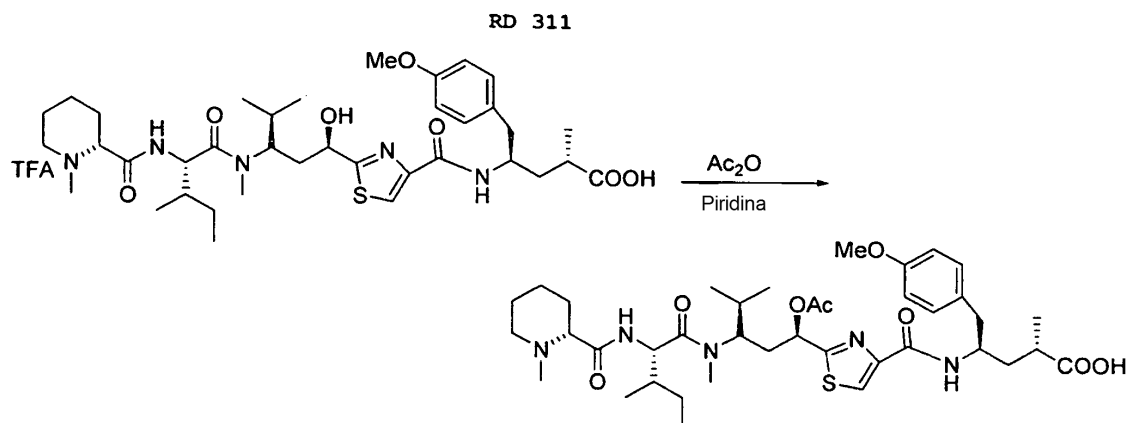
anhidro, y de la filtración, el disolvente se separó en vacío para dar 241 mg de RD 305 puro (rendimiento del 85%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,41$ (Hex/AcOEt 4:6).



- 5 A una disolución de éster Mep pentafluorofenílico bruto (0,85 mmol) se añadieron RD 305 (215 mg, 0,34 mmol) y Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (1 x 15 mL) y con salmuera (1 x 15 mL). Después de secar sobre Na_2SO_4 anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/AcOEt 1:1 para eluir las impurezas menos polares, DCM: MeOH 9:1 para eluir el producto) para dar 163 mg de RD 308 (rendimiento del 66%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,4$ (DCM / MeOH 9:1).
- 10

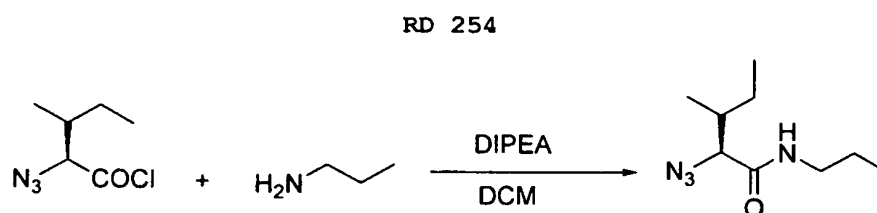


- 15 A una disolución de RD 308 (153 mg, 0,21 mmol) en THF (5 mL) se añadió una disolución acuosa 1 N de LiOH (630 μL , 0,63 mmol). La reacción se agitó durante 5 días y después se acidificó con TFA hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se lavó con H_2O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (DCM/MeOH 9:1), proporcionando 173 mg de RD 309 (rendimiento del 82%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,37$ (DCM / MeOH 9:1).

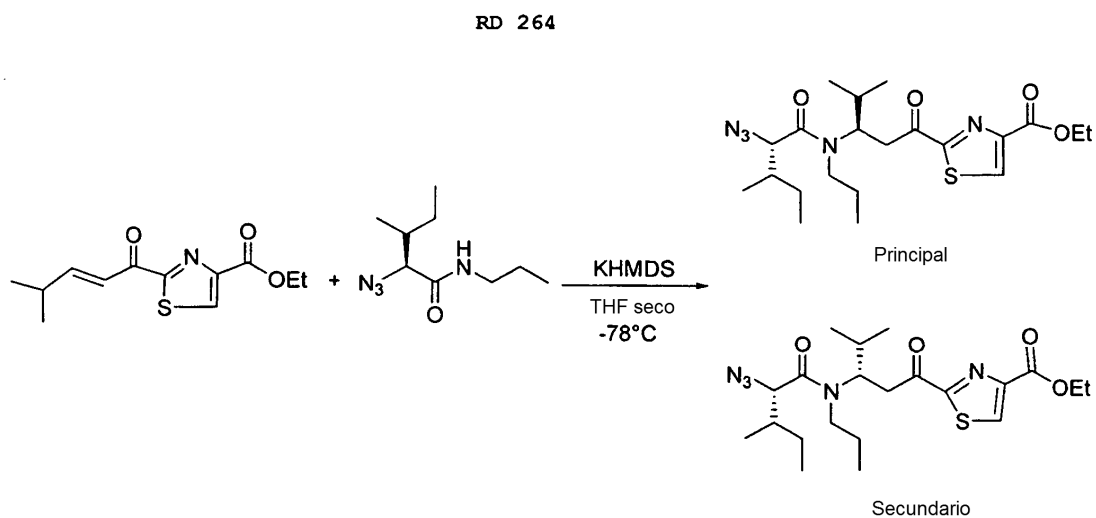


5 A una disolución de RD 309 (153 mg, 0,19 mmol) en piridina (2 mL) se añadió Ac₂O (1 mL) y la disolución se agitó durante una noche. El disolvente se evaporó y el producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con H₂O (10 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (1 x 10 mL). El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (DCM: MeOH 9:1) para dar 86 mg de RD 311 (rendimiento del 60%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,39 (DCM / MeOH 9:1)

