

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 888**

51 Int. Cl.:

C07K 5/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 12708034 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2686336**

54 Título: **N-carboxialquil-auristatinas y su utilización**

30 Prioridad:

16.03.2011 EP 11158481

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

25.08.2015

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**LERCHEN, HANS-GEORG;
EL SHEIKH, SHERIF;
STELTE-LUDWIG, BEATRIX;
SCHUHMACHER, JOACHIM y
GNOTH, MARK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 888 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

N-carboxialquil-auristatinas y su utilización

La presente solicitud se refiere a nuevos derivados de monometilauristatina E y monometilauristatina F, sustituidos en el término N con un grupo carboxialquilo, a procedimientos para la preparación de estos derivados, a la utilización de estos derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, así como a la utilización de estos derivados para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de enfermedades hiperproliferativas y/o angiogénicas tales como, por ejemplo, enfermedades cancerígenas. Estos tratamientos se pueden efectuar como monoterapia o también en combinación con otros medicamentos u otras medidas terapéuticas.

Las enfermedades cancerígenas son la consecuencia de un crecimiento celular incontrolado de los tejidos más diversos. En muchos casos las nuevas células se introducen en tejidos ya existentes (crecimiento invasivo), o forman metástasis en órganos alejados. Las enfermedades cancerígenas aparecen en muy diversos órganos y tienen frecuentemente transcurso de la enfermedad específicos del tejido. Por lo tanto, la expresión enfermedad cancerígena describe como concepto principal un gran grupo de enfermedades cancerígenas definidas de diferentes órganos, tejidos y tipos celulares.

Los tumores en estadios tempranos se pueden eliminar eventualmente por medidas quirúrgicas y radioterapéuticas. Los tumores metastatizados se pueden tratar por lo regular por agentes quimioterapéuticos solo de forma paliativa. La finalidad en este caso es conseguir la combinación óptima de una mejora de la calidad de vida y de la prolongación del tiempo de vida.

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos aplicados hoy en día parenteralmente no apuntan frecuentemente al tejido tumoral o a las células tumorales, sino que por la administración sistémica se distribuyen en el cuerpo de forma no específica, es decir también en lugares en los cuales no es deseada una exposición del principio activo tal como, por ejemplo, en células, tejidos y órganos sanos. Esto puede llevar desde a efectos secundarios no deseados hasta a graves efectos en general tóxicos, los cuales limitan entonces fuertemente el margen de dosificación terapéuticamente útil del principio activo o exigen una renuncia total a la medicación.

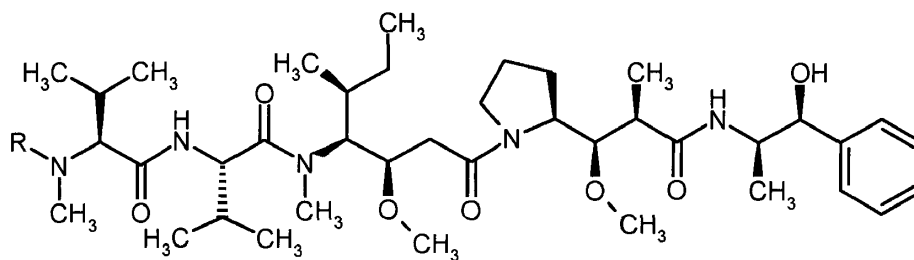
La disponibilidad mejorada y selectiva de estos agentes quimioterapéuticos en la célula tumoral o en el tejido directamente circundante y, unido a ello, el incremento del efecto por un lado, y la minimación de efectos secundarios tóxicos, por otro lado, se sitúa por lo tanto desde hace varios años en el foco del desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Se emprendieron entre tanto muchos ensayos para desarrollar métodos eficaces para la introducción de principios activos en la célula diana. Sin embargo, la optimización de la asociación entre principio activo y diana intracelular y la minimación de la distribución intracelular del principio activo, por ejemplo en células vecinas, representan tanto ahora como entonces un complicado problema.

Para la señalización dirigida de tejidos tumorales y células tumorales son adecuados, por ejemplo, anticuerpos monoclonales. El significado de tales anticuerpos para el tratamiento clínico de enfermedades cancerígenas ha crecido en general en los últimos años de manera considerable, en base a la eficacia de agentes tales como Trastuzumab (Herceptina), Rituximab (Rituxan), Cetuximab (Erbix) y Bevacizumab (Avastina), los cuales entre tanto han sido admitidos para la terapia de algunas enfermedades tumorales específicas [véase, por ejemplo, G. P. Adams y L. M. Weiner, Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157 (2005)]. Como consecuencia de esto, se ha incrementado también claramente el interés por los denominados inmunoconjugados, en los cuales un anticuerpo internalizante dirigido contra un antígeno asociado al tumor está unido de forma covalente a través de una unidad de enlazamiento ("linker") con un agente que actúa citotóxicamente, el cual después de la introducción y subsiguiente separación del conjugado dentro de la célula tumoral se libera y puede desarrollar allí su efecto directo y selectivamente. Por esta vía se podría mantener el daño del tejido normal en márgenes significativamente más estrechos en comparación con una quimioterapia convencional de la enfermedad cancerígena [véase, por ejemplo, J. M. Lambert, Curr. Opin. Pharmacol. 5, 543-549 (2005); A. M. Wu y P. D. Senter, Nat. Biotechnol. 23, 1137-1146 (2005); P. D. Senter, Curr. Opin. Chem. Biol. 13, 235-244 (2009); L. Ducry y B. Stump, Bioconjugate Chem. 21, 5-13 (2010)].

En lugar de anticuerpos se pueden utilizar también ligandos de la zona de moléculas pequeñas del principio activo, los cuales se unen selectivamente a un punto diana especial ("target"), como por ejemplo a un receptor [véase por ejemplo E. Ruoslahti et al., Science 279, 377-380 (1998); D. Karkan et al., PLoS ONE 3 (6), e2469 (Junio 25, 2008)]. También son conocidos los conjugados de principio activo citotóxico y ligando señalizante, los cuales presentan entre ligando y principio activo una lugar de corte definido para la liberación del principio activo. Un punto de "corte nominal" de este tipo puede consistir, por ejemplo, en una cadena peptídica, la cual en un punto determinado puede ser cortada en el lugar de actuación por un enzima selectivo [véase por ejemplo R. A. Firestone y L. A. Telan, Patente de aplicación de EE.UU 2002/0147138].

La auristatina E (AE) y la monometilauristatina E (MMAE) son compuestos sintéticos análogos de las dolastatinas, de un grupo especial de pseudopéptidos lineales, los cuales se aislaron en un principio a partir de fuentes marinas y las cuales presentan en parte una actividad citotóxica muy potente frente a células tumorales [para un aspecto

general véase, por ejemplo, G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70, 1-79 (1997); G. R. Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design 10, 529-544 (1995); G. R. Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design 13, 243-277 (1998)].

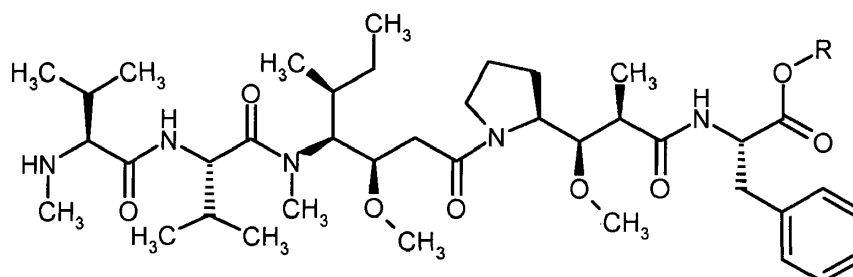


Auristatina E (AE): R = CH₃

5 Monometilauristatina E (MMAE): R = H

Sin embargo, MMAE tiene la desventaja de una toxicidad sistémica comparativamente elevada. Además, este compuesto en el caso de una administración en forma de conjugados de anticuerpo-principio activo (inmunoconjugados) no es compatible con unidades de unión (Linker) entre anticuerpo y principio activo, que no presenten ningún lugar nominal de posible corte enzimático [S. O. Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17, 114-124 (2006)].

La monometilauristatina F (MMAF) es un derivado de la auristatina con una unidad de fenilalanina C-terminal, que tan solo presenta un efecto anti-proliferativo moderado en comparación con MMAE. Probablemente, esto se puede atribuir al grupo carboxilo libre, el cual debido a su polaridad y carga influye negativamente sobre la posibilidad de acceso a la célula de este compuesto. En relación con esto, el éster metílico de MMAF (MMAF-OMe) fue descrito como un derivado prefármaco con carga neutra accesible a la célula, el cual en comparación con MMAF presenta una citotoxicidad *in vitro* aumentada varias veces frente a diferentes líneas celulares de carcinoma [S. O. Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17, 114-124 (2006)]. Cabe suponer que este efecto es provocado por el propio MMAF, el cual después de la absorción del profármaco en las células se libera rápidamente por hidrólisis intracelular del éster.



20 Monometilauristatina F (MMAF): R = H

Éster metílico de monometilauristatina F- (MMAF-OMe): R = CH₃

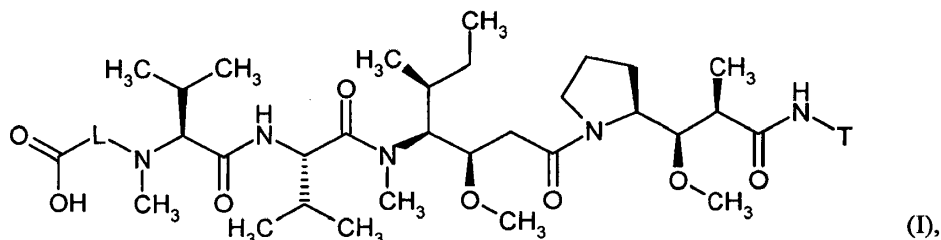
Sin embargo, los compuestos de principios activos en base de simples derivados estéricos pueden correr el riesgo en general de una inestabilidad química debido a una hidrólisis estérica no específica, independiente del lugar de acción previsto, por ejemplo por las esterasas existentes en el plasma sanguíneo; esto puede limitar claramente la posibilidad de aplicación de estos compuestos en terapia. Además de esto, los derivados de auristatina tales como MMAE y MMAF son también sustratos para proteínas de transporte, las cuales son expresadas también por muchas células tumorales, lo cual puede llevar a desarrollar una resistencia a estos principios activos.

Misión de la presente invención era por lo tanto identificar nuevos derivados de auristatina y ponerlos a disposición para su utilización para el tratamiento de especialmente enfermedades cancerígenas, que presentaran una actividad citotóxica más potente en ensayos de células enteras frente a la monometilauristatina F (MMAF) sólo moderadamente efectiva y/o propiedades del sustrato para proteínas de transporte, menos acusadas. Tales sustancias podrían ser adecuadas en medida especial como toxóforos para la unión con proteínas tales como, por ejemplo, anticuerpos, o también con ligandos de bajo peso molecular para dar (inmuno)-conjugados que actúen antiproliferativamente.

Monometilauristatina F (MMAF) así como diferentes derivados de éster y amida de ésta se dieron a conocer en el documento WO 2005/081711-A2. Otros análogos de auristatina con una unidad C-terminal de fenilalanina sustituida amídicamente se describen en el documento WO-01/18032-A2. En los documentos WO 02/088172-A2 y WO 2007/008603-A1 se reivindican compuestos análogos de MMAF, que se refieren a modificaciones en las cadenas laterales de la fenilalanina, y en WO 2007/008848-A2 aquellos en los que el grupo carboxílico de la fenilalanina está modificado. Otros conjugados de auristatina enlazados a través del término N ó C se describen, entre otros, en los

documentos WO 2004/010957-A2 y WO 2009/117531-A1 [véase también S. O. Doronina et al., Bioconjugate Chem. 19, 1960-1963 (2008)].

Objeto de la presente invención son por lo tanto compuestos de la fórmula general (I)

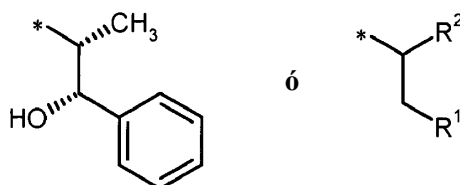


5 en la cual

L representa (C₁-C₁₂)-alcanodiilo de cadena lineal, el cual puede estar sustituido hasta cuatro veces con metilo y en el cual (a) dos átomos de carbono, en relación 1,2, 1,3 o 1,4 entre sí, pueden formar un puente incluyendo los átomos de carbono que se encuentran eventualmente entre ellos para dar un anillo (C₃-C₆)-cicloalquilo o un anillo fenilo, o (b) hasta tres grupos CH₂ no vecinos entre si pueden estar sustituidos por -O-,

10 y

T representa un grupo de la fórmula



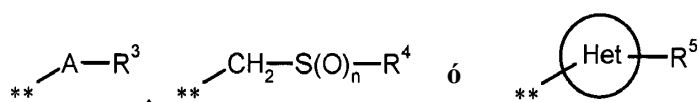
en las cuales

* designa el punto de unión con el átomo de nitrógeno,

15 R¹ significa fenilo o 1*H*-indol-3-ilo,

y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



en las cuales

20 ** designa el correspondiente punto de unión con el resto del respectivo grupo T ,

A representa (C₁-C₄)-alcanodiilo de cadena lineal o (C₂-C₄)-alquenodiilo de cadena lineal,

R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

n representa el número 0, 1 o 2 ,

25 R⁴ representa fenilo, bencilo o 2-feniletilo, los cuales respectivamente en el grupo fenilo pueden estar sustituidos con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

Het representa un anillo heteroarílico divalente de 5 miembros con hasta tres heteroátomos anulares de la serie N, O y/o S,

y

R⁵ representa (C₃-C₆)-cicloalquilo, fenilo o (C₁-C₄)-alquilo, el cual puede estar sustituido con fenilo,

30 pudiendo estar sustituidos por su parte los mencionados grupos fenilo con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

Compuestos conformes a la invención son los compuestos de la fórmula (I) y sus sales, solvatos y solvatos de las sales, los compuestos comprendidos en la fórmula (I) de las fórmulas que se citan a continuación y sus sales, solvatos y solvatos de las sales, así como los compuestos comprendidos en la fórmula (I) que se citan a continuación como ejemplos de ejecución y sus sales, solvatos y solvatos de las sales, siempre que los compuestos comprendidos en la fórmula (I), que se citan a continuación, no se traten ya de sales, solvatos y solvatos de las sales.

Los compuestos conformes a la invención, dependiendo de su estructura, pueden existir en diferentes formas estereoisómeras, es decir en forma de isómeros de configuración o eventualmente también en forma de isómeros de conformación (enantiómeros y/o diastereoisómeros, incluidos aquellos en el caso de atropisómeros. Por ello, la presente invención comprende los enantiómeros y/o diastereoisómeros y sus respectivas mezclas. A partir de tales mezclas de enantiómeros y/o diastereoisómeros se pueden aislar de forma conocida los componentes estereoisómeros unitarios; para ello se utilizan preferentemente procedimientos cromatográficos, especialmente cromatografía HPLC en fase quiral y aquiral.

Siempre que los compuestos conformes a la invención se puedan presentar en formas tautómeras, la presente invención abarca todas las formas tautómeras.

En el marco de la presente invención, como sales son preferidas las sales fisiológicamente inocuas de los compuestos conformes a la invención. También están comprendidas las sales que por sí mismas no son adecuadas para las propias aplicaciones farmacéuticas pero que se pueden utilizar, por ejemplo, para el aislamiento o purificación de los compuestos conformes a la invención..

Sales fisiológicamente inocuas de los compuestos conformes a la invención comprenden las sales por adición de ácidos de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, por ejemplo sales del ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido naftalindisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido vínico, ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Las sales fisiológicamente inocuas de los compuestos conformes a la invención comprenden también sales de las bases habituales tales como, por ejemplo y preferentemente, sales de metales alcalinos (por ejemplo sales de sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoniaco o de aminas orgánicas con 1 a 16 átomos de C tales como, por ejemplo y preferentemente, etilamina, dietilamina, trietilamina, *N,N*-diisopropiletilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dimetilaminoetanol, dietilaminoetanol, procaína, dicitclohexilamina, dibencilamina, *N*-metilpiperidina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina y 1,2-etilendiamina.

Como solvatos en el marco de la invención se designan aquellas formas de los compuestos conformes a la invención, las cuales en estado sólido o líquido forman un complejo por coordinación con moléculas del disolvente. Los hidratos son una forma especial de solvatos, en los que la coordinación tiene lugar con agua. Como solvatos en el marco de la presente invención se prefieren los hidratos.

En el marco de la presente invención, los sustituyentes, siempre que no se especifique de otro modo, tienen el siguiente significado:

(C₁-C₄)-alquilo representa en el marco de la invención un radical alquilo lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de carbono. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*.-butilo y *terc*.-butilo.

(C₁-C₁₂)-alcanodiilo, (C₁-C₈)-alcanodiilo y (C₁-C₆)-alcanodiilo representan en el marco de la invención un radical alquilo lineal, α,ω -divalente con 1 a 12, 1 a 8 respectivamente 1 a 6 átomos de carbono. Se prefiere un grupo alcanodiilo lineal con 1 a 8, particularmente preferido con 1 a 6 átomos de carbono. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: metileno, etano-1,2-diilo (1,2-etileno), propano-1,3-diilo (1,3-propileno), butano-1,4-diilo (1,4-butileno), pentano-1,5-diilo (1,5-pentileno), hexano-1,6-diilo (1,6-hexileno), heptano-1,7-diilo (1,7-heptileno), octano-1,8-diilo (1,8-octileno), nonano-1,9-diilo (1,9-nonileno), decano-1,10-diilo (1,10-decileno), undecano-1,11-diilo (1,11-undecileno) y dodecano-1,12-diilo (1,12-dodecileno).

(C₁-C₄)-alcanodiilo representa en el marco de la invención un radical alquilo lineal α,ω -divalente con 1 a 4 átomos de carbono. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: metileno, etano-1,2-diilo (1,2-etileno), propano-1,3-diilo (1,3-propileno) y butano-1,4-diilo (1,4-butileno).

(C₂-C₄)-alquenodiilo representa en el marco de la invención un radical alquenilo lineal α,ω -divalente con 2 a 4 átomos de carbono y un enlace doble. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: eteno-1,2-diilo, propeno-1,3-diilo, but-1-eno-1,4-diilo y but-2-eno-1,4-diilo. En este caso, el enlace doble se puede presentar en una configuración *cis* o en una *trans*.

(C₁-C₄)-alcoxi representa en el marco de la invención un radical alcoxi lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de carbono. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi y *terc*-butoxi.

- 5 (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo representa en el marco de la invención un radical alcoxi lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de carbono, el cual está ligado a través de un grupo carbonilo [-C(=O)-] unido al oxígeno. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, *n*-propoxycarbonilo, isopropoxycarbonilo, *n*-butoxycarbonilo y *terc*.-butoxycarbonilo.

(C₃-C₆)-cicloalquilo representa en el marco de la invención un grupo cicloalquilo saturado, monocíclico con 3 a 6 átomos de carbono. Se pueden citar por ejemplo y preferentemente: ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

- 10 Heteroarilo de 5 miembros en la definición del anillo Het representa un heterociclo aromático divalente (heteroaromático) con en total 5 miembros, el cual contiene hasta tres heteroátomos anulares iguales o diferentes de la serie N, O y/o S, y está enlazado a través de dos átomos de carbono anulares o eventualmente un átomo de nitrógeno anular y un átomo de carbono anular. Se pueden citar por ejemplo: furilo, pirrolilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, 1,2-oxazolilo, 1,3-oxazolilo, 1,2-tiazolilo, 1,3-tiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo y 1,3,4-tiasiazolilo. Preferido es un heteroarilo de 5 miembros con dos o tres heteroátomos anulares iguales o diferentes de la serie N, O y/o S, tal como especialmente pirazolilo, imidazolilo, 1,3-oxazolilo, 1,3-tiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo y 1,3,4-oxadiazolilo.

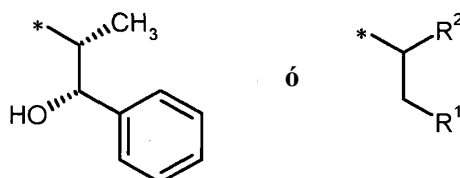
- 20 En el marco de la presente invención es válido que para todos los radicales que aparecen varias veces, su significado es independiente entre sí. Cuando en los compuestos conformes a la invención hay radicales sustituidos, si no se indica de otro modo los restos pueden estar sustituidos una o varias veces. Se prefiere una sustitución con uno o con dos sustituyentes iguales o diferentes. Particularmente preferida es la sustitución con un solo sustituyente.

