



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 292 558**

⑯ Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01904169 .8**

⑯ Fecha de presentación : **09.02.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1254162**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.2002**

⑯ Título: **Kahalalido F y compuestos relacionados.**

⑯ Prioridad: **09.02.2000 GB 0002952**

⑯ Titular/es: **PHARMA MAR, S.A.**
c/ de la Calera, 3
Polígono Industrial de Tres Cantos
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **16.03.2008**

⑯ Inventor/es: **Albericio, Fernando;**
Giralt, Ernest;
Jiménez, José, Carlos;
López, Ángel;
Manzanares, Ignacio;
Rodrigues, Ignacio y
Royo, Miriam

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **16.03.2008**

⑯ Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 292 558 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

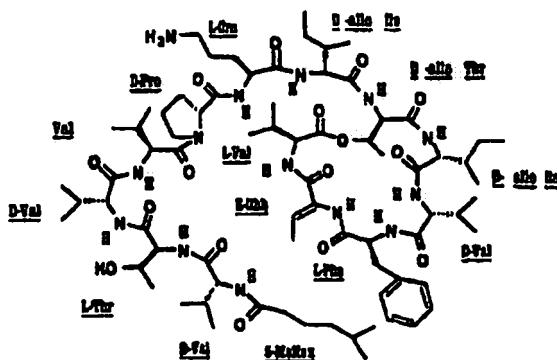
Kahalalido F y compuestos relacionados.

5 La presente invención se refiere a compuestos de kahalalido, y en particular a kahalalido F y compuestos relacionados, así como una ruta de síntesis para tales compuestos.

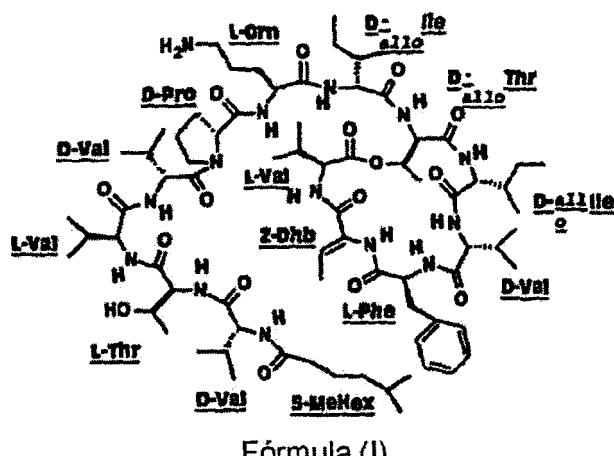
Antecedentes de la invención

10 Kahalalido F es un depsipeptido cíclico bioactivo aislado a partir del molusco *Sacoglossan Elysia rufescens* y su
dieta, el alga verde *Bryopsis* sp. El kahalalido F se aisló por primera vez Hamann y Scheuer, véase Hamann, M. T.;
Scheuer, P. J. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 5825-5826, y véanse también los documentos EP 610078 y US 6011010.
En estas publicaciones, no se determinó la estereoquímica absoluta de las valinas individuales (3 D-Val y 2 L-Val) ni
15 de las treoninas (L-Thr y D-allo-Thr). Las publicaciones muestran que kahalalido F es una mezcla de isómeros. En
una publicación posterior, Scheuer *et al.* (Goetz, G.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. Tetrahedron, 1999, 55, 7739-7746)
asignaron una posición en la molécula para las 5 Val y las 2 Thr.

Por tanto, la estructura de kahalalido F según Scheuer *et al.* era:



³⁵ Mientras tanto, el Prof. Rinehart también asignó la posición individual de las 5 Val y de las 2 Thr (K. L. Rinehart, comunicación personal). Aunque para las 2 Thr y 3 Val, su asignación concuerda con la del Prof. Scheuer, para 2 las últimas Val existe una discrepancia. Por tanto, en la asignación de Rinehart, se intercambian las dos Val consecutivas en la cadena lateral y la estructura es de la fórmula (I):



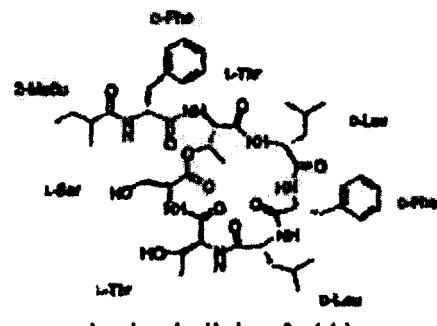
Ahora se acepta, y se demuestra de nuevo en este texto, que la fórmula correcta de kabhalalido E es la fórmula (I).

La estructura es compleja, comprendiendo seis aminoácidos como una parte cíclica, y una cadena exocíclica de siete aminoácidos con un grupo acilo terminal. Kahalalido F (I) es un agente antitumoral extremadamente potente y derivado marino escaso, aunque la ausencia de cantidades adecuadas ha frenado los planes para ensayos clínicos.

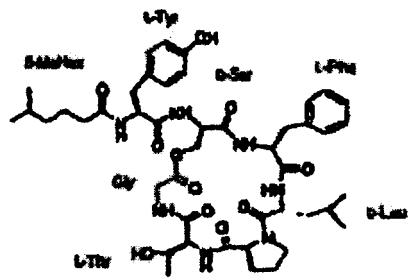
65 Se conocen otros compuestos de kahalalido, y por ejemplo se hace referencia a Hamann, M. T., *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1996, "Kahalalides: Bioactive Peptides from Marine Mollusk *Elysia rufescens* and its Algal Diet *Bryopsis* sp.", vol. 61, págs. 6594-6660. Así como kahalalido F, este artículo da las estructuras para kahalalidos de A a E. Se informó de kahalalido K en *J. Nat. Prod.*, 1999, 62, 1169, y se informó de kahalalido O en *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 152.

ES 2 292 558 T3

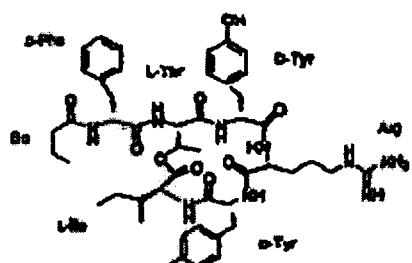
Las estructuras para estos compuestos de kahalalido adicionales se muestran en las siguientes fórmulas:



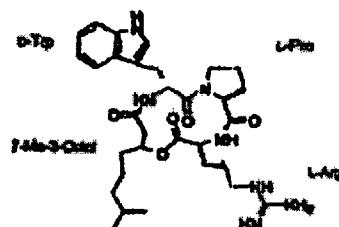
kahalalido A (1)



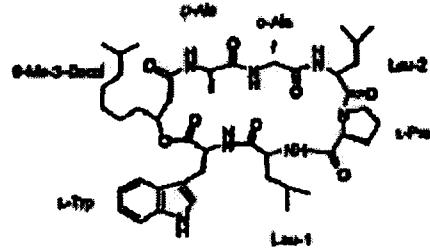
kahalalido B (2)



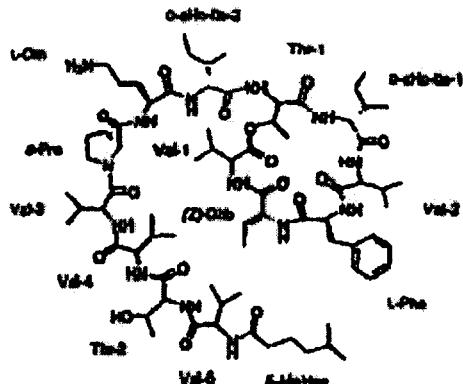
kahalalido C (3)



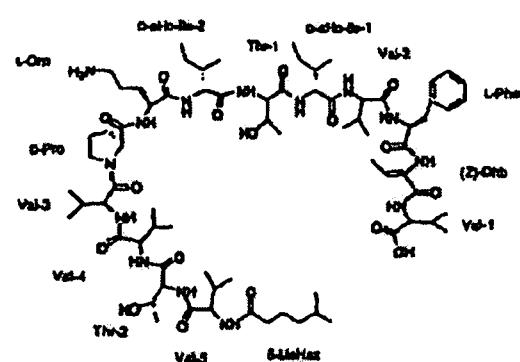
kahalalido D (4)



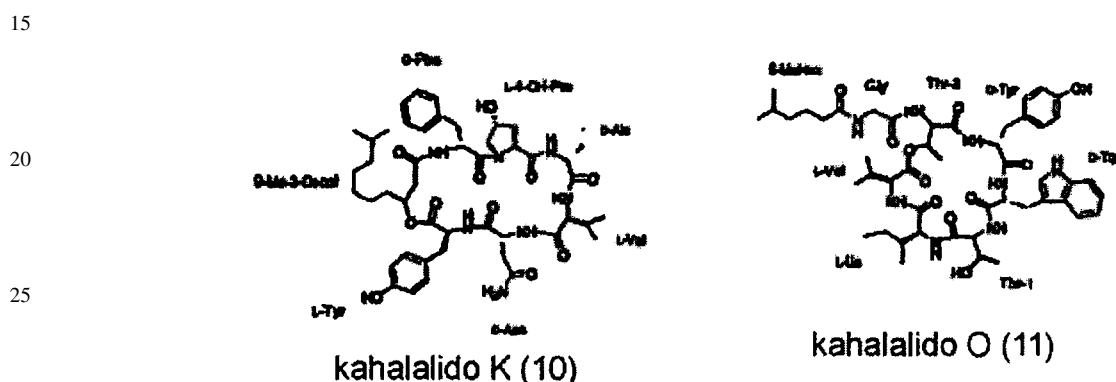
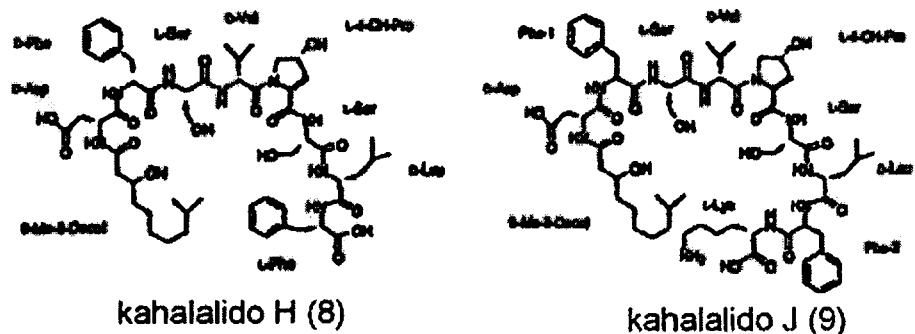
kahalalido E (5)



kahalalido F (6)



kahalalido G (7)

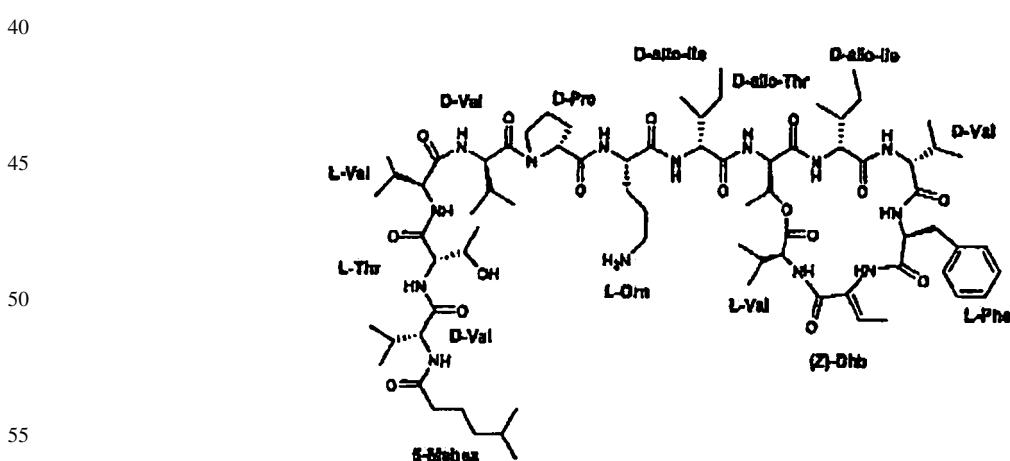


30 Los kahalalidos cíclicos tienen un anillo de aminoácidos, y una cadena lateral que termina en un grupo acilo.

Los kahalalidos tienen un intervalo de actividades biológicas, particularmente actividad antitumoral y antituberculosis.

35 **Sumario de la invención**

Los derivados de esta invención tienen una estructura con una parte cíclica y una cadena lateral derivada de la fórmula (I):



El derivado se diferencia de la cadena lateral de la fórmula (I) en uno o más de los siguientes aspectos:

60 1 ó 2 aminoácidos que no son los mismos que el aminoácido en la cadena lateral de la estructura de fórmula (I), o están omitidos;

de 1 a 10 grupos metíleno adicionales en el grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I),

65 de 1 a 6 grupos metíleno omitidos del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I); y

de 1 a 3 sustituyentes añadidos al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

ES 2 292 558 T3

De manera adecuada los compuestos de esta invención se diferencian de la fórmula (I) en uno o más de los siguientes aspectos:

1 aminoácido que no es el mismo que un aminoácido en la estructura de fórmula (I);

5 de 1 a 10, especialmente de 1 a 6, más especialmente de 1 a 3, lo más especialmente 1 ó 2, grupos metileno adicionales en el grupo acilo de la cadena lateral del compuesto original;

10 de 1 a 6, especialmente de 1 a 3, más especialmente 1 ó 2, grupos metileno omitidos del grupo acilo de la cadena lateral del compuesto original;

de 1 a 3, especialmente 1 ó 3, sustituyentes añadidos al grupo acilo de la cadena lateral del compuesto original.