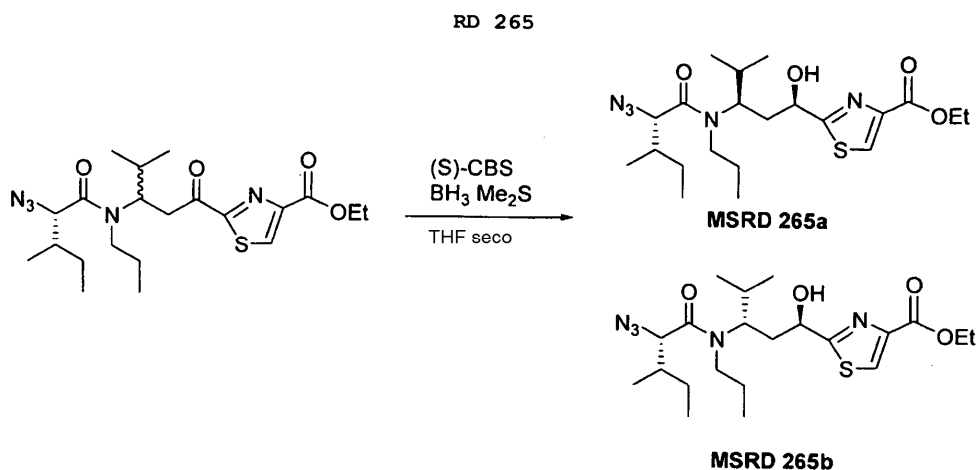
Síntesis del análogo N-Pr-Tuv de F-tubulisina D



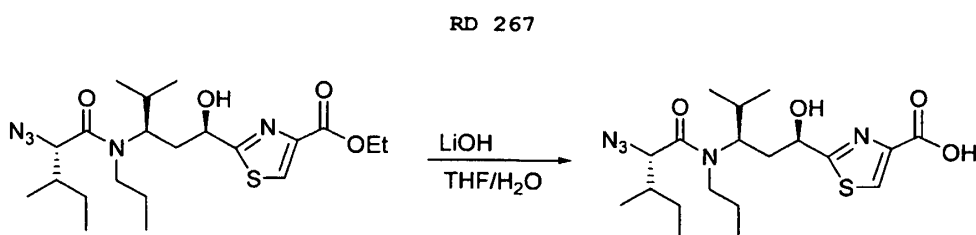
10 A una disolución de propilamina (3,1 mL, 38 mmol) y DIPEA (3,9 mL, 22,8 mmol) en DCM (50 ml), enfriada a 0°C, se añadió una disolución de Ilezida (7,6 mmol) en DCM (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se enfrió bruscamente con H₂O (50 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex: AcOEt 7:3) para dar 1,258 g de RD 254 (rendimiento del 83%) en forma de un aceite amarillo. R_f = 0,5 (Hex / AcOEt 7:3)



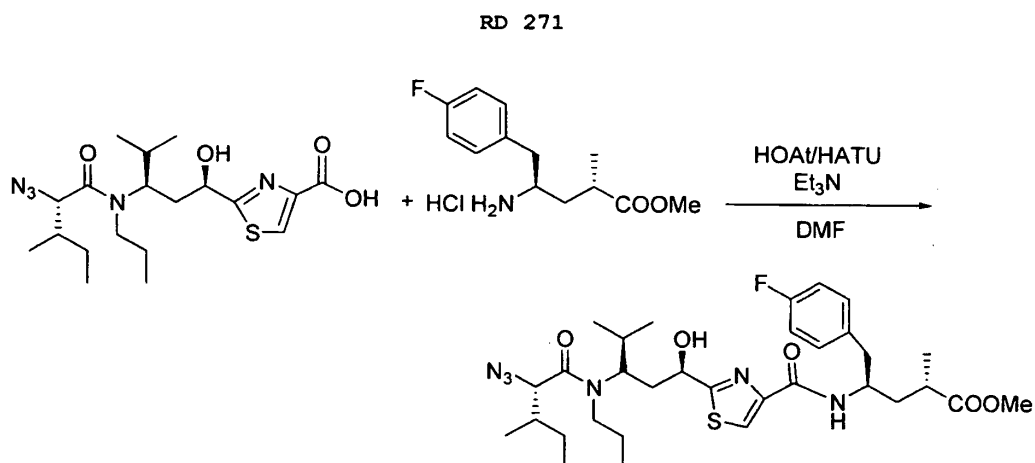
- 5 A una disolución de azida (809 mg, 4,08 mmol) en THF seco (30 mL), enfriada a -78°C y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió KHMDS 0,5 M en tolueno (8,16 mL, 4,08 mmol). Después de agitar a la misma temperatura durante 5 min, se añadió una disolución de la enona (430 mg, 1,70 mmol) en THF (5 mL) (disolución de color púrpura). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 h y después se enfrió bruscamente con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (50 mL). Se añadió AcOEt (50 mL) y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (Hex / AcOEt 8:2), proporcionando 907 g de una mezcla 2:1 de azida y MSR D 264 (rendimiento del 67%, los dos diastereómeros y la azida tienen el mismo Rf) en forma de un aceite amarillo. Rf = 0,5 (Hex / AcOEt 7:3).



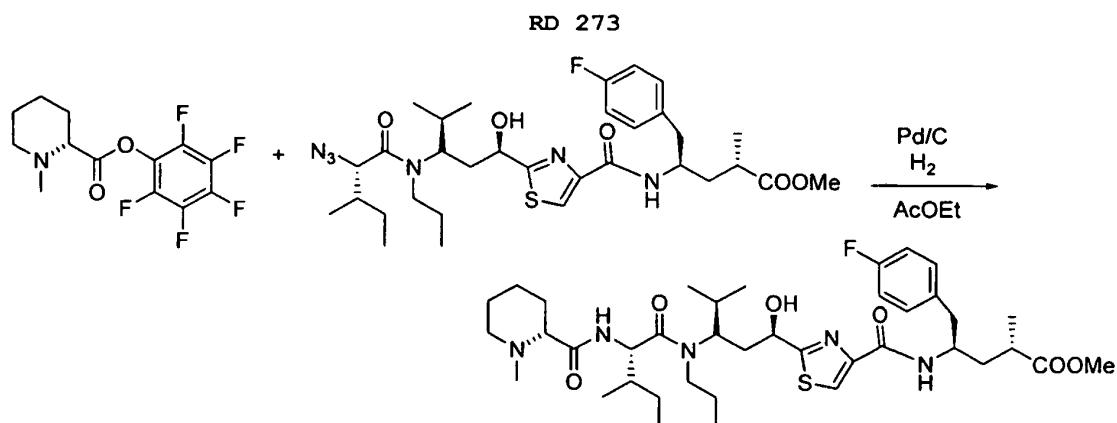
- 10 A una disolución 1 M de (S)-CBS en tolueno (120 μL , 0,12 mmol) en THF seco (5 mL) se añadió una disolución 10 M de $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ en THF (114 μL , 1,14 mmol). La disolución se agitó durante 10 min a t. a. y después se enfrió a 0°C . Se añadió una disolución de dipéptido (515 g, 1,14 mmol) en THF seco (5 mL). La reacción se agitó durante 6 h a la misma temperatura y después se enfrió bruscamente con MeOH (2 mL). El disolvente se separó en vacío y el residuo se purificó mediante FC (Hex / AcOEt 8:2), proporcionando 275 mg de MSR D 265a y 130 mg de RD 265b (rendimiento total de 78%) en forma de aceites de color amarillo.
- 15 Rf RD 265a = 0,39 (Hex / AcOEt 7:3)
Rf RD 265b = 0,25 (Hex / AcOEt 7:3)



