

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 378**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2019 PCT/EP2019/054715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2019 WO19162524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2019 E 19706670 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 3759108**

54 Título: **Miméticos de poliprolina del módulo 15 derivado de prolina**

30 Prioridad:

26.02.2018 EP 18158650

04.06.2018 EP 18175731

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2024

73 Titular/es:

FORSCHUNGSVERBUND BERLIN E.V. (50.0%)

Rudower Chaussee 17

12489 Berlin, DE y

UNIVERSITÄT ZU KÖLN (50.0%)

72 Inventor/es:

KÜHNE, RONALD;

SCHMALZ, HANS-GÜNTHER;

DOHMEN, STEPHAN;

BARONE, MATTHIAS;

MÜLLER, MATTHIAS;

CHIHA, SLIM y

ALBAT, DOMINIK

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 964 378 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

Miméticos de poliprolina del módulo 15 derivado de prolina

5 La presente invención se refiere a compuestos químicos que pueden usarse en particular como miméticos estructurales de péptidos ricos en prolina. Los compuestos de la presente invención son capaces de inhibir selectivamente las interacciones proteína-proteína mediadas por Ena/VASP-EVH1. La invención se refiere además al uso de estos compuestos como agentes farmacéuticos y al uso de los agentes farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades tumorales.

10 Antecedentes de la invención

15 Las interacciones entre proteínas juegan un papel central en casi todos los procesos fisiológicos y bioquímicos de los organismos vivos. Las proteínas no sólo realizan tareas biocatalíticas (por ejemplo, como enzimas), sino que también participan en varios procesos biológicos. La inhibición selectiva de la interacción física entre los ligandos peptídicos y los receptores proteicos correspondientes puede tener una influencia significativa en varios mecanismos biológicos en la célula.

20 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica anterior, particularmente en el tratamiento de enfermedades, de desarrollar moléculas que inhiban interacciones proteína-proteína específicas para lograr efectos técnicos biológicamente o médicamente relevantes.

25 Un ejemplo de tales inhibidores son los miméticos estructurales de unidades de diprolina. En comparación con otros aminoácidos, la prolina tiene un papel especial debido a su estructura química. La prolina es el único aminoácido proteinogénico secundario que no tiene un protón NH libre para formar enlaces de hidrógeno después de que se ha formado un enlace peptídico. Por esta razón, las secuencias de poliprolina no pueden existir en las estructuras secundarias clásicas de hélice alfa o lámina beta. Debido a estas propiedades físicas especiales, las secuencias de aminoácidos de poliprolina (por ejemplo, motivos ricos en prolina (PRM)) son muy adecuadas para formar interacciones proteína-proteína específicas con receptores (por ejemplo, dominios de unión a motivos ricos en prolina (PBD)). Al proporcionar miméticos de poliprolina, algunas de estas interacciones pueden inhibirse selectivamente.

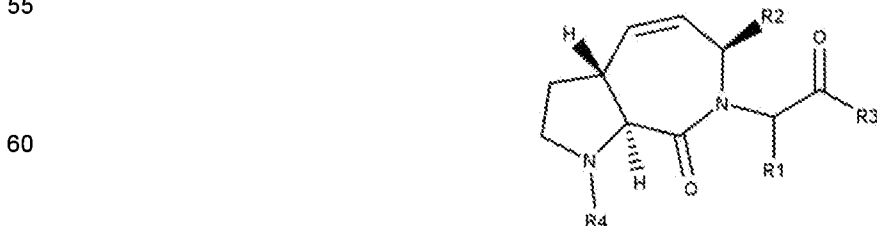
35 Los documentos WO 2008/040332, WO 2013/030111 y WO 2016/092069 describen compuestos químicos adicionales que funcionan como miméticos de diprolina. Por ejemplo, el documento WO 2013/030111 describe compuestos peptídicos que, en lugar de cuatro aminoácidos de prolina, presentan dos miméticos de diprolina adyacentes, los miméticos de diprolina están flanqueados por secuencias peptídicas. Los péptidos descritos en el mismo muestran una buena afinidad por un dominio VASP-EVH1, pero su producción es compleja debido a su estructura peptídica especial. Además, las estructuras peptídicas se degradan debido a la estructura peptídica y a la presencia de proteasas endógenas, posiblemente *en vivo*. Algunos de estos compuestos también muestran una permeabilidad celular subóptima, lo que es claramente desventajoso para su uso como medicamento. Reuter y otros (Eur. J. Org. Chem., 2014, 13, 2664-2667) describen un compuesto similar al del documento WO 2008/040332, que tiene una estructura de anillo bicíclica, específicamente un derivado de ProM- 1 de "anillo oeste abierto".