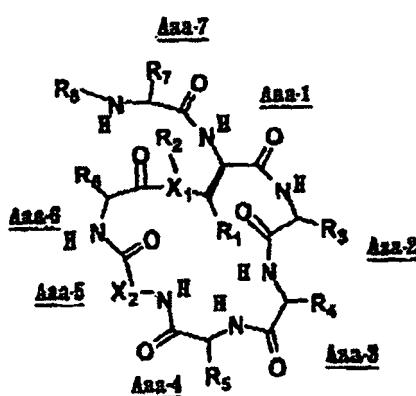
Los derivados de esta invención son compuestos relacionados con kahalalido F, y que tienen la fórmula:

15

20

25

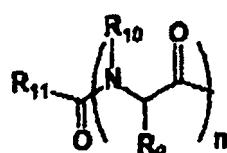
30



Fórmula (II)

35 en la que Aaa₁, Aaa₂, Aaa₃, Aaa₄, Aaa₅ con X₂ y Aaa₆ son como en kahalalido F, R₇ es H o un grupo orgánico seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo y sus derivados sustituidos con un grupo hidroxilo, un grupo mercapto, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo halógeno; en la que X₁ es O; en la que R₈ es independientemente de las siguientes fórmulas III, IV o V:

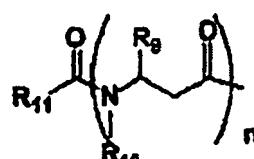
40



45

Fórmula III

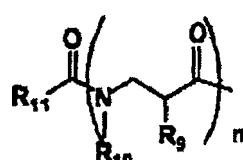
50



55

Fórmula IV

60



65

Fórmula V

en las que R₉, R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H o un grupo orgánico seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo y sus derivados sustituidos con un grupo hidroxilo, un grupo

mercапто, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo carboxilo, un grupo carboxamido, un grupo halógeno; R₉ y R₁₀ pueden formar parte del mismo ciclo; R₉ puede otorgar configuración S o R, si se aplica, al carbono al que se une; y n es de 0 a 6. Las partes respectivas entre paréntesis en las fórmulas (III), (IV) y (V) pueden entremezclarse para dar una cadena lateral compuesta de unidades de repetición tomadas de más de una de estas fórmulas. R₇ y R₈ se eligen 5 para ajustarse a la definición de derivados en la reivindicación 1.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de síntesis para la formación de compuestos de kahalalido F y estructuras relacionadas.

10 Los compuestos de esta invención están relacionados con kahalalido F (I), en el que en la fórmula (II), Aaa-1 es D-allo-Thr (X₁ = O, R₁ = CH₃), Aaa-2 es D-allo-Ile (R₃ = 1-metilpropilo), Aaa-3 es D-Val (R₄ = isopropilo), Aaa-4 es Phe (R₅ = bencilo), Aaa-5 es Z-Dhb (X₂ = C=CHCH₃ con configuración Z), Aaa-6 es L-Val (R₆ = isopropilo), Aaa-7 es D-allo-Ile (R₇ = 1-metilpropilo), y R₈ contiene un derivado hexapeptídico de la siguiente fórmula (fórmula VI):

15

20

25

30

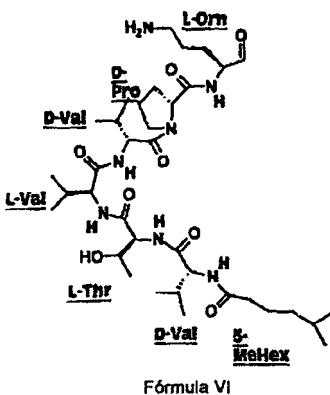
35

40

45

55

60



Se prefieren especialmente los compuestos que tienen los mismos aminoácidos que en la fórmula (I), pero se diferencian en la cadena lateral, especialmente en la parte acilo. Tales diferencias pueden incluir más o menos grupos metileno, normalmente como mucho un cambio de dos grupos metileno, y más o menos sustituyentes, particularmente la adición de un halógeno tal como sustituyentes flúor.

Tal como se usa en el presente documento, el término "grupo orgánico" significa un grupo hidrocarbonado que está clasificado como un grupo alifático, grupo cíclico o combinación de grupos alifáticos y cílicos (por ejemplo, grupos aralquilo). En el contexto de la presente invención, el término "grupo alifático" significa un hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado. Se usa este término para englobar grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por ejemplo.

El término "grupo alquilo" significa un grupo hidrocarbonado saturado lineal o ramificado que incluye, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, isobutilo, t-butilo, heptilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-ethylhexilo, 2-metilbutilo, 5-metilhexilo, 9-metil-3-decilo y similares, particularmente grupos alquilo que tienen un único grupo metilo ramificado. De manera adecuada el grupo alquilo es largo y tiene de 1 a 20 átomos de carbono, más normalmente de 1 a 15 o de 1 a 10 átomos de carbono, o puede ser corta y tiene de 1 a 6 o de 1 a 3 átomos de carbono. El grupo R₁₁ es apto para las cadenas de carbono largas, y en general todos los demás grupos alquilo son preferiblemente cortos.

El término "grupo alquenilo" significa un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado con uno o más enlaces dobles carbono-carbono, tal como un grupo vinilo. De manera adecuada el grupo alquenilo tiene de 2 a 8 o de 2 a 4 átomos de carbono.

El término "grupo alquinilo" significa un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado con uno o más enlaces triples carbono-carbono. De manera adecuada el grupo alquinilo tiene de 2 a 8 o de 2 a 4 átomos de carbono.

El término "grupo cíclico" significa un grupo hidrocarbonado de anillo cerrado que está clasificado como un grupo alicíclico, grupo aromático o grupo heterocíclico. El término "grupo alicíclico" significa un grupo hidrocarbonado cíclico que tiene propiedades que se parecen a las de los grupos alifáticos, y es de manera adecuada un mono o biciclo con de 4 a 10 átomos de carbono. El término "grupo aromático" o "grupo arilo" significa un grupo hidrocarbonado aromático mono o policíclico, de manera adecuada un mono o biciclo con de 5 a 10 átomos de carbono. El término "grupo heterocíclico" significa un hidrocarburo de anillo cerrado en el que uno o más de los átomos de carbono en el anillo son un elemento distinto del carbono (por ejemplo, de 1 a 3 de uno o más de nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.), de manera adecuada un mono o biciclo con de 4 a 10 átomos de anillo.

Tal como se entiende bien en esta área técnica, no sólo se tolera un gran grado de sustitución, sino que a menudo es recomendable. Se prevé la sustitución en los compuestos de la presente invención. Como un medio para simplificar la discusión y citación de determinada terminología usada a lo largo de esta solicitud, los términos "grupo" y "resto" se usan para diferenciar entre especies químicas que permiten la sustitución o que pueden estar sustituidas y aquellas que

ES 2 292 558 T3

no permiten o no pueden estar sustituidas. Por tanto, cuando se usa el término "grupo" para describir un sustituyente químico, el material químico descrito incluye el grupo no sustituido y ese grupo con átomos de O, N o S, por ejemplo, en la cadena así como grupo carbonilo u otra sustitución convencional. Cuando se usa el término "resto" para describir un sustituyente o compuesto químico, sólo pretende incluirse un material químico no sustituido. Por ejemplo, la frase 5 "grupo alquilo" pretende incluir no sólo sustituyentes alquilo hidrocarbonados saturados de cadena abierta puros, tales como metilo, etilo, propilo, isobutilo, y similares, sino también sustituyentes alquilo que llevan sustituyentes adicionales conocidos en la técnica, tales como hidroxilo, alcoxilo, amino, carboxilo, carboxamido, átomos de halógeno, ciano, nitro, alquilsulfonilo, etc. Por tanto, "grupo alquilo" incluye grupos éter, haloalquilos, alcoholes, tioles, carboxilo, aminas, hidroxialquilos, sulfoalquilos, etc. Actualmente se prefieren los grupos haloalquilo. Por el contrario, la 10 frase "resto alquilo" se limita solo a la inclusión de sustituyentes alquilo hidrocarbonados saturados de cadena abierta puros, tales como metilo, etilo, propilo, isobutilo, y similares.

Preferiblemente la cadena lateral R comprende 5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile, o un congénere del mismo, incluyendo análogos y homólogos. Ejemplos de congéneres incluyen los de fórmula general (R¹)_m-(aminoácido)_n-, siendo m + n distinto de cero, en los que R¹ representa un grupo terminal, de manera adecuada un alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroalquilo, alicílico u otro terminador, y -(aminoácido)_n- representa una cadena de aminoácido que concuerda con la reivindicación 1.

Un grupo alquilo terminal tiene de manera adecuada de 1 a 12 átomos de carbono, más normalmente de 4 a 10 20 átomos de carbono, puede estar sustituido y está preferiblemente ramificado. Ejemplos incluyen butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo y otros grupos alquilo que llevan 1 o más grupos laterales metilo o etilo o más largos preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono, especialmente 5-metilhexilo y otros grupos alquilo que se ramifica en posición distal del punto de unión al resto de la molécula. Los sustituyentes adecuados incluyen halógeno, hidroxilo, alcoxilo, amino, carboxilo, carboxamido, ciano, nitro, alquilsulfonilo, alcoxilo, alcoxialquilo, arilalquilarilo, heterocíclico, alicílico, 25 arilo, aralquilo y otros grupos mencionados en el presente documento. Según sea apropiado, tales sustituyentes pueden llevar sustituyentes adicionales, tales como por ejemplo un grupo tolilo. Actualmente los sustituyentes halógeno son los más preferidos, especialmente 1 o más, tal como de 1 a 3, átomos de flúor. Pueden seleccionarse otros grupos terminales según la directriz dada en este texto, e incluyen grupos alicílico, aralquilo, arilo, heterocíclico u otros, 30 posiblemente con 1 o más, especialmente de 1 a 3, sustituyentes.

La cadena lateral R-CO-N- puede tener hidrógeno o un sustituyente en el nitrógeno, tal como grupo alquilo, arilo o aralquilo.

Congéneres de cadena lateral adecuados emplean aminoácidos sustitutos en los que la sustitución se realiza teniendo en cuenta la estructura del aminoácido respectivo en kahalalido F. Los sustitutos para treonina incluyen serina 35 y otros homólogos así como cisteína y homólogos. Los sustitutos para isoleucina incluyen otros aminoácidos con grupos no polares, incluyendo alanina, valina, leucina y prolina así como análogos y homólogos. En este sentido, la exposición de los átomos de nitrógeno (N) en la fórmula (A) no excluye la posibilidad de formación de anillo tal como sucede con la prolina. Los sustitutos para valina incluyen isoleucina y los otros aminoácidos con grupos no polares, 40 incluyendo análogos y homólogos.

Las alternativas a ornitina incluyen lisina, histidina, arginina; alternativas a prolina incluyen alanina y otros aminoácidos no polares tales como glicina, isoleucina y los otros mencionados anteriormente. La cadena R tiene de manera 45 adecuada 5, 6 ó 7, especialmente 7, residuos de aminoácidos. Cuando hay más de siete aminoácidos, entonces los aminoácidos extra son preferiblemente aminoácidos que se producen de manera natural, particularmente los mencionados en el presente documento.

Pueden usarse aminoácidos racémicos o L o D. Preferiblemente cuando hay aminoácidos presentes en la cadena lateral R, entonces uno o más de ellos está en la configuración dada para la cadena lateral que se produce de manera natural. Con respecto al hexapéptido cíclico, los residuos de aminoácidos están en la configuración DLDDLLD. El grupo alquilo terminal tiene de manera adecuada de 1 a 12 átomos de carbono, más normalmente de 4 a 10 átomos de carbono, puede estar sustituido y preferiblemente es ramificado. Sustituyentes adecuados incluyen halógeno, hidroxilo, alcoxilo, amino, carboxilo, carboxamido, ciano, nitro, alquilsulfonilo y otros grupos mencionados en el presente documento. Actualmente los sustituyentes halógeno son los más preferidos.

55 De manera más general, la cadena lateral R-CO-N- puede ser tal como se definió para la cadena lateral R₈-NH-CHR₇-CO-NH- en los compuestos de fórmula (II), incluyendo compuestos con mezclas de aminoácidos definidos en las fórmulas (III), (IV) y (V).

60 Los compuestos de esta invención tienen actividad biológica útil, incluyendo una actividad antitumoral.

Por tanto, la presente invención permite un método para tratar cualquier mamífero, particularmente un ser humano, afectado por cáncer que comprende administrar al individuo afectado una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica del mismo.

65 La presente invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas, que contienen como principio activo un compuesto o compuestos de la invención, así como los procedimientos para su preparación.