Preferidos en el marco de la presente invención son compuestos de la fórmula (I), en la cual

- 25 L representa un (C₁-C₈)-alcanodiilo de cadena lineal, en el que (a) dos átomos de carbono en relación 1,3 o 1,4 entre sí pueden formar un puente incluyendo uno, respectivamente los dos átomos de carbono situados entre ellos para dar un anillo fenilo, o (b) hasta dos grupos CH₂ no vecinos entre sí pueden estar reemplazados por -O-,

y

T representa un grupo de la fórmula



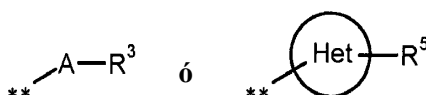
en las cuales

- 30 * designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno,

R¹ significa fenilo o 1*H*-indol-3-ilo,

y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



- 35 en las cuales

** designa el lugar de unión con el radical del respectivo grupo T ,

A representa eteno-1,2-diilo ó propeno-1,3-diilo,

R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

- 40 Het representa un anillo heteroarílico divalente de 5 miembros seleccionado de la serie pirazolilo, imidazolilo, 1,3-oxazolilo, 1,3-tiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo y 1,3,4-oxadiazolilo,

y

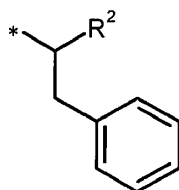
R⁵ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo, así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

Particularmente preferido en el marco de la presente invención son los compuestos de la fórmula (I), en la cual

5 L representa un (C₁-C₆)- alcanodiilo lineal,

y

T representa un grupo de la fórmula

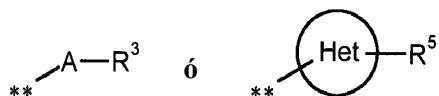


en la cual

10 * designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno

y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



en las cuales

15 ** designa el lugar de unión con el radical del respectivo grupo T ,

A representa eteno-1,2-diilo,

R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con metoxycarbonilo o carboxilo,

Het representa 1,3,4-oxadiazol-2,5-diilo,

y

20 R⁵ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con metoxycarbonilo o carboxilo, así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

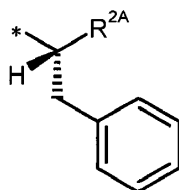
De particular significado en el marco de la presente invención son los compuestos de la fórmula (I), en la cual

L representa propano-1,3-diilo,

así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

25 De particular importancia en el marco de la presente invención son también los compuestos de la fórmula (I), en la cual

T representa un grupo de la fórmula



en la cual

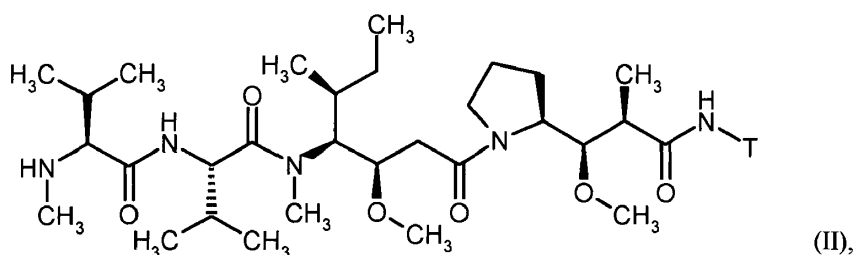
* designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno

y

R^{2A} tiene los significados de R^2 , pero no representa hidrógeno,

así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

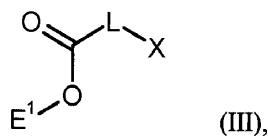
- 5 Las definiciones de radicales indicados individualmente en las respectivas combinaciones, respectivamente en las combinaciones preferidas de radicales se reemplazan también arbitrariamente, independientemente de las respectivas combinaciones de radicales indicadas, por definiciones de radicales de otras combinaciones. De modo muy particularmente preferidas son las combinaciones de dos o más de las clases preferidas antes mencionadas. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de los compuestos de la fórmula (I),
- 10 caracterizado porque un compuesto de la fórmula (II)



en la cual T tiene los significados indicados anteriormente,

se hace reaccionar en un disolvente inerte, o bien

[A] con un compuesto de la fórmula (III) por alquilación inducida por bases,



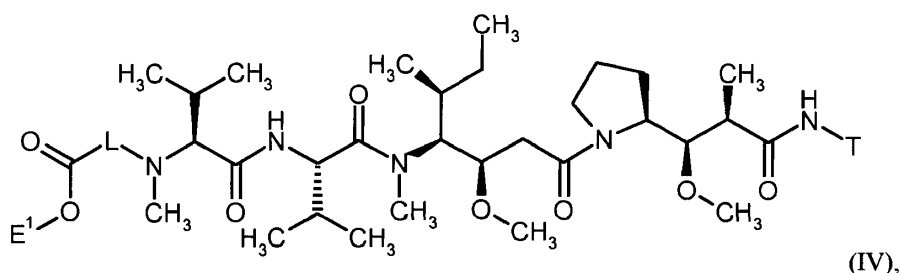
en la cual L tiene el significado indicado anteriormente,

E^1 representa hidrógeno, (C₁-C₄)-alquilo o bencilo,

y

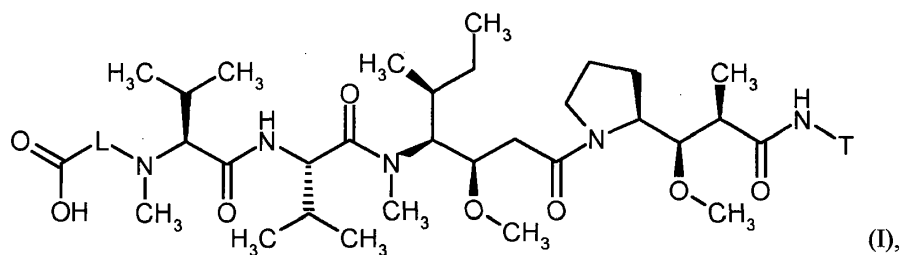
X representa un grupo volátil tal como, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, triflato o tosilato,

para dar un compuesto de la fórmula (IV)



en la cual E^1 , L y T tienen el significado anteriormente indicado,

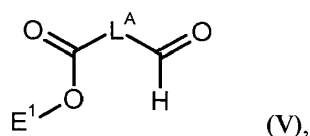
y, a continuación, en el caso en que E^1 represente (C₁-C₄)-alquilo o bencilo, este radical éster se separa según métodos habituales, de modo que igual que en el caso en que E^1 en (III) representa hidrógeno, se obtiene el ácido carboxílico de la fórmula (I) conforme a la invención



en la cual L y T tienen los significados anteriormente indicados,

o bien

[B] con un compuesto de la fórmula (V)



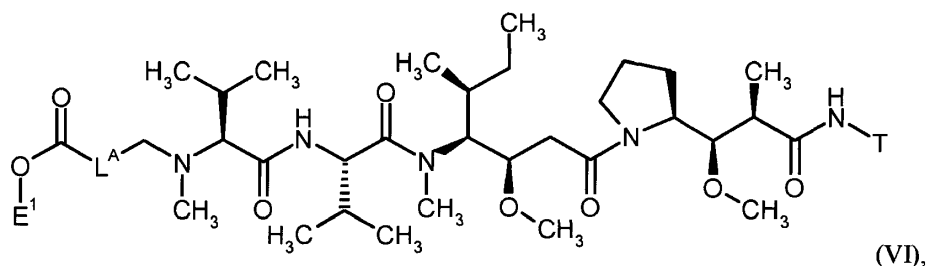
en la cual

E¹ representa hidrógeno, (C₁-C₄)-alquilo o bencilo,

y

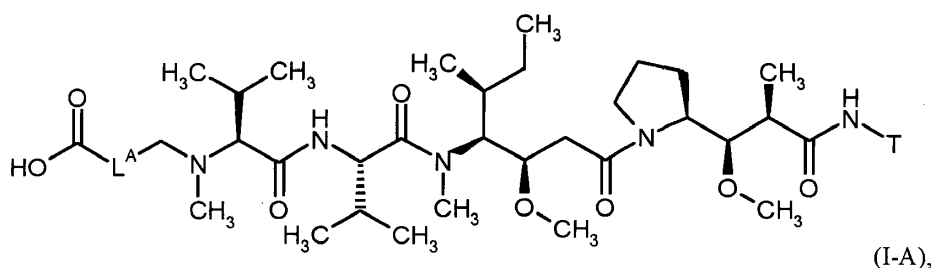
L^A tiene el significado de L indicado anteriormente, sin embargo acortado en la longitud de la cadena alquímica por una unidad CH₂,

en presencia de un adecuado agente de reducción, se transforma en un compuesto de la fórmula (VI)



en la cual E¹, L^A y T tienen los significados anteriormente indicados,

y, a continuación, en el caso en que E¹ represente (C₁-C₄)-alquilo o bencilo este radical éster se separa por métodos habituales, de modo que igualmente que en el caso en que E¹ en (V) representa hidrógeno, se obtiene el ácido carboxílico de la fórmula (I-A) conforme a la invención,



en la cual L^A y T tienen los significados indicados anteriormente,

y los compuestos resultantes de la fórmula (I), respectivamente (I-A) se separan eventualmente en sus enantiómeros y/o diastereoisómeros y/o con los correspondientes disolventes (i) y/o bases o ácidos (ii) se transforma en sus solvatos, sales y/o solvatos de las sales.

Como disolventes inertes para la reacción (II) + (III) → (IV) son adecuados por ejemplo éteres tales como dietiléter, diisopropiléter, metil-*tert*-butiléter, tetrahydrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano o bis-(2-metoxietil)-éter, hidrocarburos tales como benceno, tolueno, xileno, pentano, hexano, heptano, ciclohexano o fracciones del petróleo

o disolventes polares apróticos tales como acetona, metiletilcetona, acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), *N,N*-dimetilacetamida (DMA), *N,N*-dimetilpropileno urea (DMPU), *N*-metilpirrolidinona (NMP) o piridina. Igualmente es posible emplear mezclas de tales disolventes. Se utiliza preferentemente acetona o *N,N*-dimetilformamida.

- 5 Bases adecuadas para esta reacción de alquilación son especialmente hidróxidos alcalinos tales como, por ejemplo, hidróxido de litio, de sodio o de potasio, carbonatos alcalinos o alcalinotérreos tales como, por ejemplo, carbonato de litio, de sodio, de potasio, de calcio o de cesio, o aminas orgánicas habituales tales como trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, *N,N*-diisopropiletilamina, piridina o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina. Preferentemente se utiliza carbonato de potasio o de cesio. Eventualmente es ventajosa la adición de un catalizador de alquilación tal como, por ejemplo, bromuro o yoduro de litio, yoduro de sodio o de potasio, bromuro o yoduro de tetra-*n*-butilamonio o bromuro de benciltriethylamonio.

La reacción (II) + (III) $\rightarrow$ (IV) se lleva a cabo en general en un intervalo de temperatura de -20°C a +100°C, preferentemente a 0°C a +50°C. La reacción puede tener lugar a presión normal, a presión incrementada o a presión reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); por lo regular se trabaja a presión normal.

- 15 La reacción (II) + (V) $\rightarrow$ (VI) tiene lugar en los disolventes inertes habituales para una aminación reductora, bajo las condiciones de reacción, eventualmente en presencia de un ácido y/ o de un agente extractor de agua como catalizador. A estos disolventes pertenecen, por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol o *tert*-butanol, éteres tales como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano o bis-(2-metoxietil)-éter, u otros disolventes tales como diclorometano, 1,2-dicloroetano, *N,N*-dimetilformamida o también agua. Igualmente es posible emplear mezclas de tales disolventes. Como disolvente se utiliza preferentemente una mezcla de 1,4-dioxano/agua bajo adición de ácido acético o ácido clorhídrico diluido como catalizador.

Como agentes de reducción para esta reacción son adecuados especialmente borohidruros complejos tales como, por ejemplo, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, acetoxiborohidruro de sodio o borohidruro de tetrabutilamonio. Preferentemente se emplea cianoborohidruro de sodio.

- 25 La reacción (II) + (V) $\rightarrow$ (VI) se lleva a cabo en general en un intervalo de temperatura de 0°C a +120°C, preferentemente a +50°C a +100°C. La reacción puede tener lugar a presión normal, a presión incrementada o a presión reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); por lo regular se trabaja a presión normal.

- 30 La separación de un radical éster E¹ en las etapas de procedimiento (IV) $\rightarrow$ (I) y (VI) $\rightarrow$ (I-A) [E¹ = (C₁-C₄)-alquilo o bencilo] se lleva a cabo según métodos habituales, tratando el éster en un disolvente inerte con un ácido o una base, transformándose en esta última variante la sal carboxilato que se forma primero en el ácido carboxílico libre, por subsiguiente adición de un ácido. En el caso de un *tert*-butiléster, la separación se efectúa mediante un ácido. En el caso de un éster bencílico la separación se puede efectuar también por hidrógenolisis en presencia de un adecuado catalizador de paladio tal como, por ejemplo, paladio sobre carbón activo.

- 35 El radical éster E¹ procedente del compuesto (III) respectivamente (V) se elige en este caso de tal modo que las condiciones para su separación sean compatibles con el correspondiente grupo T en el compuesto (IV) y (VI).

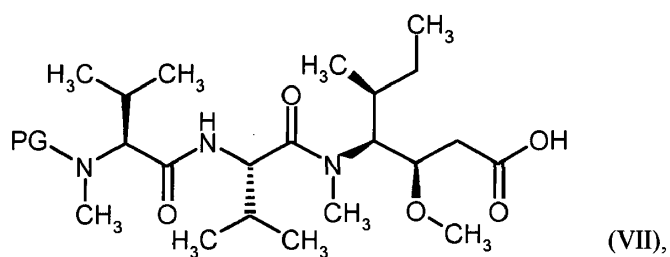
Como base para la hidrólisis del éster son adecuadas las habituales bases inorgánicas. A ellas pertenecen especialmente hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos tales como, por ejemplo, hidróxido de litio, de sodio, de potasio o de bario, o carbonatos alcalinos o alcalinotérreos tales como carbonato de sodio, de potasio o de calcio. Son preferidos los hidróxidos de litio, de sodio o de potasio.

- 40 Como ácidos para la separación de ésteres son adecuados en general ácido sulfúrico, hidruro de cloro/ácido clorhídrico, hidruro de bromo/ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido toluenosulfónico, ácido metanosulfónico o ácido trifluorometanosulfónico o sus mezclas, eventualmente con adición de agua. Preferidos son hidruro de cloro o ácido trifluoroacético en el caso de un *tert*-butiléster y ácido clorhídrico en el caso de un metiléster.

- 45 Como disolventes inertes para estas reacciones son adecuados agua o los disolventes orgánicos habituales para una separación de ésteres. A ellos pertenecen preferentemente los alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, *n*-propanol o isopropanol, éteres tales como dietiléter, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes tales como diclorometano, acetona, metiletilcetona, *N,N*-dimetilformamida o dimetilsulfóxido. Igualmente es posible emplear mezclas de tales disolventes. En el caso de una hidrólisis básica de ésteres se utilizan preferentemente mezclas de agua con 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, metanol, etanol y/o dimetilformamida. En el caso de la reacción con ácido trifluoroacético se emplea preferentemente diclorometano y en el caso de la reacción con hidruro de cloro, preferentemente tetrahidrofurano, éter dietílico, 1,4-dioxano o agua.

La separación de ésteres se lleva a cabo en general en un intervalo de temperatura de -20°C a +100°C, preferentemente a 0°C a +50°C.

- 55 Los compuestos de la fórmula (II) se pueden preparar por métodos habituales de la química de péptidos, por ejemplo haciendo que un compuesto de la fórmula (VII)

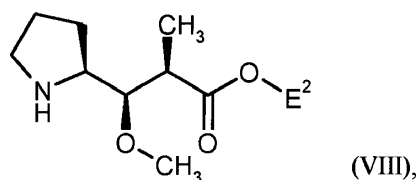


en la cual

PG representa un grupo aminoprotector tal como, por ejemplo, (9H-fluoren-9-ilmetoxy)carbonilo, *tert*-butoxicarbonilo o benciloxycarbonilo,

5 en un disolvente inerte, bajo activación de la función carboxilo en (VII) o bien

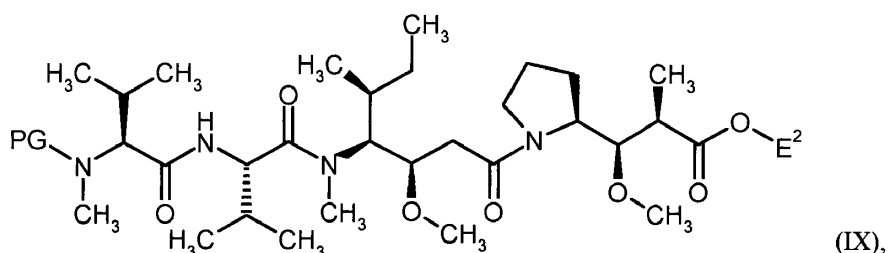
[C] se acopla primero con un compuesto de la fórmula (VIII)



en la cual

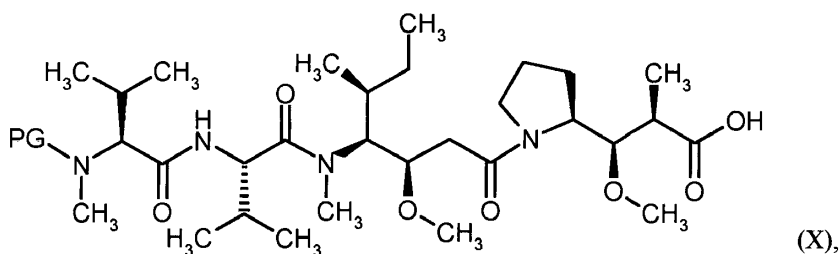
E² representa hidrógeno, (C₁-C₄)-alquilo o bencilo,

10 o con una sal de este compuesto, para dar un compuesto de la fórmula (IX)



en la cual E² y PG tienen los significados indicados anteriormente,

a continuación en el caso en que E² represente (C₁-C₄)-alquilo o bencilo, este radical éster se separa según métodos habituales y el ácido carboxílico resultante de la fórmula (X)

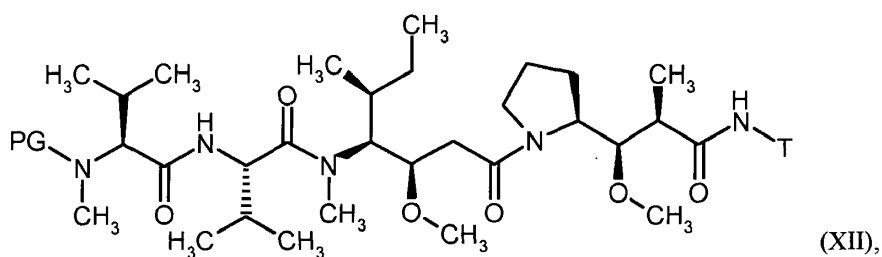


15 en la cual PG tiene el significado indicado anteriormente,
después, en un disolvente inerte, bajo activación de la función carboxilo se acopla con un compuesto de la fórmula (XI)



20 en la cual T tiene el significado anteriormente indicado,

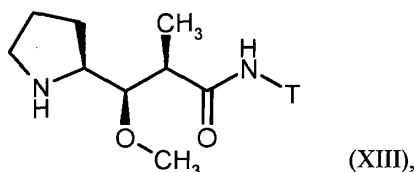
o con una sal de este compuesto, para dar un compuesto de la fórmula (XII)



en la cual PG y T tienen los significados anteriormente indicados,

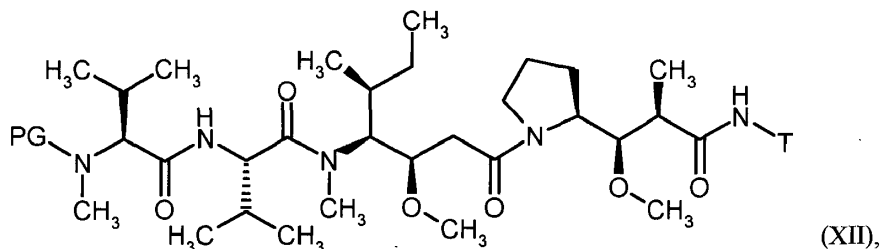
o

[D] se acopla con un compuesto de la fórmula (XIII)



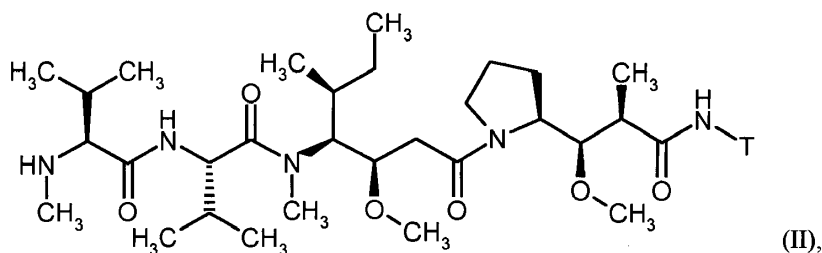
en la cual T tiene los significados indicados anteriormente,

o con una sal de este compuesto, para dar igualmente un compuesto de la fórmula (XII)



en la cual PG y T tienen los significados anteriormente indicados,

10 y el compuesto de la fórmula (XII) se desprotege después de forma habitual para dar un compuesto de la fórmula (II)



en la cual T tiene los significados indicados anteriormente,

15 Las reacciones de acoplamiento descritas anteriormente (formación de amida a partir del respectivo componente de amina y ácido carboxílico) se llevan a cabo según métodos generalmente habituales de la química de péptidos [véase por ejemplo M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin, 1993; M. Bodanszky y A. Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin, 1984; H.-D. Jakubke y H. Jeschkeit, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1982].

20 Disolventes inertes para las reacciones de acoplamiento (VII) + (VIII) → (IX), (X) + (XI) → (XII) y (VII) + (XIII) → (XII) son por ejemplo éteres tales como dietiléter, diisopropiléter, *tert*-butil-metiléter, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano o bis-(2-metoxietil)-éter, hidrocarburos tales como benceno, tolueno, xileno, pentano, hexano, heptano, ciclohexano o fracciones del petróleo, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, triclorometano, tetraclorometano, 1,2-dicloroetano, tricloroetileno o clorobenceno, o disolventes apróticos dipolares tales como acetona, metiletilcetona, acetonitrilo, acetato de etilo, piridina, sulfóxido de dimetilo (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), *N,N*-dimetilacetamida (DMA), *N,N'*-dimetilpropileno urea (DMPU) o *N*-metilpirrolidinona

25

(NMP). Igualmente es posible emplear mezclas de tales disolventes. Preferentemente se emplea *N,N*-dimetilformamida.

Como agentes de activación/condensación para estos acoplamientos son adecuados por ejemplo carbodiimidas tales como *N,N*-dietil-, *N,N*-dipropil-, *N,N*-diisopropil-, *N,N*-d ciclohexil-carbodiimida (DCC) o *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida-hidrocloruro (EDC), derivados del fosgeno tales como *N,N*-carbonildiimidazol (CDI) o isobutilcloroformiato, compuestos de 1,2-oxazolio tales como 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio-3-sulfato o 2-*tert*-butil-5-metilisoxazolio-perclorato, compuestos acilamino tales como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, α -clorenaminas tales como 1-cloro-2-metil-1-dimetilamino-1-propeno, compuestos de fósforo tales como anhídrido de ácido propanofosfónico, dietiléster de ácido cianofosfónico, cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosforilo, benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio-hexafluorofosfato o benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidino)fosfonio-hexafluorofosfato (PyBOP), o compuestos de uronio tales como *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TBTU), *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HBTU), 2-(2-oxo-1-(2*H*)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TPTU), *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HATU) u *O*-(1*H*-6-clorbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TCTU), eventualmente en combinación con otros coadyuvantes tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o *N*-hidroxisuccinimida (HOSu), y como bases carbonatos alcalinos, por ejemplo carbonato de sodio o de potasio, o aminobases terciarias tales como trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, *N,N*-diisopropiletilamina, piridina o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina.

En el marco de la presente invención como agente de activación / condensación para tales reacciones de acoplamiento se utiliza preferentemente *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida-hidrocloruro (EDC) en combinación con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y *N,N*-diisopropiletilamina, u *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HATU) igualmente en combinación con *N,N*-diisopropiletilamina.

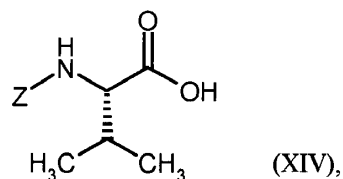
Las reacciones de acoplamiento (VII) + (VIII) $\rightarrow$ (IX), (X) + (XI) $\rightarrow$ (XII) y (VII) + (XIII) $\rightarrow$ (XII) se llevan a cabo por lo regular en un intervalo de temperaturas de -20°C a +60°C, preferentemente a 0°C a +40°C. Las reacciones pueden tener lugar a presión normal, incrementada o reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); En general se trabaja a presión normal.

Grupos funcionales eventualmente presentes - como especialmente grupos amino, hidroxilo y carboxilo -en las etapas del procedimiento anteriormente descritas, en caso de que fuera conveniente o necesario, se podrían presentar también en forma temporalmente protegida. La introducción y separación de estos grupos protectores tiene lugar en este caso según métodos habituales conocidos en la química de péptidos [véase por ejemplo T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1999; M. Bodanszky y A. Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin, 1984]. En el caso de existir varios grupos protegidos, su liberación se puede hacer eventualmente de forma simultánea en una reacción de un solo recipiente o también en etapas de reacción separadas.

Como grupo aminoprotector se utiliza preferentemente *tert*-butoxicarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Z) o (9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo (Fmoc); para una función hidroxilo o carboxilo se emplea preferentemente *tert*-butilo o bencilo como grupo protector. La separación de un grupo *tert*-butil- ó *tert*-butoxicarbonilo se efectúa habitualmente por tratamiento con un ácido fuerte tal como hidruro de cloro, hidruro de bromo o ácido trifluoroacético, en un disolvente inerte tal como dietiléter, 1,4-dioxano, diclorometano o ácido acético; eventualmente, esta reacción también se puede llevar a cabo sin adición de un disolvente inerte. En el caso de bencilo o benciloxycarbonilo como grupo protector, éstos se separan preferentemente por hidrogeno lisis en presencia de un adecuado catalizador de paladio tal como, por ejemplo, paladio sobre carbón activo. El grupo (9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo se separa generalmente con ayuda de una base de amina secundaria tal como dietilamina o piperidina.