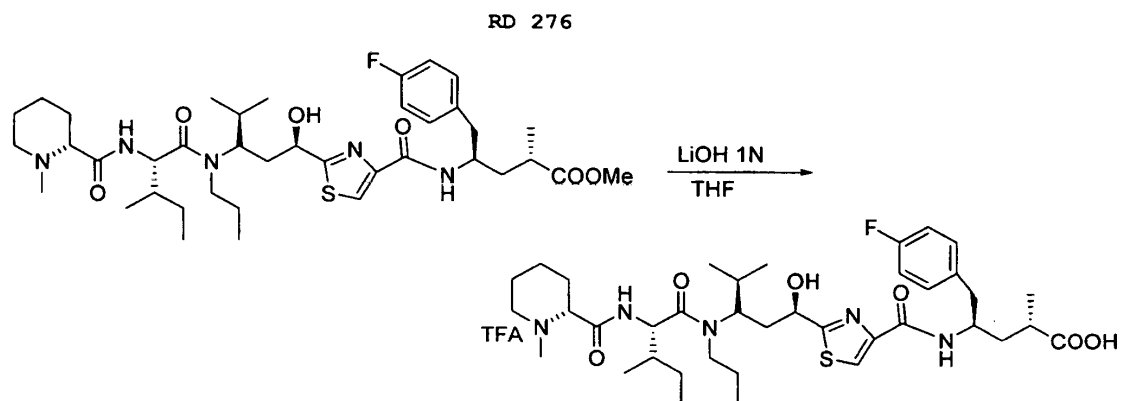
- 20 A una disolución de RD 265a (224 mg, 0,49 mmol) en una mezcla 4:1 de THF/ H_2O (10 mL) se añadió $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (31 mg, 0,74 mmol). La reacción se agitó durante 5 h y después se añadieron H_2O (10 mL) y AcOEt (20 mL). Las capas se separaron y se añadió una disolución acuosa 1 M de HCl a la fase acuosa hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío para dar 171 mg de RD 267 puro (rendimiento del 82%) en forma de un sólido blanco. Rf MSR D 267 = 0,25 (DCM / MeOH 9:1).



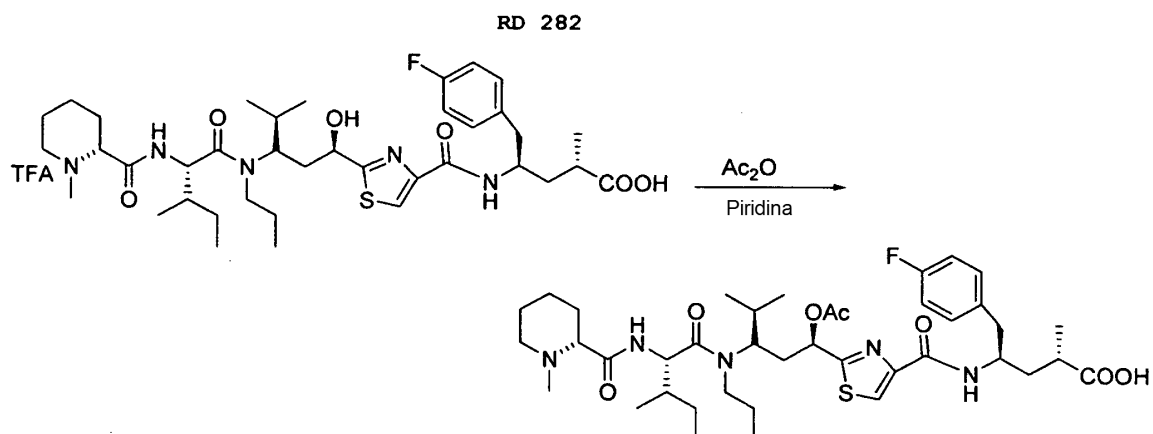
- 5 A una disolución de RD 267 (157 mg, 0,37 mmol) en DMF (5 mL) se añadieron HOAt (56 mg, 0,41 mmol), HATU (156 mg, 0,41 mmol) y Et₃N (113 μ L, 0,81 mmol). Después de agitar durante 5 min se añadió una disolución de F-Tup (102 mg, 0,37 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó con H₂O (10 mL) y se extrajo con Et₂O (1 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1N de HCl (1 x 15 mL), con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1x 15 mL) y con salmuera (2 x 15 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío para dar 173 mg de RD 271 puro (rendimiento del 72%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,54 (Hex / AcOEt 4:6)



- 10 A una disolución de éster Mep pentafluorofenílico bruto (0,50 mmol) se añadieron RD 271 (158 mg, 0,24 mmol) y una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1x 15 mL) y con salmuera (1 x 15 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/AcOEt 1:1 para eluir las impurezas menos polares, DCM:MeOH 9:1 para eluir el producto) para dar 107 mg de RD 273 (rendimiento del 60%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,4 (DCM / MeOH 9:1).
- 15