45 Aunque los compuestos descritos en el mismo pueden inhibir las interacciones proteína-proteína mediante unión selectiva a un receptor, todavía existe la necesidad de proporcionar otros miméticos de poliprolina que tengan propiedades de unión mejoradas y efectos biológicos correspondientes.

Descripción detallada de la invención

50 Por lo tanto, teniendo en cuenta técnica anterior, el objetivo de la invención era proporcionar compuestos que puedan usarse como miméticos para péptidos ricos en poliprolina, en particular como agentes farmacéuticos para el tratamiento de varias enfermedades. Otro objetivo de la invención era proporcionar nuevos fármacos anticancerígenos que sean efectivos contra la invasión y motilidad de las células cancerosas.

55 El problema de acuerdo con la invención se resuelve al proporcionar un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



65 en donde

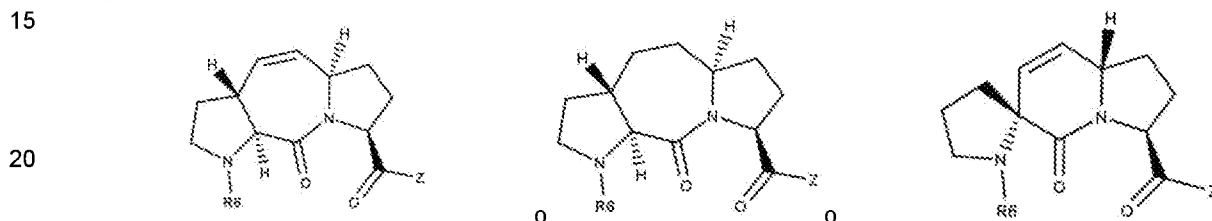
R1: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

5 R2: alquilo, arilo, alcoxi, alquilo, cicloalquilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, arilalquilo, fluoroalquilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

R3: OH, alquilo, O-alquilo, O-arilo, NRR' (R, R': H o alquilo), NROR' (R, R': H, alquilo), heteroarilo,

10 R4: H, alquilo, acilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, o R5, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

R5:



Z: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula I,

25 R6: H, alquilo, arilo, cicloalquilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, arilalquilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos, o



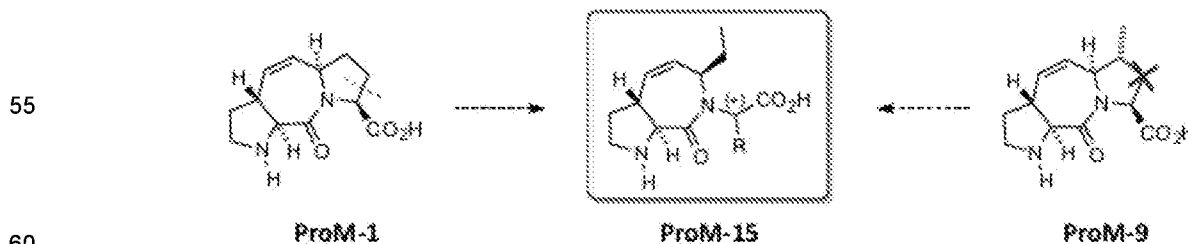
35 Y: enlace a la estructura de acuerdo con R5,