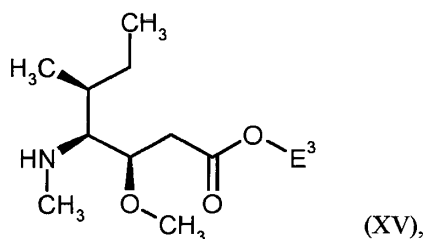
Un radical E² en el compuesto (VIII) [E² = (C₁-C₄)-alquilo o bencilo] se elige en este caso de tal modo que las condiciones de su separación sean compatibles con el respectivo grupo protector PG del compuesto (VII) incorporado.

Los compuestos de la fórmula (VII) se pueden preparar de manera análoga, por ejemplo porque primeramente, *N*-(benciloxycarbonil)-L-valina de la fórmula (XIV)



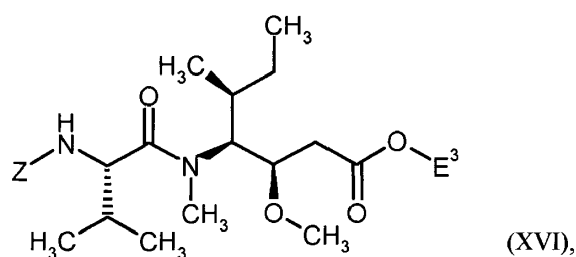
en la cual Z representa el grupo protector benciloxycarbonilo,

con ayuda de un agente de condensación se acopla con un compuesto de la fórmula (XV)



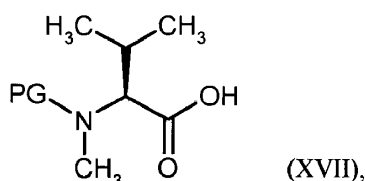
en la cual E^3 representa (C₁-C₄)-alquilo,

o con una sal de este compuesto, para dar un compuesto de la fórmula (XVI)



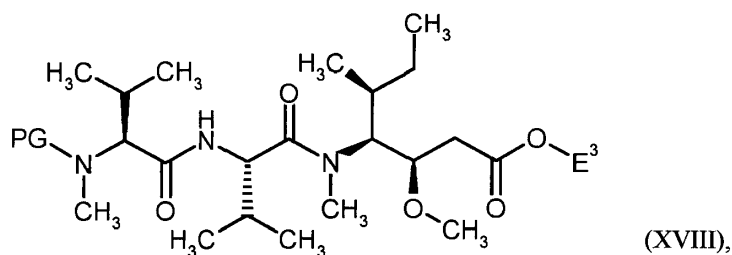
- 5 en la cual E^3 y Z tienen los significados indicados anteriormente,

éste, después de la separación hidrogenolítica del grupo protector Z, en presencia de un agente de condensación, N- protegido, N-metil-L-valina, de la fórmula (XVII)



en la cual

- 10 PG representa un grupo aminoprotector tal como, por ejemplo, (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo, *tert*-butoxicarbonilo o benciloxicarbonilo,
se acopla para dar un compuesto de la fórmula (XVIII)



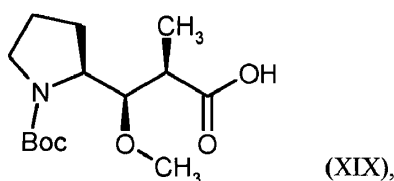
en la cual E^3 y PG tienen los significados indicados anteriormente,

- 15 y, finalmente, la agrupación éster -C(O)O- E^3 en (XVIII) con métodos habituales se lleva al ácido carboxílico (VII) libre.

Los acoplamientos (XIV) + (XV) → (XVI) y (XVI) Z-desprotegido + (XVII) → (XVIII) se llevan a cabo bajo condiciones de reacción análogas a las descritas anteriormente para las etapas de acoplamiento realizadas en los procedimientos [C] y [D].

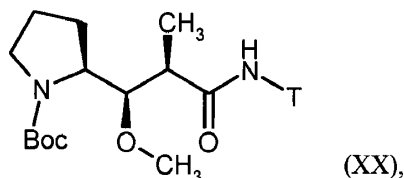
- 20 La hidrólisis del grupo éster -C(O)O- E^3 en la etapa de reacción (XVIII) → (VII) tiene lugar de manera análoga como se describe anteriormente en el marco de las secuencias del procedimiento [A] y [B] para el radical éster E^1 . El grupo alquilo E^3 en el compuesto (XV) se elige en este caso de tal modo que las condiciones de su separación sean compatibles con el grupo protector PG del respectivo compuesto (XVII), introducido.

- 25 Los compuestos de la fórmula (XIII), por su parte, son accesibles por acoplamiento del compuesto (XI), anteriormente descrito, con el compuesto (XIX)



en el cual Boc representa el grupo protector *tert*-butoxicarbonilo,

para dar el compuesto de la fórmula (XX)

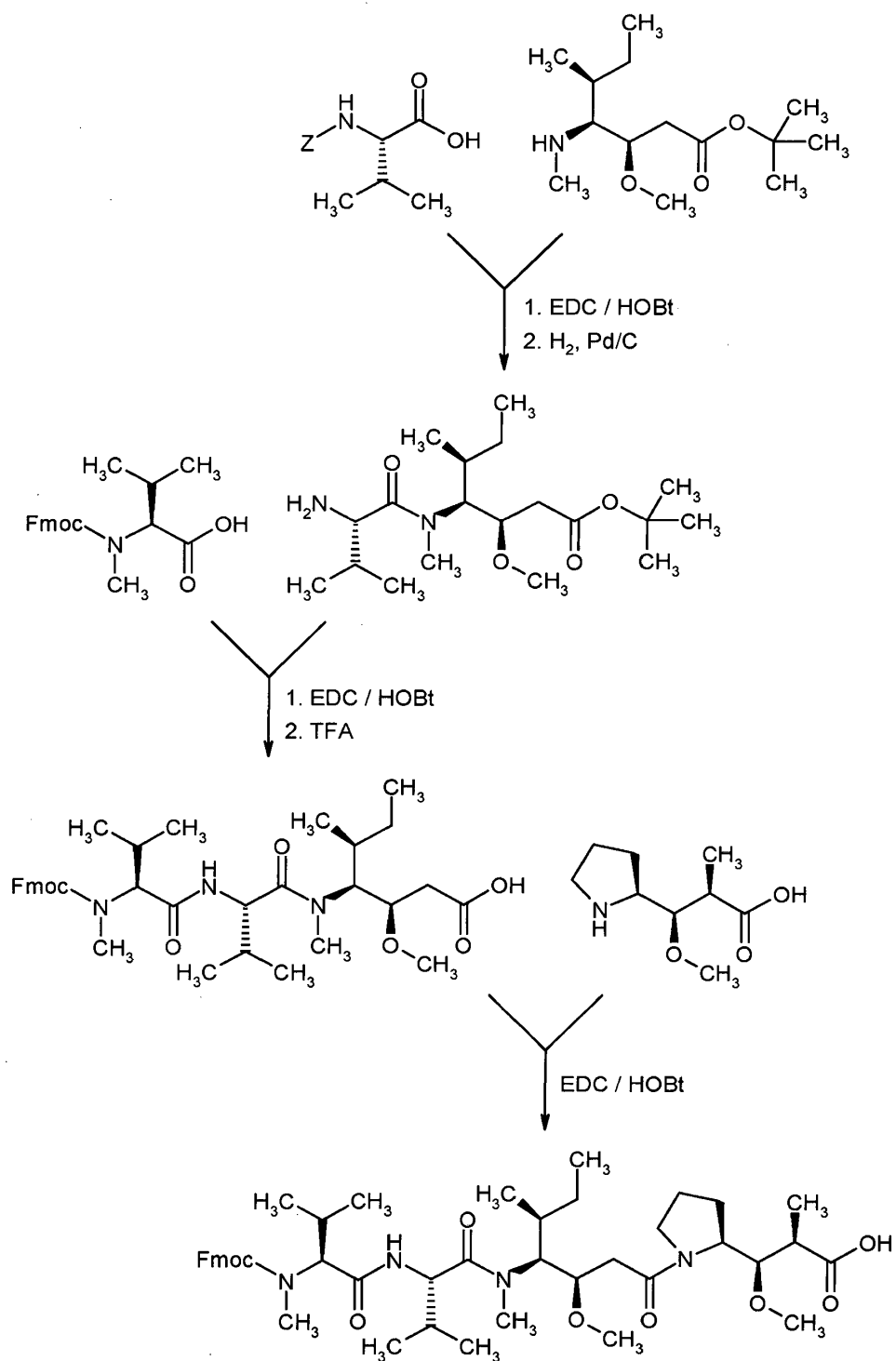


- 5 en la que Boc y T tienen los significados anteriormente indicados,
y subsiguiente separación del grupo protector Boc.

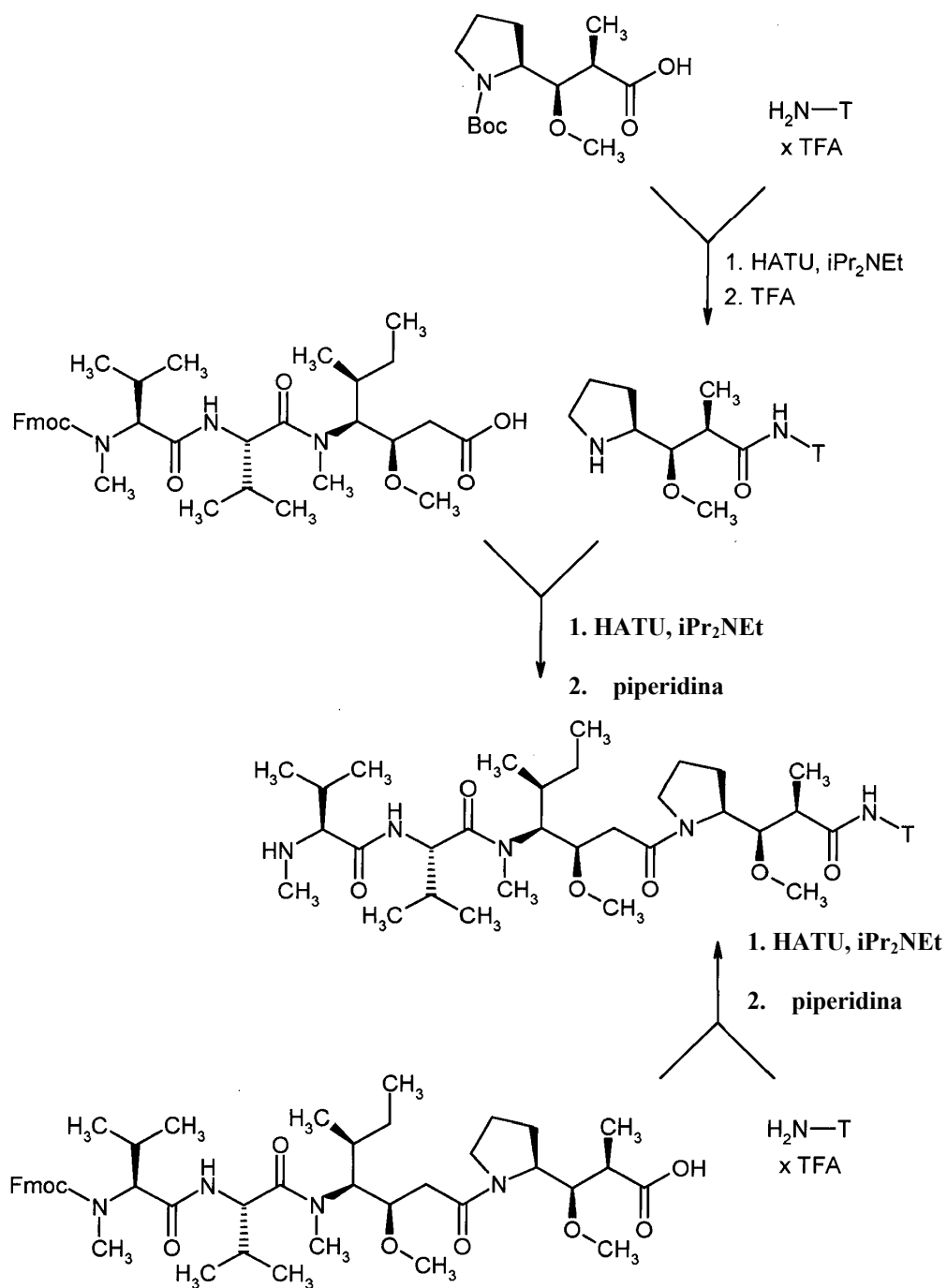
La reacción de acoplamiento (XI) + (XIX) → (XX) se lleva a cabo nuevamente bajo análogas condiciones con que fue realizada anteriormente en las etapas de acoplamiento descritas en el caso de los procedimientos [C] und [D] .

- 10 Los compuestos de las fórmulas (III), (V), (VIII), (XI), (XIV), (XV), (XVII) y (XIX) incluidas, donde compete, las formas quirales o diastereoisómeras de ellas, se pueden obtener comercialmente o se encuentran descritas como tales en la bibliografía, o se pueden obtener por las vías conocidas por el experto en la materia, en analogía con los métodos publicados en la bibliografía. Numerosas prescripciones detalladas así como citas bibliográficas para la preparación de los materiales de partida se encuentran también en la parte experimental en el apartado para la preparación de los compuestos de partida y productos intermedios.
- 15 Si no estuvieran a disposición los correspondientes materiales de partida con pureza isomérica, entonces se puede efectuar una separación de los compuestos conformes a la invención en los correspondientes enantiómeros o distereoisómeros ya convenientemente también en la etapa de los compuestos (II), (IV), (VI), (XI), (XII), (XIII) y (XX), los cuales, después, de forma separada conforme a las etapas de reacción anteriormente descritas pueden seguir reaccionando. Una separación de los estereoisómeros de este tipo se puede llevar a cabo según métodos habituales
- 20 conocidos por el experto en la materia. Preferentemente se aplican procedimientos cromatográficos en fases de separación aquirales, respectivamente quirales; en el caso de ácidos carboxílicos libres como productos intermedios, alternativamente puede tener lugar también una separación a través de las sales diastereoisómeras con ayuda de bases quirales.
- 25 La preparación de los compuestos conformes a la invención se puede interpretar, por ejemplo, por el siguiente conjunto de esquemas:

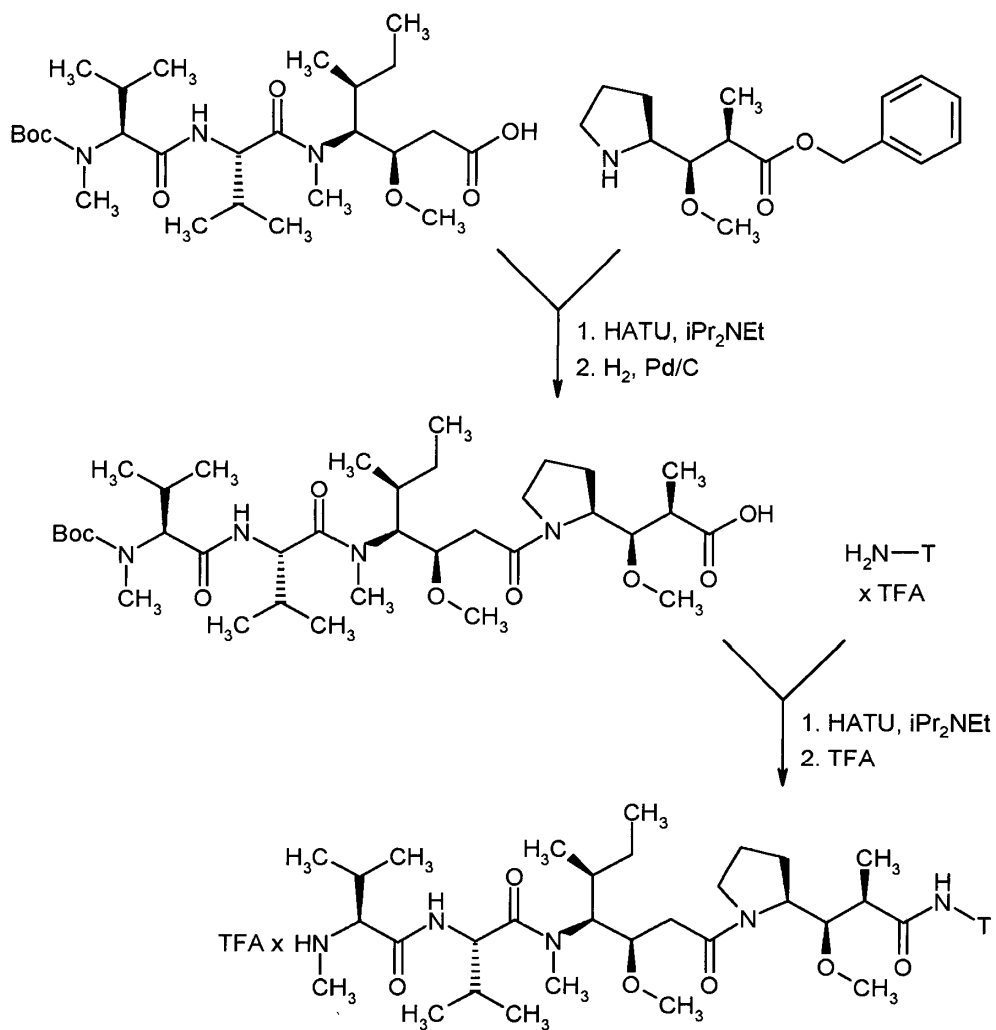
Esquema 1



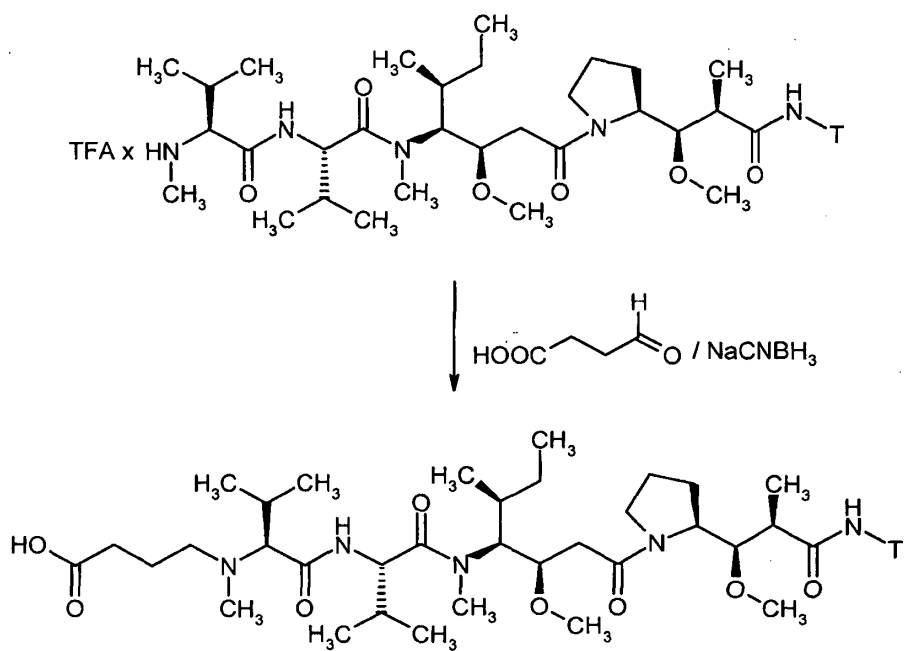
Esquema 2



Esquema 3



Esquema 4



Los compuestos conformes a la invención poseen valiosas propiedades farmacológicas y se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de enfermedades en seres humanos y animales.

En comparación con otros derivados de auristatina, conocidos en el estado actual de la técnica, el grupo N-terminal carboxialquilo [HOOC-L- en la fórmula (I)] contenido en los compuestos de la presente invención, no tiene la mera función de un linker para la unión potencial con proteínas de anticuerpos u otros ligandos, sino que representa más bien un elemento estructural constitutivo para el perfil de propiedades, sorprendentemente ventajoso, de estos compuestos.

Los compuestos conformes a la invención muestran en comparación por ejemplo con la monometilauristatina F (MMAF) una actividad citotóxica más potente o presentan un potencial más bajo de ser también al mismo tiempo sustratos para proteínas de transporte celulares.

Los compuestos conformes a la invención son por lo tanto adecuados, en especial medida, para su utilización en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas en seres humanos y animales mamíferos en general. Los compuestos, por un lado pueden inhibir, bloquear, reducir o rebajar la proliferación celular y la partición celular y, por otro lado, reforzar la apoptosis. A las enfermedades hiperproliferativas, para cuyo tratamiento se pueden emplear los compuestos conformes a la invención, pertenece especialmente el grupo de las enfermedades cancerígenas y tumorales. Entre ellas, en el marco de la presente invención, se entienden especialmente las siguientes enfermedades, pero sin estar limitado a ellas: carcinomas de pecho y tumores de pecho (carcinomas mamarios incluidas formas ductales y lobulares, también *in situ*), tumores de las vías respiratorias (carcinoma de células pequeñas y células no pequeñas, carcinomas bronquiales), tumores cerebrales (por ejemplo del tronco cerebral y del hipotálamo, astrocitoma, ependimoma, glioblastoma, gliomas, blastoma medular, meningiomas, así como tumores neuro-ectodérmicos y pineales), tumores de los órganos digestivos (carcinoma de los tubos gastrointestinales, estómago, vesícula biliar, intestino delgado, intestino grueso, recto y anal), tumores hepáticos (entre otros carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangiocarcinoma hepatocelular mixto), tumores de la zona de la cabeza y cuello (carcinoma de laringe, hipofaringe, nasofaringe, orofaringe, labios y cavidad oral, melanomas orales), tumores de la piel (basaliomas, espinoliomas, carcinoma epitelial escamoso, sarcoma de Kaposi, melanomas malignos, cáncer de piel de tipo no melanoma, cáncer de piel de células Merkel, tumores de mastocitos), tumores del tejido conjuntivo y de apoyo (entre otros sarcomas de partes blandas, osteosarcomas, histiocitomas fibrosos malignos, condrosarcomas, fibrosarcomas, hemangiosarcomas, leiomiomas, liposarcomas, infosarcomas y rabdomiosarcomas), tumores oculares (entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma), tumores de los ganglios endocrinos y exocrinos (por ejemplo de las glándulas tiroideas y paratiroides, carcinomas de la glándula pancreática, adenocarcinomas), tumores del tracto urinario (tumores de vejiga, pene, riñones, pelvis renal y vías urinarias), así como tumores de los órganos reproductivos (carcinoma de endometrio, de cérvix, ovárico, vaginal, de vulva y útero de la mujer, así como carcinoma de próstata y testículos del hombre). A ellas pertenecen también enfermedades proliferativas de la sangre, del sistema linfático y de la médula espinal, en forma sólida y como células circulantes tales como leucemias, linfomas y enfermedades mieloproliferativas, por ejemplo leucemia mieloide aguda, linfoblástica aguda, linfocítica aguda, mielogénica crónica y leucemia de las células peludas, linfomas relacionados con SIDA, linfomas de Hodgkin, linfomas no-Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfomas Burkitt y linfomas del sistema nervioso central.

Estas enfermedades del hombre, bien caracterizadas, pueden aparecer también con etiología comparable en otros mamíferos e igualmente pueden ser tratadas allí con los compuestos de la presente invención.

El tratamiento de las enfermedades cancerígenas anteriormente citadas mediante los compuestos conformes a la invención comprende tanto un tratamiento de los tumores sólidos como también un tratamiento de formas metastatizadas o circulantes de ellas.

