

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 068**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/02** (2006.01)

**C07K 5/06** (2006.01)

**A61K 38/05** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11740837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2596008**

54 Título: **Análogos de tubulisina**

30 Prioridad:

**19.07.2010 EP 10007468**

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

**17.04.2015**

73 Titular/es:

**LEIBNIZ-INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE  
(IPB) (100.0%)**

**Stiftung des öffentlichen Rechts Weinberg 3  
06120 Halle (Saale), DE**

72 Inventor/es:

**WESSJOHANN, LUDGER A. y  
PANDO MOREJÓN, ORLANDO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 534 068 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).

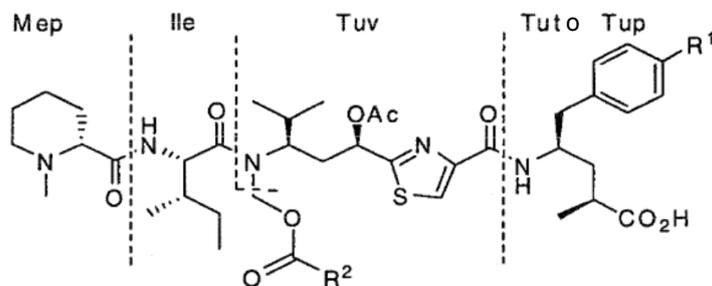
## DESCRIPCIÓN

## Análogos de tubulisina

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de tubulisina (análogos de tubulisina), así como a sus formulaciones farmacéuticas. La presente invención se refiere además al uso de tales compuestos para aplicaciones medicinales, agrícolas, bioherramientas o aplicaciones cosméticas. En particular, los nuevos análogos de tubulisina muestran un efecto citostático y pueden usarse por lo tanto para el tratamiento de trastornos proliferativos. El resto de amida terciaria de los análogos de tubulisina (denominados tubugis) conforme a la presente invención se genera mediante una reacción de tipo Ugi.

Las tubulisinas, una nueva clase de tetrapéptidos antimitóticos que inhiben considerablemente la proliferación de microtúbulos, fueron aisladas por primera vez a partir de cultivos mixobacterianos (F. Sasse *et al.*, *J. Antibiot.* 2000, 53, 879). Los factores de inhibición del crecimiento ( $GI_{50}$ ) que varían desde concentraciones nanomolares a picomolares, superando de 20 a 1000 veces las de agentes quimioterapéuticos bien conocidos como el Taxol o Vinblastina, y una alta actividad citotóxica sobre líneas celulares resistentes a múltiples fármacos, hacen que las tubulisinas sean protagonistas atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos (H. Steinmetz *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 4888).

## Fórmula (I)



Tubulisina A ,  $R^1 = OH$ ,  $R^2 = CH_2CH(CH_3)_2$   
 Tubulisina D ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = CH_2CH(CH_3)_2$

La tubulisina D de fórmula (I) es el miembro más potente de esta familia de citotoxinas. Estructuralmente, las tubulisinas están comprendidas por cuatro aminoácidos que constituyen la estructura básica de este tetrapéptido, como se representa en la fórmula (I): en el extremo C la tubufenilalanina (Tup) o tubutirosina (Tut), el complejo de tubuvalina (Tuv) como el núcleo central, L-isoleucina (Ile), y el ácido D-N-metil-pipecólico hidrófobo (Mep) como aminoácido en el extremo N. Una funcionalidad de éster de N,O-acetal de amida inusual, que hace la parte media de la molécula extremadamente poblada, está también presente. En general, las tubulisinas naturales que llevan esta funcionalidad tienen la mayor actividad citotóxica.

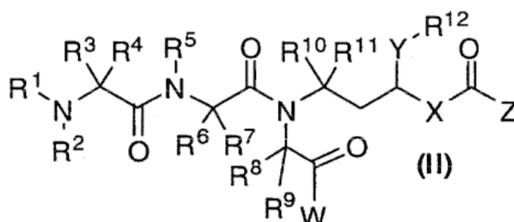
Desde el punto de vista sintético, este raro motivo químico representa un gran desafío, y solamente unos pocos grupos han tenido éxito en su introducción durante la síntesis total de tubulisinas (H. M. Peltier *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 16019; y O. Pando *et al.*, *Org. Lett.*, 2009, 11, 5567). Hasta la fecha, se han propuesto varios métodos para la síntesis de tubulisinas (documentos de patente DE 10008089, DE 10254439, DE 19638870, EP 1562979, EP 2028185, US 2005/0239713, DE 10230872, WO 2004/046170, WO 2009/055562) y análogos y/o conjugados de tubulisina (documentos de patente DE 10230874, DE 10230875, DE 10305531, DE 10 2004 030227, US 2010/0048490, WO 2004/005269, WO 2004/005326, WO 2004/005327, WO 2008/138561, WO 2009/012958, WO 2009/134279, WO 2010/034724).

Sin embargo, debido a los desafíos sintéticos, estos métodos proporcionan de manera general las tubulisinas y/o sus análogos en relativamente pequeñas cantidades. Además, han de usarse reactivos electrófilos extremadamente tóxicos durante la preparación de las tubulisinas y/o sus análogos. Además, los análogos de la tubulisina que no tienen la funcionalidad N,O-acetal, muestran de manera común actividades citotóxicas inferiores cuando se comparan con, por ejemplo, la tubulisina D.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva generación de compuestos de tubulisina altamente citotóxicos, que pueden sintetizarse fácilmente en alto rendimiento, evitando al mismo tiempo el uso de reactivos electrófilos altamente tóxicos. Los nuevos compuestos deben ser capaces de formar compuestos conjugados con biomoléculas, para una administración orientada al objetivo, y/o con restos moleculares que puedan mejorar la solubilidad, penetración, liberación o selectividad (por ejemplo, selectividad tisular).

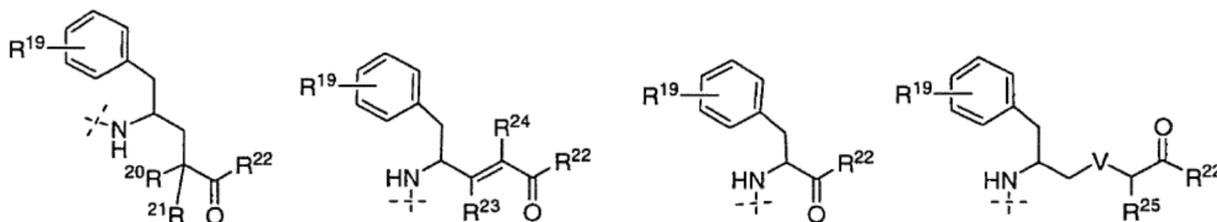
Se proporciona la solución a los objetivos anteriores mediante las realizaciones que se caracterizan en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención proporciona análogos de tubulicina con una estructura tetrapeptídica terciaria (denominados tubugis) de fórmula general (II):



en la que:

W es un grupo seleccionado de  $OR^{13}$  o  $NR^{14}R^{15}$ ,  
 X es un anillo aromático (arileno) o heteroaromático (heteroarileno) sustituido de cinco o seis miembros, preferiblemente tiazol u oxazol,  
 Y es H,  $-CH_2-$ , NH, NMe, un átomo de azufre o un átomo de oxígeno, preferiblemente un átomo de oxígeno,  
 Z es un grupo seleccionado de  $OR^{16}$ ,  $NR^{17}R^{18}$  o:



$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{13}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{20}, R^{21}, R^{23}, R^{24}$  y  $R^{25}$ , cada uno representa independientemente H, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y en el que  $R^1$  y  $R^3$  o  $R^1$  y  $R^2$  pueden unirse para formar junto con el átomo de nitrógeno un anillo de pirrolidina de cinco miembros o un anillo de piperidina de seis miembros,

$R^{12}$  es H, un grupo de acilo (C(O)R), un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, siendo R un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, o un arilo sustituido o sin sustituir,

$R^{19}$  representa H, halógeno, nitro, amina, grupo de monoalquilamina o dialquilamina, hidroxilo, alquilo, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en las posiciones 2 y/o 3 y/o 4, y/o 5, y/o 6, o en cualquier combinación,

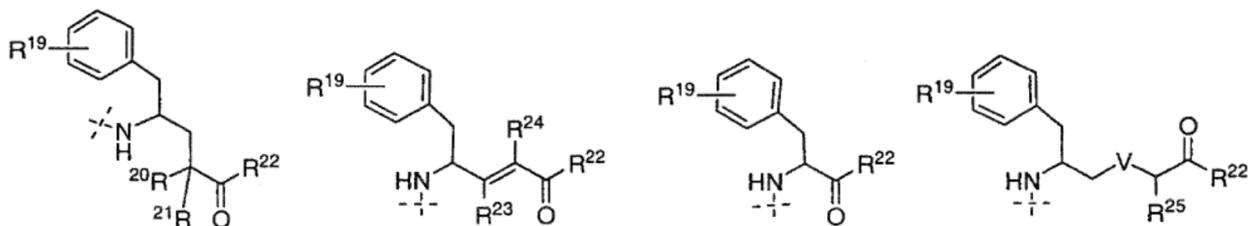
$R^{22}$  representa OH,  $NH_2$ , alquilo, grupo alquilamino o dialquilamino, o un conector, V es un átomo de azufre u oxígeno,  $-CH_2-$ , NH o grupo de NH-alquilo, y sales, hidratos, solvatos, estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros y sus polimorfos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se refiere a los tubugis de fórmula (II) conjugados con biomoléculas para una administración orientada al objetivo. Una biomolécula se define como un péptido, proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, (oligo)sacárido, (poli)sacárido, ácido nucleico, hormona o ligante a receptores de hormonas, o vitamina. Un conector puede actuar como mediador en la conjugación.