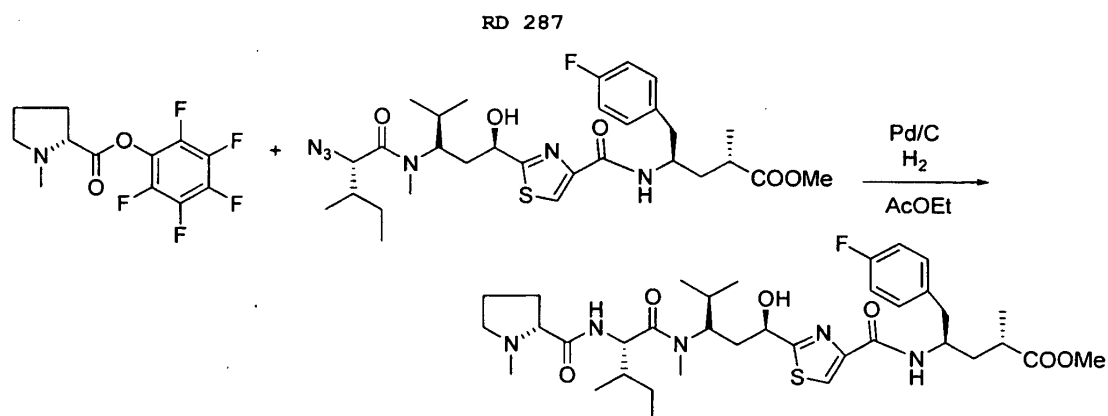


5 A una disolución de RD 273 (90 mg, 0,12 mmol) en THF (5 mL) se añadió una disolución acuosa 1N de LiOH (420 μ L, 0,42 mmol). La reacción se agitó durante 5 días y después se acidificó con TFA hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se lavó con H₂O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (DCM/MeOH 9:1), proporcionando 90 mg de MSR 276 (rendimiento del 90%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,39 (DCM/MeOH 9:1).

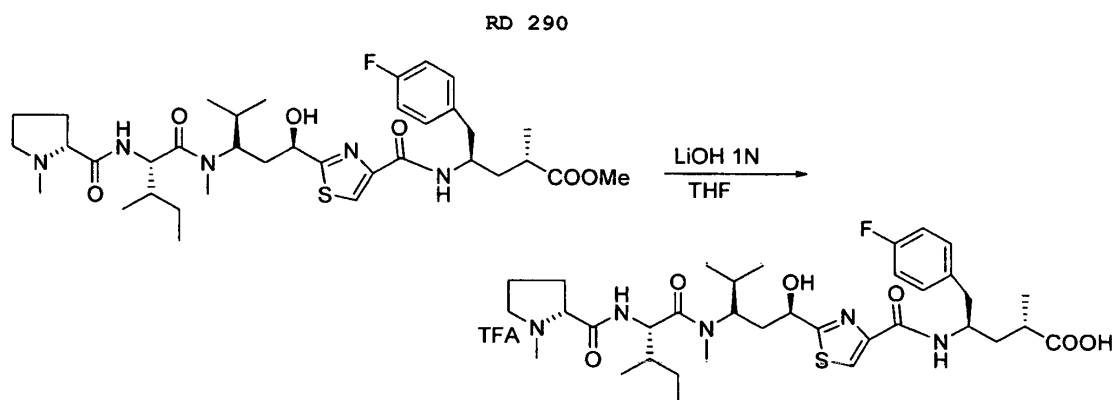


10 A una disolución del RD 276 (85 mg, 0,1 mmol) en piridina (2 mL) se añadió Ac₂O (1 mL) y la disolución se agitó durante una noche. El disolvente se evaporó y el producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con H₂O (10 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (1 x 10 mL). El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (DCM: MeOH 9:1) para dar 32 mg de RD 282 (rendimiento del 41%) en forma de una espuma de color blanco. R_f = 0,41 (DCM / MeOH 9:1).

Síntesis del análogo N-Me-Tuv de Pro-F-tubulisinina D

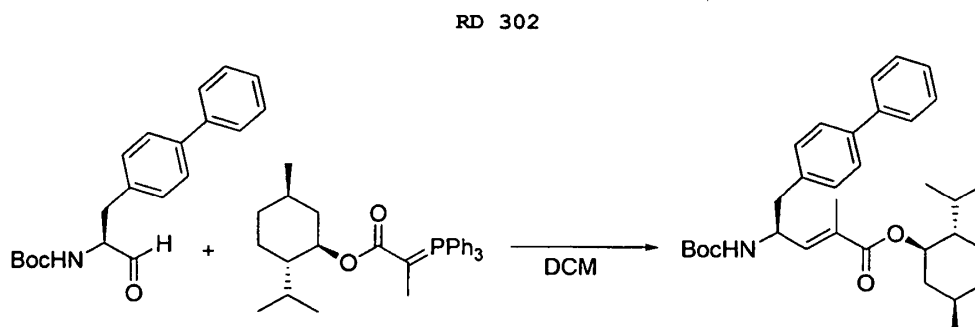


- 5 A una disolución de éster N-Me Pro pentafluorofenílico (0,78 mmol) se añadieron RD 285 (195 mg, 0,31 mmol) y una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (1 x 15 mL) y con salmuera (1 x 15 mL). Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/AcOEt 1:1 para eluir las impurezas menos polares, DCM:MeOH 9:1 para eluir el producto) para dar 160 mg de RD 287 (rendimiento del 73%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,6 (DCM / MeOH 9:1)

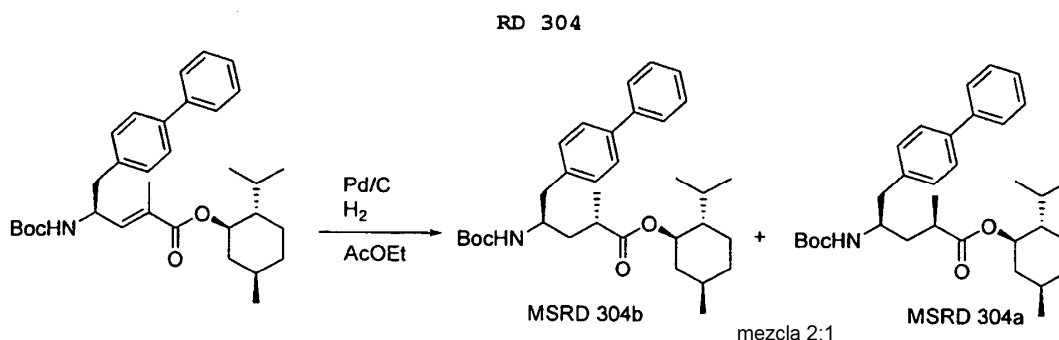


- 10
- 15 A una disolución de RD 287 (150 mg, 0,21 mmol) en THF (5 mL) se añadió una disolución acuosa 1 N de LiOH (640 μL, 0,64 mmol). La reacción se agitó durante 18 h y después se acidificó con TFA hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se lavó con H₂O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (DCM/MeOH 9:1), proporcionando 138 mg de RD 290 (rendimiento del 82%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,42 (DCM/MeOH 9:1).