El término "tratamiento" o "tratar" se utiliza en el marco de esta invención convencionalmente y significa la previsión, el cuidado y la atención de un paciente con el fin de combatir, reducir, debilitar o paliar una enfermedad o una alteración de la salud y mejorar las condiciones de vida que son deterioradas por esa enfermedad, como por ejemplo en el caso de una enfermedad cancerígena.

Otro objeto de la presente invención es por lo tanto la utilización de los compuestos conformes a la invención para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades anteriormente citadas..

Otro objeto de la presente invención es por lo tanto la utilización de los compuestos conformes a la invención para el la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades anteriormente citadas..

Otro objeto de la presente invención es un conjugado antiproliferativo, en el cual esté ligado uno de los compuestos conformes a la invención con proteínas, como por ejemplo anticuerpos. Los compuestos conformes a la invención se pueden emplear solos o si fuera necesario en combinación con una o otras sustancias farmacológicamente activas, siempre que esta combinación no lleve a efectos secundarios no deseados e inaceptables. Otro objeto de la presente invención son por lo tanto los medicamentos, que contienen al menos uno de los compuestos conformes a

la invención y uno o varios principios activos posteriores, especialmente para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades anteriormente citadas.

Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden combinar con sustancias anti-hiperproliferativas, citostáticas o citotóxicas conocidas para el tratamiento de enfermedades cancerosas. Como principios activos de combinación adecuados se pueden citar por ejemplo:

Aldelesleukina, ácido alendróico, Alfaferon, Alitretinoína, Allopurinol, Aloprim, Aloxi, Altretamina, Aminoglutetimida, Amifostina, Amrubicina, Amsacrina, Anastrozol, Anzmet, Aranesp, Arglabina, Arsenitrióxido, Aromasina, 5-azacitidina, azatioprina BCG o tice-BCG, Bestatina Betametasona-acetato, Betametasona-fosfato de sodio, Bexaroten, Bleomycin-sulfato, Broxuridina, Bortezomib, Busulfan, Calcitonina, Campath, Capecitabina, Carboplatin, Casodex, Cefeson, Celmoleukina Cerubidina Chlorambucil, Cisplatino, Cladribina, ácido clodróico, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, DaunoXome, Decadron, Decadron-fosfato, Delestrogen, Denileukina, Diftitox, Depomedrol, Deslorelina, Dexrazoxan, Diethylstilbestrol, Diflucan, Docetaxel, Doxifluridina, Doxorubicina, Dronabinol, DW-166HC, Eligard, Elitec, Ellence, Emend, Epirubicina, Epoetin-alfa, Epogen, Eptaplatin, Ergamisol, Estrace, Estradiol, Estramustina-fosfato de sodio, Etinilestradiol, Etiol, ácido etidróico, Etopofos, Etoposida, Fadrozol, Farston, Filgrastim, Finasterid, Fligrastim, Floxuridina, Fluconazol, Fludarabina, 5-Fluorodeoxiuridina-monofosfato, 5-Fluoruracil (5-FU), Fluoximesteron, Flutamida, Formestano, Fosteabina, Fotemustina, Fulvestrant, Gammagard, Gemcitabina, Gemtuzumab, Gleevec, Gliadel, Goserelina, Granisetron-hidrocloruro, Histrelina, Hicamtina, Hidrocortisona, eritro-hidroxi noniladenina, hidroxiurea, Ibritumomab Tiuxetan, Idarubicina Ifosfamida Interferon-alfa, Interferon-alfa-2, Interferon-alfa-2 α , Interferon-alfa-2 β , Interferon-alfa-n1, Interferon-alfa-n3, Interferon-beta, Interferon-gamma-1 α , Interleukina-2, Intron A, Iressa, Irinotecan, Kytril, Lentinan-sulfato, Letrozol, Leucovorina, Leuprolid, Leuprolid-acetato, Levamisol, ácido levofolínico-sal de calcio, Levotroid, Levovil, Lomustina, Lonidamina, Marinol, Mecloretamina, Mecobalamina, Medroxi progesteron-acetato, Megestrol-acetato, Melfalan, Menest, 6-Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato Metvix, Miltefosina Minociclina Mitomicina C, Mitotan, Mitoxantrón, Modrenal, Myocet, Nedaplatin, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilutamid, Nolvadex, NSC-631570, OCT-43, Octreotid, Ondansetron-hidrocloruro, Orapred, Oxaliplatin, Paclitaxel, Padiapred, Pegaspargase, Pegasis, Pentostatina, Picibanil, Pilocarpin-hidrocloruro, Pirarubicina, Plicamicina, Porfimer-sodio, Prednimustina, Prednisolona, Prednisona, Premarin, Procarbazona, Procrit, Raltitrexed, Rebif, Rhenium-186-Etidronat, Rituximab, Roferon-A, Romurtid, Salagen, Sandostatina, Sargramostim, Semustina, Sizofiran, Sobuzoxan, Solu-Medrol, Streptozocina, estroicio-89-cloruro, Sintroid, Tamoxifen, Tamsulosin, Tasonermin, Tastolacton, Taxoter, Teceleukin, Temozolomida, Teniposid, Testosteron-propionato, Testred, Tioguanina, Tiotepa, Tirotopina, ácido tiludróico, Topotecan, Toremifen, Tositumomab, Tastuzumab, Teosulfan, Tretinoína, Trexall, Trimetilmelamina, Trimetrexato, Triptorelin-acetato, Triptorelin-Pamoato, UFT, Uridina, Valrubicina, Vesnarinon, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, Virulicina, Zinecard, Zinostatin-Stimalamer, Zofran; ABI-007, Acolbifen, Actimun, Afinitak, Aminopterina Arzoxifen, Asoprisnil, Atamestan, Atrasentan, Avastina BAY 43-9006 (Sorafenib), CCI-779, CDC-501, Celebrex, Cetuximab, Crisnatol, Cyproteron-acetato Decitabina DN-101, Doxorubicin-MTC, dSLIM, Dutasterid, Edotecarina Eflornitina, Exatecan, Fenretinid, Histamin-dihidrocloruro, Histrelin-Hidrogel-Implante, Holmium-166-DOTMP, ácido ibandróico, Interferon-gamma, Intron-PEG, Ixabepilón, Keyhole Limpet-Hemocyanin, L-651582, Lanreotid, Lasofoxifen, Libra, Lonafarnib, Miproxifen, Minodronat, MS-209, liposomales MTP-PE, MX-6, Nafarelina, Nemorubicina, Neovastat, Nolatrexed, Oblimersen, Onko-TCS, Osidem, Paclitaxel-Polyglutamat, Pamidronat-Dinatrium, PN-401, QS-21, Quazepam, R-1549, Raloxifen, Ranpirnas, ácido 13-*cis*-Retinoico, Satraplatina, Seocalcitol, T-138067, Tarceva, Taxoprexina, Thymosin-alfa-1, Tiazofurina, Tipifarnib, Tirapazamina, TLK-286, Toremifen, TransMID-107R, Valspodar, Vapreotid, Vatalanib, Verteporfina, Vinflunina, Z-100, ácido zoledróico, así como combinaciones de éstos.

En una forma de ejecución preferida los compuestos de la presente invención se pueden combinar con agentes anti-hiperproliferativos, que podrían ser - sin que esta relación sea excluyente:

Aminoglutetimida L-Asparaginasa, Azatioprina, 5-Azacaytidina, Bleomicina, Busulfan, Carboplatina, Carmustina, Clorambucil, Cisplatino, Colaspase, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorubicina, detilestilbestrol, 2',2'-difluorodeoxicidina, Docetaxel, Doxorubicina (Adriamycina), Epirubicina, Etoposid y sus derivados, eritro-hidroxi noniladenina, etilneestradiol, Etoposid, Fludarabina-fosfato, 5-Fluorodeoxiuridina, 5-Fluorodeoxyuridin-monofosfato, 5-Fluoruracil, Fluoximesteron, Flutamida, hexametilmelamina, hidroxiurea, hidroxi progesteron-caproato, Idarubicina, Ifosamid, Interferon, Irinotecan, Leucovorin, Lomustin, Mecloroetamina, Medroxi progesteron-acetato, Megestrol-acetato, Melfalan, 6-mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina C, Mitotan, Mitoxantrón, Paclitaxel, Pentostatina, N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), Plicamicina, Prednisolona, Prednisona, Procarbazona, Raloxifen, Semustina, estreptozocina, Tamoxifen, Teniposid, Testosteron-propionato, Tioguanina, tiotepa, Topotecan, Trimetilmelamina, Uridina, Vinblastina, Vincristina, Vindesina y Vinorelbina.

De forma muy prometedora, los compuestos conformes a la invención se pueden combinar también con sustancias terapéuticas biológicas tales como anticuerpos (por ejemplo Avastina, Rituxan, Erbitux, Herceptina). Los compuestos conformes a la invención pueden conseguir también efectos positivos en combinación con terapias dirigidas contra la angiogénesis como, por ejemplo, con Avastina, Axitinib, Recentina, Regorafenib, Sorafenib o Sunitinib. Combinaciones con inhibidores del proteasoma y de mTOR, así como combinaciones con antihormonas e inhibidores de enzimas metabólicos esteroidales, debido a su perfil de efectos secundarios son en particular igualmente adecuadas.

En general, con la combinación de los compuestos de la presente invención con otros agentes efectivos zítostáticos o zítotóxicos se pueden perseguir los siguientes objetivos:

- una mejor eficacia en la ralentización del crecimiento de un tumor, en la reducción de su tamaño o incluso en su total eliminación en comparación con un tratamiento con un único principio activo;
- 5 • La posibilidad de emplear los agentes quimioterapéuticos utilizados en una dosificación más baja que en el caso de la monoterapia.
- La posibilidad de una terapia más tolerable con menos efectos secundarios en comparación con la toma única.
- la posibilidad para el tratamiento de un espectro más amplio de las enfermedades tamarales
- 10 • conseguir una mayor tasa de respuesta a la terapia;
- una supervivencia más prolongada de los pacientes en comparación con la terapia estándar de hoy en día.

Además de esto, los compuestos conformes a la invención se pueden emplear también en combinación de una terapia de rayos y/o de una intervención quirúrgica.

- 15 Otro objeto de la presente invención son los medicamentos que contienen al menos un compuesto conforme a la invención, habitualmente junto con uno o varios coadyuvantes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados, así como su utilización para los fines anteriormente indicados..

Los compuestos conformes a la invención pueden actuar sistémica y/o localmente. Para este fin se pueden administrar de forma adecuada tal como, por ejemplo de forma oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dermal transdermal, conjuntival, ótica o como implante, respectivamente "estent".

- 20 Para estas vías de administración, los compuestos conformes a la invención se pueden administrar en adecuadas formas de administración.

- 25 Para la administración oral son adecuados según el estado de la técnica formas de administración funcionales que liberan los compuestos conformes a la invención de forma rápida y/o modificada, que contienen los compuestos conformes a la invención en forma cristalina y/o amorfa y/o disuelta tales como, por ejemplo, comprimidos (comprimidos no recubiertos o recubiertos, por ejemplo con resistencia a los jugos gástricos o que se disuelven de modo retardado o con revestimientos insolubles, que controlan la liberación del compuesto conforme a la invención) que se deshacen rápidamente en la cavidad bucal o películas/obleas, películas/líofilizados, cápsulas (por ejemplo cápsulas de gelatina blanda o dura), grageas, granulados, "pellets", polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones.

- 30 La administración parenteral puede tener lugar eludiendo una etapa de resorción (por ejemplo por vía intravenosa, intraarterial, intracardial, intraespinal o intralumbal) o desencadenando una resorción (por ejemplo intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Para la administración parenteral son adecuadas como formas de administración, entre otras los preparados inyectables y para infusiones en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, líofilizados o polvos estériles.

- 35 Para las demás vías de administración son adecuadas por ejemplo formas medicamentosas inhalativas(entre otros inhaladores de polvos, nebulizadores), gotas, soluciones o espais nasales, comprimidos administrables lingual, sublingual u oral, películas/obleas o cápsulas, supositorios, preparados para oídos y ojos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mixturas de agitación), suspensiones lipófilas, pomadas, cremas, sistemas terapéuticos transdermales (por ejemplo parches), leche, pastas, espumas, polvos esparcibles, implantes o "estents".
- 40

Preferida es la administración oral o parenteral, especialmente la administración oral y la intravenosa.

- 45 Los compuestos conformes a la invención se pueden transformar en las formas de administración expuestas. Esto puede tener lugar de manera conocida por mezcladura con coadyuvantes farmacéuticos adecuados inertes, no tóxicos. A estos coadyuvantes pertenecen, entre otros, los excipientes (por ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (por ejemplo polietilenglicoles líquidos), emulgentes y dispersantes o reticulantes (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitano), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizantes (por ejemplo antioxidantes tales como ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo pigmentos inorgánicos tales como por ejemplo óxidos de hierro) y correctores de sabor y olor.

- 50 En general, ha resultado ventajoso en el caso de administración parenteral administrar cantidades de aproximadamente 0,001 a 1 mg/kg, preferentemente aproximadamente 0,01 a 0,5 mg/kg de peso corporal para

conseguir resultados eficaces. En el caso de administración oral la dosis es aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, preferentemente aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg y, de modo muy preferido, 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal.

- 5 A pesar de ello, a veces es necesario desviarse de las cantidades citadas, y ciertamente en función del peso corporal. vías de administración, comportamiento individual frente al principio activo, tipo de preparado y hora, respectivamente intervalo en la que tiene lugar la administración. Así, en algunos casos puede ser suficiente con menos de la cantidad mínima anteriormente citada, mientras que en otros casos se tenga que sobrepasar el límite máximo anteriormente citado. En el caso de la administración de grandes cantidades, puede ser aconsejable distribuir las en varias dosis individuales a lo largo del día.

Los siguientes ejemplos de ejecución ilustran la invención. La invención no se limita a los ejemplos.

- 10 Los datos porcentuales en los siguientes ensayos son, si no se indica de otro modo, porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Relaciones de disolución, relaciones de dilución y datos de concentración de soluciones líquido/líquido se refieren en cada caso al volumen.

A. Ejemplos

Abreviaturas y acrónimos:

15	abs.	absoluto
	Ac	acetilo
	aq.	acuoso, solución acuosa
	Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
	br.	ancho (en NMR)
20	Bsp.	ejemplo
	<i>ca.</i>	<i>casi</i> , aproximadamente
	CI	ionización química (en MS)
	d	doblete (en NMR)
	d	día(s)
25	DC	cromatografía de capa fina
	DCI	ionización química directa (en MS)
	dd	doblete de doblete (en NMR)
	DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
	DME	1,2-dimetoxietano
30	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DPBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
	dt	doblete de triplete (en NMR)
	d. Th.	del valor teórico (en rendimiento químico)
35	EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> 4-etilcarbodiimida- hidrocloreuro
	EI	ionización por choque de electrones (enei MS)
	eq.	equivalente(s)
	ESI	ionización por espray de electrones (en MS)
	FCS	suero de ternera fetal
40	Fmoc	(9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo

	GC-MS	espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases
	ges.	saturado
	GTP	guanosin-5'-trifosfato
	h	hora(s)
5	HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etansulfónico
	HOAc	ácido acético
	HOBt	1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol-hidrato
	HOSu	N-hidroxisuccinimida
10	HPLC	cromatografía de alta presión, cromatografía de líquidos de alta resolución
	HR-MS	espectrometría de masas de alta resolución
	konz.	concentrado
	LC-MS	espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos
	m	multiplete (en NMR)
15	min	minuto (s)
	MS	espectrometría de masas
	MTBE	metil- <i>tert</i> -butiléter
	MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2 <i>H</i> -tetrazolio
	NMM	N-metilmorfolina
20	NMP	N-metil-2-pirrolidinona
	NMR	espectrometría de resonancia nuclear
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	Pd/C	paladio sobre carbón activo
	quant.	cuantitativo (en rendimiento)
25	quart	cuarteto (en NMR)
	quint	quinteto (en NMR)
	R _f	índice de retención (en DC)
	TA	temperatura ambiente
	R _t	tiempo de retención (en HPLC)
30	s	singlete (en NMR)
	t	triplete (en NMR)
	<i>tert</i>	terciario
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
35	UV	espectrometría ultravioleta
	v/v	relación volumen/volumen (de una solución)
	Z	benciloxicarbonilo

Método 1 (LC-MS):

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Método 10 (HPLC):

Instrumento Agilent 1200 Series; Columna: Agilent Eclipse XDB-C18 5 μ 4,6 mm x 150 mm; Columna previa: Phenomenex KrudKatcher Disposable Pre-Column; volumen de inyección: 5 μ l; Eluyente A: 11 agua + 0,01% ácido trifluoroacético; eluyente B: 11 agua + 0,01% ácido trifluoroacético; gradiente: 0,00 min 10% B $\rightarrow$ 1,00 min 10% B $\rightarrow$ 1,50 min 90% B $\rightarrow$ 5,5 min 10% B; caudal: 2 ml/min; temperatura de la columna 30°C.

Método 11 (LC-MS):

Instrumento: Sistema Waters Acquity SQD UPLC ; Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ 30 mm x 2 mm; Eluyente A: 11 agua + 0,25 ml de ácido fórmico al 99%, eluyente B: 11 acetonitrilo + 0,25 ml de ácido fórmico al 99%, gradiente: 0,0 min 90% A $\rightarrow$ 1,2 min 5% A $\rightarrow$ 2,0 min 5% A; caudal: 0,60 mL/min estufa 50°C; detección UV: 208-400 nm.

Método 12 (GC-MS):

Instrumento: Micromass GCT, GC 6890; Columna: Restek RTX-35, 15 m x 200 μ m x 0.33 μ m; caudal constante con helio: 0,88 mL/min estufa 70°C; Inlet: 250°C; gradiente: 70°C, 30°C/min $\rightarrow$ 310°C (mantener 3 min).

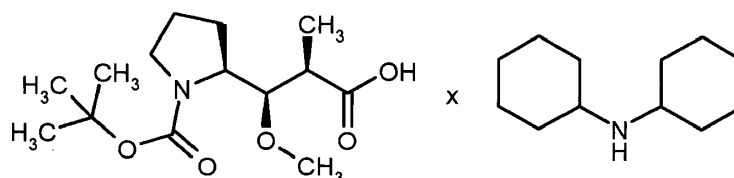
Método 13 (HR-MS):

Instrumento: Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL; FTMS ESI positivo.

Para todos los reactandos o reactivos cuya preparación en lo que sigue no se ha descrito explícitamente, vale que fueron adquiridos comercialmente a partir de fuentes en general accesibles. Para todos los demás reactandos o reactivos cuya preparación igualmente no se ha descrito en lo que sigue y que no se pudieron adquirir comercialmente o se adquirieron a partir de fuentes que en general no son accesibles, se indica una referencia de la bibliografía publicada, en la que se describe su preparación.

Compuestos de partida y compuestos intermedios:Compuesto de partida 1

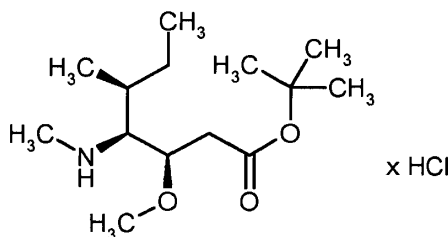
Ácido (2R,3R)-3-[(2S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoico (Boc-Dolaproin) sal de dicitclohexilamina



El compuesto titular se puede preparar por distintas vías según prescripciones bibliográficas, véase por ejemplo Pettit et al., Synthesis 1996, 719; Shioiri et al., Tetrahedron Lett. 1991, 32, 931; Shioiri et al., Tetrahedron 1993, 49, 1913; Koga et al., Tetrahedron Lett. 1991, 32, 2395; Vidal et al., Tetrahedron 2004, 60, 9715; Poncet et al., Tetrahedron 1994, 50, 5345. Aquí fue sintetizado de forma correspondiente a la prescripción de Shioiri et al. (Tetrahedron Lett. 1991, 32, 931).

Compuesto de partida 2

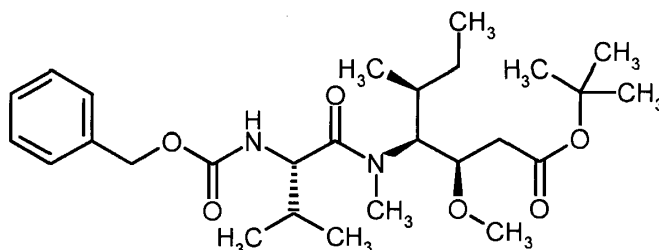
***tert*-butil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoato-hidrocloruro (Dolaisoleucin-OtBu x HCl)**



El compuesto titular se puede preparar por distintas vías según prescripciones bibliográficas, véase por ejemplo Pettit et al., Org. Chem. 1994, 59, 1796; Koga et al., Tetrahedron Lett. 1991, 32, 2395; Shioiri et al., Tetrahedron Lett. 1991, 32, 931; Shioiri et al., Tetrahedron 1993, 49, 1913. Aquí fue sintetizado de forma correspondiente a la prescripción de Koga et al. (Tetrahedron Lett. 1991, 32, 2395).

Compuesto intermedio 1

tert-butil-(3*R*,4*S*,5*S*)-4-[[*N*-[(benziloxi)carbonil]-*L*-valil](metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato



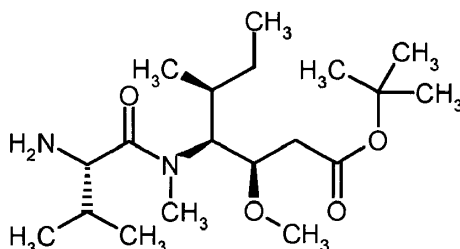
425 mg (1,7 mmol) de *N*-[(benziloxi)carbonil]-*L*-valina se disolvieron en 50 ml de DMF y sucesivamente se le añadió 500 mg (1,7 mmol) de *tert*-butil-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)-heptanoat-hidrocloruro (compuesto de partida 2), 356 mg (1,9 mmol) de 1-3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida-hidrocloruro, 285 mg (1,9 mmol) de 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol-hidrato, así como 655 mg (5,1 mmol) de *N,N*-diisopropiletilamina. La mezcla se agitó durante 20 h a TA. A continuación, se añadieron otra vez 142 mg (0,5 mmol) de *N*-[(benziloxi)carbonil]-*L*-valina, 119 mg (0,6 mmol) de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida-hidrocloruro, 95 mg (0,6 mmol) de hidrox-1*H*-benzotriazol-hidrato, así como 218 mg (1,7 mmol) de *N,N*-diisopropiletilamina y la mezcla se trató durante 90 min con ultrasonidos. La tanga se vertió después en una mezcla de solución acuosa semisaturada de cloruro amónico y acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se lavó sucesivamente con solución saturada de hidrógenocarbonato de sodio y solución saturada de cloruro de sodio; se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron 329 mg (40% del valor teórico) del compuesto titular en forma de aceite incoloro.