ES 2 292 558 T3

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier sólido (comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, etc.) o líquido (disoluciones, suspensiones o emulsiones) con composición adecuada o administración oral, tópica o parenteral, y pueden contener el compuesto puro o en combinación con cualquier vehículo u otros principios activos farmacológicos. Puede necesitarse que estas composiciones sean estériles cuando se administran por vía parenteral.

5 La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser mediante cualquier método adecuado, tal como infusión intravenosa, preparaciones orales, administración intraperitoneal e intravenosa. Los investigadores prefieren que se usen tiempos de infusión de hasta 24 horas, más preferiblemente 2-12 horas, siendo lo más preferido 2-6 horas. Los tiempos de infusión cortos que permiten que se lleve a cabo tratamiento sin 10 una estancia de una noche en el hospital son especialmente deseables. Sin embargo, la infusión puede ser de 12 a 24 horas o incluso más larga si se requiere. Puede llevarse a cabo la infusión en intervalos adecuados de por ejemplo 2 a 4 semanas. Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención pueden administrarse mediante 15 encapsulación en liposomas o nanoesferas, en formulaciones de liberación sostenida o mediante otros medios de administración convencionales.

15 La dosificación correcta de los compuestos variará dependiendo de la formulación particular, el modo de aplicación, y el sitio particular, huésped y tumor que está siendo tratado. Se tendrán en cuenta otros factores como edad, peso corporal, sexo, dieta, momento de la administración, tasa de excreción, estado el huésped, combinaciones de 20 fármacos, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. La administración puede llevarse a cabo de manera continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

25 Los compuestos y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia combinatoria. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición separada al mismo tiempo o en un momento diferente. La identidad del otro fármaco no está particularmente limitada, y candidatos adecuados incluyen:

- 30 a) fármacos con efectos antimitóticos, especialmente los que seleccionan como diana elementos citoesqueléticos, incluyendo moduladores de microtúbulo tales como fármacos de taxano (tales como taxol, paclitaxel, Taxotere, doce-taxel), podofilotoxinas o alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina);
- 35 b) fármacos antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina, análogos de purina tales como pentostatina, metotrexato);
- c) agentes de alquilación tales como mostazas de nitrógeno (tales como ciclofosfamida o ifosfamida);
- 40 d) fármacos que seleccionan como diana ADN tales como los fármacos de antraciclina adriamicina, doxorubicina, Pharmorubicin o epirubicina;
- e) fármacos que seleccionan como diana topoisomerasas tales como etopósido;
- 45 f) hormonas y agonistas o antagonistas de hormonas tales como estrógenos, antiestrógenos (tamoxifén y compuestos relacionados) y andrógenos, flutamida, leuprorelina, goserelina, ciproterona u octreotida;
- g) fármacos que se dirigen a la transducción de señal en células tumorales incluyendo derivados de anticuerpos tales como Herceptin;
- 50 h) fármacos de alquilación tales como fármacos de platino (cis-platino, carbonoplatino, oxaliplatino, paraplatino) o nitrosoureas;
- i) fármacos que afectan potencialmente a la metástasis de tumores tales como inhibidores de metaloproteinasa de matriz;
- 55 j) agentes antisentido y de terapia génica;
- k) agentes terapéuticos de anticuerpos;
- l) otros compuestos bioactivos de origen marino, particularmente las ecteinascidinas tales como ecteinascidina 743 o las dideminas tales como aplidina;
- 60 m) análogos esteroideos, en particular dexametasona;
- n) fármacos antiinflamatorios, en particular dexametasona; y
- o) fármacos antieméticos, en particular dexametasona.

65 La presente invención también se refiere a los compuestos de la invención para su uso en un método de tratamiento, y al uso de los compuestos en la preparación de una composición para el tratamiento de cáncer.

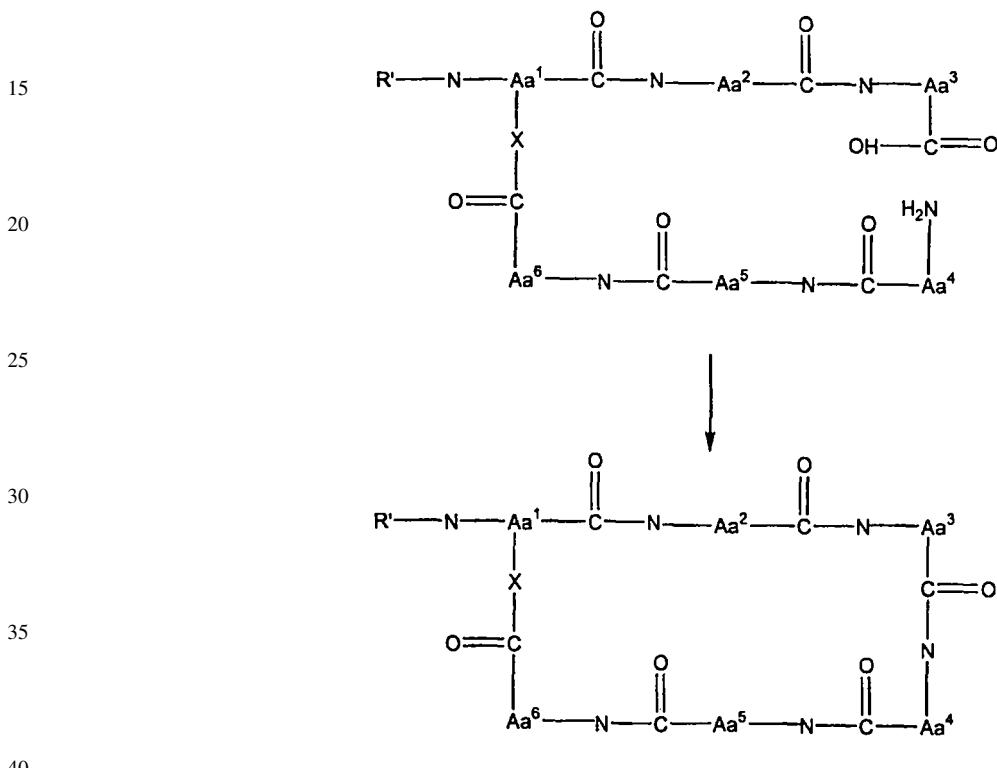
ES 2 292 558 T3

También se espera que los compuestos de esta invención tengan actividad antituberculosis.

Según esta invención también se proporciona un procedimiento para preparar compuestos de esta invención, incluyendo kahalalido F, que comprende el cierre del anillo entre Aa₃ y Aa₄. Se ha encontrado que el cierre del anillo en 5 esta posición da un procedimiento superior. El cierre del anillo puede venir precedido y/o seguido por otras modificaciones a la molécula, incluyendo formación o extensión de la cadena lateral en Aa₁, y/o eliminar grupos protectores y/o modificar sustituyentes en los aminoácidos.

Por tanto, el procedimiento puede ilustrarse mediante el siguiente esquema:

10



en el que R' es un grupo R-CO- o un precursor del mismo, y en el que uno o más de los aminoácidos puede tener grupos protectores, y en el que el -COOH de Aa³ y/o el -NH₂ de Aa⁴ puede estar opcionalmente protegido, activado 45 o derivatizado. Tales procedimientos que usan precursores o de protección, activación o derivatización son sí mismos totalmente convencionales, y no se necesitan detalles adicionales para llevar a la práctica el procedimiento.

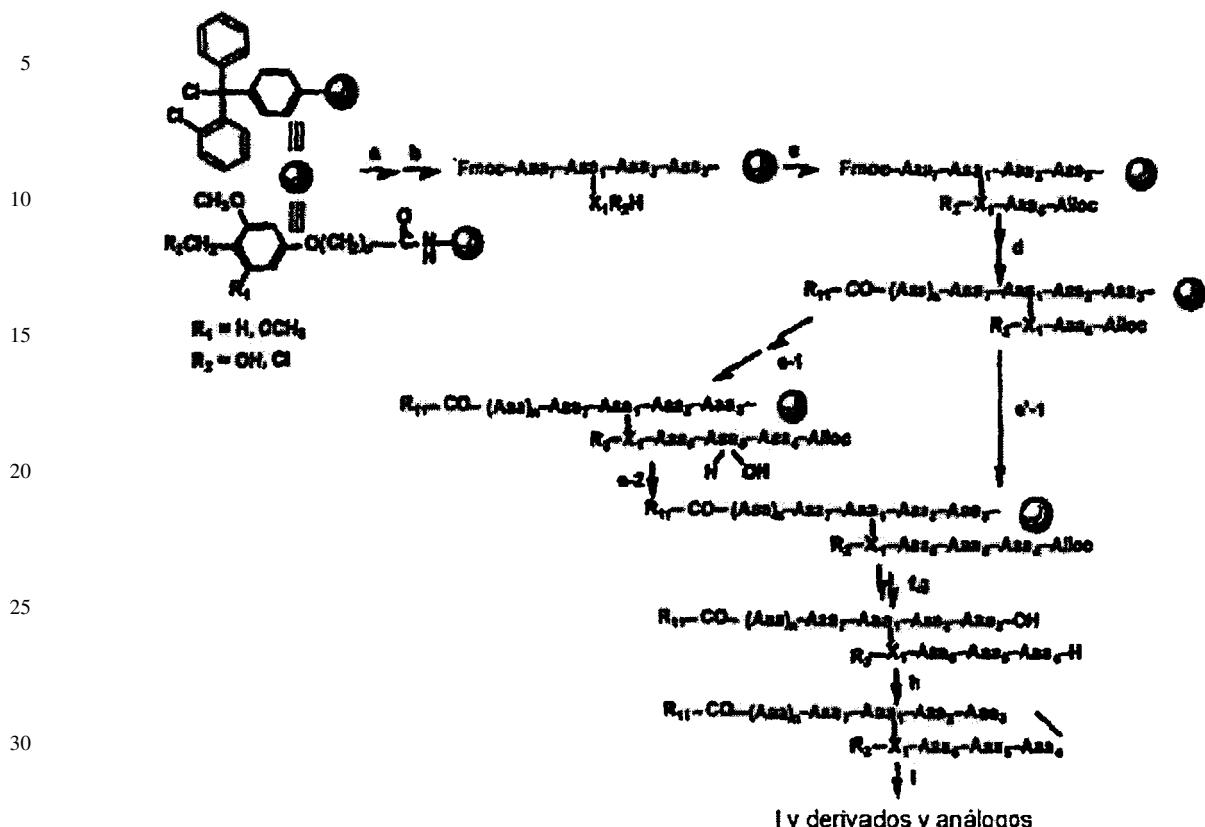
El procedimiento de esta invención puede llevarse a cabo a partir de materiales de partida en una manera enantio 50 y estereocontrolada y rápida, tomando ventaja de la metodología de síntesis en fase sólida, en la que la molécula en construcción está unida a un soporte insoluble durante todas las operaciones de síntesis. Por tanto, el exceso de reactivos y subproductos solubles puede eliminarse sencillamente lavando la molécula-resina con disolventes adecuados. Por tanto, pueden usarse grandes excesos de reactivos solubles con el fin de conducir las reacciones a finalización en un periodo de tiempo corto, evitando la racemización (si se aplica) y otras reacciones secundarias. El método también es adecuado para la automatización.

55 La realización preferida del procedimiento de síntesis de la presente invención se representa mejor en el esquema i, que se refiere a la formación de compuestos de fórmula (II).

60

65

Esquema 1



35 Tal como se muestra anteriormente en el esquema 1, el procedimiento preferido para la formación sintética de kahalalido F (I) y derivados y análogos se basa en un enfoque de fase sólida, véase por ejemplo Lloyd-Williams, P., *et al.*, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, crc Press, Boca Raton (FL), 1997.

El procedimiento del esquema 1 comprende las etapas secuenciales de:

(a) incorporar un Fmoc-aminoácido (Aaa_3) sobre un soporte sólido (por ejemplo, poliestireno, polietileno injertado en poliestireno, y similares) que contiene un grupo de unión o en forma de mango lábil en medio con superácido (por ejemplo clorotritilo, polialcoxibencilo, y similares) que forman un enlace éster;

45 (b) alargar la cadena peptídica con tres aminoácidos (Aaa_2 , Aaa_1 , Aaa_7) usando una estrategia Fmoc/t-Bu. Para I, $\text{X}_1 = \text{OH}$ e introducido sin protección. Cuando $\text{X}_1 = \text{NH}_2$, éste se introduce con protección Alloc:

(c) incorporar (Aaa_c) usando una estrategia Alloc/t-Bu:

50 (d) alargar la cadena peptídica con los aminoácidos restantes y $R_{11}\text{-COOH}$ hasta Aaa_7 usando una estrategia Emoc/t-Bu;

(e-1) alargar la cadena peptídica con dos aminoácidos [Aaa₅ (OH,H), Aaa₄] hasta Aaa₆ usando una estrategia Alloc/t-Bu. El OH unido a Aaa₅ no está protegido:

(e-2) deshidratar en fase sólida para dar el péptido con Aaa₅: 0

(e'-1) incorporar el dipéptido Alloc-Aaa₁-Aaa₅-OH, que se ha combinado y deshidratado en disolución;

60 (f) eliminar el grupo Alloc de Δ_{aa} , mientras el péptido está todavía anclado al soporte sólido;

(g) escindir el péptido protegido con la cadena lateral protegida, si se aplica, del soporte sólido;

(b) ciclar el péptido en disolución:

(i) eliminar los grupos protectores de cadena lateral lábiles en TEA

Se apreciará que la elección particular de grupos protectores no es crítica, y hay otras elecciones distintas ampliamente disponibles. Por ejemplo, grupos de tipo Bz1 pueden sustituir t-Bu/Boc; Boc en lugar de Fmoc; Fmoc en lugar de Alloc; resina Wang en lugar de clorotritilo.