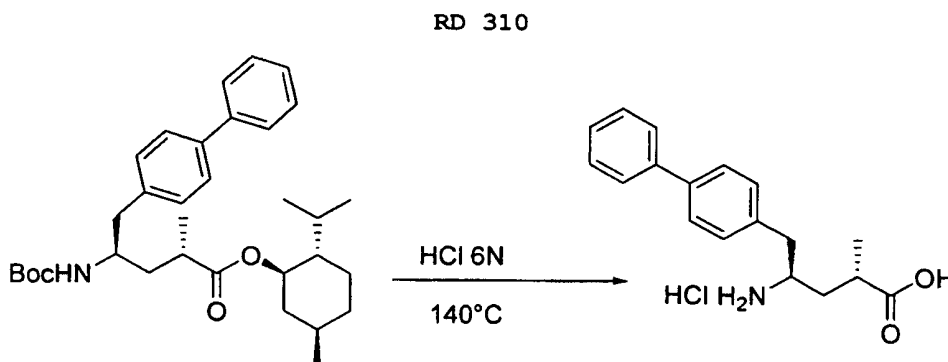
- 5 A una disolución de RD 300 (700 mg, 2,1 mmol) en DCM (30 mL) se añadieron NaHCO_3 (3,5 g, 42 mmol) y peryodinato de Dess-Martin (1,4 g, 3,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, se diluyó con Et_2O (50 mL), se agitó durante 10 min y se vertió en una disolución acuosa saturada de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL). La agitación se continuó hasta la neutralización completa del ácido liberado. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 se filtró y se concentró en vacío para dar 650 mg (rendimiento del 95%) de MSDR 310 puro en forma de un sólido blanco. $R_f = 0,38$ (Hex/AcOEt 6:4).



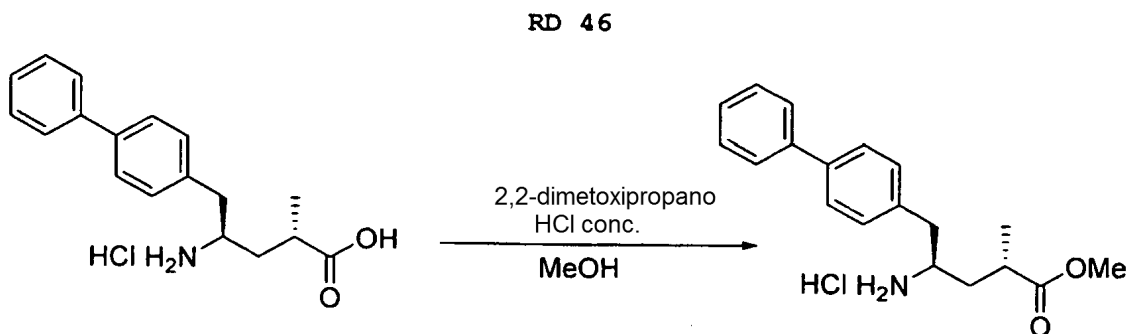
- 10 A una disolución de iluro de mentol (1,4 g, 2,99 mmol) en DCM seco (30 mL), enfriada a 0°C , se añadió RD 301 (650 mg, 1,99 mmol). Después de agitar durante 15 min a 0°C , se dejó que la temperatura ascendiera hasta la t. a. La mezcla de reacción se agitó durante 8 horas, se enfrió bruscamente con una disolución acuosa 1N de NaHSO_4 (50 mL) y se extrajo con DCM (2x 50 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (1x 50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró en vacío. El producto bruto se purificó mediante FC (Hex:AcOEt 8:2) para dar 750 mg de RD 302 (rendimiento del 72%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,35$ (Hex/*i*PrO₂ 55:95).



- 15 A una disolución de RD 302 (650 mg, 1,25 mmol) en AcOEt (10 mL), se añadió una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante una noche y se filtró a través de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/*i*PrO₂ 6:4) para dar 165 mg de RD 304a y 329 mg de RD 304b (rendimiento del 75%) en forma de sólidos blancos. RD 41b $R_f = 0,32$ (Hex/*i*PrO₂ 55:45).

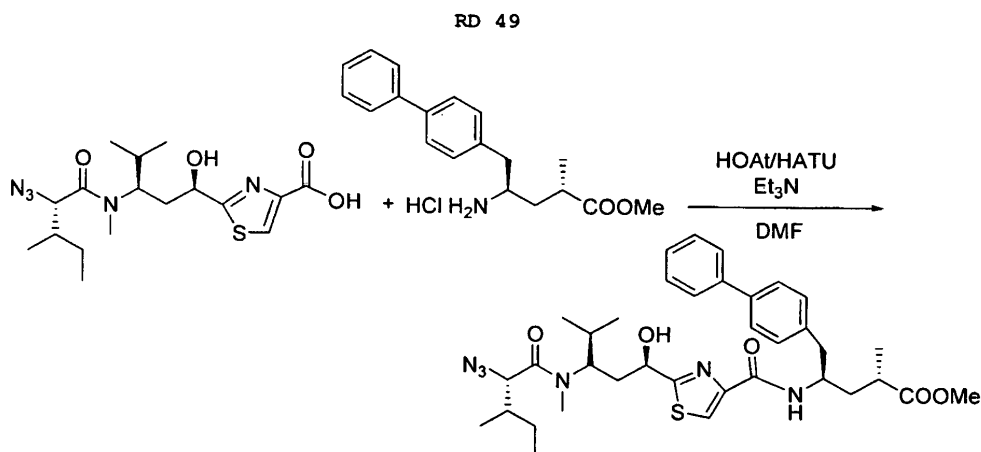


Una suspensión de RD 304b (319 mg, 0,61 mmol) en una disolución acuosa 6 N de HCl (4 mL) se calentó a 140°C durante 1,5 h. Después de enfriar a t. a. se añadió AcOEt (10 mL) y las capas se separaron. La fase acuosa se concentró en vacío para dar 150 mg de RD 310 puro (rendimiento del 89%) en forma de un sólido blanco. $R_f = 0,3$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3).