HPLC (método 5): $R_t = 2,5$ min;

(LC-MS) (método 1): $R_t = 1,45$ min; MS (ESIpos): $m/z = 493$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 2

tert-butil-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(-*L*-valil)amino]heptanoato



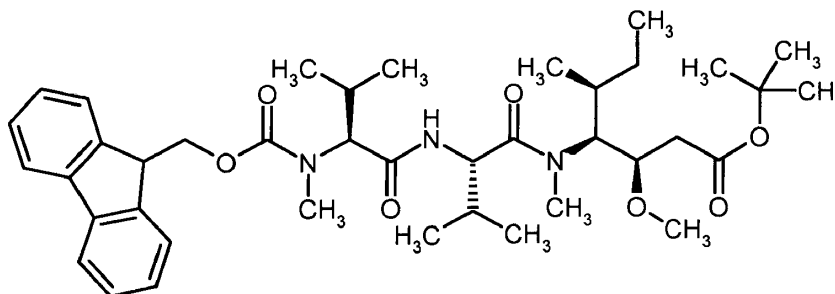
500 mg (1 mmol) de *tert*-butil-(3*R*,4*S*,5*S*)-4-[[*N*-[(benziloxi)carbonil]-*L*-valil](metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato (compuesto intermedio 1) se disolvieron en 50 ml de metanol y después de la adición de 100 mg de paladio al 10% sobre carbón activo se hidrogenó durante 1 h a TA bajo presión normal. El catalizador se separó después por filtración y el disolvente se separó en vacío. Se obtuvieron 370 mg (cuantitativo) del compuesto titular en forma de aceite casi incoloro.

HPLC (método 5): $R_t = 1.59$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,74$ min; MS (ESIpos): $m/z = 359$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 3

N-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-*tert*-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



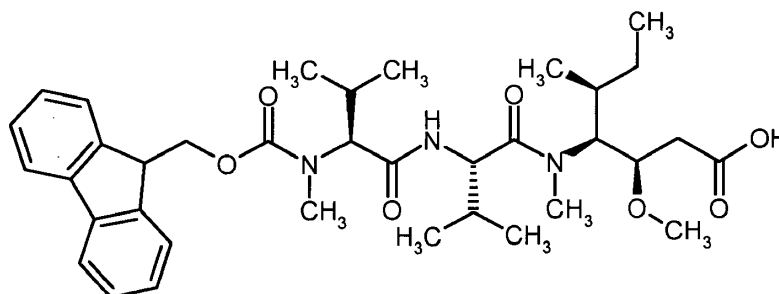
- 5 396 mg (1,1 mmol) de *N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-metil-L-valina se disolvieron en 20 ml de DMF y sucesivamente se le añadió 365 mg (1 mmol) de *tert*-butil-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(L-valil)amino]heptanoato (compuesto intermedio 2), 234 mg (1,2 mmol) de 1-3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida-hidrocloruro, así como 187 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol-hidrato. La mezcla se agitó durante una noche a TA. La tанда se vertió después en una mezcla de solución acuosa semisaturada de cloruro amónico y acetato de etilo. La
- 10 fase orgánica se separó, se lavó sucesivamente con solución saturada de hidrógenocarbonato de sodio y solución saturada de cloruro de sodio; se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró. El residuo, sin más purificación, se utilizó directamente en la siguiente etapa. Rendimiento: 660 mg (68% del valor teórico)

HPLC (método 5): $R_t = 3,0$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,61$ min; MS (ESIpos): $m/z = 694$ ($M+H$)⁺.

15 **Compuesto intermedio 4**

N-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-metil-L-valil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-L-valinamida



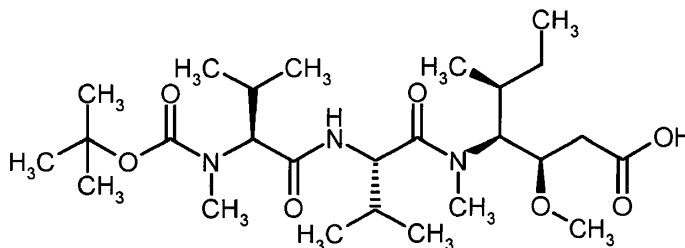
- 20 650 mg (0,94 mmol) de *N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-*tert*-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 3) se recogieron en 5 ml de diclorometano, se añadió 5 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante una noche a TA. A continuación se concentró en vacío y el residuo remanente se purificó mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron 430 mg (72% del valor teórico) del compuesto titular en forma de espuma incolora.

HPLC (método 5): $R_t = 2,4$ min;

- 25 LC-MS (método 2): $R_t = 1,51$ min; MS (ESIpos): $m/z = 638$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 5

N-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-L-valinamida



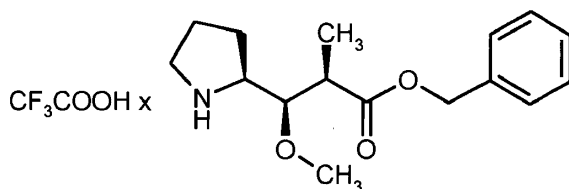
51 mg (0,08 mmol) de *N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-metil-L-valil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 4) se disolvieron en 10 ml de DMF y se le añadió 0,5 ml de piperidina. Tras 10 min de agitación a TA la tanda se concertó en vacío y el residuo se mezcló con dietiléter. Los componentes insolubles se separaron por filtración y se lavaron varias veces con dietiléter. Después, el residuo de filtración se recogió en 5 ml de dioxano/agua (1:1) y la solución se ajustó con lejía de sodio a pH 11. Bajo tratamiento de ultrasonidos se añadieron en varias porciones un total de 349 mg (1,6 mmol) de di-*tert*-butildicarbonato, manteniéndose el valor del pH de la solución en 11. Tras finalizar la reacción, el dioxano se evaporó y la solución acuosa se ajustó a un valor del pH 2-3 con ácido cítrico. Se extrajo dos veces con respectivamente 50 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se reunieron, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron en vacío. El residuo se recogió en dietiléter y el producto se precipitó con pentano. El disolvente se separó por decantación. El residuo se digirió aun varias veces con pentano y finalmente se secó en alto vacío. Se obtuvieron 31 mg (93% del valor teórico) del compuesto titular.

HPLC (método 6): $R_t = 2,2$ min;

LC-MS (método 2): $R_t = 1,32$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 6

Benzil-(2*R*,3*R*)-3-metoxi-2-metil-3-[(2*S*)-pirrolidin-2-il]propanoato sal del ácido trifluoroacético



Primero se liberó el ácido (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoico a partir de 1,82 g (3,88 mmol) de la sal de dicitclohexilamina (compuesto de partida 1) recogiéndola en 150 ml de acetato de etilo y agitación con 100 ml de ácido sulfúrico acuoso al 0,5%. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró. El residuo se recogió en 10 ml de dioxano y 10 ml de agua, se añadió 1517 mg (4,66 mmol) de carbonato de cesio y se trató 5 min en baño de ultrasonidos. A continuación se concentró en vacío y el residuo se co-distiló una vez con DMF. El residuo se recogió después en 15 ml de DMF y se le añadió 1990 mg (11,64 mmol) de bromuro de bencilo. La mezcla se trató 15 min en el baño de ultrasonidos y, a continuación, se concentró en vacío. El residuo se distribuyó entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio y después se concentró. El residuo se purificó finalmente mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron de este modo 1170 mg (80% del valor teórico) del producto intermedio protegido con Boc *tert*-butil-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-(benziloxi)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-carboxilato.

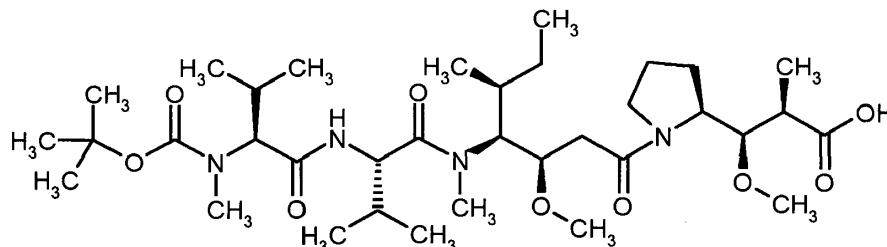
Inmediatamente después estos 1170 mg del producto intermedio se recogieron en 15 ml de diclorometano y se leas añadieron 5 ml de ácido trifluoroacético. Tras 15 min de agitación a TA la tanda se concertó en vacío y el residuo se liofilizó a partir de dietiéter. Después de secar en alto vacío quedaron remanentes 1333 mg (84% del valor teórico) del compuesto titular en forma de aceite amarillo.

HPLC (método 5): $R_t = 1,5$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,59$ min; MS (ESIpos): $m/z = 278$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 7

N-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



- 5 1200 mg (2,33 mmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 5) se juntaron con 910,8 mg (2,33 mmol) de la sal bencil-(2*R*,3*R*)-3-metoxi-2-metil-3-[(2*S*)-pirrolidin-2-il]propanoato del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 6), 1327 mg (3,49 mmol) de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluroniohexafluorofosfato y 2027 μ l de *N,N*-diisopropiletilamina en 50 ml de DMF y se agitó 5 min a TA. Después el disolvente se separó en vacío. El residuo remanente se recogió en acetato de etilo y se agitó sucesivamente con solución acuosa de ácido cítrico al 5% y solución saturada de hidrógenocarbonato de sodio. La fase orgánica se separó y concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa. Las fracciones de producto se reunieron, se concentraron y el residuo se secó en alto vacío. Se obtuvieron así 1000 mg (55% del valor teórico) del éster bencílico del producto intermedio *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-(benziloxi)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en forma de resina.

LC-MS (método 1): $R_t = 1,56$ min; MS (ESIpos): $m/z = 775$ ($M+H$)⁺.

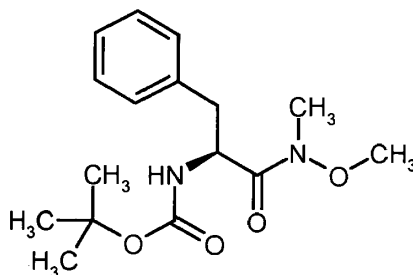
- La cantidad total obtenida de este compuesto intermedio se recogió en 5 ml de una mezcla de metanol y diclorometano (20:1) y el grupo éster bencílico se separó por hidrogenación a presión normal con 10% de paladio sobre carbón activo como catalizador. Después de agitar 30 min a TA el catalizador se separó por filtración y el filtrado se concentró en vacío. Se obtuvieron 803 mg (91% del valor teórico) del compuesto titular en forma de sólido blanco.

HPLC (método 5): $R_t = 2,1$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,24$ min; MS (ESIpos): $m/z = 685$ ($M+H$)⁺.

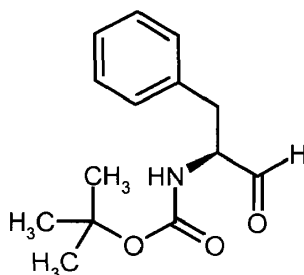
Compuesto intermedio 8

- 25 *N*¹-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metoxi-*N*-metil-L-fenilalaninamida



- 1000 mg (3,77 mmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-fenilalanina se dispusieron previamente en 10 ml de diclorometano y se les añadió 733 mg (4,52 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. La tanda se agitó 15 min hasta la finalización del desarrollo de gases. A continuación, a la mezcla se añadieron 441 mg (4,52 mmol) de *N,O*-dimetilhidroxilamina-hidrocloreto, así como 657 μ l (3,77 mmol) de *N,N*-diisopropiletilamina y se agitó 1 h a TA. Después la tanda se diluyó con diclorometano y se lavó sucesivamente agua destilada, ácido clorhídrico 0,5 N y solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se separó, las fases acuosas reunidas se extrajeron con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron en vacío. Se obtuvieron 1090 mg (93% del valor teórico) del compuesto titular.

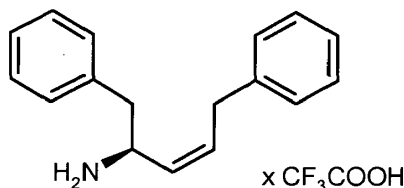
- 35 LC-MS (método 1): $R_t = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 309$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 9*tert*-butil-[(2*S*)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]carbamato

5 1090 mg (3,5 mmol) de *N*^a-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metoxi-*N*-metil-L-fenilalaninamida se disolvieron en 20 ml de 2-metiltetrahydrofurano y se enfriaron a 0°C. Después se añadieron lentamente 4,2 ml (4,2 mmol) de una solución 1 M de hidruro de litio y aluminio en THF y la mezcla de reacción se agitó 30 min a 0°C. A continuación, se añadió cuidadosamente una solución acuosa al 5% de hidrógenosulfato de potasio. La tanga se diluyó con agua y se extrajo con MTBE. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró. Se obtuvieron 820 mg (94% del valor teórico) del compuesto titular.

10 Método 12 (GC-MS): *R*_t = 5,61 min; MS (ESIpos): *m/z* = 220 (M-29)⁺

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1,15-1,42 (m, 9H), 7,11-7,39 (m, 5H), 9,52 (s, 1H) [otras señales escondidas bajo los picos del disolvente]

Compuesto intermedio 10(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-amino sal del ácido trifluoroacético

15 Bajo argón se añadieron a una suspensión de 986 mg (2,2 mmol) de bromuro de trifenil(2-feniletil)fosfonio [obtenible por ejemplo según R.W. Hartmann, M. Reichert, Archiv der Pharmazie 333, 145 (2000); K.C. Nicolaou et al., European J. Chem. 1, 467 (1995)] en 125 ml de THF a -78°C 842 µl (2,1 mmol) de solución 2,5 M de *n*-butilitio en hexano, y la mezcla se agitó a continuación 1 h a 0°C. La mezcla de reacción se enfrió después otra vez a -78°C y se añadió una solución de 500 mg (2,0 mmol) de *tert*-butil-[(2*S*)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]carbamato en 5 ml de THF seco. La tanga se calentó a 0°C y se siguió agitando 3 h a esa temperatura. La reacción se detuvo entonces por adición de solución acuosa saturada de cloruro amónico. La mezcla se diluyó con MTBE, se separaron las fases, y la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró en vacío. El residuo se purificó a través de una columna de gel de sílice con el eluyente ciclohexano/acetato de etilo 5:1. Después de concentrar las correspondientes fracciones se obtuvieron 173 mg (25,6% del valor teórico) del compuesto intermedio protegido con Boc *tert*-butil-[(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-il]carbamato.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1,16-1,46 (m, 9H), 2,62 (dd, *J* = 13,20 Hz, 7,34 Hz, 1H), 2,73-3,18 (m, 1H), 4,56 (t, *J* = 7,46 Hz, 1H), 5,27-5,57 (m, 1H), 6,98-7,32 (m, 10H) [otras señales escondidas bajo los picos del disolvente]

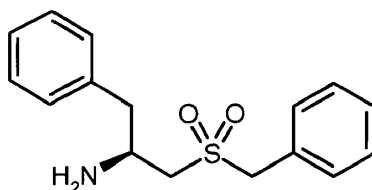
30 173 mg (512 µmol) del compuesto intermedio *tert*-butil-[(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-il]carbamato se dispusieron previamente en 16 ml de diclorometano, se les añadió 4 ml de ácido trifluoroacético y se dejaron reposar 30 min a TA. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se secó en vacío. Se obtuvieron 180 mg (99% del valor teórico) der compuesto titular.

LC-MS (método 1): *R*_t = 0,74 min; MS (ESIpos): *m/z* = 238 (M+H)⁺

35 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2,64-2,83 (m, 1H), 2,88-3,02 (m, 1H), 3,05-3,22 (m, 2H), 4,00-4,55 (m, 1H), 5,16-5,46 (m, 1H), 5,48-5,78 (m, 1H), 6,60-6,89 (m, 2H), 7,14 (s, 3H), 7,22-7,36 (m, 5H), 7,89-8,27 (m, 2H).

Compuesto intermedio 11

(2S)-1-(benzilsulfonyl)-3-fenilpropan-2-amina



- 5 200 mg (1,13 mmol) de (4S)-4-benzil-1,3-oxazolidin-2-ona se dispusieron previamente en 3 ml de *tert*-butanol y se les añadió 280 mg (2,26 mmol) de bencilmercaptano. La mezcla se calentó a continuación a reflujo 2 días. Después la tunda se concentró en el evaporador rotativo y el compuesto intermedio obtenido (2S)-1-(bencilsulfanil)-3-fenilpropan-2-amina se siguió haciendo reaccionar directamente sin elaboración.

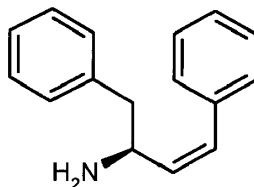
HPLC (método 10): $R_t = 2,63$ min;LC-MS (método 1): $R_t = 0,67$ min; MS (ESIpos): $m/z = 258$ (M+H)⁺.

- 10 El compuesto intermedio bruto anteriormente obtenido se disolvió en una solución de 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y 5 ml de ácido fórmico y se agitó durante 12 h a TA. Después, la mezcla de reacción se vertió sobre solución acuosa saturada de sulfato de sodio y se extrajo tres veces con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró. El producto bruto obtenido se purificó mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron 343 mg (61% del valor teórico) del compuesto titular.

- 15 HPLC (método 10): $R_t = 2,40$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,65$ min; MS (ESIpos): $m/z = 290$ (M+H)⁺.**Compuesto intermedio 12**

(2S,3Z)-1,4-difenilbut-3-en-2-amina



- 20 552,7 mg (9,85 mmol) de hidróxido de potasio se disolvieron en metanol, se extendieron sobre 1,1 g de óxido de aluminio neutro y después se secaron en alto vacío. A una solución de 240 mg (0,82 mmol) de (2S)-1-(bencilsulfonil)-3-fenilpropan-2-amina y 1,56 g del hidróxido de potasio así preparado sobre óxido de aluminio en 6,2 ml de *n*-butanol, se añadieron gota a gota a 5-10°C 307 μ l (3,3 mmol) de dibromo-difluormetano. La mezcla de reacción se agitó 2 h a TA, después se filtró sobre celita y el residuo se lavó bien con diclorometano. El filtrado se concentró y el residuo resultante se secó en vacío. El producto bruto obtenido se purificó mediante cromatografía HPLC preparativa. Se obtuvieron 98 mg (35% del valor teórico) del compuesto titular con una relación *E/Z* de diastereoisómeros de 4:1.

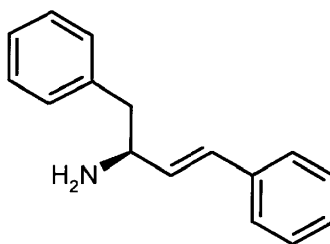
HPLC (método 10): $R_t = 2,46$ min;LC-MS (método 1): $R_t = 0,75$ min; MS (ESIpos): $m/z = 224$ (M+H)⁺.

- 30 La mezcla de *E/Z*-diastereoisómeros obtenida anteriormente se disolvió en 2 ml de etanol y 0,2 ml de *N,N*-diisopropiletilamina y se separó a través de HPLC en fase quiral [columna: Daicel Chiralpak AD-H, 5 μ m, 250 mm x 20 mm; eluyente: hexano/(etanol + 0,2% de dietilamina) 50:50 v/v; detección UV: 220 nm; Temperatura: 30°C]. Las respectivas fracciones se concentraron en el evaporador rotativo y el residuo se secó en vacío. Se obtuvieron 10 mg del compuesto titular en forma de isómero *Z* puro.

- 35 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2,71 (d, $J = 6,60$ Hz, 2H), 3,73-3,95 (m, 1H), 5,42-5,67 (m, 1H), 6,21-6,50 (m, 1H), 7,08-7,38 (m, 10H) [otras señales escondidas bajo picos del disolvente].

Compuesto intermedio 13

(2S,3Z)-1,4-difenilbut-3-en-2-amina

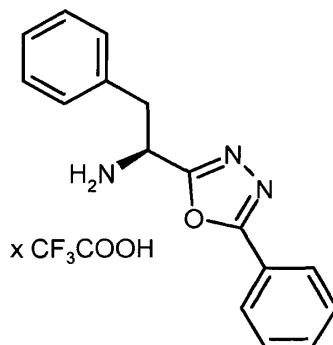


5 El compuesto titular (isómero E puro) se obtuvo en el transcurso de la separación cromatográfica de diastereoisómeros en fase quiral descrita en el caso del compuesto intermedio 12, con un rendimiento de 45 mg.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 2,62-2,83 (m, 2H), 3,52-3,71 (m, 1H), 6,18-6,30 (m, 1H), 6,34-6,46 (m, 1H), 6,98-7,57 (m, 10H) [otras señales escondidas bajo los picos del disolvente].

Compuesto intermedio 14

(1S)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanoamina sal del ácido trifluoroacético



10 200 mg (0,75 mmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-fanilalanina se dispusieron previamente a 0°C en 5.5 ml de diclorometano y se les añadió 128 mg (0,79 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. Al cabo de 30 min se añadieron 103 mg (0,75 mmol) de benzoilhidrazida. Al cabo de otros 45 min a 0°C se añadieron finalmente 500 mg (1,5 mmol) de tetrabromuro de carbono y 395 mg (1,5 mmol) de trifenilfosfina. La tanda se agitó primero 2 h a 0°C y después se siguió agitando durante una noche a TA. La mezcla se concentró a continuación en el evaporador rotativo y el residuo se secó en alto vacío. El producto bruto así obtenido se purificó mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron 217 mg (78% del valor teórico) del producto intermedio, protegido con Boc, *tert*-butil-[(1S)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]carbamato.

HPLC (método 10): R_t = 3,01 min;

20 LC-MS (método 1): R_t = 1,15 min; MS (ESIpos): m/z = 366 ($M+H$) $^+$.

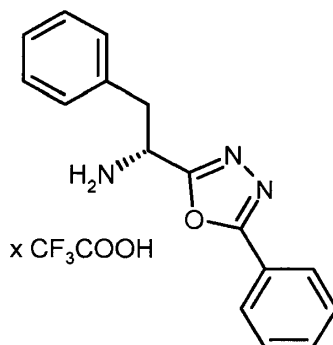
Estos 217 mg (0,59 mg) del producto intermedio se recogieron en 3 ml de diclorometano, se les añadió 0,6 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante 30 min a TA. A continuación se concentró en vacío. El residuo remanente se siguió secando en vacío y después se liofilizó a partir de dioxano. Se obtuvieron de este modo 214 mg (90% del teórico) del compuesto titular en forma de sólido blanco.

25 HPLC (método 10): R_t = 2,43 min;

LC-MS (método 11 ()): R_t = 0,62 min; MS (ESIpos): m/z = 266 ($M+H$) $^+$.

Compuesto intermedio 15

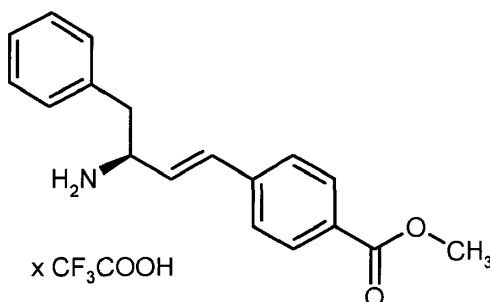
(1R)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanoamina sal del ácido trifluoroacético



200 mg (0,75 mmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-D-fenilalanina se dispusieron previamente a 0°C en 5,5 ml de diclorometano y se les añadió 128,3 mg (0,79 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol. Al cabo de 30 min se añadieron 103 mg (0,75 mmol) de benzoilhidrazida. Al cabo de otros 45 min a 0°C min se añadieron finalmente 500 mg (1,5 mmol) de tetrabromuro de carbono y 395 mg (1,5 mmol) de trifenilfosfina. La tanda se agitó primero 2 h a 0°C y después se siguió agitando durante una noche a TA. La mezcla se concentró a continuación en el evaporador rotativo y el residuo se secó en alto vacío. El producto bruto así obtenido se purificó mediante HPLC preparativa. Se obtuvieron 219 mg (80% del valor teórico del compuesto intermedio *tert*-butil-[(1R)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]carbamato, protegido por Boc.

HPLC (método 10): $R_t = 3,01$ min;LC-MS (método 2): $R_t = 1,36$ min; MS (ESIpos): $m/z = 366$ (M+H)⁺.