5 Descripción detallada de las realizaciones preferidas del procedimiento

En el esquema 1 se ilustra el procedimiento preferido de la presente invención. Tal como se muestra en él, y tal como se trata con mayor detalle en los ejemplos que siguen más adelante, este procedimiento se llevó a cabo tal como sigue:

10 Se incorporó Fmoc-Aaa₃-OH preferiblemente a una resina de clorotritilo-poliestireno, véase Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1991, 30, 590-593, en presencia de DIEA manteniendo el nivel de sustitución de aproximadamente 0,15-0,5 mmol/g. El uso de cargas mayores provoca la presencia de péptidos terminados en el producto final, véase Chiva, C.; Vilaseca, M.; Giralt, E.; Albericio, F. J., Pept. Sci. 1999, 5,131-140.

15 La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina-DMF (2:8, v/v) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). Los acoplamientos de Fmoc-, Alloc-Aaa-OH, y R11-COOH (5 equiv) se llevaron a cabo con HATU-DIEA, véase Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A., Albericio, F. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1994, 201-203, (5:10) en DMF durante 90 min. Tras el acoplamiento se llevó a cabo una prueba de ninhidrina y si era positivo se repitió el acoplamiento en las mismas condiciones, de otra manera se continuó el procedimiento. Se llevaron a cabo lavados entre las etapas de desprotección, acoplamiento, y desprotección de nuevo con DMF (5 x 0,5 min) y CH₂Cl₂ (5 x 0,5 min) usando cada vez 10 ml de disolvente /g de resina.

20 Se llevó a cabo la incorporación de Alloc-Aaa₆-OH (7 equiv) cuando X1 = O con cantidad equimolar de DIPCDI y 0,7 equiv de DMAP durante 2 h. Se repitió este acoplamiento dos veces.

25 Se llevó a cabo la eliminación del grupo Alloc con Pd(PPh₃)₄ (0,1 equiv) en presencia de PhSiH₃ (10 equiv) bajo atmósfera de Ar, véase Gómez-Martínez, P.; Thieriet, N.; Albericio, F.; Guibé, F. J. Chem. Soc. Perkin I 1999, 2871-2874.

30 Se llevó a cabo la deshidratación en fase sólida con EDC (carbodiimida soluble en agua, 100 equiv) en presencia de CuCl (60 equiv) en CH₂Cl₂-DMF (10:2) durante 6 días. Se ha usado EDC/CuCl mediante deshidratación en disolución de un residuo de Thr en un fragmento de nisina. Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, K.; Horimoto, S.; Fujita, H.; Kubo, A.; Wakamiya, T.; Shibe, A. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1992, 65, 2227-2240.

35 El dipéptido Alloc-Aaa₄-Aaa₅-OH (5 equiv), que se preparó en disolución a partir de Alloc-Aaa₄-OH y H-Aaa₅ (OH, H)-OtBu con EDC, y posterior deshidratación y tratamiento con TFA, se acopló con HATU-DIEA (5:10) durante 16 h y se volvió a acoplar durante 3 h. El uso de otros reactivos de acoplamiento basados en HOBr, tales como HBTU o DIPCDI-HOBr, llevaron a incorporaciones incompletas del dipéptido.

40 Se logró la escisión del péptido protegido de la resina mediante TFA-CH₂Cl₂ (1:99) (5 x 30 seg).

45 Se llevó a cabo la etapa de ciclación con DIPCDI-HOBr (3:3 equiv) en CHCl₂-DMF durante 2 h. También pueden usarse otros métodos, tales como PyBOP/DIEA (3:6 equiv) en DMF.

Se llevó a cabo la desprotección final con TFA-H₂O (95:5) durante 1 h.

Ejemplos de la invención

50 Abreviaturas

Las abreviaturas usadas para los aminoácidos y las designaciones de péptidos siguen las reglas de la IUPAC-IUB Comisión de nomenclatura bioquímica en J. Biol. Chem. 1972, 247, 977-983. Se usan las siguientes abreviaturas adicionales: 4-AcBut-OH, ácido 4-acetoxibutírico; AcButBut-OH, ácido 4-(4-acetoxibutanoiloxy)-butírico; ACH, ácido a-ciano-4-hidroxycinámico; Alloc, aliloxicarbonilo; Boc, terc-butiloxicarbonilo; t-Bu, terc-butilo; But-OH, ácido butírico; Cl-TrtCl-resina, cloruro de 2-clorotritilo-resina; Dap, ácido 2,3-diaminopropiónico; 4-DiMeABut-OH, ácido N,N-dimetil-4-aminobutírico; 3,3-DiMeBut-OH, ácido 3,3-dimetilbutírico; DHB, ácido 2,5-dihidroxibenzoico; Z-Dhb, ácido a,b-dideshidro-a-aminobutírico; DIEA, N,N-diisopropiletilamina; DMF, N,N-dimetilformamida; EDC, clorhidrato de 1-etyl-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida; Etg, etilglicina; ES-EM, espectrometría de masas por electrospray; EM-FAB, espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos; Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; HATU, N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metileno]-N-metilmelanaminio; HBTU, N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metylén]-N-metilmelanaminio; 2-Hedo-OH, ácido 2,4-hexadienoico; Hep-OH, ácido heptanoico; HOAc, ácido acético, HOAt, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol(3-hidroxi-3H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridina); HOBr, 1-hidroxibenzotriazol; IBut-OH, ácido isobutírico; 3-MeBut-OH, ácido 3-metilbutírico; 5-MeHex-OH, ácido 5-metilhexanoico; MeOH, metanol; 4-MePen-OH, ácido 4-metilpentanoico; NMM, N-metilmorfolina; ácido 4-HOBut, 4-hidroxibutírico; (b-OH)Phe-OH, b-hidroxifenilalanina; Lit-OH, ácido litocólico; Pal, ácido palmítico; D-Phe-OH, a,b-dideshidrofenilalanina; PyAOP, hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio; PyBOP, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-

ES 2 292 558 T3

il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio; SPS, síntesis en fase sólida; TFA, ácido trifluoroacético; Tico-OH, ácido tetraicosanoico. Los símbolos de aminoácidos representan la configuración L a no ser que se especifique de otra manera. Todas las razones de disolvente son volumen/volumen a no ser que se especifique de otra manera.

5 Procedimientos generales. Cl-TrtCl-resina, derivados de Fmoc-aminoácidos protegidos, HOBr, PyBOP, HATU eran de PerSeptive Biosystems (Framingham, MA), Bachem (Bubendorf, Suiza), NovaBiochem (Läufelfingen, Suiza). Los Alloc-aminoácidos se prepararon esencialmente tal como se describe por Dangles *et al.*, véase Dangles, O.; Guibé, F.; Balavoine, G.; Lavielle, S.; Marquet, A. J. Org. Chem. 1987, 52, 4984-4993, y 5-MeHex-OH mediante una síntesis malónica. DIEA, DIPCDI, EDC, piperidina, TFA eran de Aldrich (Milwaukee, WI). DMF y CH_2Cl_2 eran de SDS (Peypin, Francia). El acetonitrilo (calidad para HPLC) era de Scharlau (Barcelona, España). Se usaron todos los disolventes y reactivos comerciales tal como se recibieron con la excepción de DMF y CH_2Cl_2 , que se burbujearon con nitrógeno para eliminar los contaminantes volátiles (DMF) y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4 Å activados (Merck, Darmstadt, Alemania) (DMF) o CaCl_2 (CH_2Cl_2). Se llevaron a cabo las reacciones de disolución en matraces de fondo redondo. Se secaron los extractos de disolvente orgánico sobre MgSO_4 anhidro, seguido por eliminación de disolvente a presiones reducidas y <40°C.

20 Se llevaron a cabo las síntesis en fase sólida en jeringas de polipropileno (20, 10 ml) equipadas con un disco poroso de polietileno. Se eliminaron los disolventes y los reactivos solubles mediante succión. Se llevó a cabo la eliminación del grupo Fmoc con piperidina-DMF (2:8, v/v) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). Se llevaron a cabo lavados entre las etapas de desprotección, acoplamiento, y desprotección de nuevo con DMF (5 x 0,5 min) y CH_2Cl_2 (5 x 0,5 min) usando cada vez 10 ml de disolvente /g de resina. Las transformaciones de síntesis peptídica y lavados se llevaron a cabo a 25°C. Las síntesis llevadas a cabo en fase sólida se controlaron mediante HPLC de los productos intermedios obtenidos tras escindir con TFA- H_2O (9:1) durante 60 min una alícuota (aproximadamente 10 mg) de peptidilo-resina. Las columnas de HPLC ([Kromasil C₁₈ (condiciones A-F)/C₄ (condiciones G, H)] columna de fase inversa, 4,6 x 250 mm, 10 mm) eran de Akzo Nobel (Bohüm, Suecia). Se llevó a cabo HPLC analítica en un instrumento Shimadzu que comprendía dos bombas de administración de disolvente (modelo LC-6A), inyector automático (modelo SIL-6B), detector de longitud de onda variable (modelo SPD-6A), controlador del sistema (modelo SCL-6B) y un trazador (modelo C-R6A). La detección UV fue a 220 nm, y se hicieron pasar gradiéntes lineales de CH_3CN (+ 0,036% de TFA) en H_2O (+ 0,045% de TFA) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min desde: (condición A) 1:9 hasta 10:0 durante 30 min; (condición B) 3:7 hasta 10:0 durante 30 min; (condición C) 1:19 hasta 19:1 durante 30 min; (condición D) 45:55 hasta 90:10 durante 30 min; (condición E) 45:55 hasta 6:4 durante 30 min; (condición F) isocrático 1:1; (condición G) 3:7 hasta 1:0 durante 30 min; (condición H) 1:1 hasta 1:0 durante 30 min.

35 Se llevaron a cabo análisis MALDI-TOF- y ES-EM de muestras peptídicas en PerSeptive Biosystems Voyager DE RP, usando matrices CHCA o DHB, y en un espectrómetro Micromass VG-quattro. Se hidrolizaron muestras de péptido-resina en HCl acuoso 12 N-ácido propiónico (1:1), a 155°C durante 1-3 h y se hidrolizaron las muestras libres de péptido en HCl acuoso 6 N a 155°C durante 1 h. Se llevaron a cabo análisis de aminoácidos posteriores en un autoanalizador Beckman System 6300. Se llevaron a cabo espectroscopía ¹H-RMN (500 MHz, 200 MHz) y ¹³C-RMN (50 MHz) en un Bruker DMX-500 (11,7 T) y Varian Gemini 200 (4,7 T). Se expresan los desplazamientos químicos (d) en partes por millón de campo bajo con respecto a TMS. Se expresan las constantes de acoplamiento en hercios.

Kahalalido F (I)

45 Ejemplo 1

H-D-Val-O-TrtCl-resina

50 Se colocó Cl-TrtCl-resina (1 g, 1,35 mmol/g) en una jeringa de polipropileno de 20 ml equipada con un disco de filtro de polietileno. Entonces se lavó la resina con CH_2Cl_2 (5 x 0,5 min), y se añadió una disolución de Fmoc-D-Val-OH (92 mg, 0,27 mmol, 0,2 equiv) y DIEA (471 ml, 2,7 mmol, 2 equiv) en CH_2Cl_2 (2,5 ml), y se agitó la mezcla durante 1 h. Se finalizó la reacción mediante adición de MeOH (800 ml), tras una agitación de 15 min. Se sometió la Fmoc-D-Val-O-TrtCl-resina a los siguientes lavados/tratamientos con CH_2Cl_2 (3 x 0,5 min), DMF (3 x 0,5 min), piperidina- CH_2Cl_2 -DMF (1:9,5:9,5, 1 x 10 min), piperidina-DMF (1:4, 1 x 15 min), DMF (5 x 0,5 min), isopropanol (2 x 1 min), DMF (5 x 0,5 min), MeOH (2 x 1 min), y se secó a vacío. La carga tal como se calculó mediante AAA fue de 0,15 mmol/g.