5

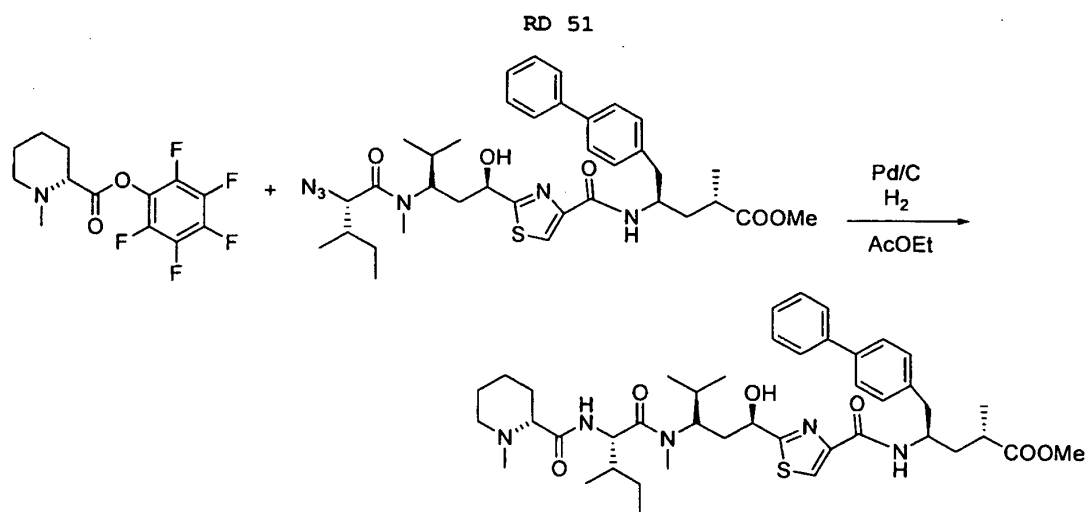
A una disolución de RD 44 (150 mg, 0,55 mmol) en MeOH (5 mL) se añadieron 2,2-dimetoxipropano (134 μL , 1,09 mmol) y HCl conc. (1,6 μL , 0,005 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante una noche. El disolvente se separó en vacío para dar 125 mg de RD 46 puro (rendimiento del 91%) en forma de un sólido blanco. $R_f = 0,54$ ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$ 8:2)



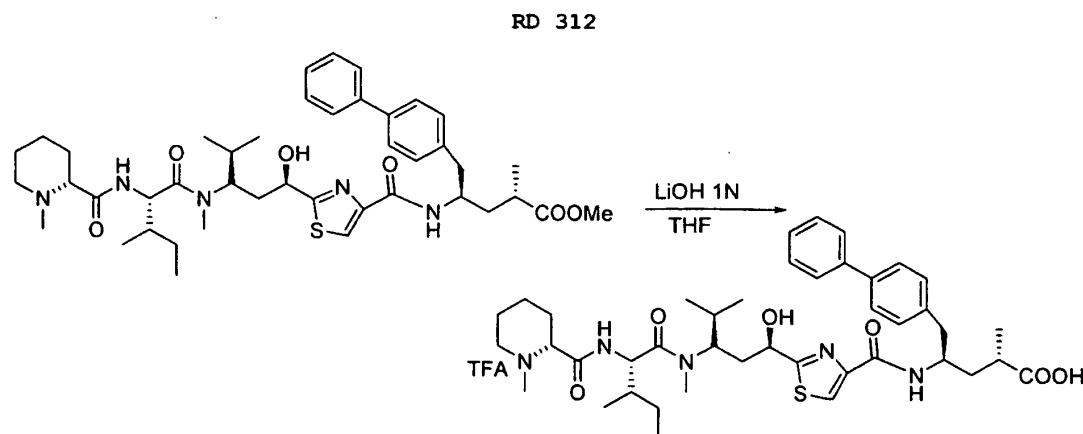
10

A una disolución de ácido (117 mg, 0,29 mmol) en DMF (5 mL) se añadieron HOAt (44 mg, 0,32 mmol), HATU (123 mg, 0,32 mmol) y Et_3N (86 μL , 0,62 mmol). Después de agitar durante 5 min se añadió una disolución de Phe-Tup (98 mg, 0,29 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó con H_2O (10 mL) y se extrajo con Et_2O (1 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1 N de HCl (1 x 15 mL), con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (1x 15 ml) y con salmuera (2 x 15 ml). Después de secar sobre Na_2SO_4 anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío para dar 189 mg de RD 49 puro (rendimiento del 96%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,29$ (Hex / AcOEt 1:1).

15

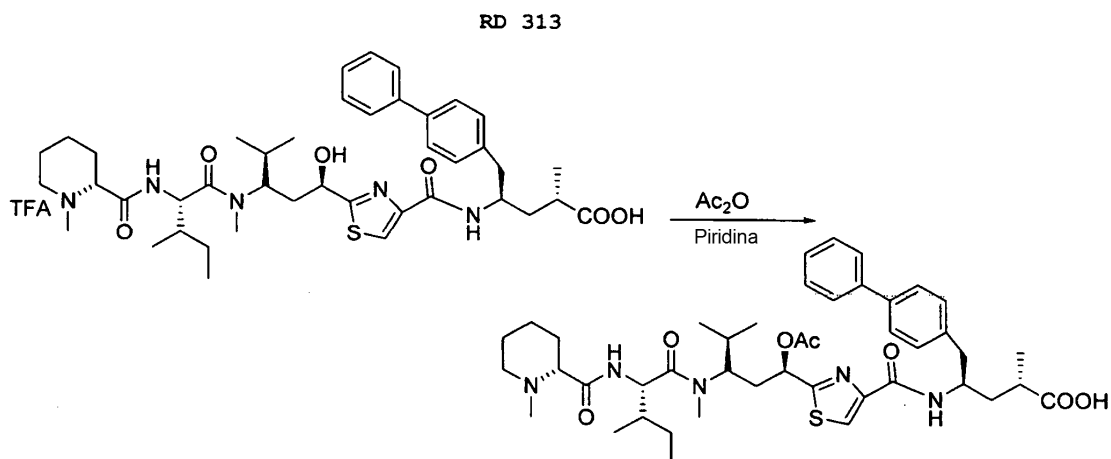


5 A una disolución de éster Mep pentafluorofenílico bruto (0,65 mmol) se añadieron RD 49 (176 mg, 0,26 mmol) y una cantidad catalítica de Pd/C. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (1 x 15 mL) y con salmuera (1 x 15 mL). Después de secar sobre Na_2SO_4 anhidro y de la filtración, el disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (Hex/AcOEt 1:1 para eluir impurezas menos polares, DCM:MeOH 9:1 para eluir el producto) para dar 158 mg RD 51 (rendimiento del 78%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,42$ (DCM/MeOH 9:1).