La presente invención también se refiere a los tubugis de fórmula (II) conjugados con restos moleculares que pueden mejorar la solubilidad, penetración, detección, liberación o selectividad (por ejemplo, selectividad tisular) de los tubugis. Tales restos son, por ejemplo, polietilenglicoles, poliaminas, poliguanidinas, tintes, o ligandos a receptores, o polímeros que son capturados de manera preferente por tejidos específicos debido a su tamaño y forma y/o que permiten una liberación definida. Un conector puede actuar como mediador en la conjugación.

En una realización de la presente invención, tal conector puede comprender una cadena alifática





5  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{23}$ ,  $R^{24}$  y  $R^{25}$ , cada uno representa independientemente H, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y en el que  $R^1$  y  $R^3$  pueden unirse para formar junto con el átomo de nitrógeno un anillo de pirrolidina de cinco miembros o un anillo de piperidina de seis miembros,

10  $R^{12}$  es H, un grupo de acilo (C(O)R), un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, siendo R un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, o un arilo sustituido o sin sustituir,

15  $R^{14}$ ,  $R^{16}$  es un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, o un grupo O-protector usual,

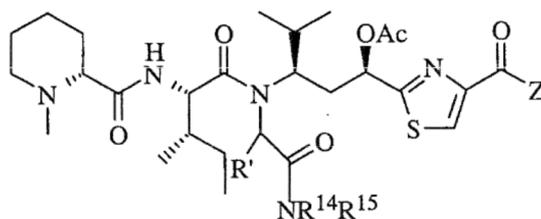
20  $R^{19}$  representa H, halógeno, nitro, amina, grupo de monoalquilamina o dialquilamina, hidroxilo, alquilo, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en las posiciones 2 y/o 3 y/o 4, y/o 5, y/o 6, o en cualquier combinación,

25  $R^{22}$  representa  $NH_2$ , alquilo, grupo alquilamino o dialquilamino, o un conector, V es un átomo de azufre u oxígeno,  $-CH_2-$ , NH o grupo de NH-alquilo.

30 Conforme a la presente invención, se ha encontrado que la introducción de una cadena principal peptídica en vez de la funcionalidad lábil *N,O*-acetal de las tubulinas naturales, como se muestra en la fórmula (I), por medio de una reacción de tipo Ugi como la etapa clave, conduce sorprendentemente a una nueva generación de tetrapéptidos terciarios (tubugis) con retención de la actividad citotóxica, y una biodisponibilidad mejorada. Adicionalmente, los tubugis muestran una mejor estabilidad a la hidrólisis que las tubulinas. La reacción de Ugi de cuatro componentes (Ugi-4CR) es una condensación en un solo reactor de una amina primaria, un componente oxo, un ácido carboxílico y un isocianuro, para proporcionar una cadena principal dipeptídica sustituida en *N*. La Ugi-4CR proporciona un método muy directo para la introducción de tanto la diversidad como la complejidad molecular, surgiendo la posibilidad de usar diferentes componentes carboxi, oxo, isociano o amino en un procedimiento en un solo reactor altamente eficaz en átomos, generando simplemente agua como subproducto, como se representa en la figura 1. Para más ilustración, la figura 2 muestra una reacción múltiple secuencial de múltiples componentes que ejemplifica la síntesis de tubugis conforme a la presente invención.

35 Conforme a la presente invención, se prefieren tubugis de fórmula general (II), en la que Y es un átomo de oxígeno y X es un tiazol u oxazol, particularmente un tiazol. Los compuestos tubugis conforme a la presente invención, en los que  $R^1$  y  $R^3$  en la fórmula (II) están unidos para formar junto con el átomo de nitrógeno un resto de piperidina, son incluso más preferidos. En otra realización, Z es preferiblemente tubufenilalanilo (Tup) o tubutirosilo (Tut), más preferiblemente Z es tubufenilalanilo (Tup). En una realización adicional, W es preferiblemente  $NR^{14}R^{15}$ . En una realización aún más preferida conforme a la presente invención, en dicha fórmula (II) X es un resto de tiazol u oxazol,  $R^1$  y  $R^3$  están unidos para formar un resto de piperidina, Z es tubufenilalanilo (Tup), y W es  $NR^{14}R^{15}$ .

45 Conforme a la presente invención, los compuestos con la siguiente fórmula (III) son particularmente preferidos:



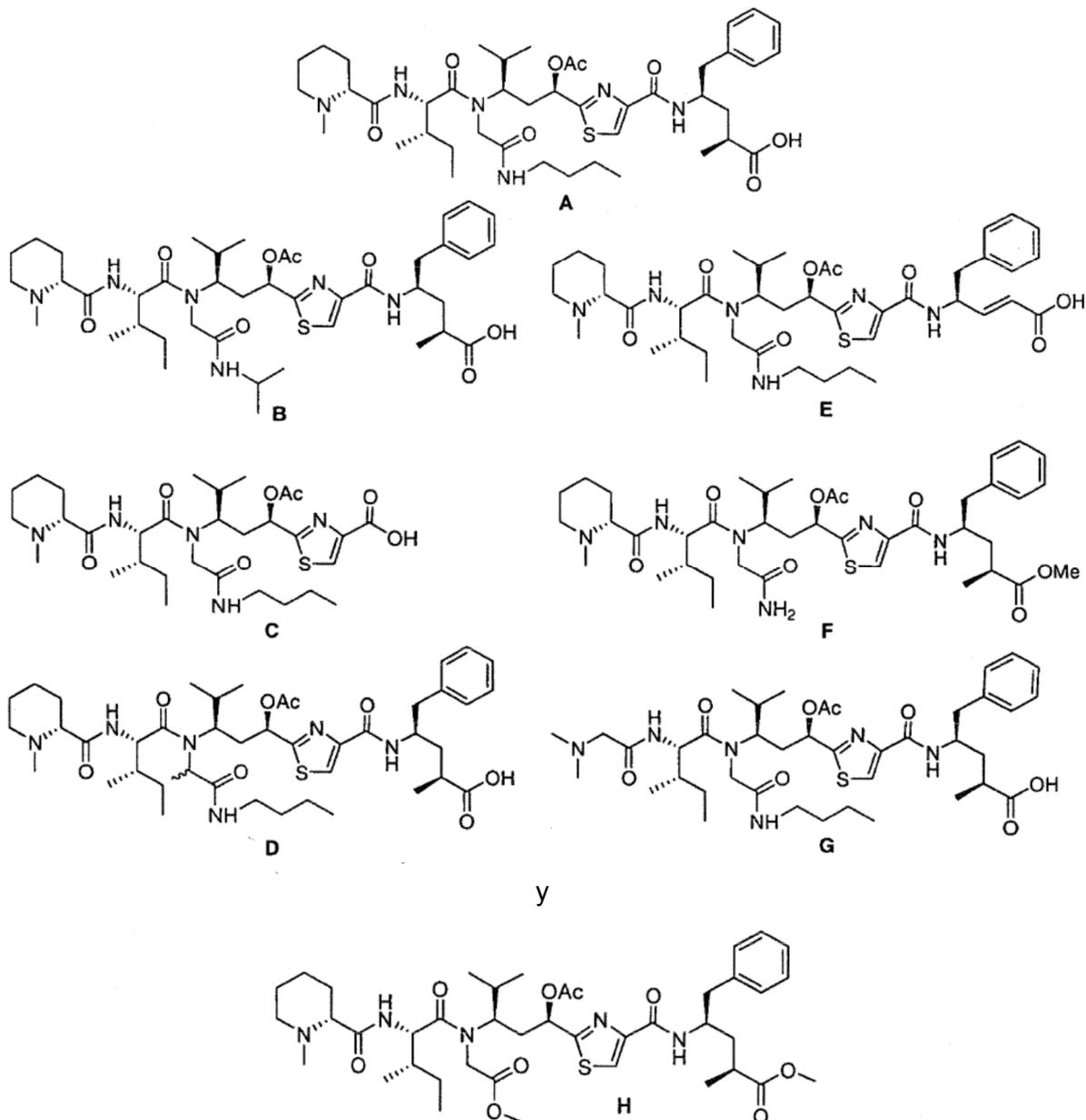
(III)

en la que:

R' es H o un grupo de metilo,

R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> y Z se definen como anteriormente, en la que Z, siendo tubufenilalanilo (Tup), es lo más preferido.

- 5 Conforme a la presente invención, los compuestos de A a H como como se dan a continuación en la siguiente memoria son aún más preferidos, en particular los compuestos A, B y D.



- 10 Los tubugis de la fórmula general (II) o (III), respectivamente, conforme a la presente invención, representan el primer ejemplo de síntesis basada en reacciones múltiples secuenciales de múltiples componentes de compuestos relacionados con productos naturales de esta clase.

- 15 Lo siguiente son definiciones de expresiones usadas en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones. La definición inicial proporcionada para un grupo o expresión en la presente memoria se aplica a ese grupo o expresión a lo largo de toda la memoria descriptiva y reivindicaciones, individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique de otra manera.