Ejemplo 2

Fmoc-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina

60 Se añadieron Fmoc-D-allo-Ile-OH (265 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-D-allo-Thr-OH (grupo hidroxilo libre) (256 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y Fmoc-D-allo-Ile-OH (265 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) secuencialmente a la H-D-Val-O-TrtCl-resina obtenida anteriormente usando HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y DIEA (261 ml, 1,5 mmol, 10 equiv) en DMF (2,5 ml). En todos los casos, tras 90 min de acoplamiento, la prueba de ninhidrina fue negativa. Se llevaron a cabo la eliminación del grupo Fmoc y los lavados tal como se describieron en los procedimientos generales. Se acopló Alloc-Val-OH (211 mg, 1,05 mmol, 7 equiv) con DIPCDI (163 mg, 1,05 mmol, 7 equiv) en presencia de

ES 2 292 558 T3

DMAP (12,8 mg, 0,105 mmol, 0,7 equiv). Se repitió este acoplamiento en las mismas condiciones dos veces. Se trató una alícuota de peptidilo-resina con TFA-H₂O (9:1) durante 60 min y la HPLC (condición A, t_R 25,9 min) del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza de > 98%. ES-EM, calculado para C₄₅H₆₃N₅O₁₁, 849,5. Hallado: m/z 850,1 [M+H]⁺.

5

Ejemplo 3

10 *5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina*

15 Se eliminó el grupo Fmoc y se añadieron secuencialmente Fmoc-Orn(Boc)-OH (341 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-D-Pro-OH (253 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-D-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-Thr(t-Bu)-OH (298 mg, 0,75 mmol, 5 equiv), Fmoc-D-Val-OH (255 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y 5-MeHex-OH (98 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) a la peptidilo-resina anterior (ejemplo 2) usando HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y DIEA (261 ml, 1,5 mmol, 10 equiv) en DMF (2,5 ml). En todos los casos, tras 90 min de acoplamiento, las pruebas de ninhidrina o cloranilo (tras la incorporación de D-Val) fueron negativas. Se llevaron a cabo la eliminación del grupo Fmoc y los lavados tal como se describieron en los procedimientos generales. Se trató una alícuota de peptidilo-resina con TFA-H₂O (9:1) durante 60 min y la HPLC (condición B, t_R 17,2 min) del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza de > 82%. ES-EM, calculado para C₆₆H₁₁₆N₁₂O₁₇, 1.348,9. Hallado: m/z 1.350,0 [M+H]⁺.

25 Ejemplo 4

20 *5-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Thr-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina*

30 Se eliminó el grupo Alloc con Pd(PPh₃)₄ (17,3 mg, 0,015 mmol, 0,1 equiv) en presencia de PhSiH₃ (185 μ l, 1,5 mmol, 10 equiv) bajo una atmósfera de Ar. Se añadieron secuencialmente Fmoc-Thr-OH (grupo hidroxilo libre) (256 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y Alloc-Phe-OH (187 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) a la peptidilo-resina anterior (ejemplo 3) usando HATU (285 mg, 0,75 mmol, 5 equiv) y DIEA (261 ml, 1,5 mmol, 10 equiv) en DMF (2,5 ml). En todos los casos, tras 90 min de acoplamiento, la prueba de ninhidrina fue negativa. Se llevaron a cabo la eliminación del grupo Fmoc y los lavados tal como se describieron en los procedimientos generales. Se trató una alícuota de peptidilo-resina con TFA-H₂O (9:1) durante 60 min y la HPLC del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza mediante HPLC (condición B, t_R 17,8 min) de > 70%. ES-EM, calculado para C₇₉H₁₃₂N₁₄O₂₀, 1.597,0. Hallado: m/z 1.598,2 [M+H]⁺.

40 Ejemplo 5

5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina (mediante deshidratación en fase sólida)

45 Se trató la peptidilo-resina anterior (ejemplo 4) con EDC (2,88 g, 15 mmol, 100 equiv), CuCl (891 mg, 9 mmol, 60 equiv) en CH₂Cl₂-DMF (10:2) (12 ml) durante 6 días. Tras lavar exhaustivamente con DMF, CH₂Cl₂ y DMF, se eliminó el grupo Alloc con Pd(PPh₃)₄ (17,3 mg, 0,015 mmol, 0,1 equiv) en presencia de PhSiH₃ (185 μ l, 1,5 mmol, 10 equiv) bajo una atmósfera de Ar. La carga final tal como se calculó mediante AAA fue de 0,11 mmol/g (rendimiento global del 92%). Se trató una alícuota de peptidilo-resina con TFA-H₂O (9:1) durante 60 min y la HPLC (condición 50 B, t_R 17,2 min) del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza de > 70%. ES-EM, calculado para C₇₅H₁₂₆N₁₄O₁₇, 1.495,0 Hallado: m/z 1.496,0 [M+H]⁺.

55 Ejemplo 6

5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH

60 Se escindió el péptido protegido de la resina (0,5 g, 55,9 μ mol) mediante TFA-CH₂Cl₂ (1:99) (5 x 30 seg). Se evaporaron los filtrados combinados hasta sequedad a presión reducida y se liofilizaron, para dar 80,2 mg (48,5 μ mol, rendimiento del 87%) del compuesto del título con una pureza de > 70% como se comprobó mediante HPLC (condición B, t_R 25,7 min). ES-EM, calculado para C₈₄H₁₄₂N₁₄O₁₉, 1.651,1. Hallado: m/z 1.652,3 [M+H]⁺.

65

ES 2 292 558 T3

Ejemplo 7

Kahalalido F (I)

5 Se disolvió el péptido protegido (ejemplo 6) (40,0 mg, 24 μ mol) en DMF (25 ml), y se añadieron PyBOP (37,8 mg, 73 μ mol, 3 equiv) y DIEA (25 ml, 145 μ mol, 6 equiv). Se dejó agitar la mezcla durante 1 h, y después se eliminó el disolvente mediante evaporación a presión reducida. Se disolvió el péptido cíclico protegido en TFA-H₂O (19:1, 5 ml) y se dejó agitar la mezcla durante 1 h. Se eliminó el disolvente mediante evaporación a presión reducida, y después se añadió H₂O (5 ml) y se liofilizó. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía de presión media (Vydac C₁₈ 15-20 μ m, 300 \AA , 240 x 24 mm), gradiente lineal desde el 20% hasta el 60% de acetonitrilo (+ 0,05% de TFA) en agua (+ 0,05% de TFA) en 5 h (300 ml cada disolvente), 120 ml/h, detección a 220 nm, para dar el producto del título (5,0 mg, 3,4 μ mol, rendimiento del 14%). EM-MALDI-TOF, calculado para C₇₅H₁₂₄N₁₄O₁₆, 1.477,9. Hallado: m/z 1.478,7 [M+H]⁺, 1.500,6 [M+Na]⁺, 1.516,5 [M+K]⁺. El producto eluyó mediante HPLC [condición D (t_R 12,5 min), E (t_R 17,4 min) y F (t_R 12,1 min)] junto con una muestra auténtica de Kahalalido F. El espectro de ¹H-RMN (500 MHz, d⁶-DMSO) del compuesto fue idéntico al del producto natural (datos mostrados en la tabla I).

TABLA I

RESIDUO	N-H	H α	H β	OTRO
(Z)-Dhb	9,69 (s)	-	6,34 (q, J = 7,0 Hz)	1,26 (d, J = 7,5 Hz, γ -CH ₃)
D-allo-Ile 1	8,82 (d, J = 10,0 Hz)	4,31	1,73	1,31, 1,02, 0,77 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
L-Phe	8,79 (d, J = 5,5 Hz)	4,42	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-allo-Thr	8,56 (d, J = 8,0 Hz)	4,53	4,96 (m)	1,07 (δ , J = 6,5 Hz, γ -CH ₃)
D-Val 3	8,10 (d, J = 8,5 Hz)	4,26	1,94	0,86 (2 γ -CH ₃)
L-Orn	7,95 (d, J = 8,5 Hz)	4,49	1,48 (2H)	1,67 (γ -CH ₂), 2,74 (sa, δ -CH ₂), 7,69 (ϵ -NH ₃ ⁺)
D-allo-Ile 2	7,90 (d)	4,37	1,69	1,30, 1,03, 0,77 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
D-Val 5	7,88 (d)	4,23	1,96	0,84 (2 γ -CH ₃)
L-Thr	7,82 (d, J = 8,0 Hz)	4,26	3,97 (m)	4,88 (d, J = 5,0 Hz, OH), 0,98 (d, J = 6,5 Hz, γ -CH ₃)
D-Val 2	7,62 (d, J = 8,5 Hz)	4,46	2,17	0,77 (γ -CH ₃), 0,62 (d, J = 7,0 Hz, γ -CH ₃)
L-Val 4	7,57 (d, J = 8,5 Hz)	4,28	1,98	0,80 (2 γ -CH ₃)
L-Val 1	6,76 (d, J = 9,0 Hz)	3,86	1,39	0,62 (d, J = 7,0 Hz, γ -CH ₃), 0,58 (d, J = 6,0 Hz, γ -CH ₃)
D-Pro	-	4,36	2,03, 1,87, 1,79 (β -CH ₂ , γ -CH ₂), 3,76 (1H, m, δ -CH ₂), 3,53 (1H, m, -CH ₂)	
5-MeHex	-	2,13 (2H)	1,47 (β -CH ₂ , δ -CH), 1,11 (γ -CH ₂), 0,82 (2 ϵ -CH ₃)	

Kahalalido F (I)

Ejemplo 8

5 Alloc-Phe-Thr-Ot-Bu

Se disolvió H-Thr-Ot-Bu-HCl (3,1 g, 15 mmol, 1,3 equiv) en CH_2Cl_2 (30 ml) y se añadió DIEA (2,9 ml, 17 mmol, 1,5 equiv) y se dejó agitar la mezcla durante 30 min. Entonces se añadieron Alloc-Phe-OH (2,8 g, 11 mmol, 1 equiv) y EDC (2,8 g, 15 mmol, 1,3 equiv) en CH_2Cl_2 (35 ml) y se agitó la reacción durante 18 h. Se lavó la mezcla de reacción 10 orgánica con H_2O (3 x 25 ml), se secó (MgSO_4) y se concentró a vacío. Se purificó el aceite resultante (4,12 g) mediante cromatografía ultrarrápida [CHCl_3 -MeOH-HOAc (9:1:0,2)] para dar el producto del título (3,25 g, 8 mmol, rendimiento del 71%), que se caracterizó mediante HPLC analítica (t_{R} 20,9 min, pureza > 98%; condición C); ES-EM, calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$, 406,2. hallado: m/z 408,0 [M+H]⁺; ¹H-RMN (200 MHz, CDCl_3): 7,1-7,3 (5 H, m, Ar); 6,89 (1 H, d, J = 8,8 Hz, NH); 5,7-5,9 (1 H, m, CH alilo); 5,56 (1 H, d, J = 8,0 Hz, OH); 5,2-5,3 (2 H, m, CH_2 g-alilo); 4,52 (2 H, d, J = 5,4 Hz, CH_2 a-alilo); 4,45 (1 H, dd, J = 8,4 Hz, 2,8 Hz, a-CH Thr); 4,22 (1 H, dq, J = 6,2 Hz, J = 3,0 Hz, b-CH Thr); 3,0-3,2 (2 H, m, b- CH_2 Phe); 1,47 (9 H, s, t-Bu); 1,15 (3 H, d, J = 6,6 Hz, g- CH_3 Thr); 15 ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl_3): 172,2 (CO), 169,5 (CO); 156,0 (CO); 136,1 (Cq, Ar); 132,5 (CH, alilo); 129,3 (CH, Ar); 128,5 (CH, Ar); 126,9 (CH, Ar); 117,7 (CH_2 , alilo); 82,7 (Cq, t-Bu); 68,5 (b-CH Thr); 65,9 (CH_2 , alilo); 58,0 (a-CH Thr); 56,2 (a-CH Phe); 38,3 (b- CH_2 Phe); 28,0 (CH_3 , t-Bu); 20,8 (g- CH_3 Thr).

20

Ejemplo 9

Alloc-Phe-Z-Dhb-Ot-Bu

25

Se disolvieron Alloc-Phe-Thr-Ot-Bu (3,25 g, 8,0 mmol), EDC (9,90 g, 52 mmol, 6,5 equiv) y CuCl (2,14 g, 22 mmol, 2,7 equiv) en CH_2Cl_2 -DMF anhídrico (65 ml, 12:1) bajo N_2 y se dejó agitar la mezcla durante 2 días bajo N_2 . Se eliminó el disolvente orgánico a vacío y se llevó el residuo en una disolución saturada de EDTA (100 ml), que se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavó la disolución orgánica combinada con salmuera (3 x 60 ml) se secó (MgSO_4) y se concentró a vacío para dar un sólido amarillo pálido (2,8 g), se purificó mediante cromatografía ultrarrápida [CHCl_3 -MeOH-HOAc (9:1:0,1)] para dar el producto del título (2,6 g, 6,7 mmol, rendimiento del 84%), que se caracterizó mediante HPLC analítica (t_{R} 23,1 min, pureza > 95%; condición C); ES-EM, calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$, 388,2. Hallado: m/z 389,6 [M+H]⁺; ¹H-RMN (200 MHz, CDCl_3): 7,2-7,4 (5 H, m, Ar); 6,69 (1 H, q, J = 7,4 Hz, CH Dhb); 5,8-6,0 (1 H, m, CH alilo); 5,2-5,3 (2 H, m, CH_2 g-alilo); 4,5-4,6 (2 H, m, a- CH_2 alilo); 3,1-3,3 (2 H, m, b- CH_2 Phe); 35 1,67 (3 H, d, J = 7,2 Hz, CH_3 Dhb); 1,47 (9 H, s, t-Bu); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl_3): 168,9 (CO); 163,1 (CO); 156,0 (CO); 136,0 (Cq, Ar); 132,6, 132,3 (CH, alilo; b-CH Dhb); 129,3 (CH, Ar); 128,7 (CH, Ar); 127,0 (CH, Ar); 117,9 (CH_2 , alilo); 81,7 (Cq, t-Bu); 66,0 (CH_2 , alilo); 56,3 (a-CH Phe); 38,2 (b- CH_2 Phe); 28,0 (CH_3 , t-Bu); 14,7 (CH_3 Dhb).