219 mg (0,6 mmol) de este producto intermedio se recogieron en 3 ml de diclorometano, se les añadió 0,6 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante 30 min a TA. A continuación se concentró en vacío. El residuo remanente se siguió secando en vacío y después se liofilizó a partir de dioxano. Se obtuvieron de este modo 196 mg (86% del teórico) del compuesto titular en forma de sólido blanco.

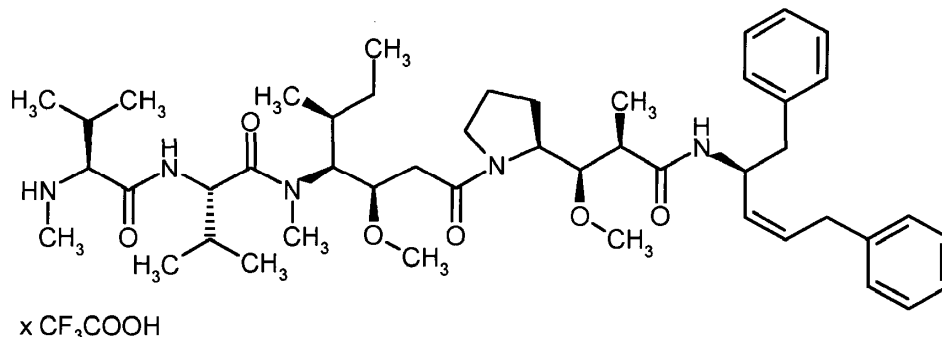
HPLC (método 10): $R_t = 2,41$ min;**Compuesto intermedio 16**Metil-4-[(1*E*,3*S*)-3-amino-4-fenilbut-1-en-1-il]benzoato sal del ácido trifluoroacético

0,9 mg (4 μmol) de acetato de paladio se dispusieron previamente en 5 ml de DMF se les añadió sucesivamente 20,8 mg (97 μmol) de metil-4-bromobenzoato, 20 mg (81 μmol) de (*S*)-*tert*-butil 1-fenilbut-3-en-2-ilcarbamato, 1,1 mg (8 μmol) de fenilurea, así como 11,2 mg (81 μmol) de carbonato de potasio. La mezcla de reacción se agitó a continuación 15 min a 160°C en un aparato de microondas (Emrys™ Optimizer)t. La mezcla se filtró después y el filtrado, a través de HPLC preparativa (eluyente : metanol/gradiente de agua con 0,1% de TFA), se separó en sus componentes. Se obtuvieron así 21,3 mg (68% del valor teórico) del compuesto titular.

HPLC (método 10): $R_t = 3,23$ min;LC-MS (método 11): $R_t = 1,32$ min; MS (ESIpos): $m/z = 382$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 17

N-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-il]-amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 5 15 mg (22 μmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) se dispusieron previamente en 750 μl de DMF y se le añadió 11,44 μl (66 μmol) de *N,N*-diisopropiletilamina, así como 10 mg (26 μmol) de HATU. La tanda se agitó 30 min a TA. A continuación, se añadieron 8,5 mg (24 μmol) de (2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-amina sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 10) y la tanda se agitó
- 10 durante una noche a TA. La mezcla de reacción se separó después directamente en sus componentes por HPLC preparativa. Se obtuvieron 18.1 mg (91% del valor teórico) del compuesto intermedio protegido con Boc *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-etil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en forma de un sólido blanco.

HPLC (método 10): $R_t = 4,74$ min;

- 15 LC-MS (método 11): $R_t = 1,58$ min; MS (ESIpos): $m/z = 905$ (M+H)⁺.

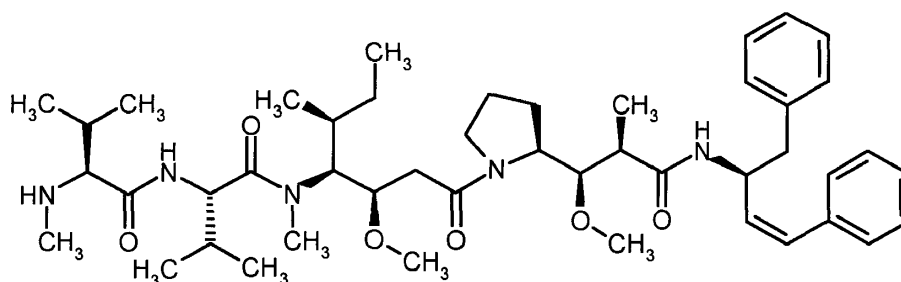
16 mg (18 mmol) de este producto intermedio se recogieron en 1 ml de diclorometano, se les añadió 0,2 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante 30 min a TA. A continuación se concentró en vacío. El residuo remanente se siguió secando en vacío y después se liofilizó a partir de dioxano. De este modo se obtuvieron 15,8 mg (97% del valor teórico de compuesto titular).

- 20 HPLC (método 10): $R_t = 2,66$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 805$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 18

N-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]-amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 25

Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en analogía a la síntesis del compuesto intermedio 17 se preparó por reacción de 20 mg (29 μmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuestos intermedio 7) con 7,1 mg (32 μmol) de (2*S*,3*Z*)-1,4-difenilbut-3-en-2-amina (compuesto intermedio 12).

30

Rendimiento: 9.2 mg (35% del valor teórico)

HPLC (método 10): $R_t = 4,52$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,54$ min; MS (ESIpos): $m/z = 891$ (M+H)⁺.

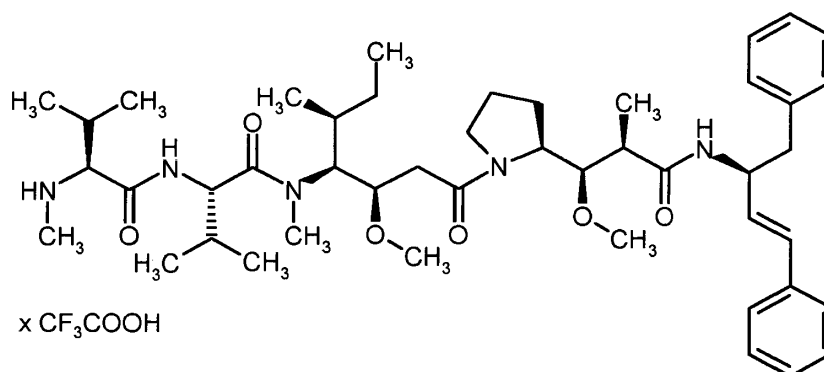
Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 9,5 mg (99% del valor teórico) del compuesto titular.

5 HPLC (método 10): $R_t = 2,58$ min;

(LC-MS (método 1): $R_t = 0,97$ min; MS (ESIpos): $m/z = 791$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 19

N-Metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*E*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]-amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



10

Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*E*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida, en analogía a la síntesis del compuesto intermedio 17, se preparó por reacción de 20 mg (29 μ mol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuestos intermedio 7) con 7,1 mg (32 μ mol) de (2*S*,3*E*)-1,4-difenilbut-3-en-2-amina (compuesto intermedio 13).

15

Rendimiento: 15.1 mg (58% del valor teórico)

HPLC (método 10): $R_t = 4,2$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,51$ min; MS (ESIpos): $m/z = 891$ (M+H)⁺.

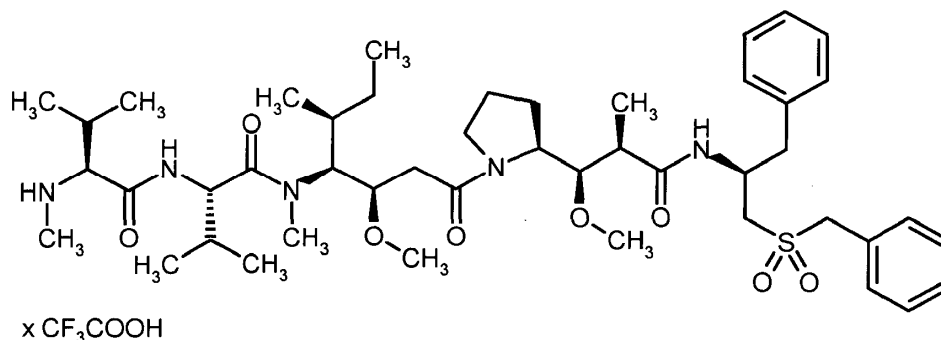
20 Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 15,7 mg (99% del valor teórico) del compuesto titular.

HPLC (método 10): $R_t = 2,62$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,97$ min; MS (ESIpos): $m/z = 791$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 20

25 *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*)-1-(bencilsulfonyl)-3-fenilpropano-2-il]-amino-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*)-1-(benzilsulfonil)-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en analogía a la síntesis de compuesto intermedio 17 se preparó por reacción de 20 mg (29 μ mol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) con 9,3 mg (20 μ mol) de (2*S*)-1-(benzilsulfonil)-3-fenilpropan-2-amina (compuesto intermedio 11).

Rendimiento: 19,2 mg (68% del valor teórico)

HPLC (método 10): $R_t = 3,5$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,41$ min; MS (ESIpos): $m/z = 957$ (M+H)⁺.

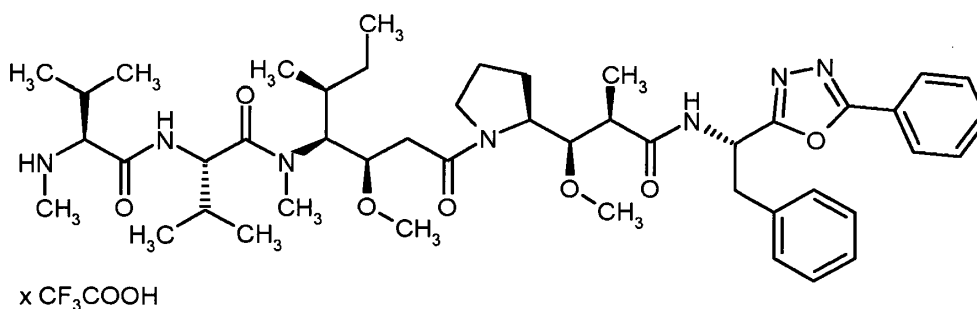
- 10 Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 19,3 mg (99% del valor teórico) del compuesto titular.

HPLC (método 10): $R_t = 2,52$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,86$ min; MS (ESIpos): $m/z = 857$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 21

- 15 *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 20 Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]-amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en analogía con la síntesis del compuesto intermedio 17 se preparó por reacción de 20 mg (29 μ mol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) con 12,2 mg (32 μ mol) de (1*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanoamina sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 14).

- 25 Rendimiento: 22 mg (81% del valor teórico)

HPLC (método 10): $R_t = 3,74$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,45$ min; MS (ESIpos): $m/z = 933$ (M+H)⁺.

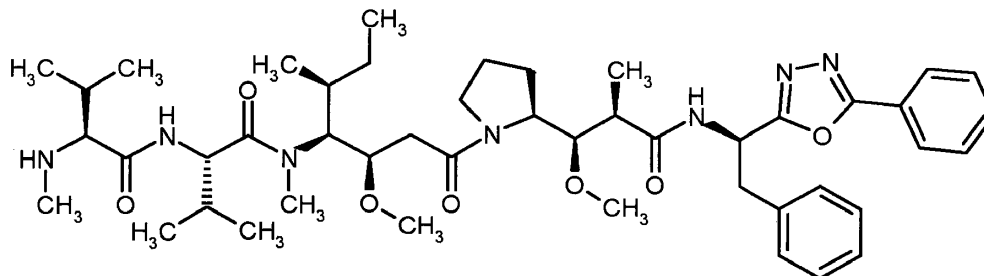
Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 22,4 mg (98% del valor teórico) del compuesto titular.

- 30 HPLC (método 10): $R_t = 2,52$ min;

LC-MS (método 11): $R_t = 0,85$ min; MS (ESIpos): $m/z = 833$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 22

N-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1*R*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 5 $\times \text{CF}_3\text{COOH}$
- Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1*R*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]-amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida en analogía con la síntesis del compuesto intermedio 17 se preparó por reacción de 20 mg (29 μmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) con 12,2 mg (32 μmol) de (1*R*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanoamina sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 15).

Rendimiento: 17 mg (64% del valor teórico)

HPLC (método 10): $R_t = 3,74$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,45$ min; MS (ESIpos): $m/z = 933$ ($M+H$)⁺.

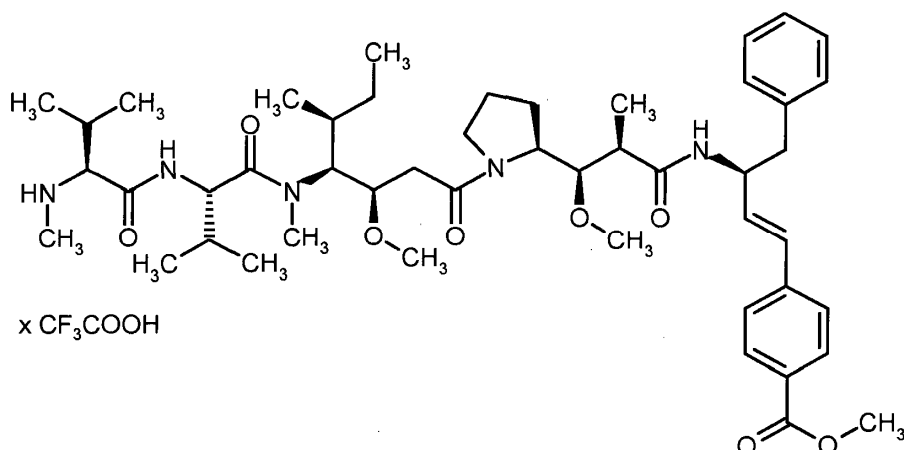
- 15 Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 17,1 mg (99% del valor teórico) del compuesto titular.

HPLC (método 10): $R_t = 2,55$ min;

LC-MS (método 11): $R_t = 0,85$ min; MS (ESIpos): $m/z = 833$ ($M+H$)⁺.

Compuesto intermedio 23

- 20 *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-[(2*S*,3*E*)-4-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1-fenilbut-3-en-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida de la sal ácido trifluoroacético



- 25 Primero *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-[(2*S*,3*E*)-4-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1-fenilbut-3-en-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida, en analogía a la síntesis del compuesto intermedio 17, se preparó por reacción de 20 mg (29 μmol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) con 12,7 mg (32 μmol) de metil-4-[(1*E*,3*S*)-3-amino-4-fenilbut-1-en-1-il]benzoato sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 16).

Rendimiento: 8,8 mg (32% del valor teórico)

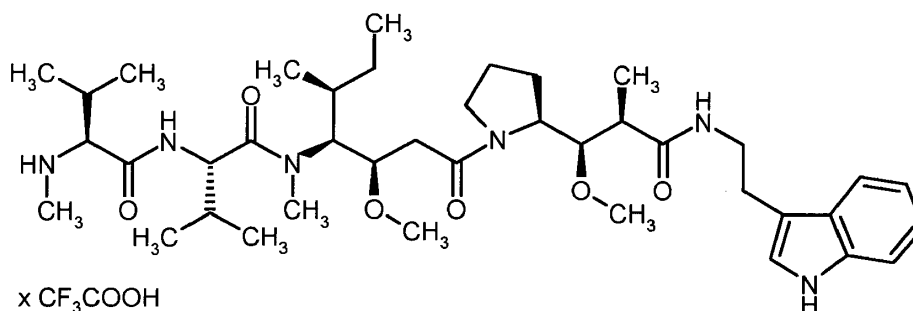
LC-MS (método 1): $R_t = 1,53$ min; MS (ESIpos): $m/z = 949$ (M+H)⁺.

Por subsiguiente separación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético se obtuvieron entonces 8 mg (90% del valor teórico) del compuesto titular.

5 LC-MS (método 1): $R_t = 1,00$ min; MS (ESIpos): $m/z = 849$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 24

N-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[2-(1*H*-indol-3-il)etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 10 A una solución de 100 mg (146 μ mol) de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-*N*-metil-L-valinamida (compuesto intermedio 7) en 30 ml de DMF se añadieron a TA 76 μ l (438 μ mol) de *N,N*-diisopropiletilamina, 83 mg (219 μ mol) de HATU, así como 26 mg (161 μ mol) de 2-(1*H*-indol-3-il)etanoamina. La mezcla se agitó durante 15 h a TA. A continuación la mezcla de reacción se concentró en vacío y el residuo se separó en sus componentes por HPLC preparativa.
- 15 Se obtuvieron 101 mg (83% del valor teórico del compuesto intermedio protegido con Boc *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[2-(1*H*-indol-3-il)-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida.

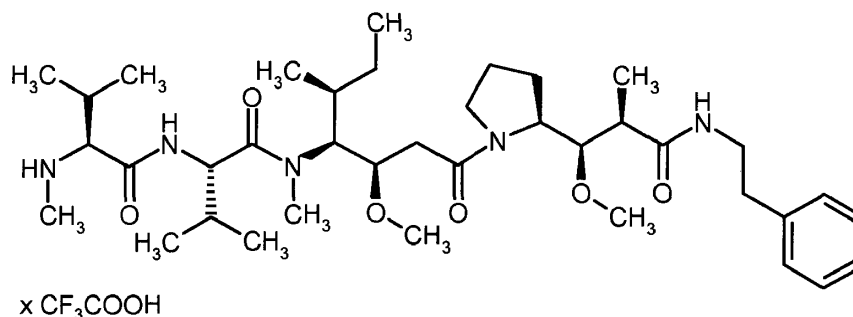
LC-MS (método 1): $R_t = 1,32$ min; $m/z = 828$ (M+H)⁺.

- 20 101 mg (122 μ mol) de este producto intermedio se recogieron en 15 ml de diclorometano, se les añadió 1 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante 30 min a TA. A continuación se concentró en vacío y el residuo remanente se liofilizó a partir de agua/acetonitrilo. De este modo se obtuvieron 108 mg del compuesto titular en rendimiento cuantitativo del compuesto titular en forma de espuma incolora.

LC-MS (método 1): $R_t = 0,84$ min; MS (ESIpos): $m/z = 728$ (M+H)⁺.

Compuesto intermedio 25

- 25 *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-fenilet)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético



- 30 El compuesto titular, en analogía con la síntesis del compuesto intermedio 24, se preparó a través de dos etapas partiendo de 60 mg (88 μ mol) del compuesto intermedio 7 por acoplamiento con 10 mg (88 μ mol) de 2-feniletanoamina y subsiguiente separación de Boc con ácido trifluoroacético. Se obtuvieron 34 mg (97% del valor teórico) del compuesto titular.

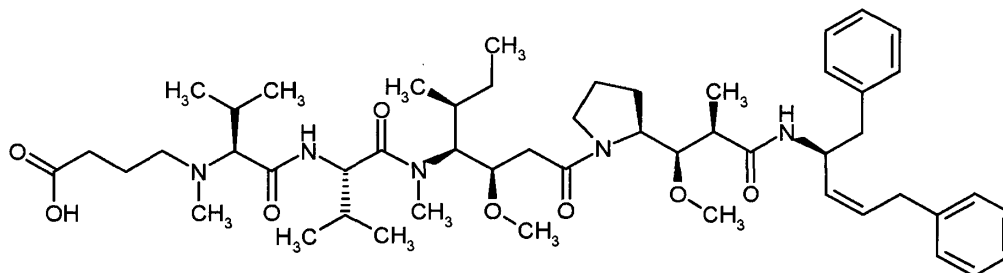
HPLC (método 5): $R_t = 2,71$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 0,80$ min; MS (ESIpos): $m/z = 689$ ($M+H$)⁺.

Ejemplos de ejecución:

Ejemplo 1

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,5-difenilpent-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



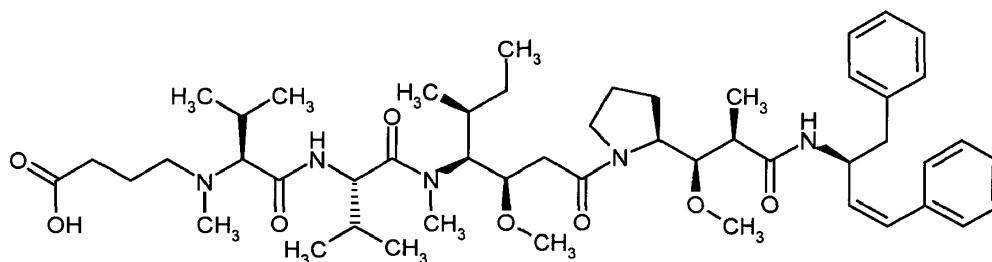
14,5 mg (16 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-1,5-difenil-pent-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 17) se disolvieron en 1 ml de dioxano/agua (1:1) y se le añadió 20,4 μ l (32 μ mol) de una solución acuosa al 15% de ácido oxobutanoico. La tanda se agitó a continuación 1 h a 100°C. Después de enfriar a TA se añadieron 1,1 mg (17 μ mol) de cianoborohidruro de sodio y la adición se ajustó a un valor del pH de 3 por adición de aproximadamente 150 μ l de ácido clorhídrico 0,1 N. La tanda se agitó a continuación otras 2 h a 100°C. Después de enfriar, se añadieron nuevamente 21 μ l (32 μ mol) de la solución al 15% de ácido 4-oxobutanoico y la tanda se agitó de nuevo a 100°C. Después se añadieron otros 1,1 mg (17 μ mol) de cianoborohidruro de sodio y a continuación se ajustó nuevamente a pH 3 por adición de aproximadamente 300 μ l de ácido clorhídrico 0,1 N. La tanda se agitó a continuación de nuevo 2 h a 100°C. Sin todavía haber completado la reacción este proceso se repitió aun una vez más. La tanda finalmente se concentró y el producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó a partir de dioxano. Se obtuvieron así 13.1 mg (93% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

HPLC (método 10): $R_t = 2,63$ min;

LC-MS (método 1): $R_t = 1,01$ min; MS (ESIpos): $m/z = 891$ ($M+H$)⁺.

Ejemplo 2

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



9 mg (10 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*Z*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 18) se disolvieron en 0,6 ml dioxano/agua (1:1) y análogamente a la síntesis del ejemplo 1 se hicieron reaccionar con solución acuosa al 15% de ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio. Tras la liofilización a partir de dioxano se obtuvieron 5,6 mg (64% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

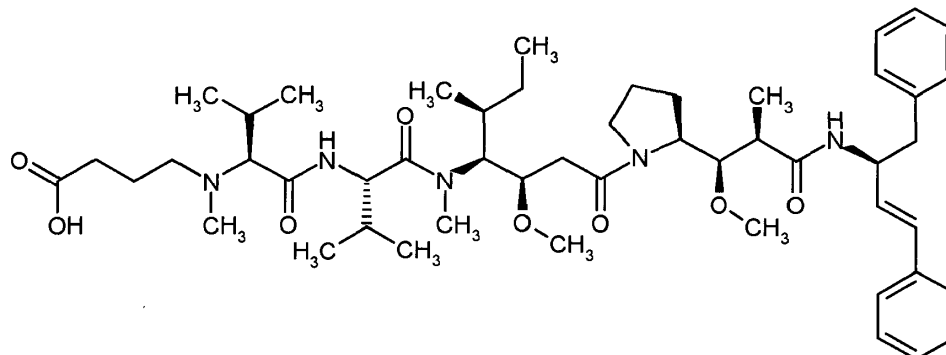
HPLC (método 10): $R_t = 2,61$ min;

LC-MS (método 11): $R_t = 0,94$ min; MS (ESIpos): $m/z = 877$ ($M+H$)⁺;

(HR-MS (método 13): $m/z = 876.5$.