La expresión “alquilo” se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono. Grupos de alquilo inferior, esto es, grupos alquílicos de 1 a 4 átomos de carbono, son los más preferidos.

5 La expresión “alquilo sustituido” se refiere a un grupo alquílico como se ha definido anteriormente que tiene uno, dos, o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo (por ejemplo, trifluorometilo), alqueno, alqueno sustituido, alquino, nitro, ciano, oxo (=O), OR<sub>a</sub>, SR<sub>a</sub>, (=S),  
 10 -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -N(alquilo)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NR<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>, -NR<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>c</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sub>c</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>C(=O)R<sub>b</sub>, SO<sub>3</sub>H,  
 -PO(OH)<sub>2</sub>, -C(=O)R<sub>a</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sub>a</sub>, -C(=O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -C(=O) (alqueno C<sub>1-4</sub>)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -C(=O)NR<sub>a</sub>(SO<sub>2</sub>)R<sub>b</sub>,  
 15 -CO<sub>2</sub>(alqueno C<sub>1-4</sub>)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -NR<sub>a</sub>C(=O)R<sub>b</sub>, -NR<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>b</sub>, -NR<sub>a</sub>(alqueno C<sub>1-4</sub>)CO<sub>2</sub>R<sub>b</sub>, =N-OH, =N-O-alquilo, arilo, cicloalquilo, heterociclo, y/o heteroarilo, en el que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> se seleccionan de hidrógeno, alquilo, alqueno, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>(alquilo), cicloalquilo C<sub>3-7</sub>, fenilo, bencilo, feniletilo, naftilo, un heterociclo de cuatro a siete miembros, o un heteroarilo de cinco a seis miembros, o cuando están unidos al mismo átomo de nitrógeno pueden unirse para formar un heterociclo o heteroarilo, y R<sub>c</sub> se selecciona a partir de los mismos grupos que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub>, pero no es hidrógeno.

20 Cuando la expresión “alquilo” se usa junto con otro grupo, tal como en “arilalquilo”, esta conjunción define con más especificidad al menos uno de los sustituyentes que contendrá el alquilo sustituido. Por ejemplo, “arilalquilo” se refiere a un grupo alquílico sustituido como se ha definido anteriormente, en el que al menos uno de los sustituyentes es un arilo, tal como bencilo.

25 La expresión “alqueno” se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada que tienen de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los más preferidos son grupos alquénicos de 2 a 6 átomos de carbono y con un doble enlace.

30 La expresión “alquino” se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada que tienen de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los más preferidos son grupos alquínicos de 2 a 6 átomos de carbono y con un triple enlace.

35 La expresión “alqueno bivalente” se refiere a grupos hidrocarbonados bivalentes de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono. Los más preferidos son grupos de alqueno inferior, esto es, grupos de alqueno de 1 a 4 átomos de carbono. Las expresiones “alqueno bivalente” y “alquino bivalente” se refieren a radicales bivalentes de grupos alquénicos y alquínicos, respectivamente, como se ha definido anteriormente.

40 Cuando se hace referencia a un grupo de alqueno, alquino, alqueno bivalente, alqueno bivalente o alquino bivalente, estos grupos están sustituidos con de uno a tres sustituyentes, como se ha definido anteriormente para grupos alquílicos sustituidos.

45 La expresión “cicloalquilo” incluye tales anillos con cero, uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo de sustituyentes que se ha dado anteriormente en la memoria descriptiva para grupos alquílicos sustituidos. La expresión “cicloalquilo” incluye también tales anillos con un segundo anillo fusionado a él (por ejemplo, que incluyen anillos benzo, heterociclo o heteroarilo), o con un puente de carbono-carbono de 3 a 4 átomos de carbono. Por lo tanto, la expresión “cicloalquilo” incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

La expresión “halo” o “halógeno” se refiere a cloro, bromo, fluro y yodo.

50 La expresión “haloalquilo” quiere decir un alquilo sustituido con uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo, “haloalquilo” incluye mono, bi y trifluorometilo.

La expresión “haloalcoxi” quiere decir un grupo de alcoxi con uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo, “haloalcoxi” incluye OCF<sub>3</sub>.

55 La expresión “arilo” se refiere particularmente a fenilo, bifenilo, 1-naftilo y 2-naftilo. La expresión “arilo” incluye tales anillos con cero, uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que se ha definido anteriormente para grupos alquílicos sustituidos. Un grupo arílico preferido es fenilo opcionalmente sustituido.

60 Las expresiones “heterociclo” o “heterocíclico” se refiere a grupos monocíclicos de 3 a 7 miembros, grupos bicíclicos de 7 a 11 miembros y grupos tricíclicos de 10 a 15 miembros, no aromáticos, sustituidos y sin sustituir, en los que al menos uno de los anillos tiene al menos un heteroátomo (O, S o N). Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre, y/o de uno a cuatro átomos de nitrógeno, a condición de que el número total de heteroátomos en cada anillo sea cuatro o inferior, y a condición además de que el anillo contenga al menos un átomo de carbono. Los anillos fusionados que completan grupos bicíclicos y tricíclicos pueden contener sólo átomos de carbono, y pueden ser saturados, parcialmente saturados, o insaturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. El grupo heterocíclico puede estar unido a cualquier átomo de nitrógeno o carbono

disponible. Grupos monocíclicos ilustrativos incluyen azetidino, pirrolidino, oxetano, imidazolinilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahidrofuranilo, piperidilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidilo, 2-oxopirrolodino, 2-oxoazepinilo, azepinilo, 4-piperidonilo, tetrahidropirano, morfolinilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido, tiamorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano, y similares.

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada de ningún modo a tales ejemplos específicos.

La invención está definida mediante las reivindicaciones adjuntas.

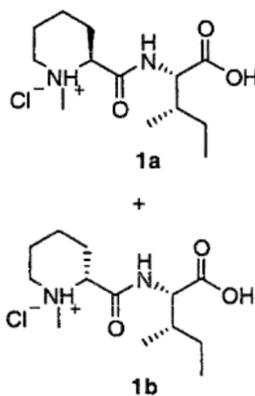
#### Cultivo celular y citotoxicidad:

Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de próstata humano (PC-3) y líneas celulares de cáncer de colon humano (HT-29) de la Colección Alemana de Microorganismos. Todas las líneas celulares se cultivaron en condiciones recomendadas por sus depositantes respectivos. Se llevaron a cabo las determinaciones de citotoxicidad y  $GI_{50}$  sobre ambas líneas celulares PC-3 y HT-29 empleando un ensayo de proliferación celular con MTT (D. A. Scudiero *et al.*, Cancer. Res. 48, 4827-4833 (1988)). Ambas líneas celulares se mantuvieron en un medio RPMI 1640, complementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de L-alanil-L-glutamina (200 mM), 1% de penicilina/estreptomicina y 1,6% de HEPES (1 M). Se sembraron durante la noche en placas de cultivo celular de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza), para líneas celulares PC-3 500 células por pocillo y para líneas celulares HT-29 1500-2000 células por pocillo, y se expusieron a diluciones en serie de cada inhibidor durante 3 días. Se determinó la formación de la sal de Formazan a 490 nm, usando un lector de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) MRX TC II (DYNEX technologies). Se prepararon a partir de cada compuesto cuatro reproducciones.

#### Procedimiento general para la reacción de Ugi-4CR

A una disolución de la amina libre (0,24 mmoles, 1 eq.) en MeOH (3 ml) se añadió lentamente una suspensión del componente de carbonilo (0,24 mmoles, 1 eq.) en MeOH (3 ml) usando una bomba de jeringa durante un periodo de 2 h. Posteriormente, se añadió el componente ácido (0,6 moles, 2,5 eq.), la reacción se agitó durante 10 min y después se añadió una disolución del componente de isocianuro (0,24 mmoles, 1 eq.) en MeOH (3 ml) durante un periodo de 3 h, usando una bomba de jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 6 h más, y el disolvente se retiró luego a presión reducida. Una cromatografía en columna rápida proporcionó el compuesto de fórmula (IV).