40 Ejemplo 10

Alloc-Phe-Z-Dhb-OH

Se disolvió Alloc-Phe-Z-Dhb-Ot-Bu (2,6 g, 6,7 mmol) en TFA- CH_2Cl_2 - H_2O (90:8:2, 5,5 ml) y se dejó agitar la mezcla durante 3 h. Se concentró la reacción orgánica a vacío para dar el producto del título (2,2 g, 6,6 mmol, rendimiento del 99%), que se caracterizó mediante HPLC analítica (t_{R} 17,0 min, pureza > 95%; condición C); ES-EM, calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$, 332,1. Hallado: m/z 333,7 [M+H]⁺; ¹H-RMN (200 MHz, CD_3OD): 7,2-7,3 (5 H, m, Ar); 6,84 (1 H, q, J = 7,2 Hz, CH Dhb); 5,8-6,0 (1 H, m, CH alilo); 5,1-5,3 (2 H, m, CH_2 g-alilo); 4,4-4,5 (2 H, m, a- CH_2 alilo); 3,2-3,3 (1 H, m, b- CH_2 Phe); 2,8-3,0 (1 H, m, b- CH_2 Phe); 1,66 (3 H, d, J = 7,4 Hz, CH_3 Dhb); ¹³C-RMN (50 MHz, CD_3OD): 173,1 (CO); 138,5 (Cq, Ar); 136,7, 134,1 (CH, alilo; b-CH Dhb); 130,3 (CH, Ar); 129,4 (CH, Ar); 127,7 (CH, Ar); 117,4 (CH_2 , alilo); 66,6 (CH_2 , alilo); 57,8 (a-CH Phe); 39,1 (b- CH_2 Phe); 14,1 (CH_3 Dhb).

55 Ejemplo 11

5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina

Se colocó Cl-TrtCl-resina (0,45 g, 1,35 mmol/g) en una jeringa de polipropileno de 10 ml equipada con un disco 60 de filtro de polietileno. Se obtuvo la peptidilo-resina siguiendo los mismos procedimientos descritos en los ejemplos 1-3 excepto porque en el acoplamiento del primer aminoácido (Fmoc-D-Val-OH) a la resina se usaron 0,3 equiv en lugar de 0,2 equiv. La carga inicial tal como se calculó mediante AAA fue de 0,29 mmol/g. Una vez se habían acoplado los aminoácidos, se trató una alícuota de peptidilo-resina con TFA- H_2O (9:1) durante 60 min y la HPLC (condición B, t_{R} 17,3 min) del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza de > 80%. ES-EM, calculado para 65 $\text{C}_{66}\text{H}_{116}\text{N}_{12}\text{O}_{17}$, 1.348,9. Hallado: m/z 1.350,1 [M+H]⁺.

ES 2 292 558 T3

Ejemplo 12

5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina (mediante incorporación del dipéptido)

5 Se trató peptidilo-resina con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (15,1 mg, 0,013 mmol, 0,1 equiv) en presencia de PhSiH_3 (161 μl , 1,3 mmol, 10 equiv) bajo atmósfera de Ar, para eliminar el grupo Alloc. Se disolvieron Alloc-Phe-Z-Dhb-OH (217 mg, 0,65 mmol, 5 equiv) y HATU (249 mg, 0,65 mmol, 5 equiv) en DMF (1,25 ml) y se añadieron a la peptidilo-resina, entonces se añadió DIEA (228 μl , 1,3 mmol, 10 equiv) y se agitó la mezcla durante la noche. Tras los lavados, se repitió el acoplamiento con la misma cantidad de reactivos durante 3 h., cuando la prueba de ninhidrina fue negativa. 10 Tras los lavados con DMF y CH_2Cl_2 , se trató una alícuota de la peptidilo-resina con TFA- H_2O (9:1) durante 60 min y la HPLC (condición B, t_{R} 18,3 min) del producto bruto obtenido tras la evaporación mostró una pureza de > 80%. EM-MALDI-TOF, calculado para $\text{C}_{79}\text{H}_{130}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$, 1.579,0. Hallado: m/z 1.580,3 [M+H]⁺, 1.602,2 [M+Na]⁺, 1.618,2 [M+K]⁺.

15

Ejemplo 13

5-MeHex-D-Val-Thr(t-Bu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH

20 Se eliminó el grupo Alloc de la peptidilo-resina (ejemplo 12) con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (15,1 mg, 0,013 mmol, 0,1 equiv) en presencia de PhSiH_3 (161 μl , 1,3 mmol, 10 equiv) bajo atmósfera de Ar. La carga final tal como se calculó mediante AAA fue de 0,16 mmol/g (rendimiento global del 79%). Se escindió el péptido protegido de la resina (235 mg, 37,5 25 mmol) mediante TFA- CH_2Cl_2 (1:99) (5 x 30 seg). Se evaporaron los filtrados combinados hasta sequedad a presión reducida y se liofilizaron, para dar 40,5 mg (24,5 mmol, 65%) del compuesto del título con una pureza > 80% tal como se comprobó mediante HPLC (condición B, t_{R} 24,3 min). EM-MALDI-TOF, calculado para $\text{C}_{84}\text{H}_{142}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$, 1.651,1. Hallado: m/z 1.674,8 [M+Na]⁺, 1.690,8 [M+K]⁺.

30

Ejemplo 14

Kahalalido F (I)

35 Se disolvió el péptido protegido (ejemplo 13) (38,5 mg, 23 μmol) en DMF (25 ml), y se añadieron PyBOP (36,4 mg, 70 μmol , 3 equiv) y DIEA (24 ml, 140 μmol , 6 equiv). Se dejó agitar la mezcla durante 1 h, y entonces se eliminó el disolvente mediante evaporación a presión reducida. Se disolvió el péptido cíclico protegido en TFA- H_2O (19:1, 5 ml) y se dejó agitar la mezcla durante 1 h. Se eliminó el disolvente mediante evaporación a presión reducida, y entonces se añadió H_2O (5 ml) y se liofilizó. Se purificó el producto bruto tal como se describió en el ejemplo 7 para dar el producto del título (3,6 mg, 2,4 μmol , rendimiento del 10%), que fue idéntico al obtenido en el ejemplo 7.

40 5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (estructura asignada a Kahalalido F por Goetz, G., *et al.* Tetrahedron, 1999, vol. 55, págs. 7739-7746)

45

Ejemplo 15

5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (mediante deshidratación en fase sólida)

50

55 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7 con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se incorporó Fmoc-Val-OH a D-Pro-peptidilo-resina y entonces tras la eliminación del grupo Fmoc, se incorporó Fmoc- D-Val-OH. La carga final tal como se calculó mediante AAA fue de 0,106 mmol/g (rendimiento global del 87%), el rendimiento de escisión fue del 83%, y se obtuvieron 4,7 mg del compuesto del título, lo que representaba un rendimiento global del 13% en las etapas de ciclación, desprotección y purificación. Este producto eluyó en HPLC 0,8-1,9 min más tarde que una muestra auténtica de Kahalalido F [condición D (t_{R} 13,3 frente 12,5 min), E (t_{R} 18,8 frente 17,4 min) y F (t_{R} 14,0 frente 12,1 min)]. EM-MALDI-TOF, calculado para $\text{C}_{75}\text{H}_{124}\text{N}_{14}\text{O}_{16}$, 1.477,9. Hallado: m/z 1.478,7 [M+H]⁺, 1.500,7 [M+Na]⁺, 1.516,6 [M+K]⁺.

60

65 El espectro ¹H-RMN (500 MHz, d^6 -DMSO) del compuesto (tablas II y III) fue diferente del obtenido para una muestra auténtica de Kahalalido F. La mayor diferencia fue que el compuesto sintético obtenido mostró dos conformaciones debido a un equilibrio cis-trans entre residuos L-Val-D-Pro que no se observó ni en el producto natural ni en el isómero obtenido en el ejemplo 7.

65

ES 2 292 558 T3

TABLA II (isómero trans, mayoritario)

RESIDUO	N-H	H α	H β	OTRO
(Z)-Dhb	9,67 (s)	-	6,33 (q)	1,27 (d, J=7,0 Hz, γ -CH ₃)
D-allo-Ile 1	8,80 (d)	4,31	1,73	1,32, 0,77 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
L-Phe	8,78 (d, J=5,5 Hz)	4,43	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-allo-Thr	8,58 (d, J=9,0 Hz)	4,53	4,95 (m)	1,07 (d, J=6,5 Hz, γ -CH ₃)
L-Val 3	7,97 (d, J=8,0 Hz)	4,34	1,94	0,84 (2 γ -CH ₃)
L-Orn	7,77 (d, J=8,5 Hz)	4,47	1,46 (2H)	1,66 (γ -CH ₂), 2,72 (sa, δ -CH ₂), 7,66 (ϵ -NH ₃ ⁺)
D-allo-Ile 2	7,87 (d, J=8,5 Hz)	4,37	1,68	0,75 (δ -CH ₃ o d-CH ₃ y γ -CH ₃)
D-Val 5	7,90	4,22	1,95	0,85 (2 γ -CH ₃)
L-Thr	7,90 (d)	4,24	4,02	4,98 (OH), 1,02 (γ -CH ₃)
D-Val 2	7,63 (d, J=8,5 Hz)	4,45	2,18	0,77 (γ -CH ₃), 0,62 (γ -CH ₃)
D-Val 4	7,56 (d, J=9,0 Hz)	4,34	2,02	0,84 (γ -CH ₃), 0,79 (γ -CH ₃),
L-Val 1	6,75 (d)	3,86	1,39	0,62 (2 γ -CH ₃)
D-Pro	-	4,30	2,03, 1,81, 1,73 (β -CH ₂ , γ -CH ₂), 3,73 (1H, m, δ -CH ₂), 3,52 (1H, m, δ -CH ₂)	
5-MeHex	-	2,08 (1H) 2,15 (1H)	1,48 (b-CH ₂ , δ -CH), 1,11 (γ -CH ₂), 0,82 (2 ϵ -CH ₃)	

60

65

ES 2 292 558 T3

TABLA III (isómero cis, minoritario)

RESIDUO	N-H	H α	H β	OTRO
(Z)-Dhb	9,63 (s)	-	6,33 (q)	1,28 (d, J=6,5 Hz, γ -CH ₃)
D-allo-Ile 1	8,76 (d)	4,30	1,71	1,33, 0,76 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
L-Phe	8,78 (d, J=5,5 Hz)	4,43	2,93 (m)	7,20 (1 H Ar, m) 7,28 (4H Ar, m)
D-allo-Thr	8,58 (d, J=9,0 Hz)	4,53	4,95 (m)	1,00 (γ -CH ₃)
L-Val 3	8,06 (d, J=8,5 Hz)	4,11	1,81	0,71 (γ -CH ₃), 0,60 (γ -CH ₃)
L-Orn	8,37 (d, J=9,0 Hz)	4,62	1,52 (2H)	1,64 (γ -CH ₂), 2,78 (sa, δ -CH ₂), 7,66 (ε -NH ₃ ⁺)
D-allo-Ile 2	8,09 (d, J=9,0 Hz)	4,42	1,64	0,77 (δ -CH ₃ o d-CH ₃ y γ -CH ₃)
D-Val 5	7,90	4,22	1,95	0,85 (2 γ -CH ₃)
L-Thr	7,88 (d)	4,23	3,99	4,93 (OH), 1,02 (γ -CH ₃)
D-Val 2	7,63 (d, J=8,5 Hz)	4,45	2,18	0,77 (γ -CH ₃), 0,62 -(γ -CH ₃)
D-Val 4	7,49 (d, J=9,0 Hz)	4,34	1,94	0,79 (γ -CH ₃), 0,73 (γ -CH ₃),
L-Val 1	6,72 (d)	3,84	1,38	0,62 (2 γ -CH ₃)
D-Pro	-	4,93	2,06, 1,89, 1,75 (β -CH ₂ , γ -CH ₂), 3,3 (m, δ -CH ₂)	
5-MeHex	-	2,08 (1H) 2,15 (1H)	1,48 (β -CH ₂ , δ -CH), 1,11 (γ -CH ₂), 0,82 (2 ε -CH ₃)	

Ejemplo 16

60 5-MeHex-D-Val-Thr-D-Val-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) (mediante incorporación del dipéptido)

65 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 8-14 con la única excepción de que, como en el ejemplo 14, se incorporó Fmoc-Val-OH a D-Pro-peptidilo-resina y entonces tras la eliminación del grupo Fmoc, se incorporó Fmoc-D-Val-OH. La carga final tal como se calculó mediante AAA fue de 0,16 mmol/g (rendimiento global del 79%), el rendimiento de escisión fue del 78%, y se obtuvieron 3,4 mg del compuesto del título, lo que representó un rendimiento global del 10% en las etapas de ciclación, desprotección y purificación. El producto purificado fue idéntico al obtenido en el ejemplo 15.