10 A una disolución de RD 51 (148 mg, 0,19 mmol) en THF (5 mL) se añadió una disolución acuosa 1 N de LiOH (57 μL , 0,57 mmol). La reacción se agitó durante 5 días y después se acidificó con TFA hasta que se alcanzó un pH de 1-2. La mezcla resultante se lavó con H_2O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se separó en vacío. El residuo se purificó mediante FC (DCM/MeOH 9:1), proporcionando 135 mg de MSR 312 (rendimiento del 83%) en forma de una espuma blanca. $R_f = 0,29$ (DCM/MeOH 9:1).

15



A una disolución de RD 312 (125 mg, 0,14 mmol) en piridina (2 mL) se añadió Ac₂O (1 mL) y la disolución se agitó durante una noche. El disolvente se evaporó y el producto bruto se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con H₂O (10 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (1 x 10 mL). El disolvente se separó en vacío y el producto bruto se purificó mediante FC (DCM:MeOH 9:1) para dar 70 mg de RD 313 (rendimiento del 62%) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,35 (DCM/MeOHt 9:1).

Ensayos de Actividad

La actividad de algunos compuestos de ejemplo representativos de acuerdo con la invención se ha determinado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Sembrar placas de 96 pocillos a una concentración de 5000 células/pocillo en un volumen de 100 μL con células A2780 (ovarios), HT-29 (colon), MDA-MB-231 (mama), NCI-H1299 (pulmón de células no pequeñas) MCF-7 (mama) o cualquier otra línea celular de cáncer disponible. Incubar durante 24 horas a 37°C.

Preparar una disolución madre de derivado de tubulisina disolviendo a razón de 10 mg/ml en metanol. Preparar diluciones de 1 mg/ml en metanol y 17 μg/ml (20 μM) en medio de cultivo celular, y hacer diluciones seriadas de 10 veces a 2 pM en medio de cultivo celular.

Añadir 100 μL de tubulisina a pocillos por triplicado para un intervalo de dosis final de 1 pM a 10 μM. Reserva tres pocillos para células "no tratadas" y tres pocillos de medio solo como un "espacio en blanco". Incubar las placas a 37°C durante 48 horas.

Preparar reactivo de ensayo MTS diluyendo CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega) 5 veces en PBS/glucosa (4,5 g/L). Aspirar medio de cultivo celular. Añadir una parte alícuota de 100 μL de reactivo MTS a cada uno de los pocillos. Incubar a 37°C durante 1-2 horas dependiendo de la línea celular.

Agitar las placas durante 5 minutos y medir la absorbancia a 485 nm utilizando un lector de placas (p. ej. Tecan). Introducir los datos en bruto en una hoja de cálculo Excel para obtener el % de supervivencia de las células para cada línea celular. Dosis gráfico (nM) frente a % de supervivencia celular y estimar Cl₅₀ de los gráficos.

Utilizar un ajuste logístico de 4 parámetros para obtener los valores de Cl₅₀:

$$y = (a-d) / (1 + (x / c)^b) + d$$

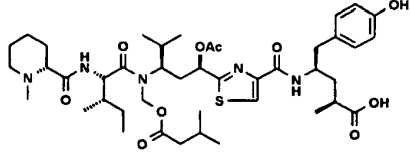
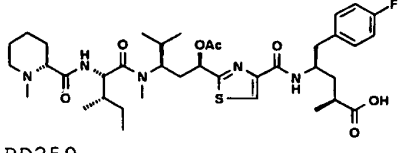
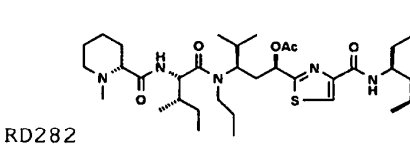
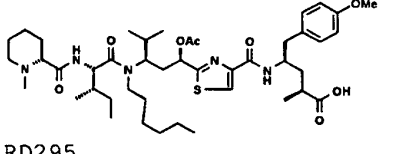
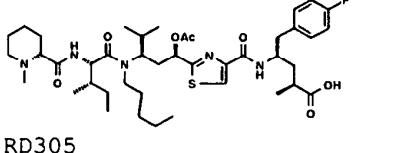
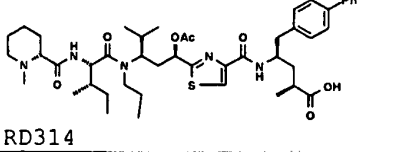
en donde x = dosis
 y = % de supervivencia celular
 a = asíntota inferior
 b = pendiente
 c = Cl₅₀
 d = asíntota superior

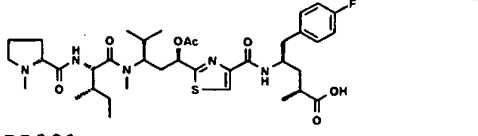
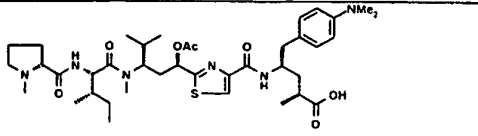
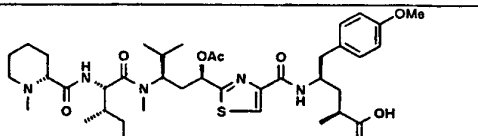
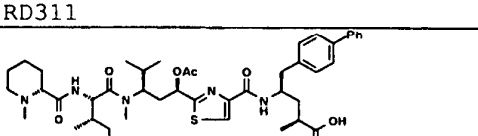
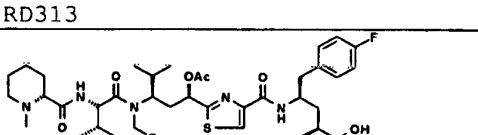
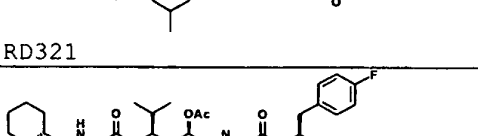
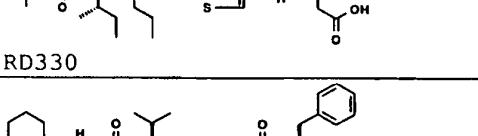
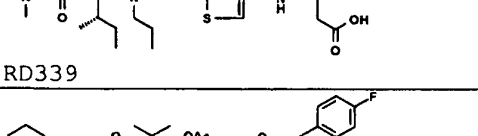
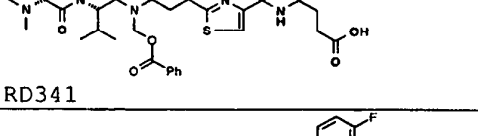
Introducir valores para x e y. Estimar los valores para a, b, c, y d. Ejecutar la herramienta solucionador de la suma de cuadrados de los errores al cuadrado. Minimizar la suma de errores al cuadrado variando los parámetros a través de d. Obtener la CI_{50} (nM) a partir del parámetro c.