#### Preparación de Mep-Ile-OH 1b:

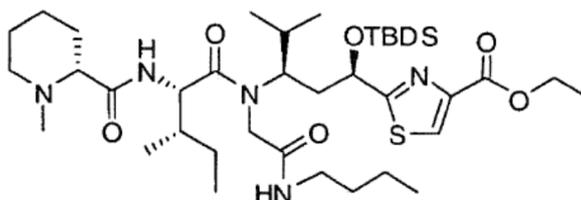


A una disolución del 4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octil (OBO) éster de isocianuro de isoleucina (225 mg, 1 mmol) en MeOH (7 ml) se añadió una disolución etanólica recién preparada de  $\Delta^1$ -piperidina (concentración máxima, 0,4 M, 20 ml). Después, se añadió gota a gota  $CF_3COOH$  (101  $\mu$ l, 1,5 moles), y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h. Posteriormente, se añadió una cantidad adicional de  $CF_3COOH$  (101  $\mu$ l, 1,5 mmoles), y la agitación se mantuvo durante un periodo de 30 min. El disolvente se retiró luego a presión reducida y el aceite resultante se disolvió en una mezcla de THF/ $H_2O$  (10 ml, 4:1 v/v). Luego, se añadió una disolución de NaOH (400 mg, 10 mmoles) en agua (15 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h. La mezcla de reacción se trató luego con una disolución acuosa concentrada de HCl (37%) hasta lograr un pH = 7-8. Después, la mezcla alcalina se neutralizó con resina DOWEX 50 W x 2 (forma  $H^+$ ), se filtró, y el disolvente se retiró a presión reducida. El producto crudo resultante se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

El aceite obtenido anteriormente se disolvió en una mezcla de MeOH/ $H_2O$  (20 ml, 3:1 v/v). Se añadió paraformaldehído (300 mg, 10 mmoles) y  $Pd(OH)_2$  al 20%/C (106 mg, 0,1 mmoles de Pd). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de hidrógeno durante un periodo de 16 h, y después se filtró sobre Celite. El disolvente se retiró luego a presión reducida. La mezcla resultante de diastereoisómeros (una razón de aproximadamente 1:1) se

resolvió mediante cromatografía en columna rápida (CH<sub>3</sub>COOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O, 7/2/1). Los dos diastereoisómeros se recogieron por separado, y las fracciones se concentraron de manera independiente, y se filtraron sobre un filtro de jeringa RC de 0,22 µm. El disolvente se retiró luego a presión reducida. Los aceites resultantes se situaron en matraces diferentes, y cada uno se disolvió en THF/H<sub>2</sub>O (6 ml, 1:1 v/v). Ambas disoluciones se acidificaron luego hasta pH = 2 con una disolución acuosa concentrada de HCl (37%). La agitación se mantuvo durante 5 min. Después, el THF en ambos casos se retiró a presión reducida. Las disoluciones acuosas resultantes se extrajeron con *n*-butanol (3 x 3 ml). Las fracciones orgánicas recogidas por separado se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el disolvente se retiró a presión reducida. Los dos sólidos se secaron luego a alto vacío durante un periodo de 2 h, para proporcionar 105 mg (0,36 mmoles, rendimiento total de 36%) del diastereoisómero menos polar **1a** *Rf* = 0,38 CH<sub>3</sub>COOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O, 5/4/1), y 91 mg (0,31 mmoles, rendimiento total de 31%) del diastereoisómero más polar **1b** *Rf* = 0,17 CH<sub>3</sub>COOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O, 5/4/1). La asignación estereoquímica inequívoca de los diastereoisómeros **1a** y **1b** se llevó a cabo por comparación de sus *Rf* respectivos y valores de rotación óptica específica con los de la sal de hidrocloreuro de Mep-Ileu-OH, sintetizada mediante acoplamiento peptídico clásico en cuatro etapas. No se encontraron diferencias significativas después de una comparación de los espectros de ambos diastereoisómeros. Los espectros de RMN probaron que eran dependientes de pH. Para el diastereoisómero con la estereoquímica natural **1b**: <sup>1</sup>H-RMN (399,9 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 0,92 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,26-1,36 (m, 1H), 1,43-1,54 (m, 1H), 1,63-1,99 (m, 6H), 2,12-2,16 (m, 1H), 2,83 (s, 3H), 3,16 (td, 1H, *J* = 12,3/2,6 Hz), 3,50-3,55 (d, 1H, *J* = 12,9 Hz), 4,03 (dd, 1H, *J* = 11,7/2,9 Hz), 4,32 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz) ppm. HRMS (espectrometría de masas de alta resolución, del inglés "high resolution mass spectrometry") calculado para C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 257,1861, encontrado: 257,1863.

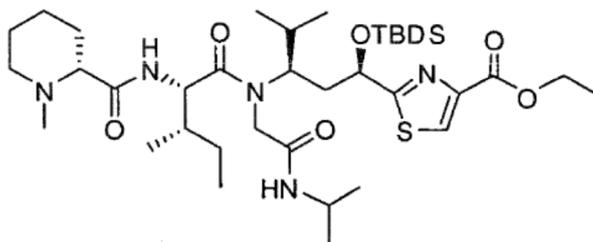
### Compuesto 2:



A una disolución del éster etílico de *N*-Boc tubuvalina (82 mg, 0,22 mmoles) en DMF (1 ml) se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (TBDSCl) (83 mg, 0,55 mmoles, 2,5 eq.) e imidazol (2,5 eq.) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, se agitó durante la noche y se diluyó con éter (3 ml). La mezcla se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (2 x 5 ml) y salmuera (2 x 5 ml). Las capas se separaron, y la parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida hasta sequedad. El producto crudo resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml), la disolución se enfrió a 0°C y se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (0,25 ml). La mezcla se agitó y se siguió cuidadosamente la evolución de la reacción mediante cromatografía en capa fina (TLC) hasta que se consumió el material de partida (aproximadamente en 4 h). La mezcla de concentró luego a presión reducida, y el aceite resultante se redisolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml). La disolución se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (3 x 5 ml) y salmuera (3 x 5 ml). Las capas se separaron, y la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se retiró a presión reducida. El material crudo se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

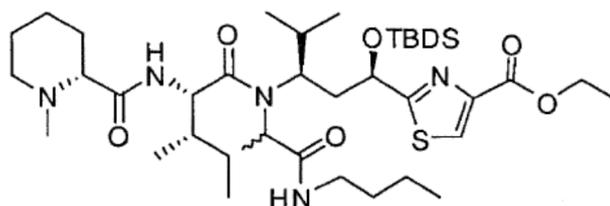
A una disolución de la amina libre obtenida anteriormente en MeOH seco (3 ml), se añadió lentamente una suspensión de formaldehído (7,2 mg, 0,24 mmoles) en MeOH (3 ml) usando una bomba de jeringa durante un periodo de 2 h. Posteriormente, se añadió **1b** (154 mg, 0,6 moles), la reacción se agitó durante 10 min y después se añadió una disolución de isocianuro de *n*-butilo (27 µl, 0,24 mmoles) en MeOH (3 ml) durante un periodo de 3 h, usando una bomba de jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 6 h más, y el disolvente se retiró luego a presión reducida. Una cromatografía en columna rápida (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N, 30:1:0,3 v/v/v) proporcionó 69 mg (0,091 mmoles, 41% de rendimiento para las tres etapas) del peptoide **2** como un aceite amarillo. Se observó una mezcla de confómeros mediante RMN (razón estimada de 4:1). Las señales asignadas pertenecen al confómero principal. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>): δ = -0,07 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0,17 (s, 3H), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0,78 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 0,90 (d, 6H, *J* = 7,8 Hz), 0,93 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0,98 (t, 6H, *J* = 6,6 Hz), 1,14 (m, 1H), 1,31-1,35 (m, 3H), 1,39 (t, 3H, *J* = 7,8 Hz), 1,44-1,51 (m, 4H), 1,59-1,69 (m, 5H), 1,98-2,09 (m, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,44-2,46 (m, 1H), 2,87-2,88 (m, 2H), 3,21-3,25 (m, 1H), 3,29-3,33 (m, 1H), 3,67 (d, 1H, *J* = 17,2 Hz), 4,35-4,45 (m, 6H), 5,10 (m, 1H), 7,0 (d, 1H), 8,06 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SSi [M+H]<sup>+</sup>: 738,4654, encontrado: 738,4658.

### Compuesto 3:



Se trató el éster etílico de la *N*-Boc tubuvalina (70 mg, 0,19 mmoles) con TBDSCI (72 mg, 0,48 mmoles), seguido de desprotección de Boc y la reacción Ugi-4CR, empleando formaldehído (21 mg, 0,20 mmoles), **1b** (123 mg, 0,48 mmoles) e isocianuro de isopropilo (19  $\mu$ l, 0,20 mmoles) de un modo similar al descrito para la síntesis del peptoide **2**, para proporcionar 49 mg (0,068 mmoles, 35% de rendimiento para las tres etapas) de peptoide **3** como un aceite amarillo, después de una columna en cromatografía rápida ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ , 30:1:0,3 v/v/v). Se observó una mezcla de confórmeros mediante RMN (razón estimada de 2:1). Las señales asignadas pertenecen a la mezcla de confórmeros.  $^1\text{H}$ -RMN (599,8 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}_3$ ):  $\delta$  = -0,09 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), -0,08 (s, 1,5H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0,15 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0,17 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0,78 (d, 3H,  $J$  = 6,6 Hz), 0,84-0,88 (m, 9H,  $J$  = 7,8 Hz), 0,93 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0,95 (s, 4,5H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0,98 (t, 4,5H,  $J$  = 6,6 Hz), 1,08 (d, 1,5H,  $J$  = 6,4 Hz), 1,13-1,16 (m, 6H), 1,19 (d, 3H,  $J$  = 6,4 Hz), 1,39 (t, 4,5H,  $J$  = 7,2 Hz), 1,60-1,71 (m, 5H), 1,78-1,87 (m, 3H), 1,98-2,03 (m, 3H), 2,05 (s, 1,5H), 2,06-2,13 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,40-2,51 (ma, 1H), 2,85-2,93 (ma, 1H), 3,64 (d, 1,5H,  $J$  = 17,4 Hz), 3,79-3,86 (ma, 0,5H), 3,93-4,0 (ma, 1H), 4,04-4,15 (m, 2,5H), 4,34-4,46 (m, 6H), 4,64 (d, 0,5H,  $J$  = 9,1 Hz), 5,15 (m, 1H), 5,20 (dd, 0,5H,  $J$  = 9,7/1,9 Hz), 8,07 (s, 1H), 8,11 (s, 0,5H) ppm. HRMS calculado para  $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_6\text{SSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 724,4498, encontrado: 724,4486.