ES 2 292 558 T3

Ejemplo 22

But-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

5 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por But-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 14,7 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{72}H_{118}N_{14}O_{16}$, 1.435,9. Hallado: m/z 1.459,6 [M+Na]⁺, 1.475,6 [M+K]⁺.

10 Ejemplo 23

3-MeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

15 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 3-MeBut-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 15,9 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{73}H_{120}N_{14}O_{16}$, 1.449,9. Hallado: m/z 1.473,2 [M+Na]⁺, 1.489,2 [M+K]⁺.

Ejemplo 23bis: omitido

20 Ejemplo 24

3,3-DiMeBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

25 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 3,3-DiMeBut-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 16,3 min, condición B) y MALDI-TOF-MS, calculado para $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$, 1.463,9. Hallado: m/z 1.487,4 [M+Na]⁺, 1.503,6 [M+K]⁺.

30 Ejemplo 25

4-MePen-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

35 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 4-MePen-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 16,5 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{74}H_{122}N_{14}O_{16}$, 1.463,9. Hallado: m/z 1.487,7 [M+Na]⁺, 1.503,6 [M+K]⁺.

Ejemplo 26

40 *Hep-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por Hep-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 17,5 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$, 1.477,9. Hallado: m/z 1.501,4 [M+Na]⁺, 1.517,5 [M+K]⁺.

Pal-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

50 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por Pal-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 22,1 min, condición G) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{84}H_{142}N_{14}O_{16}$, 1.603,1. Hallado: m/z 1.626,9 [M+Na]⁺, 1.642,9 [M+K]⁺.

Ejemplo 27a

55 *4-DiMeABut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 4-DiMeABut-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 12,0 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{74}H_{123}N_{15}O_{16}$, 1.477,9. Hallado: m/z 1.478,6 [M+H]⁺, 1.500,6 [M+Na]⁺, 1.516,6 [M+K]⁺.

Ejemplo 27b

65 *2-Hedo-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 2-Hedo-OH. Se caracterizó

ES 2 292 558 T3

el producto mediante HPLC (t_R 15,8 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{74}H_{118}N_{14}O_{16}$, 1.458,9. Hallado: m/z 1.460,0 [M+H]⁺, 1.482,0 [M+Na]⁺, 1.497,9 [M+K]⁺.

Ejemplo 27c

5 **4-AcBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 4-AcBut-OH. Se 10 caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 18,2 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{74}H_{120}N_{14}O_{18}$, 1.492,9. Hallado: m/z 1.493,7 [M+H]⁺, 1.515,8 [M+Na]⁺, 1.531,7 [M+K]⁺.

Ejemplo 27d

15 **4-HOBu-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por 4-HOBu-OH. Se 20 caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 16,6 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{72}H_{118}N_{14}O_{17}$, 1.450,9. Hallado: m/z 1.451,6 [M+H]⁺, 1.473,6 [M+Na]⁺, 1.489,6 [M+K]⁺.

Ejemplo 27e

25 **Ac-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por HOAc. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 17,0 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{70}H_{114}N_{14}O_{16}$, 1.406,9. Hallado: m/z 1.407,8 [M+H]⁺, 1.429,8 [M+Na]⁺.

Ejemplo 27f

30 **TFA-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

35 Obtenido como un subproducto durante la preparación de (ión trifluoroacetilo durante la etapa de ciclación) del ejemplo 27e. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 14,7 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{70}H_{111}F_3N_{14}O_{16}$, 1.460,8. Hallado: m/z 1.462,0 [M+H]⁺, 1.484,1 [M+Na]⁺, 1.500,0 [M+K]⁺.

Ejemplo 27g

40 **AcButBut-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por AcButBut-OH. Se 45 caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 14,1 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{78}H_{126}N_{14}O_{20}$, 1.578,9. Hallado: m/z 1.581,2 [M+H]⁺, 1.602,2 [M+Na]⁺, 1.618,2 [M+K]⁺.

Ejemplo 27h

50 **IBut-D-allo-Ile-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por Fmoc-D-allo-Ile-OH, eliminación del grupo Fmoc y acilación con IBut-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 15,3 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{78}H_{129}N_{15}O_{17}$, 1.548,0. Hallado: m/z 1.548,8 [M+H]⁺, 1.570,8 [M+Na]⁺, 1.586,8 [M+K]⁺.

Ejemplo 27i

60 **Lit-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)**

Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por Lit-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 13,1 min, condición H) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{92}H_{150}N_{14}O_{17}$, 1.723,1. Hallado: m/z 1.724,6 [M+H]⁺, 1.746,6 [M+Na]⁺, 1.761,5 [M+K]⁺.

Ejemplo 27j

TFA-Lit-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

5 Obtenido como un subproducto durante la preparación de (ión trifluoroacetilo durante la etapa de ciclación) del ejemplo 27i. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 17,1 min, condición H) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{94}H_{159}F_3N_{14}O_{18}$, 1.819,1. Hallado: m/z 1.820,6 [M+H]⁺, 1.842,6 [M+Na]⁺, 1.858,6 [M+K]⁺.

Ejemplo 27k

10 *Tlco-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

15 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, se sustituyó 5-MeHex por Tlco-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 16,8 min, condición H) y ES-EM, calculado para $C_{92}H_{158}N_{14}O_{16}$, 1.715,2. Hallado: m/z 858,2 [M+H]^{+/2}, 1.171,8 [M+H]⁺.

Ejemplo 28

20 *H-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

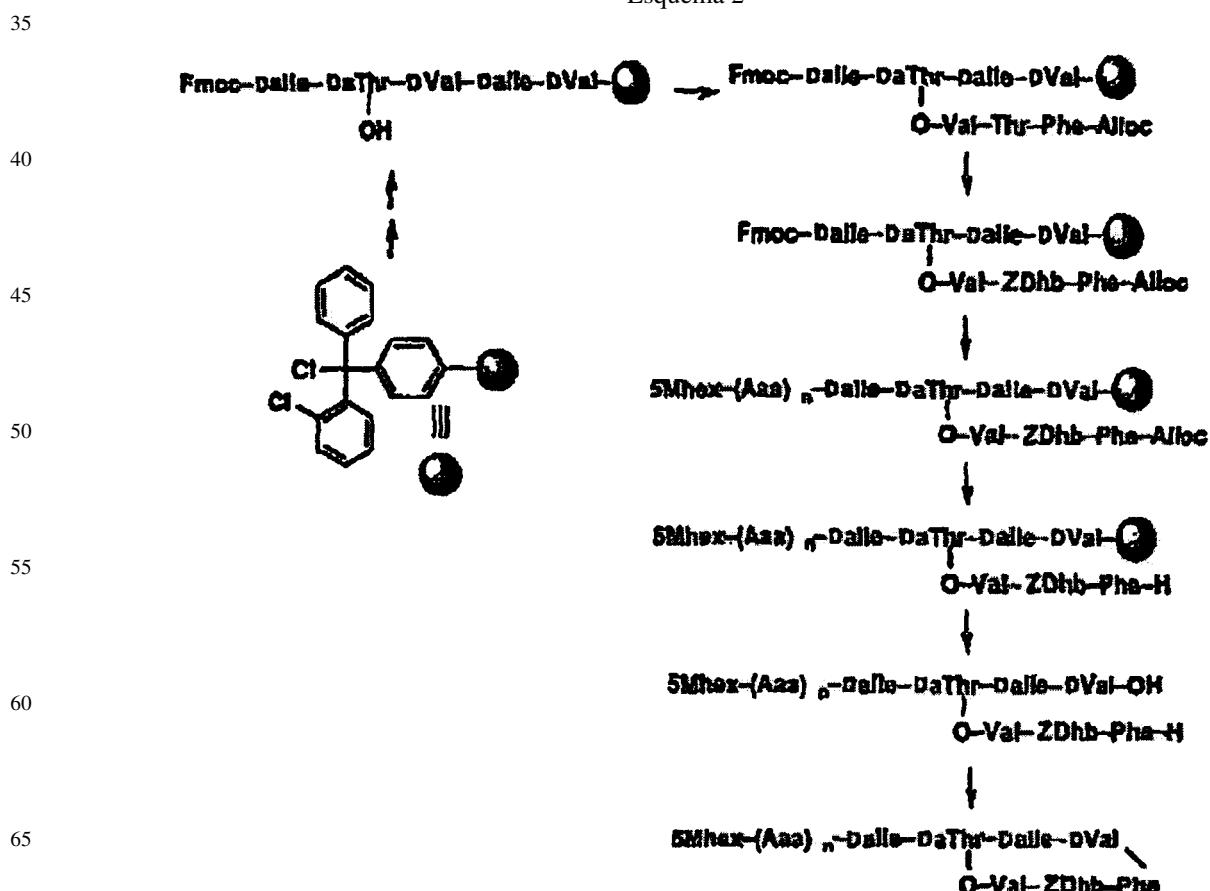
25 Se llevaron a cabo los procedimientos experimentales tal como se describieron en los ejemplos 1-7, empezando con 200 mg de resina, con la única excepción de que, en el ejemplo 3, no se incorporó 5-MeHex. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 11,6 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{68}H_{112}N_{14}O_{15}$, 1.364,8. Hallado: m/z 1.388,3 [M+Na]⁺, 1.404,3 [M+K]⁺.

Ejemplo 29

30 *5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Pho-Z-Dhb-Val)*

35 Procedimientos experimentales esencialmente tal como se describieron en los ejemplos 1-7, pero según el esquema 2.

Esquema 2



ES 2 292 558 T3

La síntesis empieza con 200 mg de resina y no se incorporó Fmoc-Orn(Boc)-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 23,9 min, condición A) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{70}H_{114}N_{12}O_{15}$, 1,362.9. Hallado: m/z 1.386,4 [M+Na]⁺, 1.402,4 [M+K]⁺.

5 Ejemplo 30

5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Procedimientos experimentales esencialmente tal como se describieron en los ejemplos 1-7, pero según el esquema 2. La síntesis empieza con 200 mg de resina y no se incorporaron Fmoc-Orn(Boc)-OH ni Fmoc-D-Pro-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 20,3 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{65}H_{107}N_{11}O_{14}$, 1,265.8. Hallado: m/z 1.288,5 [M+Na]⁺, 1.304,5 [M+K]⁺.

15 Ejemplo 31

5-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

Procedimientos experimentales esencialmente tal como se describieron en los ejemplos 1-7, pero según el esquema 2. La síntesis empieza con 200 mg de resina y no se incorporaron Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH ni Fmoc-D-Val-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 20,0 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{60}H_{98}N_{10}O_{13}$, 1.166,7. Hallado: m/z 1.190,9 [M+Na]⁺, 1.206,9 [M+K]⁺.

Ejemplo 32

25 *5-MeHex-D-Val-Thr-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)*

Procedimientos experimentales esencialmente tal como se describieron en los ejemplos 1-7, pero según el esquema 2. La síntesis empieza con 200 mg de resina y no se incorporaron Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH ni Fmoc-Val-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 24,6 min, condición A) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{55}H_{89}N_9O_{12}$, 1.067,7. Hallado: m/z 1.068,7 [M+H]⁺, 1.090,6 [M+Na]⁺, 1.106,5 [M+K]⁺.

Ejemplo 33

5-MeHex-D-Val-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)

35 Procedimientos experimentales esencialmente tal como se describieron en los ejemplos 1-7, pero según el esquema 2. La síntesis empieza con 200 mg de resina y no se incorporaron Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-Val-OH ni Fmoc-Thr(t-Bu)-OH. Se caracterizó el producto mediante HPLC (t_R 19,8 min, condición B) y EM-MALDI-TOF, calculado para $C_{51}H_{82}N_8O_{10}$, 966,6. Hallado: m/z 990,7 [M+Na]⁺, 1007,2 [M+K]⁺.

40 *Bioactividad*

La bioactividad de los compuestos de esta invención junto con el compuesto de fórmula (I) que es la estructura de kahalalido F según Rinehart se demuestra mediante los resultados en las siguientes tablas obtenidas según la metodología de Berjerón *et al.*, Biochem and Bioph Res. Comm. 1984, 121, 3, 848-854. Las líneas celulares son P388, linfoma murino; A549, carcinoma de pulmón humano; HT-29, carcinoma de colon humano; MEL-28, melanoma humano; DU-145, carcinoma de próstata humano.