Ejemplo 3

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*E*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



- 5 15.5 mg (10 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*E*)-1,4-difenilbut-3-en-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxo-heptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 19) se disolvieron en 1,0 ml dioxano/agua (1:1) y análogamente a la síntesis del ejemplo 1 se hicieron reaccionar con solución acuosa al 15% de ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio. Tras la liofilización a partir de dioxano se obtuvieron 10,3 mg (68% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

HPLC (método 10): R_t = 2,59 min;

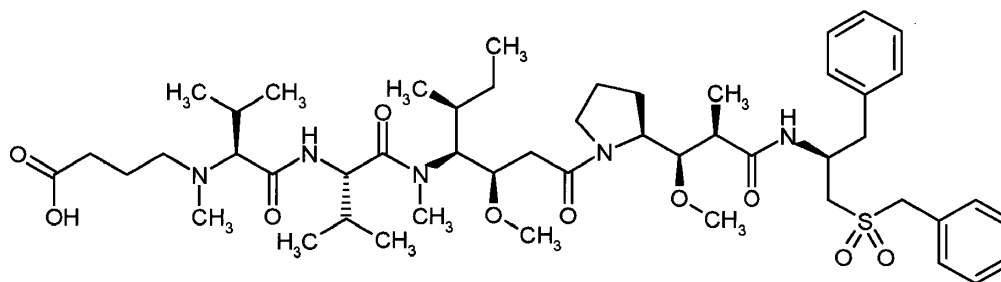
LC-MS (método 11): R_t = 0,94 min; MS (ESIpos): m/z = 877 ($M+H$)⁺;

HR-MS (método 13): m/z = 876.6.

- 15 ¹H-NMR (500 MHz, diclorometano- d_2): δ [ppm] = 0.72-1.21 (m, 18H), 1.23-1.47 (m, 3H), 1.51-2.22 (m, 8H), 2.25-2.54 (m, 5H), 2.65-2.86 (m, 2H), 2.90-3.47 (m, 16H), 3.53-4.46 (m, 6H), 4.71-5.27 (m, 4H), 5.46-5.72 (m, 1H), 6.10-6.36 (m, 1H), 6.44-6.67 (m, 2H), 7.03-7.67 (m, 10H), 9.13 (ancho, s, 1H).

Ejemplo 4

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*)-1-(bencil-sulfonil)-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



- 20 19,3 mg (20 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*)-1-(bencil-sulfonil)-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 20) se disolvieron en 1,2 ml de dioxano/agua (1:1) y análogamente a la preparación del ejemplo 1 se hizo reaccionar con solución acuosa al 15% de ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio. Tras la liofilización a partir de dioxano se obtuvieron 8,6 mg (45% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

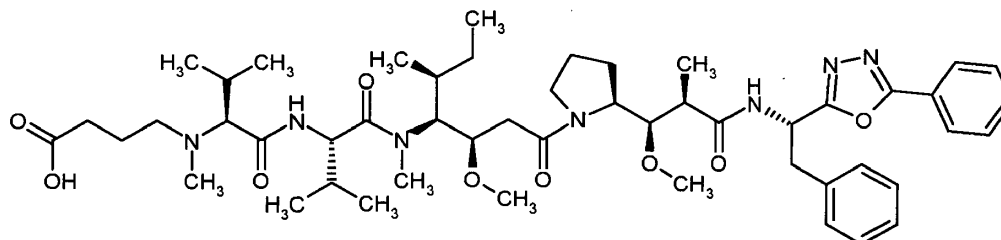
LC-MS (método 11): R_t = 0,85 min; MS (ESIpos): m/z = 943 ($M+H$)⁺;

HR-MS (modo 13): m/z = 942,.

- 30 ¹H-NMR (500 MHz, diclorometano- d_2): δ [ppm] = 0.72-1,23 (m, 18H), 1,26-1,56 (m, 2H), 1,60-1,94 (m, 4H), 1,95-2,17 (m, 3H), 2,22-2,54 (m, 5H), 2,69-2,87 (m, 2H), 2,90-3,27 (m, 11H), 3,31-3,53 (m, 8H), 3,58-4,20 (m, 7H), 4,25-4,54 (m, 3H), 4,59-5,15 (m, 4H), 6,22 (ancho, s, 1H), 6,97-8,00 (m, 10H), 9,13 (ancho, s, 1H).

Ejemplo 5

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



- 5 22,4 mg (24 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 21) se disolvieron en 1,4 ml de dioxano/agua (1:1) y análogamente con al síntesis del ejemplo 1 se hizo reaccionar con solución acuosa al 15% de ácido oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio. Tras la liofilización a partir de dioxano se obtuvieron 8,2 mg (38% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

HPLC (método 10): R_t = 2,54 min;

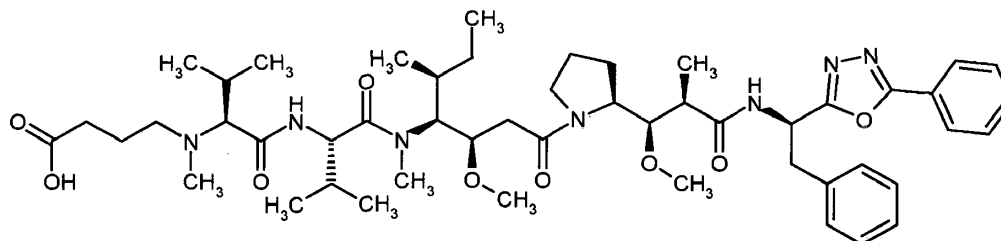
LC-MS (método 1): R_t = 0,94 min; MS (ESIpos): m/z = 919 ($M+H$)⁺;

HR-MS (método 13): m/z = 918.6.

- 15 ¹H-NMR (500 MHz, diclorometano- d_2): δ [ppm] = 0.58-1.21 (m, 20H), 1.25-1.52 (m, 2H), 1.62-2.19 (m, 8H), 2.28-2.50 (m, 5H), 2.64-2.84 (m, 2H), 2.89-3.16 (m, 6H), 3.19-3.52 (m, 10H), 3.59-4.00 (m, 4H), 4.02-4.40 (m, 3H), 4.66-5.13 (m, 3H), 5.61 (d, 1H), 7.32 (d, 5H), 7.49-7.69 (m, 3H), 7.93-8.16 (m, 2H), 9.07 (ancho. s, 1 H).

Ejemplo 6

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*R*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



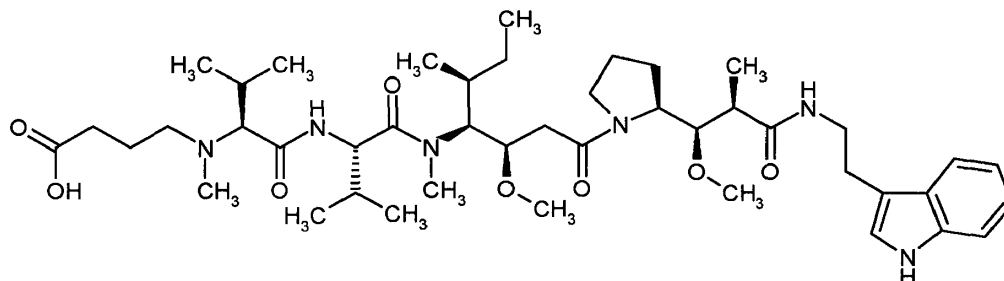
- 20 17,1 mg (18 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*R*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 22) se disolvieron en 1,1 ml de dioxano/agua (1:1) y análogamente con al síntesis del ejemplo 1 se hizo reaccionar con solución acuosa al 15% de ácido oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio. Tras la liofilización a partir de dioxano se obtuvieron 14,8 mg (89% del valor teórico) del compuesto titular en forma de un sólido blanco.

HPLC (método 10): R_t = 2,54 min;

LC-MS (método 1): R_t = 0,92 min; MS (ESIpos): m/z = 919 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 7

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[2-(1*H*-indol-3-il)-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



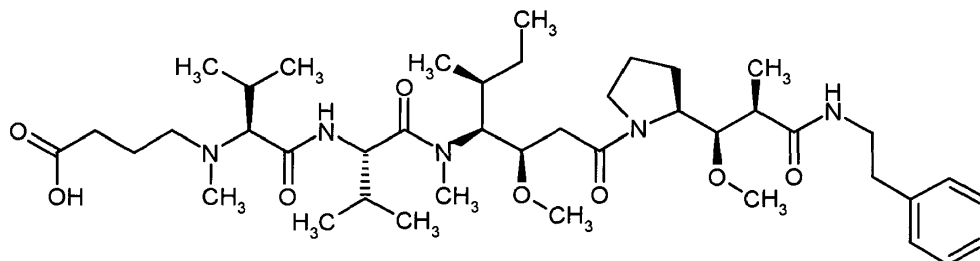
- 5 El compuesto titular en analogía a la síntesis del ejemplo 1 se obtuvo por reacción de 100 mg (119 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[2-(1*H*-indol-3-il)etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 24) con solución acuosa al 15% de ácido oxobutanoico en presencia de cianohidruro de boro.

Rendimiento: 50 mg (49% del valor teórico)

- 10 LC-MS (método 1): R_t = 0,87 min; MS (ESIpos): m/z = 814 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 8

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



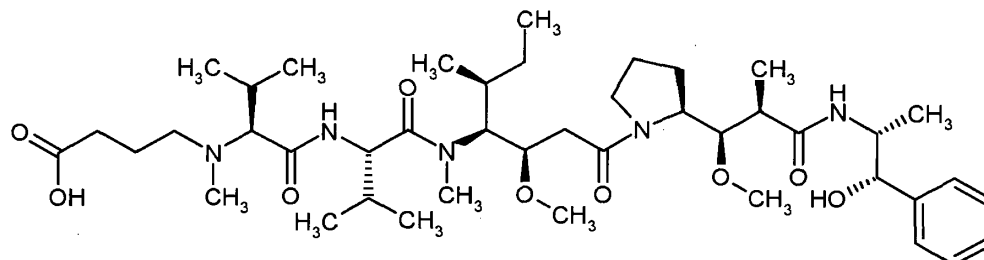
- 15 El compuesto titular en analogía a la síntesis del ejemplo 1 se obtuvo por reacción de 57 mg (71 μ mol) de la sal de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 25) con solución acuosa al 15% del ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio.

Rendimiento: 10 mg (19% del valor teórico)

- 20 LC-MS (método 1): R_t = 0,85 min; MS (ESIpos): m/z = 775 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 9

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida



- 25 El compuesto titular se obtuvo en analogía a la síntesis del ejemplo 1 por reacción de 57 mg (71 μ mol) de *N*-metil-L-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida sal del ácido trifluoroacético (obtención análoga al compuesto intermedio 17 por acoplamiento del compuesto intermedio 7 con (1*S*,2*R*)-(+)-

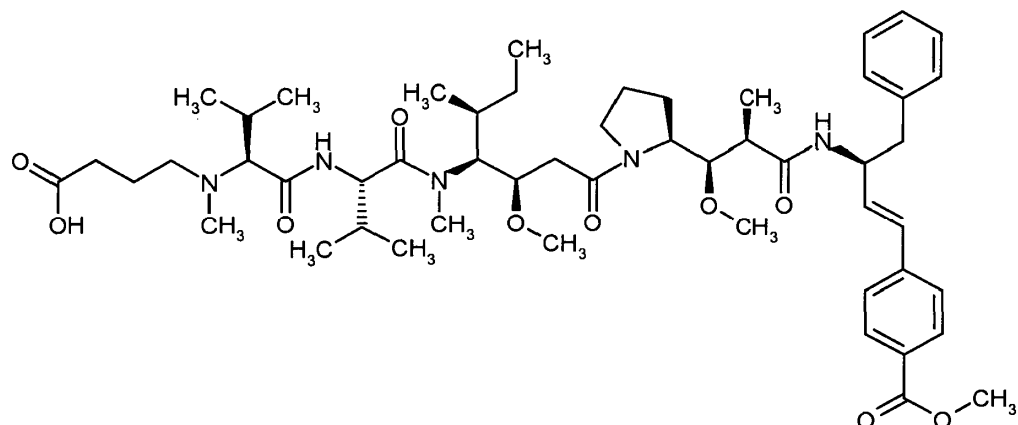
norefedrina y subsiguiente desprotección con ácido trifluoroacético] con solución acuosa al 15% de ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio.

Rendimiento: 94 mg (84% del valor teórico)

LC-MS (método 1): $R_t = 0,79$ min; MS (ESIpos): $m/z = 805$ ($M+H$)⁺.

5 Ejemplo 10

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-*L*-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-[(2*S*,3*E*)-4-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1-fenilbut-3-en-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida



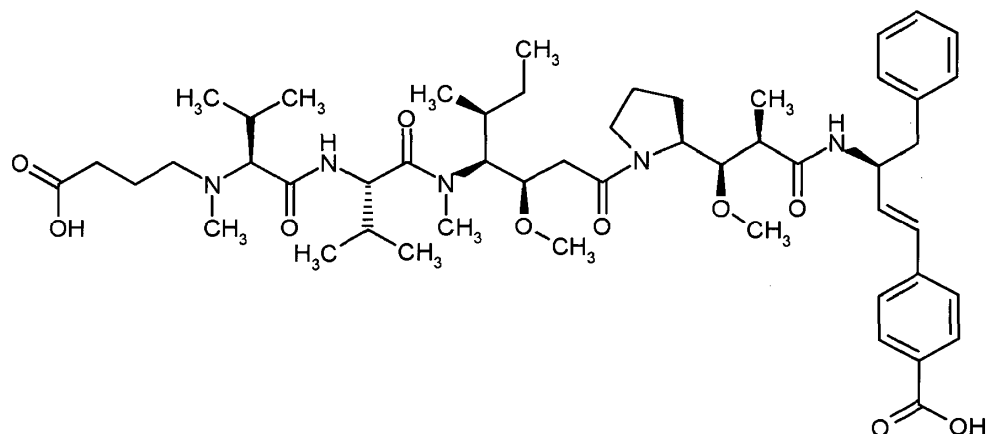
- 10 El compuesto titular en analogía a la síntesis del ejemplo 1 se obtuvo por reacción de 45 mg (47 μ mol) de *N*-metil-*L*-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-[(2*S*,3*E*)-4-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1-fenilbut-3-en-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida sal del ácido trifluoroacético (compuesto intermedio 23) con solución acuosa al 15% de ácido 4-oxobutanoico en presencia de cianoborohidruro de sodio.

- 15 Rendimiento: 33,9 mg (78% del valor teórico)

LC-MS (método 1): $R_t = 1,02$ min; MS (ESI_{neg}): $m/z = 933$ ($M-H$)⁻.

Ejemplo 11

N-(3-carboxipropil)-*N*-metil-*L*-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[(2*S*,3*E*)-4-(4-carboxifenil)-1-fenilbut-3-en-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida



- 20 33,9 mg (36 μ mol) de *N*-(3-carboxipropil)-*N*-metil-*L*-valil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-[(2*S*,3*E*)-4-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1-fenilbut-3-en-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida (ejemplo 10) se dispusieron previamente en 1,1 ml de THF/agua (1:1) y se le añadió 3,5 mg (145 μ mol) de hidróxido de litio. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a TA, a continuación se acidificó por adición de ácido clorhídrico 1 N y se extrajo dos veces con respectivamente 10 ml de acetato de etilo.
- 25 Las fases orgánicas reunidas, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron en vacío. Se obtuvieron 18,3 mg (84% de pureza, 46% del valor teórico) del compuesto titular.

LC-MS (método 9): Rt = 4,98 min; MS (ESI^{neg}): m/z = 919 (M-H)⁻.

B. Evaluación de la eficacia biológica

La actividad biológica del compuesto conforme a la invención se puede demostrar por exámenes *in vitro* e *in vivo*, como son conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de los compuestos conformes a la invención se pueden determinar con ayuda de los ensayos posteriormente descritos:

B-1. Determinación del efecto antiproliferativo en la línea celular HT29wt:

Un número definido de células de la línea celular HT29wt (tipo salvaje) del carcinoma de colon humano se sembró en una placa para microtitulación de 96 pocillos en medio entero (10% FCS-RPMI) (2.500 células/pocillo) y se incubaron durante una noche a 37°C / 5% CO₂. Después de 18 h el medio de siembra fue reemplazado por medio reciente con 10% de FCS. El tratamiento se inició con la adición de la correspondiente sustancia de ensayo. De las sustancias a examinar se determinaron curvas de eficacia-dosis en un intervalo de concentraciones de 10⁻⁵ M a 10⁻¹⁴ M (serie de diluciones 1:10). Se eligieron tiempos de incubación de 48 h a 96 h. La detección de la proliferación se efectuó con ayuda del ensayo MTT (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU., n° catálogo 30-1010K). Después de transcurrir el tiempo de incubación elegido, el reactivo MTT se incubó con las células durante 4 h, antes de que por adición del detergente tuviera lugar durante la noche la lisis de las células. La detección del colorante formado tuvo lugar a 570 nm. La proliferación sin sustancia de ensayo, pero por lo demás con células idénticamente tratadas, fue definido como valor 100%. Los datos obtenidos a partir de este ensayo representan determinaciones por triplicado y se llevaron a cabo al menos dos experimentos independientes.

En la siguiente Tabla 1 se exponen los valores C_{50I} de los ejemplos de ejecución representativos de este ensayo:

Tabla 1

Ejemplo de ejecución	C _{50I} [nM]
1	15
2	3.3
3	0,3
4	1.1
5	0,1
6	0,1
8	0,5
9	6
11	4.5

En comparación con esto, la monometilauristatina F (MMAF) muestra en este ensayo un valor de C_{50I} de 10 nM.

B-2. Determinación de la influencia sobre polimerización de tubulina:

Las células cancerígenas son células desnaturalizadas, las cuales frecuentemente también por una partición celular incrementada conducen a la formación de un tumor. Los microtúbulos forman las fibras de huso del aparato de huso y son un componente esencial del ciclo celular. La construcción y degradación regulada de microtúbulos posibilita la división exacta de los cromosomas en las células hija y representa un proceso dinámico continuo. Una perturbación de esta dinámica conduce a una partición celular defectuosa y finalmente a la muerte de la célula. Sin embargo, la partición celular incrementada de las células cancerígenas las hace también especialmente sensibles frente a los tóxicos de las fibras de huso, los cuales representan un sólido componente de la quimioterapia. Tóxicos de las fibras de huso tales como Paclitaxel o Etoposide conducen a una velocidad de polimerización fuertemente incrementada de los microtúbulos, mientras que los alcaloides de la vinca o también la monometilauristatina E (MMAE) conducen a una velocidad de polimerización fuertemente reducida de los microtúbulos. En los dos casos, la dinámica necesaria

en el ciclo celular está sensiblemente perturbada. Los compuestos examinados en el marco de la presente invención conducen a una velocidad de polimerización reducida de los microtúbulos.

Para el examen de la polimerización de tubulinas se utilizó el "Fluorescence-based Microtubule Polymerisation Assay Kit" de la firma Cytoskeleton (Denver, Colorado, USA; Número de pedido: BK011). En este ensayo se añade Tubulina GTP no polimerizada, con lo cual puede tener lugar la polimerización espontáneamente. El ensayo se basa en la unión del fluoróforo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a la tubulina. DAPI libre o ligado se pueden diferenciar en virtud del diferente espectro de emisión. Puesto que DAPI presenta una afinidad claramente superior frente a tubulina polimerizada en comparación con la tubulina no polimerizada, se puede observar la polimerización de tubulina por medio del aumento de la fluorescencia de los fluoróforos DAPI ligados.

Para llevar a cabo estos ensayos las sustancias de ensayo disueltas en DMSO, desde su concentración de partida de 10 mM se diluyeron a 1 µM en agua. Junto al control del tampón, como control del ensayo se adjuntaron también incrementando la polimerización Paclitaxel y, por otro lado, inhibiendo de polimerización Vinblastina. Para la medición se utilizaron placas de 96 pocillos con la mitad de superficie de fondo. La cinética de la polimerización de la tubulina se observó durante 1 h a 37°C en un fluorímetro. La longitud de onda de excitación era 355 nm, la emisión se observó a 460 nm. Para la zona de la subida lineal en los primeros 10 minutos se calculó la variación de fluorescencia por minuto ($\Delta F/\text{min}$), la cual representa la velocidad de polimerización de los microtúbulos. La potencia de las sustancias de ensayo se cuantificó con ayuda de la correspondiente reducción de la velocidad de polimerización.

B-3. Determinación de la estabilidad de plasma *in vitro*:

Método A:

1 mg de la correspondiente sustancia de ensayo se disolvió en 0,5 ml de acetonitrilo/DMSO (9:1). De esta solución se retiraron 20 µl y se añadieron a 1 ml de plasma de rata, respectivamente plasma humano, calentado a 37°C (plasma de ratas macho Wistar con Li-heparina, Fa. Harlan & Winkelmann, respectivamente plasma humano reciente depletado de leucocitos extraído de sangre entera). A partir de esta solución de plasma fuertemente agitada, inmediatamente después de la adición de la muestra (valor inicial como magnitud de referencia) y entonces después de 5, 10, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos, así como eventualmente después de 24 horas, se tomaron respectivamente 100 µl de partes alícuotas y se echaron en 300 µl de acetonitrilo. Las proteínas plasmáticas precipitadas se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm y 30 µl del sobrenadante se analizaron por HPLC en cuanto a su contenido en la sustancia de ensayo no modificada. Se cuantificó el porcentaje de superficie de los respectivos picos.

Método HPLC en plasma de rata:

Instrumento: Agilent 1200 con DAD, bomba primaria, "autosampler", horno de columna y termostato; Columna: Kromasil 100 C18, 250 mm x 4 mm, 5 µm; temperatura de la columna 45°C; Eluyente A: 5 ml de Ácido perclórico / L de agua eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0-8 min 98% A, 2% B; 8-15 min 56% A, 44% B; 15-20 min 10% A, 90% B; 20-21 min 10% A, 90% B; 21-23 min 98% A, 2% B; 23-25 min 98% A, 2% B; caudal: 2 ml/min; detección UV: 220 nm.

Método HPLC en plasma humano:

Instrumento: Agilent 1100 mit DAD, bomba binaria, autosampler, horno de columna y termostato; columna: Kromasil 100 C18, 250 mm x 4 mm, 5 µm; temperatura de la columna: 45°C; eluyente A: 5 ml de ácido perclórico / L agua, eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0-3 min 98% A, 2% B; 3-10 min 65% A, 35% B; 10-15 min 40% A, 60% B; 15-21 min 10% A, 90% B; 21-22 min 10% A, 90% B; 22-24 min 98% A, 2% B; 24-26 min 98% A, 2% B; caudal: 2 ml/min; detección UV: 220 nm.

Método B:

La correspondiente sustancia de ensayo se incubó en plasma de rata, respectivamente plasma humano a 37°C durante un espacio de tiempo de 5 h bajo ligera agitación. En distintos momentos (0, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 y 300 minutos) se tomaron respectivamente 100 µl de partes alícuotas. Después de la adición de un estándar interno (10 µl) las proteínas se precipitaron por adición de 200 µl de acetonitrilo, y la mezcla se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 5 minutos. Después de la adición de 150 µl de tampón acetato de amonio pH 3 a 150 µl de sobrenadante se analizó mediante LC/MSMS el contenido en sustancia de ensayo no modificada.

B-4. Determinación de la permeabilidad celular:

La permeabilidad celular de una sustancia se puede examinar mediante un ensayo Flux *in vitro* utilizando células Caco-2 [M.D. Troutman y D.R. Thakker, Pharm. Res. 20 (8), 1210-1224 (2003)]. Para ello se cultivaron las células en placas de filtro con 24 pocillos durante 15-16 días. Para la determinación de la permeación, la respectiva sustancia de ensayo, en un tampón HEPES, se vertió o bien de modo apikal (A) o basal (B) sobre las células y se incubó durante 2 horas. Después de 0 h y después de 2 h se extrajeron muestras a partir de los compartimentos cis y trans.