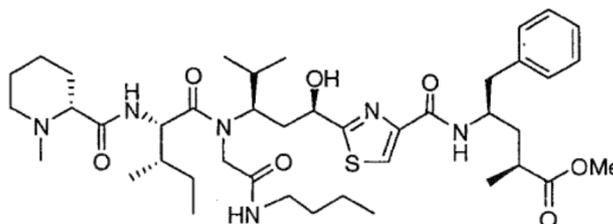
#### Mezcla diastereomérica 4



Se trató el éster etílico de la *N*-Boc tubuvalina (100 mg, 0,27 mmoles) con TBDSCI (101 mg, 0,68 mmoles) seguido de desprotección de Boc y la reacción Ugi-4CR, empleando etanal (9  $\mu$ l, 0,3 mmoles), **1b** (174 mg, 0,68 mmoles) e isocianuro de *n*-butilo (34  $\mu$ l, 0,3 mmoles) de un modo similar al descrito para la síntesis del compuesto **2**, para proporcionar 105 mg (0,14 mmoles, 52% de rendimiento para las tres etapas) de la mezcla diastereomérica **4** como un aceite amarillo, después de una columna en cromatografía rápida. Se pueden distinguir dos confórmeros de cada diastereoisómero mediante RMN. Las señales asignadas pertenecen a la mezcla completa.  $^1\text{H}$ -RMN (399,9 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}_3$ ):  $\delta$  = -0,18-0,15 (m, 21H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0,25 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0,81-0,95 (m, 72H), 0,96-1,17 (m, 28H), 1,22-1,42 (m, 32H), 1,48-1,90 (m, 28H), 1,92-2,09 (m, 8H), 2,16-2,19 (m, 12H), 2,22-2,48 (m, 8H), 2,81-2,94 (m, 4H), 3,0-3,11 (m, 4H), 3,18-3,34 (m, 7H), 3,40-3,51 (m, 1H), 3,82-4,01 (m, 4H), 4,07-4,13 (m, 2H), 4,20-4,42 (m, 10H), 4,46 (sa, 1H), 4,54-4,60 (sa, 1H), 4,65-4,70 (m, 2H), 4,73-4,81 (sa, 1H), 4,95-5,04 (m, 2H), 5,25-5,28 (m, 1H), 5,36-5,40 (m, 1H), 8,04-8,14 (4s, 4H) ppm. HRMS calculado para  $\text{C}_{38}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_6\text{SSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 752,4811, encontrado: 752,4805.

#### Procedimiento general para los compuestos 5, 6 y 7:

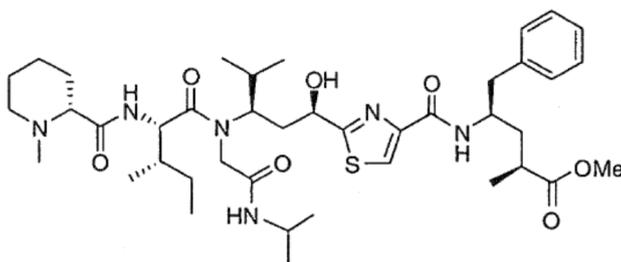
##### Compuesto 5:



Se disolvió el silil éter **2** (24 mg, 32,8  $\mu$ moles) en TFA/THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml, 2:2:1 v/v/v) y se agitó a temperatura ambiente durante 36 h. La mezcla se concentró luego a presión reducida y el aceite resultante se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , que se destiló para retirar el TFA de manera azeotrópica. Este procedimiento se repitió varias veces. Después, el material crudo se disolvió en THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1 ml, 2:1 v/v) y se añadió LiOH (2,0 mg, 82  $\mu$ moles, 2,5 eq.) a 0°C. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente, se agitó 8 h y se acidificó con  $\text{NaHSO}_4$  acuoso al 10% hasta

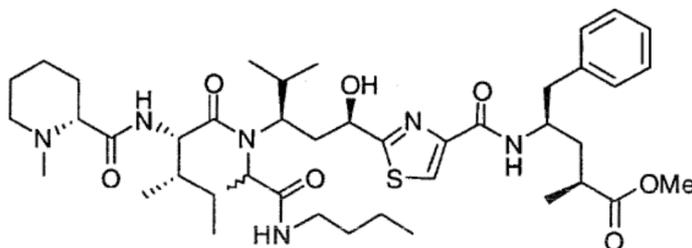
pH 4. La mezcla se diluyó con AcOEt (1 ml), las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida. El ácido resultante se añadió a una disolución 0,2 M de pentafluorofenol (PFP, 1,4 mg, 7,3  $\mu$ moles) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 1,1  $\mu$ l, 7,3  $\mu$ moles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0°C. Se dejó que la disolución alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. Después, el disolvente se retiró a presión reducida. Se añadió AcOEt (1 ml) a la mezcla, y la suspensión resultante se filtró con succión, para proporcionar el ácido activado deseado en las aguas de filtrado. Se retiró el AcOEt a presión reducida; se añadió DMF (0,5 ml), seguido de la sal de hidrocloreto del éster metílico de la tubufenilalanina (25 mg, 98,4  $\mu$ moles) y diisopropiletilamina (17  $\mu$ l, 98,4  $\mu$ moles). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, y luego se retiró la DMF a presión reducida. La purificación del producto crudo en HPLC de fase inversa proporcionó 15 mg (19  $\mu$ moles, 58% de rendimiento total) del éster metílico **5**. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,83-0,90 (m, 6H), 0,94 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 6,60 Hz), 1,07 (d, 3H, *J* = 6,2 Hz), 1,15 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,22 (m, 1H), 1,32-1,42 (m, 5H), 1,54-1,81 (m, 8H), 2,0-2,10 (m, 5H), 2,20-2,35 (m, 2H), 2,58-2,64 (m, 1H), 2,74-2,80 (ma, 1H), 2,85-2,89 (m, 1H), 2,98-3,01 (m, 1H), 3,05-3,10 (m, 1H), 3,21-3,25 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,72-3,77 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,55-4,67 (ma, 2H), 5,09-5,19 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,25 (m, 4H), 7,37 (m, 1H), 7,96 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 799,4786, encontrado: 799,4786.

### Compuesto 6:



El silil éter **3** (17 mg, 24  $\mu$ moles) se sometió en primer lugar a hidrólisis ácida, seguido de escisión del éster etílico y acoplamiento con la sal de hidrocloreto del éster metílico de la tubufenilalanina (15 mg, 60  $\mu$ moles), de un modo similar al descrito para la síntesis del compuesto **5**. La purificación del producto crudo en HPLC de fase inversa proporcionó 10 mg (13  $\mu$ moles, 55% de rendimiento total) del éster metílico **6**. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,95-0,99 (m, 9H), 1,06 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,08 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 1,09 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 1,15 (d, 3H, *J* = 7,8 Hz), 1,18 (m, 1H), 1,42-1,50 (m, 1H), 1,54-1,72 (m, 6H), 1,79-1,82 (m, 2H), 1,97-2,03 (m, 3H), 2,06-2,12 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,51-2,53 (m, 1H), 2,58-2,64 (m, 1H), 2,85-2,88 (m, 1H), 2,93-2,95 (m, 1H), 2,97-3,01 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,75-3,79 (m, 1H), 3,93-3,98 (m, 1H), 4,29 (ma, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,53 (m, 1H), 4,60 (d, 1H, *J* = 10,6 Hz), 5,18 (m, 1H), 7,0 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,25 (m, 4H), 7,34 (m, 1H), 7,95 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 785,4630, encontrado: 785,4630.

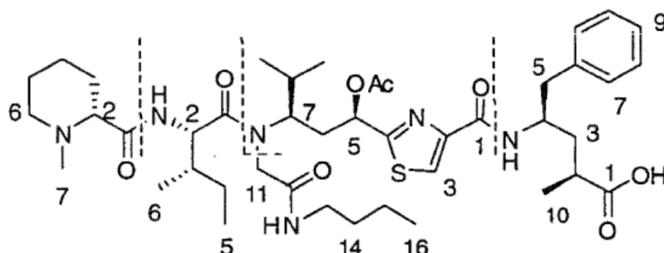
### Mezcla diastereomérica 7:



La mezcla diastereomérica **4** (16 mg, 22  $\mu$ moles) se sometió en primer lugar a hidrólisis ácida, seguido de escisión del éster etílico y acoplamiento con la sal de hidrocloreto del éster metílico de la tubufenilalanina (14 mg, 0,055 mmoles), de un modo similar al descrito para la síntesis del compuesto **5**. La purificación del producto crudo en HPLC de fase inversa proporcionó 22 mg (54  $\mu$ moles, 62% de rendimiento para las tres etapas) de los ésteres metílicos **7**. Como se esperaba, la mezcla de diastereoisómeros es claramente visible mediante RMN (razón estimada de 1:1). Las señales asignadas pertenecen a la mezcla completa. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,82 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz), 0,90 (t, 6H, *J* = 7,0 Hz), 0,93-0,96 (m, 9H), 1,02 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,04 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,08 (d, 6H, *J* = 7,0 Hz), 1,12-1,14 (m, 6H), 1,15-1,19 (m, 2H), 1,36-1,42 (m, 10H), 1,49-1,70 (m, 16H), 1,74-1,88 (m, 6H), 1,94-2,06 (m, 6H), 2,23 (s, 3H), 2,26 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,36-2,40 (m, 2H), 2,53-2,62 (m, 2H), 2,83-2,92 (m, 4H), 2,95-3,01 (ma, 2H), 3,06-3,20 (m, 4H), 3,26 (m, 2H), 3,56 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,88-4,01 (m, 2H), 4,27-4,44 (m, 4H), 5,03 (m, 2H), 5,11 (m, 1H), 5,21 (m, 1H), 7,15 (m, 2H), 7,25 (m, 8H), 7,99 (s, 1H), 8,04 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 813,4943, encontrado: 813,4941.