50

TABLA

Congéneres de kahalalido F				
55	Compuesto	Ciclo	Cadena**	PM
60	27j	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: TFA-Lit-	1820
65	27i	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: litocoloilo (Lit).	1724

ES 2 292 558 T3

5	27	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: palmitoilo Palm	1604
10	27g	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 4-(4-acetoxibutanoiloxi)-butirilo (AcButBut-)	1579
15	27h	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	IBut-D-allo-Ile-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1548
20	27c	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 4-acetoxibutirilo (4-AcBut)	1493
25	27a	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: N,N-dimetil-4-aminobutirilo (4-DiMeABut)	1478
30	(como Scheuer) 15	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-Val-L-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1477
35	26	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: Heptanoilo (Hep)	1477
40	(Rinehart) 7	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-	1477
45	24	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 3,3-dimetilbutirilo (3,3-DIMeBut)	1463
50	25	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal-Metilpentanoilo (4-MePen)	1463
55	27f	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: trifluoracetilo (TFA)	1461
60	27b	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 2,4-hexadienoilo (Hedo)	1459
65	27d	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 4-hidroxibutirilo	1451
	23	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: 3-Metilbutirilo (3-MetBut)	1451
	22	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: Butirilo (But)	1435
	27c	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	Terminal: acetilo	1407
	28	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-	Terminal: sin ácido graso	1365

ES 2 292 558 T3

	Z-Dhb- Val)		
29	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-allo-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-D- allo-lle-	1363
31	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D- allo-lle-	1167
32	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb- Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-allo-Ile-	1068
** Los compuestos en los que se indica la cadena como terminal tienen la misma cadena que el compuesto 7, pero con la sustitución indicada para 5-MeHex.			

TABLA

Citotoxicidad de congéneres de kahalalido F					
Valores de CI50 (molar) para derivados					
Compuesto	A549M	DU145M	HT29M	MEL28M	p388M
27j	5,49E-08	5,49E-08	5,49E-08	5,49E-08	2,75E-06
27i	5,80E-07	5,80E-07	2,90E-08	1,45E-07	1,45E-06
27	1,58E-07	3,12E-08	6,23E-08	6,23E-08	3,12E-06
27g	>6,33E-07	>6,33E-07	1,58E-06	3,17E-06	>3,17E-06
27h	NA	NA	NA	NA	NA
27c	NA	NA	6,70E-07	3,35E-06	NA
27a	NA	NA	NA	NA	NA
(como Scheuer) 15	>3,39E-06	3,39E-06	3,39E-06	>3,39E-06	>3,39E-06
26	3,39E-07	3,39E-08	6,77E-07	1,69E-06	3,39E-06
(Rinehart) 7	3,39E-07	1,69E-07	3,99E-08	3,39E-07	>3,39E-08
24	1,71E-06	3,42E-07	3,42E-07	3,42E-06	>3,42E-06
25	3,42E-07	3,42E-07	>3,42E-06	>3,42E-06	>3,42E-06
27f	NA	3,42E-06	>3,42E-06	3,42E-06	3,42E-06
27b	3,43E-06	6,85E-07	3,43E-06	NA	NA
27d	NA	NA	NA	NA	NA
23	>3,45E-06	>3,45E-07	>3,45E-08	>3,45E-07	>3,45E-06
22	>3,48E-06	1,74E-06	NA	NA	NA
27c	NA	>3,55E-06	>3,55E-06	>3,55E-06	>3,55E-06

ES 2 292 558 T3

5	28	>3,66E-06	>3,66E-06	>3,66E-06	>3,66E-06	>3,66E-06
	29	>3,67E-06	>3,67E-06	>3,67E-06	>3,67E-06	>3,67E-06
	31	>4,28E-07	>4,28E-08	>4,28E-06	>4,28E-06	>4,28E-06
10	32	NA	NA	4,68E-08	4,68E-08	>4,68E-06

Bibliografía

- Hamann, M. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993. "Kahalalide F: a Bioactive Depsipeptide from the Sacoglossan Mollusk *Elysia refescens* and the Green Alga *Bryopsis* sp." vol. 115, pp 5825-5826.
- Hamann, M. T. *et al.*, *J. Org. Chem.* 1996. "Kahalalides: Bioactive Peptides from Marine Mollusk *Elysia rufescens* and its Algal Diet *Bryopsis* sp." vol. 61, pp. 6594-6660.
- 20 Garcia-Rocha, M., *et al. Cancer Lett.*, 1996. "The Antitumoral Compound Kahalalide F Acts on Cell Lysosomes", vol. 99, 43-50.
- Hamann, M. T., *et al. J. Org. Chem.* 1998. "Kahalalides: Bioactive Peptides from Marine Mollusk *Elysia rufescens* and its Algal Diet *Bryopsis* sp." vol. 63, p. 485 (Correction of *J. Org. Chem.*, 1996, vol. 61, pp. 6594-6660).
- 25 Lloyd-Williams, P. *et al.*, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", *CRC Press*, 1997.
- Goetz, G. *et al. J. Nat. Prod.*, 1997. "Two Acyclic Kahalalides from the Sacoglossan Mollusk *Elysia rufescens*", vol. 60, pp. 562-567.
- 30 Goetz, G. *et al. Tetrahedron*, 1999. "The Absolute Stereochemistry of Kahalalide F", vol. 55, pp. 7739-7746.
- Kan, Y. *et al., J. Nat. Prod.* 1999, vol. 62, 1169-1172.
- 35 Horgen, F. D *et al., J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, pp. 152-154.

40

45

50

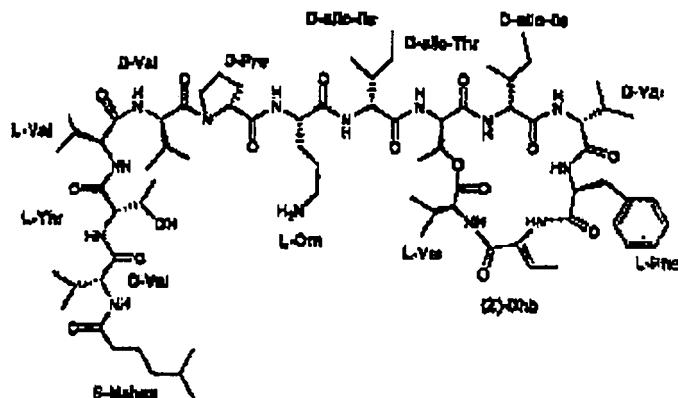
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Derivado de kahalalido F, teniendo el derivado una estructura con una parte cíclica y una cadena lateral derivado de la fórmula (I):



25 diferenciándose el derivado de la cadena lateral de la fórmula (I) en uno o más de los siguientes aspectos:

1 ó 2 aminoácidos que no son los mismos que el aminoácido en la cadena lateral de la estructura de fórmula (I), o están omitidos:

30 de 1 a 10 grupos metíleno adicionales en el grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I)

de 1 a 6 grupos metíleno omitidos del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I); y

de 1 a 3 sustituyentes añadidos al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (D).

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que se añaden de 1 a 10 grupos metileno al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

40 3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que se añaden de 1 a 6 grupos metileno al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I)

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se omiten de 1 a 6 grupos metileno del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

45 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añaden de 1 a 3 sustituyentes al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que los sustituyentes son halógenos.

50 7. Compuesto según la reivindicación 1, que se diferencia de la fórmula (I) en uno o más de los siguientes aspectos:

1 aminoácido que no es el mismo que un aminoácido en la estructura de fórmula (I):

1 grupo metíleno adicional en el grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (D):

1 grupo metíleno omitido del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I):

1 sustituyente añadido al grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

8. Derivado según la reivindicación 1, en el que las diferencias con respecto a la cadena lateral de fórmula (uno o más de los siguientes aspectos:

de 1 a 10 grupos metíleno adicionales en el grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula

de 1 a 6 grupos metíleno omitidos del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula

ES 2 292 558 T3

9. Derivado según la reivindicación 1, en el que las diferencias con respecto a la cadena lateral de fórmula (I) están en uno o más de los siguientes aspectos:

de 1 a 10 grupos metíleno adicionales en el grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I); y

5 de 1 a 6 grupos metíleno omitidos del grupo acilo de la cadena lateral de la estructura de fórmula (I).

10. Compuesto según la reivindicación 1, en el que se omiten 1 ó 2 aminoácidos que no son los mismos que un aminoácido en la estructura de fórmula (I), y la omisión es de la cadena lateral de la estructura.

11. Compuesto según la reivindicación 1, en el que se sustituye 5-MeHex por un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroalquilo o alicíclico terminal.

12. Compuesto según la reivindicación 11, con un grupo alquilo terminal.

15 13. Compuesto según la reivindicación 12, en el que el grupo alquilo terminal tiene de 4 a 10 átomos de carbono.

14. Compuesto según la reivindicación 13, en el que el grupo alquilo terminal tiene 1 o más grupos metilo o etilo que se ramifica en posición distal con respecto al punto de unión al resto de la molécula.

20 15. Compuesto según la reivindicación 12, 13 ó 14, en el que el grupo alquilo tiene un único grupo metilo ramificado.

25 16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el grupo alquilo está sustituido con halógeno, hidroxilo, alcóxilo, amino, carboxilo, carboxamido, ciano, nitro, alquilsulfonilo, alcóxilo, alcóxialquilo, arilalaquilarilo, heterocíclico, alicíclico, arilo o aralquilo.

30 (Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 558 T3

17. Compuesto que es de fórmula:

	Parte cíclica	Cadena lateral**
5	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: TFA-Lit-
10	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: litocoloilo (Lit).
15	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: palmitoilo Palm
20	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 4-(4-acetoxibutanoiloxi)-butirilo (AcButBut-)
25	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	IBut-D-allo-Ile-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-
30	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 4-acetoxibutirilo (4-AcBut)
35	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: N,N-dimetil-4-aminobutirilo (4-DiMeABut)
40	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-Val-L-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-
45	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: Heptanoilo (Hep)
50	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 3,3-dimetilbutirilo (3,3-DiMeBut)
55	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 4-Metilpentanoilo (4-MePen)
60	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: trifluoracetilo (TFA)
65	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 2,4-hexadienoilo (Hedo)
	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 4-hidroxibutirilo
	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: 3-Metilbutirilo (3-MetBut)
	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: Butirilo (But)

5	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	Terminal: acetilo
10	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-D-allo-Ile-
15	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-allo-Ile-
20	ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val)	5-MeHex-D-Val-L-Thr-D-allo-Ile-
** Los compuestos en los que se indica la cadena como terminal tienen la cadena 5-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-, pero con la sustitución indicada para 5-MeHex.		

25 18. H-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

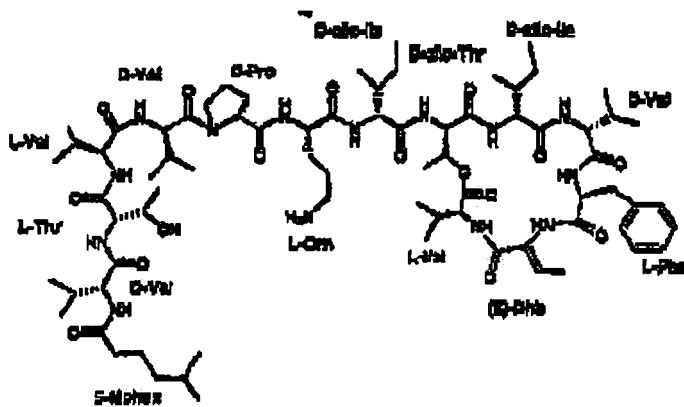
30 19. Pal-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

35 20. TFA-Lit-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-ciclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

21. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

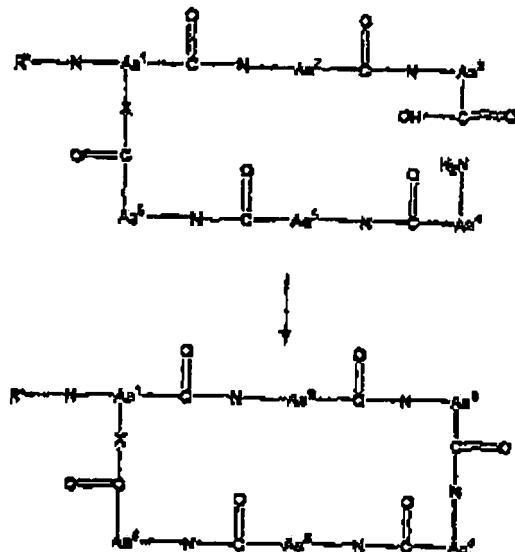
35 22. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer que incluye la administración de una cantidad eficaz de tal compuesto.

40 23. Procedimiento para preparar un derivado de kahalalido F según la reivindicación 1 o kahalalido F que tiene la estructura (I):



ES 2 292 558 T3

procedimiento que comprende un cierre de anillo entre Aa3 y Aa4 según el siguiente esquema:



25 en el que se eligen Aa1 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es D-allo-Thr, Aa2 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es D-allo-Ile, Aa3 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es D-Val, Aa4 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es L-Phe, Aa5 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es Z-Dhb, Aa6 con el -N- respectivo adyacente y -CO- es L-
30 Val, X es O y R' se selecciona con el fin de dar un derivado de kahalalido F según la reivindicación 1 o kahalalido F de fórmula (I), y en el que el grupo R' puede ser un precursor del mismo, y en el que uno o más aminoácidos pueden tener grupos protectores, y en el que el -COOH de Aa3 y/o el NH2 de Aa4 pueden estar opcionalmente protegidos, activados o derivatizados.

35

40

45

50

55

60

65