Las muestras se separaron mediante HPLC (Agilent 1200, Böblingen, Alemania) utilizando columnas de fase inversa. El sistema HPLC estaba acoplado a través de un " Turbo Ion Spray-Interface" a un espectrómetro de masas Triple Quadropol API 4000 (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Alemania). La permeabilidad se evaluó con ayuda de un valor P_{app} , el cual se calculó mediante una fórmula publicada por Schwab *et al.* [D. Schwab et al., J. Med. Chem. 46, 1716-1725 (2003)]. Una sustancia fue clasificada como activamente transportada, si la relación de P_{app} (B-A) a P_{app} (A-B) era > 2 o $< 0,5$.

De significado decisivo para los toxóforos que son liberados intracelularmente, es la permeabilidad de B con respecto a A [P_{app} (B-A)]: cuanto más baja sea esta permeabilidad, tanto mayor es la permanencia de la sustancia en la célula después de la liberación intracelular y, con ello, también el tiempo en el cual se dispone de una interacción con la diana bioquímica (aquí: tubulina).

En la siguiente Tabla 2 se exponen datos de permeabilidad de los ejemplos de ejecución representativos de este ensayo:

Tabla 2

Ejemplo de ejecución	P_{app} (B-A) [nm/s]
2	157
3	179
4	19
5	29
6	45
7	11
8	10
9	2
11	2

En este ensayo, en comparación con ello, la monometilauristatina E (MMAE) y la monometilauristatina F (MMAF) muestran en este ensayo un valor P_{app} (B-A) de 89 nm/s, respectivamente 73 nm/s.

B-5. Determinación de las propiedades del sustrato para la glucoproteína P(P-gp)

Muchas células tumorales expresan proteínas de transporte para principios activos, lo que frecuentemente transcurre junto con un desarrollo de resistencia frente a sustancias citostáticas. Las sustancias que no son sustratos de tales proteínas de transporte como, por ejemplo, la glucoproteína P (P-gp) o BCRP, podrían presentar por lo tanto un perfil de eficacia mejorado.

Las propiedades de sustrato de una sustancia para P-gp (ABCB1) se determinaron mediante un ensayo de flujo (Flux) utilizando células LLC-PK, las cuales sobreexpresan P-gp (células L-MDR1) [A.H. Schinkel et al., J. Clin. Invest. 96, 1698-1705 (1995)]. Para ello, las células LLC-PK1 ó L-MDR1 se cultivaron en placas de filtro de 96 pocillos durante 3-4 días. Para la determinación de la permeabilidad, la respectiva sustancia de ensayo se añadió, sola o en presencia de un inhibidor (como, por ejemplo, Ivermectin o Verapamil), en un tampón HEPES, o bien de forma apical (A) o basal (B) sobre las células y se incubó durante 2 h. Después de 0 h y después de 2 h se extrajeron muestras a partir de los compartimentos cis y trans. Las muestras se separaron mediante HPLC utilizando columnas de fase inversa. El sistema HPLC estaba acoplado a través de un " Turbo Ion Spray-Interface" a un espectrómetro de masas Triple Quadropol API 3000 (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Alemania). La permeabilidad se evaluó con ayuda de un valor P_{app} , el cual se calculó mediante una fórmula publicada por Schwab *et al.* [D. Schwab et al., J. Med. Chem. 46, 1716-1725 (2003)]. Una sustancia fue clasificada como sustrato de P-gp, cuando la relación flujo de salida (Efflux) de P_{app} (B-A) a P_{app} (A-B) era > 2 .

Como ulteriores criterios para la evaluación de las propiedades de sustrato de P-gp de pueden comparar entre sí las relaciones Efflux en células L-MDR1 y LLC-PK1 o la relación Efflux en presencia o ausencia de un inhibidor. Cuando estos valores se diferencian en más de un factor 2, entonces la sustancia en cuestión se trata de un sustrato P-gp.

C. Ejemplos de ejecución de composiciones farmacéuticas

- 5 Los compuestos conformes a la invención se pueden transformar en preparados farmacéuticos de la siguiente manera:

Comprimido:

Composición:

- 10 100 mg del compuesto conforme a la invención, 50 mg de lactosa (monohidrato), 50 mg de almidón de maíz (nativo), 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP 25) (Fa. BASF, Ludwigshafen, Alemania) y 2 mg de estearato de magnesio.

Peso del comprimido 212 mg. Diámetro 8 mm, radio de bóveda 12 mm

Preparación:

- 15 La mezcla del compuesto conforme a la invención, lactosa y almidón se granula con una solución al 5% (m/m) del PVP en agua. Después del secado, el granulado se mezcla con el estearato de magnesio durante 5 minutos. Esta mezcla se comprime en una prensa para comprimidos habitual (véase arriba el formato del comprimido). Como valor de referencia para la compresión se utiliza una fuerza de presión de 15 kN.

Suspensión administrable oralmente:

Composición:

- 20 1000 mg del compuesto conforme a la invención, 1000 mg de etanol (96%), 400 mg de Rhodigel® (goma xantano de la sociedad Pennsylvania, EE.UU.) y 99 g de agua.

Una dosis individual de 100 mg del compuesto conforme a la invención corresponden a 10 ml de suspensión oral.

Preparación:

El Rhodigel se suspende en etanol, el compuesto conforme a la invención se añade a la suspensión. La adición de agua tiene lugar bajo agitación. Hasta la finalización de la aglutinación del Rhodigel se agita aproximadamente 6 h.

- 25 **Solución administrable oralmente:**

Composición:

500 mg del compuesto conforme a la invención, 2,5 g de polisorbato y 97 g de polietilenglicol 400. Una dosis individual de 100 mg del compuesto conforme a la invención corresponden a 20 g de solución oral.

Preparación:

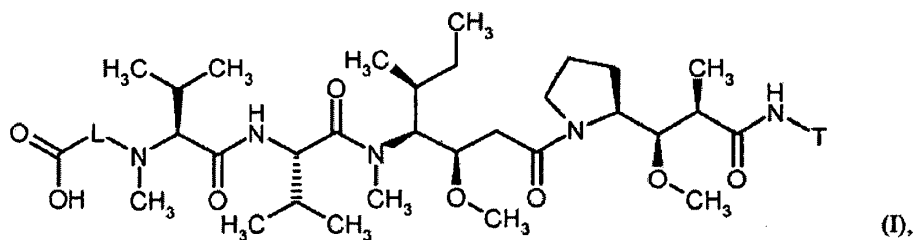
- 30 El compuesto conforme a la invención se suspende bajo agitación en la mezcla de polietilenglicol y polisorbato. El proceso de agitación se prosigue hasta la disolución total del compuesto conforme a la invención.

Solución i.v.:

- 35 El compuesto conforme a la invención se disuelve en una concentración inferior a la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente tolerable (por ejemplo, solución isotónica de sal común, solución de glucosa al 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). La solución se filtra de forma estéril y se envasa en recipientes para inyección estériles y exentos de pirogénicos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula (I)

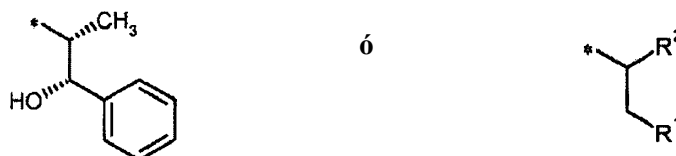


en la cual

- 5 L representa (C₁-C₁₂)-alcanodiilo de cadena lineal, el cual puede estar sustituido hasta cuatro veces con metilo y en el cual (a) dos átomos de carbono en relación 1,2-, 1,3- o 1,4 entre sí pueden formar un puente incluyendo los átomos de carbono que se encuentran eventualmente entre ellos para dar un anillo (C₃-C₆)-cicloalquilo o un anillo fenilo o (b) hasta tres grupos CH₂ no vecinos entre si pueden estar sustituidos por -O-,

y

- 10 T representa un grupo de la fórmula



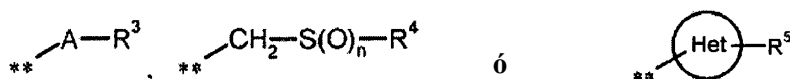
en las cuales

* designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno,

R¹ significa fenilo o 1*H*-indol-3-ilo,

- 15 y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



en las cuales

** designa el correspondiente lugar de unión con el resto del respectivo grupo T ,

- 20 A representa un (C₁-C₄)-alcanodiilo de cadena lineal o un (C₂-C₄)-alquenodiilo de cadena lineal,

R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

n representa el número 0, 1 o 2 ,

R⁴ representa fenilo, bencilo o 2-feniletilo, los cuales respectivamente en el grupo fenilo pueden estar sustituidos con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

- 25 Het representa un anillo heteroarilo divalente de 5 miembros con hasta tres heteroátomos anulares de la serie N, O y/o S,

y

R⁵ representa (C₃-C₆)-cicloalquilo, fenilo o (C₁-C₄)-alquilo, el cual puede estar sustituido con fenilo,

pudiendo estar sustituidos por su parte los mencionados grupos fenilo con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

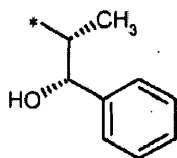
- 30 así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

2. Compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1, en la cual

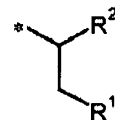
L representa un (C₁-C₈)-alcanodiilo de cadena lineal, en el que (a) dos átomos de carbono en relación 1,3 o 1,4 entre sí pueden formar un puente incluyendo uno, respectivamente los dos átomos de carbono situados entre ellos para dar un anillo fenilo o (b) hasta dos grupos CH₂ no vecinos entre sí pueden estar reemplazados por -O-,

5 y

T representa un grupo de la fórmula



ó



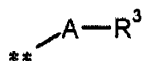
en las cuales

* designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno,

10 R¹ significa fenilo o 1*H*-indol-3-ilo,

y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



ó



en las cuales

15 ** designa el lugar de unión con el resto del respectivo grupo T ,

A representa eteno-1,2-diilo ó propeno-3-diilo,

R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

Het representa un anillo heteroarílico divalente de 5 miembros seleccionado de la serie pirazolilo, imidazolilo, 1,3-oxazolilo, 1,3-tiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo y 1,3,4-oxadiazolilo,

20 y

R⁵ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con (C₁-C₄)-alcoxycarbonilo o carboxilo,

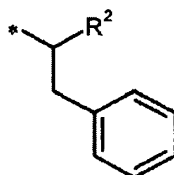
así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

3. Compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1 o 2, en la cual

L representa un (C₁-C₆)- alcanodiilo lineal,

25 y

T representa un grupo de la fórmula

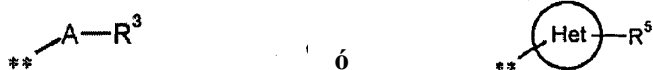


en la cual

* designa el lugar de unión con el átomo de nitrógeno,

30 y

R² significa hidrógeno o un grupo de la fórmula



en las cuales

** designa el lugar de unión con el radical del respectivo grupo T ,

A representa eteno-1,2-diilo,

5 R³ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con metoxycarbonilo o carboxilo,

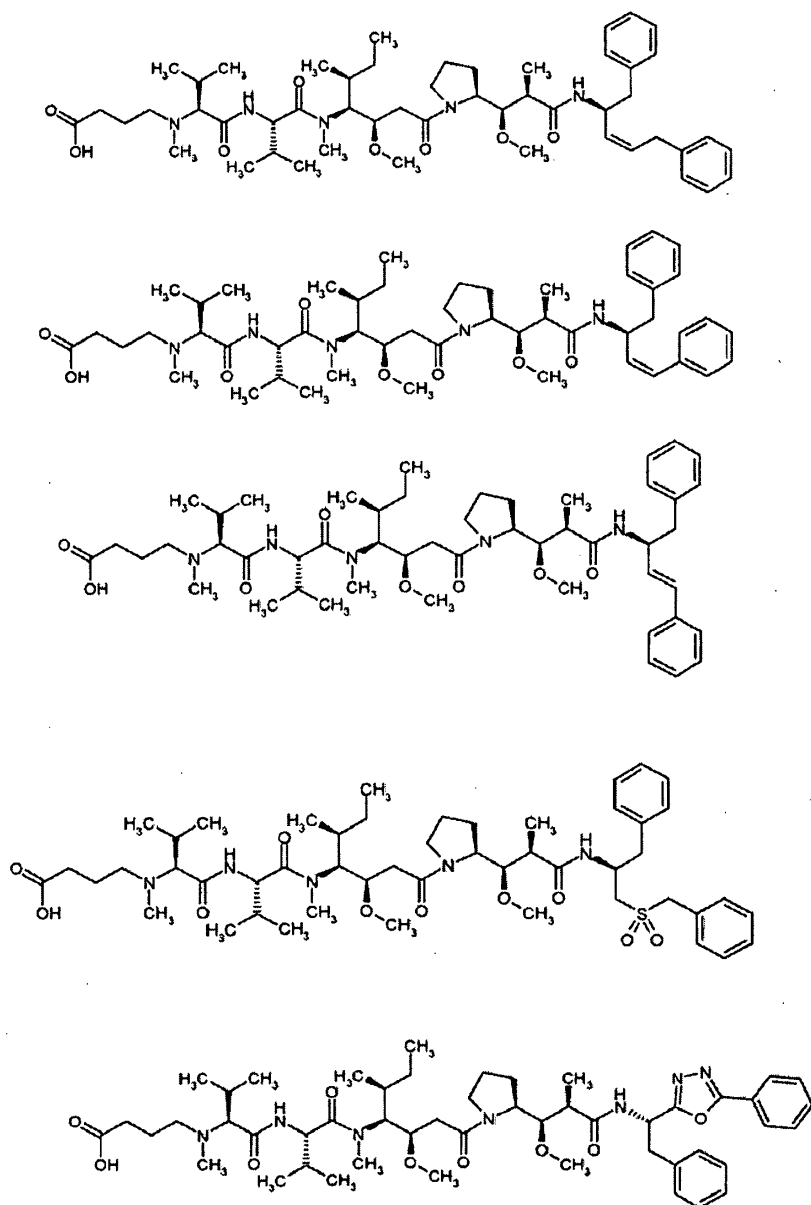
Het representa 1,3,4-oxadiazol-2,5-diilo,

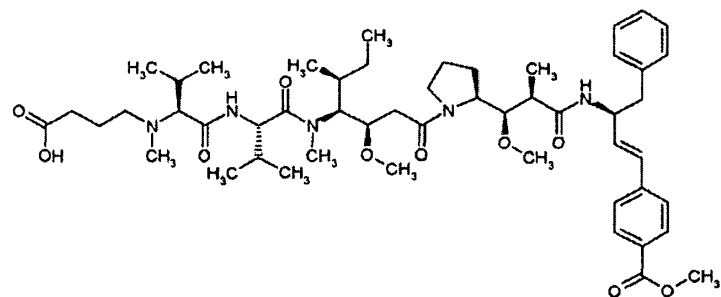
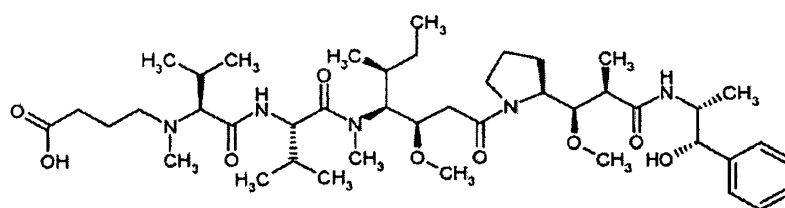
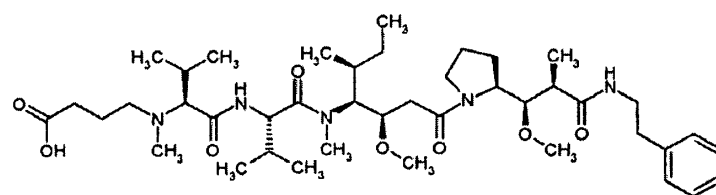
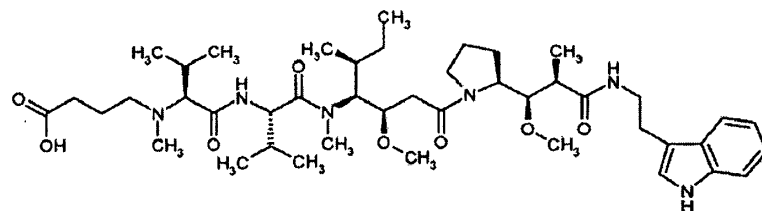
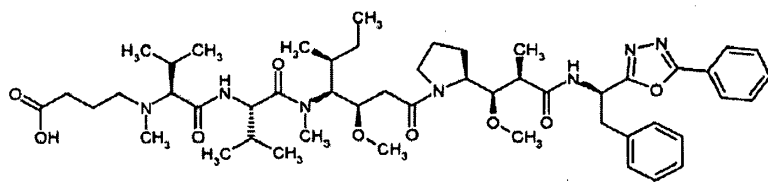
y

R⁵ representa fenilo, el cual puede estar sustituido con metoxycarbonilo o carboxilo,

así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

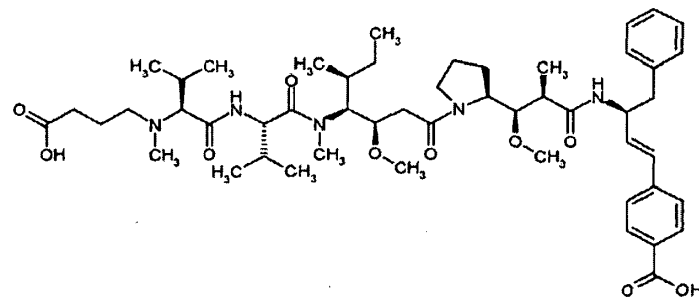
10 4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionándose el compuesto del grupo constituido por:





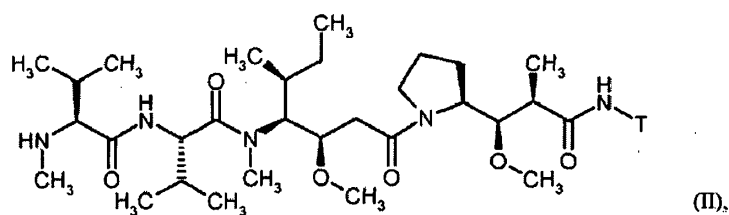
5

y



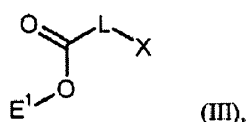
así como sus sales, solvatos y solvatos de las sales.

10 **5.** Procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque un compuesto de la fórmula (II)



en la cual T tiene el significado indicado en las reivindicaciones 1 a 3, se hace reaccionar en un disolvente inerte o bien

[A] por alquilación inducida por bases, con un compuesto de la fórmula (III)

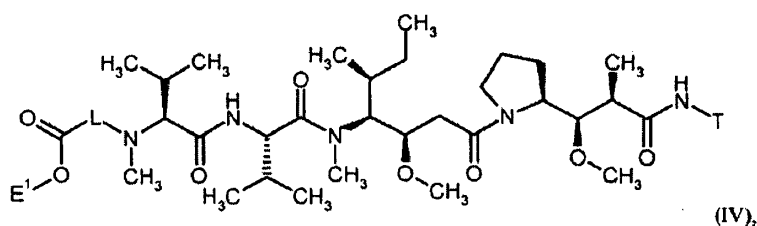


en la cual L tiene el significado indicado en las reivindicaciones 1 a 3,

E¹ representa hidrógeno, (C₁-C₄)-alquilo o bencilo,

y

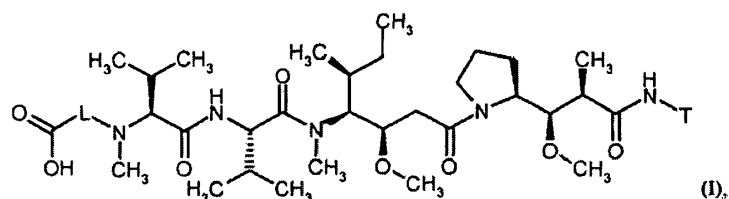
X representa un grupo volátil tal como, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, triflato o tosilato, para dar un compuesto de la fórmula (IV)



en la cual E¹, L y T tienen el significado anteriormente indicado,

y, a continuación, en el caso en que E¹ represente (C₁-C₄)-alquilo o bencilo, este radical éster se separa según métodos habituales, de modo que igual que en el caso en que E¹ en (III) representa hidrógeno, se obtiene el ácido carboxílico de la fórmula (I) conforme a la invención

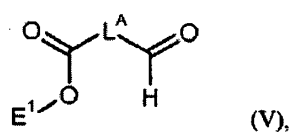
Fórmula (I)



en la cual L y T tienen el significado anteriormente indicado,

o

[B] por reacción con un compuesto de la fórmula (V)



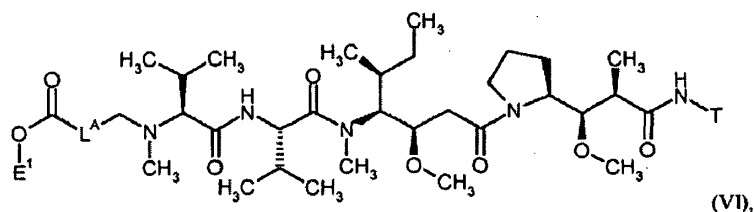
en la cual

E¹ representa hidrógeno, (C₁-C₄)-alquilo o bencilo,

y

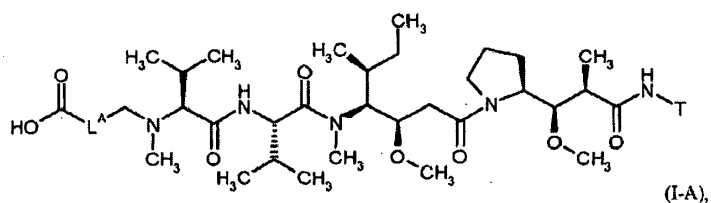
L^A tiene el significado de L indicado definido en las reivindicaciones 1 a 3, sin embargo acortado en la longitud de la cadena alquílica por una unidad CH_2 ,

en presencia de un adecuado agente de reducción, se transforma en un compuesto de la fórmula (VI)



en la cual E^1 , L^A y T tienen los significados anteriormente indicados,

y, a continuación, en el caso en que E^1 represente (C_1-C_4) -alquilo o bencilo, este radical éster se separa por métodos habituales, de modo que igualmente que en el caso en que E^1 en (V) representa hidrógeno, se obtiene el ácido carboxílico de la fórmula (I-A) conforme a la invención,



en la cual L^A y T tienen los significados anteriormente indicados,

y los compuestos resultantes de la formular (I) respectivamente (I-A) se separan eventualmente en sus enantiómeros y/o diastereoisómeros y/o con los correspondientes disolventes (i) y/o bases o ácidos (ii) se transforma en sus solvatos, sales y/o solvatos de las sales.

- 15 **6.** Compuesto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cancerígenas.
- 7.** Compuesto tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en un procedimiento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cancerígenas y tumorales.
- 20 **8.** Medicamento que contiene un compuesto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con uno o varios coadyuvantes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados.
- 9.** Medicamento que contiene un compuesto tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con uno o varios principios activos ulteriores.
- 10.** Medicamento según la reivindicación 8 o 9 para su utilización para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cancerígenas o tumorales.
- 25 **11.** Conjugado antiproliferativo, en el cual un compuesto de una o varias de las reivindicaciones 1-4 está unido con una proteína.
- 12.** Conjugado antiproliferativo según la reivindicación 12, en donde la proteína es un anticuerpo.