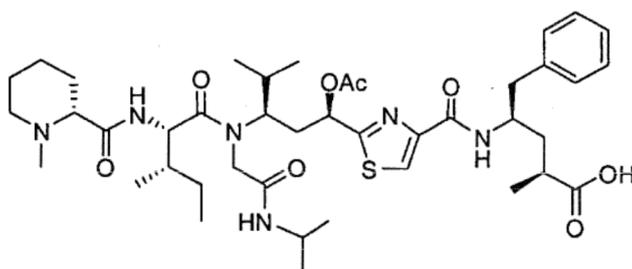
### Procedimiento general para los tubugis A, B y D:

#### Tubugi A



- 5 Se añadió LiOH (1,4 mg, 57  $\mu$ moles, 7,5 eq.) a una disolución del éster metílico **5** (6,1 mg, 7,6  $\mu$ moles) en THF/H<sub>2</sub>O (1 ml, 2:1 v/v) a 0°C. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente, se agitó durante 5 días, y se acidificó con NaHSO<sub>4</sub> acuoso al 10% hasta pH 4. La mezcla se diluyó luego con AcOEt (2 ml), las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida. El residuo se disolvió luego en 1 ml de piridina y la disolución se enfrió a 0°C. Se añadió anhídrido acético (5,8  $\mu$ l, 61  $\mu$ moles), y se dejó que la reacción alcanzara temperatura ambiente, se agitó durante la noche y se enfrió a 0°C. Después, se añadió 1 ml de H<sub>2</sub>O. Se mantuvo la agitación 30 min más y luego se retiró el disolvente a presión reducida. La purificación del producto crudo en HPLC de fase inversa preparativa proporcionó 5,1 mg (6,2  $\mu$ moles, 82% de rendimiento total) de **tubugi A** como sólido amarillo pálido. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>OD): Tup  $\delta$  = 1,16 (d, 3H, *J* = 7,7 Hz, CH<sub>3</sub>-10), 1,64 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-3), 1,99 (m, 1H, CH<sub>a</sub>-3), 2,53 (m, 1H, CH-2), 2,87 (dd, 1H, *J* = 13,5/6,6 Hz, CH<sub>b</sub>-5), 2,91 (dd, 1H, *J* = 13,5/7,3 Hz, CH<sub>a</sub>-5), 4,36 (m, 1H, CH-4), 7,15 (m, 2H, CH-9), 7,22 (m, 2H, CH-7, CH-7'), 7,22 (m, 2H, CH-8, CH-8'), ppm. Tuv  $\delta$  = 0,78 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>-10)<sup>a</sup>, 0,86 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>3</sub>-16), 1,07 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>-9)<sup>a</sup>, 1,31 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-15), 1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-14), 1,78 (m, 1H, CH-8), 1,92 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-6), 2,33 (ddd, 1H, *J* = 15,1/13,6/11,5 Hz, CH<sub>a</sub>-6), 2,15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 3,11 (dt, 1H, *J* = 13,5/7,0 Hz, CH<sub>b</sub>-13), 3,24 (dt, 1H, *J* = 13,5/7,0 Hz, CH<sub>a</sub>-13), 3,79 (d, 1H, 17,7 Hz, CH<sub>b</sub>-11), 4,58 (sa, 1H, CH-7), 4,75 (d, 1H, *J* = 17,7 Hz, CH<sub>a</sub>-11), 6,31 (dd, 1H, *J* = 11,5/1,9 Hz, CH-5), 8,05 (s, 1H, CH-3) ppm. *L*-Ile  $\delta$  = 0,88 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 0,98 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>-6), 1,14 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-4), 1,57 (m, 1H, CH<sub>a</sub>-4), 2,0 (m, 1H, CH-3), 4,43 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz, CH-2) ppm. *D*-Mep  $\delta$  = 1,36 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-4), 1,59 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-3), 1,61 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-5), 1,70 (m, 1H, CH<sub>a</sub>-5), 1,80 (m, 1H, CH<sub>a</sub>-4), 1,85 (m, 1H, CH<sub>a</sub>-3), 2,26 (m, 1H, CH<sub>b</sub>-6), 2,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7), 2,78 (da, 1H, *J* = 10,9 Hz, CH-2), 3,03 (da, 1H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>a</sub>-6) ppm. HRMS calculado para C<sub>43</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 827,4735, encontrado: 827,4746 (<sup>a</sup>) = asignación intercambiable).

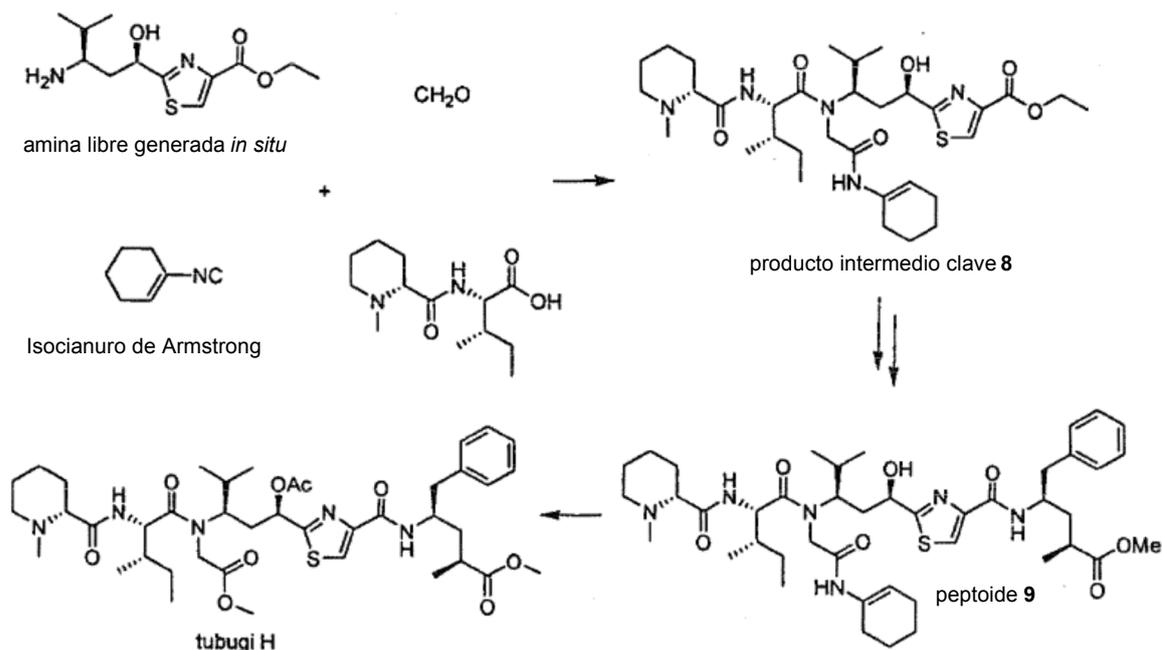
#### Tubugi B



- 30 El éster metílico **6** (4,9 mg, 6,3  $\mu$ moles) se sometió a hidrólisis alcalina, seguido de acetilación del alcohol secundario de un modo similar al descrito para la síntesis de **tubugi A**, para proporcionar 4,4 mg (5,4  $\mu$ moles, 86% de rendimiento total) de **tubugi B** como sólido amarillo tras purificación en HPLC de fase inversa preparativa. <sup>1</sup>H-RMN (599,8 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 0,80 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 0,90 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz), 1,0 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz), 1,07 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz), 1,14 (m, 1H), 1,17 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 1,18 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,42-1,45 (m, 1H), 1,57-1,61 (m, 2H), 1,63-1,69 (m, 3H), 1,77-1,86 (m, 3H), 1,95 (m, 1H), 2,02 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,32-2,37 (m, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,49-2,56 (m, 1H), 2,85-2,94 (m, 2H), 3,06 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 3,78 (d, 1H, *J* = 17,9 Hz), 3,96 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,44 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz), 4,57 (ma, 1H), 4,70 (d, 1H, *J* = 17,6 Hz), 6,31 (dd, 1H, *J* = 11,4/1,8 Hz), 7,17 (m, 1H), 7,23 (m, 4H), 8,07 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 813,4579, encontrado: 813,4585.