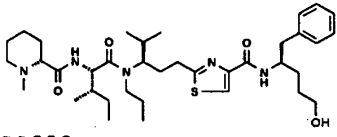
5

Tubulisin A ha sido utilizada como referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

| Compuesto | CI50 de la línea celular [nM] | | | |
|---|-------------------------------|---------------|-------------------|--------------|
|  <p>Tubulisin A (Referencia)</p> | HT-29 0,75 | A2780 0,8 | | MCF-7 0,6 |
|  <p>RD259</p> | HT-29 3,0 | A2780 0,8 | NCI-H1299 1,93 | |
|  <p>RD282</p> | HT-29 0,48 | A2780 0,30 | NCI-H1299 0,52 | MCF-7 0,4 |
|  <p>RD295</p> | HT-29 0,43 | | | |
|  <p>RD305</p> | HT-29 0,35 | | | MCF-7 0,6 |
|  <p>RD314</p> | HT-29 0,28 | | | MCF-7 0,4 |

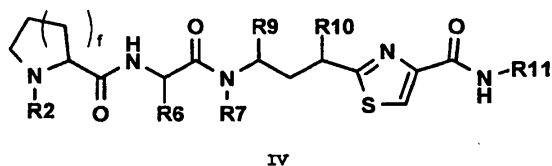
| | | | | |
|--|---------------|--------------|--|---------------|
|  <p>RD291</p> | HT-29 3,1 | | | MCF-7 1,1 |
|  <p>RD307</p> | HT-29 2,1 | A2780 0,7 | | |
|  <p>RD311</p> | HT-29 2,0 | A2780 0,8 | | MCF-7 0,6 |
|  <p>RD313</p> | HT-29 | A2780 | | |
|  <p>RD321</p> | HT-29 3,5 | A2780 0,9 | | MCF-7 1,1 |
|  <p>RD330</p> | HT-29 0,49 | A2780 0,3 | | |
|  <p>RD339</p> | HT-29 3,1 | A2780 1,1 | | |
|  <p>RD341</p> | HT-29 0,45 | | | MCF-7 0,4 |
|  <p>RD344</p> | HT-29 23,0 | | | MCF-7 15,2 |

| | | | | |
|--|----------------------|----------------------|--|--|
|  <p>RD353</p> | <p>HT-29 4,3</p> | <p>A2780 1,6</p> | | |
|--|----------------------|----------------------|--|--|

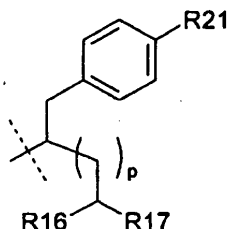
En general las nuevas moléculas de acuerdo con esta invención muestran una actividad contra varias líneas celulares de cáncer entre 0,03 y 60 nm.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (IV):



5 en donde
 R² es alquilo C₁-C₄,
 R⁶ es alquilo C₁-C₆,
 R⁷ es alquilo C₁-C₆, CH₂OR¹⁹ o CH₂OCOR²⁰, en donde R¹⁹ es alquilo, especialmente isopropilo, R²⁰ es
 10 alqueno C₂-C₆, fenilo o CH₂-fenilo,
 R⁹ es alquilo C₁-C₆,
 R¹⁰ es H, OH, O-alquilo u O-acetilo;
 f es 1 ó 2;
 R¹¹ tiene la siguiente estructura:



15 en donde
 R²¹ es H, OH, halógeno, NH₂, alquiloxi, fenilo, alquil-amino o dialquil-amino;
 R¹⁶ es H o un grupo alquilo C₁-C₆;
 R¹⁷ es CO₂H, CO₂R¹⁸, CONHNH₂, OH, NH₂, SH o un grupo alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo o
 20 heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, en donde R¹⁸ es un grupo alquilo, heteroalquilo o
 heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; y
 p es 0, 1, 2 ó 3;

o una sal farmacológicamente aceptable, un solvato, un hidrato o una formulación farmacológicamente aceptable del
 mismo, en donde la expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a grupos, en donde uno o varios átomos de H
 25 pueden estar reemplazados por F, Cl, Br o I, u OH, SH, NH₂, NO₂; la expresión "opcionalmente sustituido" se refiere,
 además, a grupos que pueden estar sustituidos exclusiva o adicionalmente con alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquinilo
 C₂-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₂-C₉, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo C₁-C₉, aralquilo C₇-C₁₂
 o heteroaralquilo C₂-C₁₁ no sustituido.

30 2. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, y opcionalmente uno
 o más soportes y/o adyuvantes.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación
 2, para uso en el tratamiento de tumores, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades
 35 inflamatorias y artritis reumatoide, así como modificaciones en la superficie de implantes de plástico o de metal, o para
 uso en el tratamiento de enfermedades cancerígenas.

4. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la
 reivindicación 2, para la preparación de conjugados que comprenden al menos un compuesto de Fórmula (IV) y una
 40 molécula biológica, p. ej. oligosacáridos o polisacáridos, anticuerpo monoclonal, lectina, PSA (antígeno específico de la
 próstata) o vectores peptídicos, hormonas, vitaminas, lípidos o un polímero sintético y, opcionalmente, también un
 enlazador o polímero de origen natural o no natural tal como un polímero pegilado, almidón, ciclodextrina o una mezcla
 de un polímero sintético con una molécula biológica.