#### 40 Tubugi D (mezcla diastereomérica)





Se disolvió el éster etílico de la *N*-Boc tubuvalina (74 mg, 0,20 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$  (3 ml, 4:1 v/v). La mezcla se agitó 1 h a temperatura ambiente, y después se concentró a presión reducida. El aceite resultante se redisolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y la disolución se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado (3 x 5 ml) y salmuera (3 x 5 ml). Las capas se separaron y la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró, y el disolvente se retiró a presión reducida. El material crudo se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

A una disolución de la amina libre obtenida anteriormente en MeOH (3 ml) se añadió lentamente una suspensión de formaldehído (6,0 mg, 0,20 mmoles) en MeOH (3 ml), usando una bomba de jeringa, durante un periodo de 2 h. Posteriormente, se añadió Mep-Ileu-OH (112 mg, 0,44 mmoles), la reacción se agitó 10 min y después se añadió una disolución de isocianuro de Armstrong (21 mg, 0,20 mmoles) en MeOH (3 ml) durante un periodo de 3 h, usando una bomba de jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h más, y el disolvente se retiró luego a presión reducida. Una cromatografía en columna rápida (gradiente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ , 30:1:0,3 v/v/v  $\rightarrow$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ , 15:1:0,3 v/v/v) proporcionó una mezcla de compuestos que contenía el producto intermedio clave 8. HRMS calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 648,3789, encontrado: 648,3787 y HRMS calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 547,2949, encontrado: 547,2953. Varios intentos de purificar esta mezcla, incluso mediante cromatografía en columna rápida, resultaron infructuosos. De este modo, la mezcla se disolvió en THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml, 2:1 v/v) y se añadió LiOH (11,9 mg, 0,49 mmoles) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se agitó durante 6 h y se dejó que alcanzara gradualmente temperatura ambiente. A continuación, se acidificó con una disolución acuosa de HCl al 37% hasta pH = 7-8, y luego se acidificó ligeramente hasta pH = 6,8 con disolución una tampón acuosa, es decir, mediante dilución de la mezcla con la disolución tampón. La mezcla se extrajo con *n*-butanol (3 x 20 ml), las capas se separaron y las fases orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida, para proporcionar un material crudo que se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

El ácido obtenido anteriormente se acopló con la sal de hidrocloreuro del éster metílico de la tubufenilalanina (Tup) (22,5 mg, 0,09 mmoles) siguiendo el protocolo DIC/PFP, de un modo similar al descrito para la síntesis del compuesto 5, para proporcionar, después de purificación por HPLC en fase inversa, el peptide 9 (8,0 mg, 9,8  $\mu\text{moles}$ ). HRMS calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 823,4795, encontrado: 823,4789. Posteriormente, el aceite obtenido se disolvió en una disolución 4 N de HCl en dioxano (2 ml) disponible comercialmente, y la mezcla se agitó durante 1 h. Después, se añadió MeOH (2 ml) y la agitación continuó durante 3 h más (la hidrólisis de las amidas Ugi-Armstrong convertibles puede llevarse a cabo también alternativamente en la etapa de los productos intermedios como 8, etc.). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en piridina (4,0 ml), y la disolución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ . Se añadió anhídrido acético (84  $\mu\text{l}$ , 0,90 mmoles) y la reacción se agitó durante la noche, y se dejó que alcanzara gradualmente temperatura ambiente. Se retiró el disolvente a presión reducida y la mezcla en crudo se sometió a purificación por HPLC en fase inversa, para proporcionar 6,3 mg de tubugi H (7,9  $\mu\text{moles}$ , 4,0% de rendimiento total).  $^1\text{H}$ -RMN (599,8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , señales representativas):  $\delta$  = 0,79 (d, 3H,  $J$  = 6,6 Hz), 0,90 (t, 3H,  $J$  = 7,4 Hz), 0,98 (d, 6H,  $J$  = 7,0 Hz), 1,01 (d, 3H,  $J$  = 6,6 Hz), 1,14 (d, 3H,  $J$  = 7,4 Hz), 1,18-1,23 (m, 1H), 1,38 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,63 (d, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,42 (d, 1H,  $J$  = 9,9 Hz), 4,58 (ma,

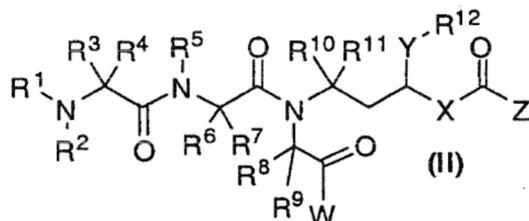
1H), 4,83 (señal solapada), 6,32 (dd, 1H,  $J = 11,6/1,9$  Hz), 7,16 (m, 1H), 7,21 (m, 4H), 8,01 (s, 1H) ppm. HRMS calculado para  $C_{41}H_{62}N_5O_9S$   $[M+H]^+$ : 800,4277, encontrado: 800,4280.

5 En resumen, la presente invención proporciona una síntesis concisa y fiable de una nueva clase de análogos de tubulicina citotóxicos (tubugis), con valores de  $GI_{50}$  en el intervalo nanomolar y picomolar alto. La rara y lábil funcionalidad de *N,O*-acetal que está presente en las tubulicinas naturales más activas, se ha remplazado por una cadena principal *terc*-peptídica mucho más estable, con retención o incluso mejora de la actividad citotóxica.

10

## Reivindicaciones

1. Compuestos de tubulisina con la fórmula general (II)



5

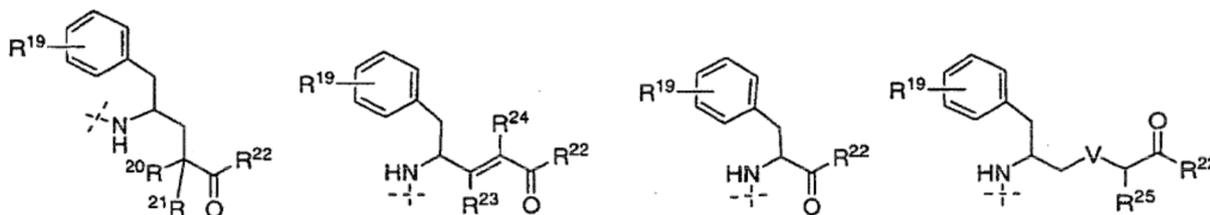
en la que:

W es un grupo seleccionado de OR<sup>13</sup> o NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>,

X es un anillo aromático (arileno) o heteroaromático (heteroarileno) sustituido de cinco o seis miembros,

10 Y es H, -CH<sub>2</sub>-, NH, NMe, un átomo de azufre o un átomo de oxígeno, preferiblemente un átomo de oxígeno,

Z es un grupo seleccionado de OR<sup>16</sup>, NR<sup>17</sup>R<sup>18</sup> o:



15

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>23</sup>, R<sup>24</sup> y R<sup>25</sup>, cada uno representa independientemente H, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y en el que R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup> o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar junto con el átomo de nitrógeno un anillo de pirrolidina de cinco miembros o un anillo de piperidina de seis miembros,

20

R<sup>12</sup> es H, un grupo de acilo (C(O)R), un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, siendo R un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, o un arilo sustituido o sin sustituir,

25

R<sup>19</sup> representa H, halógeno, nitro, amina, grupo de monoalquilamina o dialquilamina, hidroxilo, alquilo, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en las posiciones 2 y/o 3 y/o 4, y/o 5, y/o 6, o en cualquier combinación,

30

R<sup>22</sup> representa OH, NH<sub>2</sub>, alquilo, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en las posiciones 2 y/o 3 y/o 4, y/o 5, y/o 6, o en cualquier combinación, y sales, hidratos, solvatos, estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros y sus polimorfos farmacéuticamente aceptables.

35

2. Los compuestos de tubulisina conforme a la reivindicación 1, en los que Y es un átomo de oxígeno y X es un tiazol o un oxazol.

40

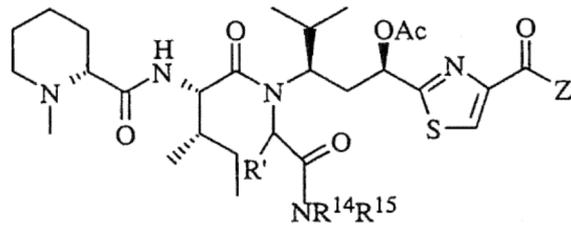
3. Los compuestos de tubulisina conforme a la reivindicación 1 o 2, en los que R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup> están unidos para formar un resto de piperidina.

45

4. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que Z es tubufenilalanilo (TuP).

5. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que W es NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>.

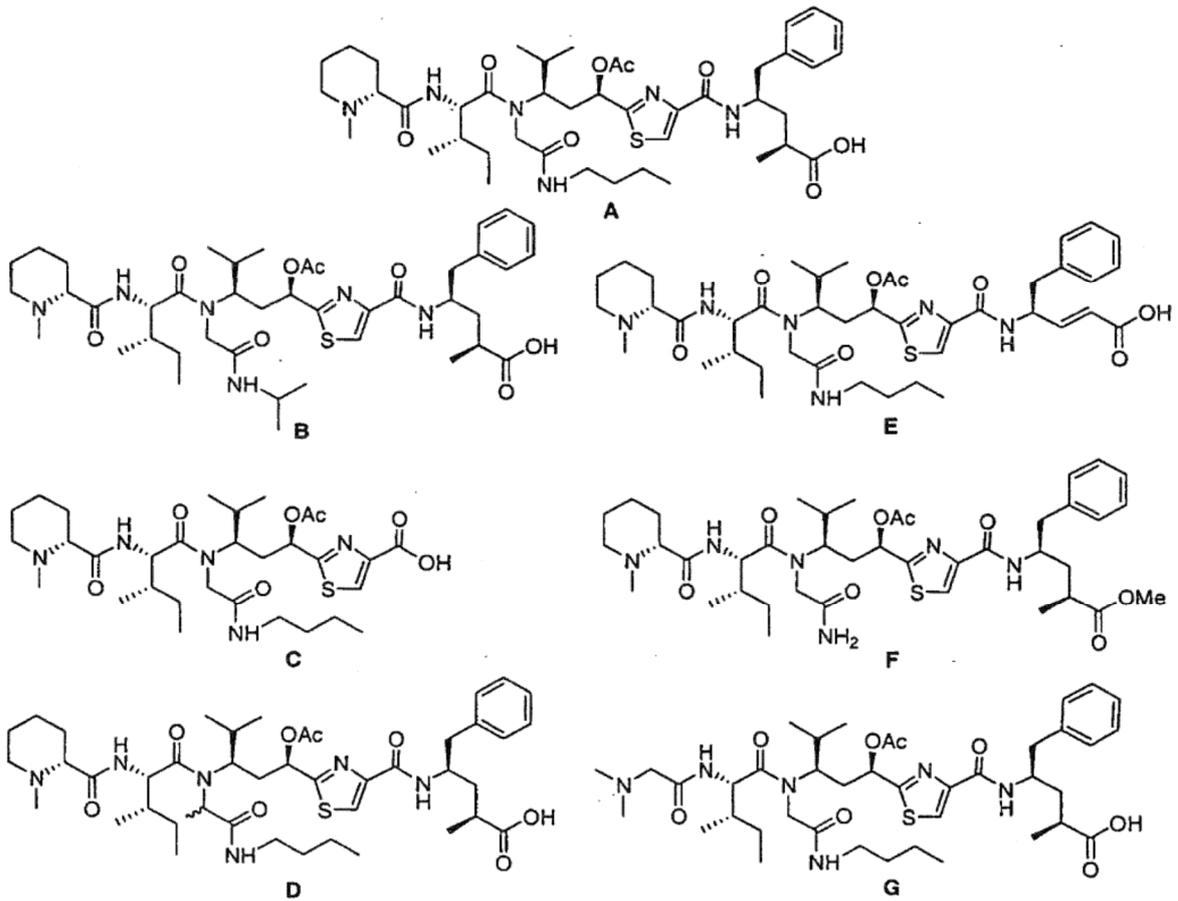
6. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con la fórmula general (III):

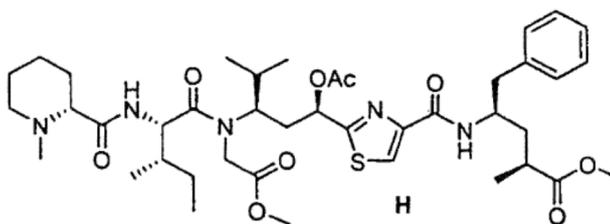


(III)

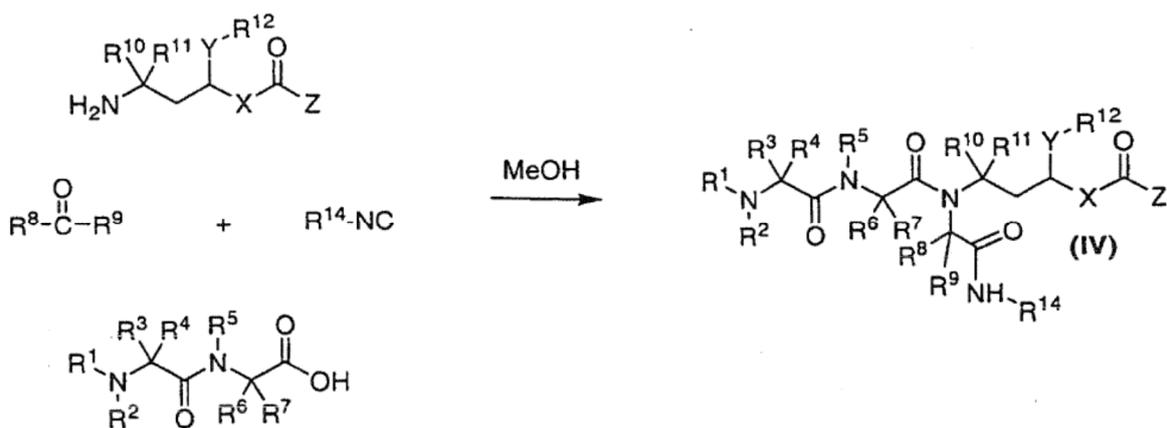
en la que:

- 5 R<sup>1</sup> es H o un grupo de metilo,  
R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> y Z se definen como anteriormente.
7. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que son



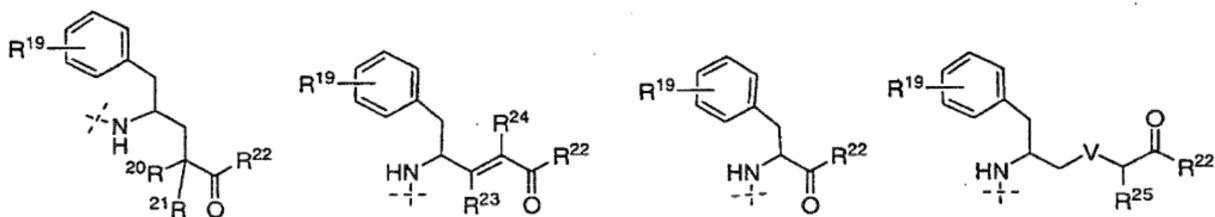


- 5 8. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en los que los compuestos están conjugados con
- (i) biomoléculas, para una administración orientada al objetivo, o
- (ii) restos moleculares, que pueden mejorar su solubilidad, penetración, detección, liberación o selectividad.
- 10 9. Los compuestos de tubulisina conforme a la reivindicación 8, en los que la biomolécula es un péptido, proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, (oligo)sacárido, (poli)sacárido, ácido nucleico, hormona o ligante a receptores de hormonas, o vitamina.
- 15 10. Los compuestos de tubulisina conforme a la reivindicación 8, en los que los restos moleculares se seleccionan de polietilenglicoles, poliaminas, poliguanidinas, tintes, ligandos a receptores, o polímeros.
11. El uso de los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para aplicaciones medicinales, agrícolas, bioherramientas o aplicaciones cosméticas.
- 20 12. Una formulación farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10, y opcionalmente, uno o más vehículos, aditivos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 25 13. Los compuestos de tubulisina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10, para usar en el tratamiento de trastornos proliferativos.
14. Un método para preparar compuestos con la fórmula general (IV) mediante una reacción de tipo Ugi para la generación del enlace de amida terciaria, como se muestra a continuación



en la que

- 35 X es un anillo aromático (arileno) o heteroaromático (heteroarileno) sustituido de cinco o seis miembros, Y es H, -CH<sub>2</sub>-, NH, NMe, un átomo de azufre o un átomo de oxígeno, preferiblemente un átomo de oxígeno, Z es un grupo seleccionado de OR<sup>16</sup>, NR<sup>17</sup>R<sup>18</sup> o:



5  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{17}, R^{18}, R^{20}, R^{21}, R^{23}, R^{24}$  y  $R^{25}$ , cada uno representa independientemente H, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y en el que  $R^1$  y  $R^3$  pueden unirse para formar junto con el átomo de nitrógeno un anillo de pirrolidina de cinco miembros o un anillo de piperidina de seis miembros,

10  $R^{12}$  es H, un grupo de acilo (C(O)R), un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, siendo R un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, o un arilo sustituido o sin sustituir,

15  $R^{14}, R^{16}$  es un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, o un grupo O-protector usual,

20  $R^{19}$  representa H, halógeno, nitro, amina, grupo de monoalquilamina o dialquilamina, hidroxilo, alquilo, un alquilo sustituido o sin sustituir, un cicloalquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, un heteroarilo sustituido o sin sustituir, un heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en las posiciones 2 y/o 3 y/o 4, y/o 5, y/o 6, o en cualquier combinación,

25  $R^{22}$  representa  $NH_2$ , alquilo, grupo alquilamino o dialquilamino, o un conector, V es un átomo de azufre u oxígeno,  $-CH_2-$ , NH o grupo de NH-alquilo.

Figura 1

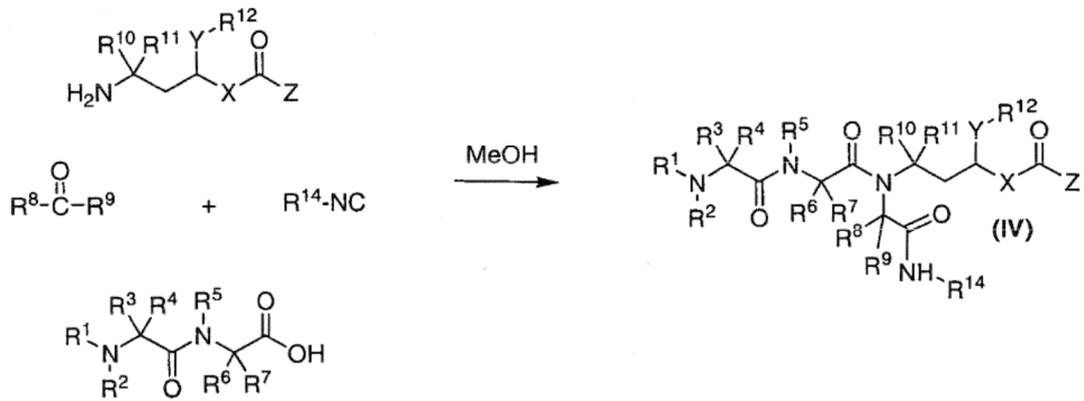


Figura 2