40 R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

45 R8: H, alquilo, arilo, acilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

45 Los compuestos de acuerdo con la invención tienen propiedades aglutinantes sorprendentemente buenas.

50 Como se mostrará en detalle más abajo, la invención se refiere a miméticos de poliprolina similares a los documentos WO 2008/040332, WO 2013/030111 y WO 2016/092069, pero con una subestructura de anillo "abierto". Los soportes de la presente invención se denominan ProM-15 en algunas modalidades y las generaciones anteriores se designan con diferentes números de ProM (por ejemplo, ProM-1, -2 o -9), por ejemplo:

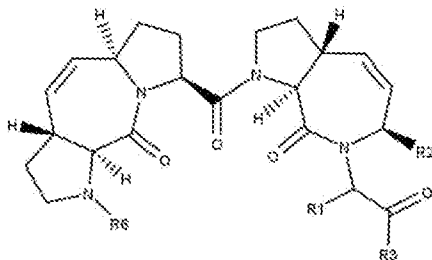


65 Por lo tanto, se puede entender que ProM-15 es un derivado de ProM-1 con "anillo este abierto" o un derivado de ProM-9 reducido en un átomo de carbono. Las estructuras de fórmula I pueden denominarse estructuras o derivados de "ProM-15".

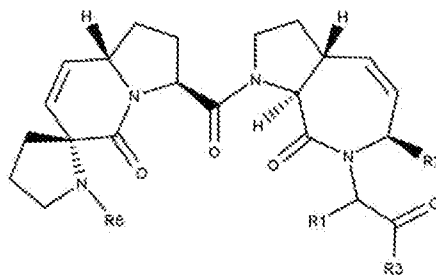
Por un lado, los estudios de modelado por ordenador muestran que una mayor flexibilidad del extremo C de ProM-1 representaría una opción prometedora para aumentar la afinidad de unión al dominio Ena/VASP-EVH1 mediante la posible formación de enlaces de hidrógeno. De hecho, las estructuras de la presente invención tienen una mayor afinidad por el objetivo Ena/VASP-EVH1.

Por otro lado, ProM-15 ofrece la posibilidad de "imitar" el sustituyente metilo de ProM-9 al mismo tiempo que reduce el peso molecular y, por tanto, también mediante el uso del bolsillo de unión hidrófobo abordado con éxito anteriormente. En consecuencia, ProM-15 se caracteriza porque las propiedades de unión positiva de ProM-9 se combinan con una reducción del peso molecular y un aumento de la flexibilidad C-terminal.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula II-a o la fórmula II-b:



Fórmula II-a



Fórmula II-b

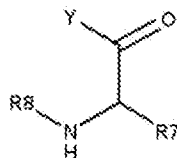
en donde

R1: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

R2: alquilo, arilo, alcoxialquilo, cicloalquilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, arilalquilo, fluoroalquilo.

R3: OH, alquilo, O-alquilo, O-arilo, NRR' (R, R': H o alquilo), NROR' (R, R': H, alquilo), heteroarilo,

R6: H, alquilo, arilo, cicloalquilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, arilalquilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos, o

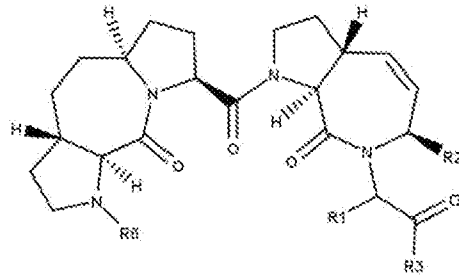


Y: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula II-a o II-b,

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

R8: H, alquilo, arilo, acilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula II-c,



Fórmula II-c

en donde los sustituyentes R1-R8 son los mismos que los anteriores para la fórmula II-a o II-b.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R7: es CH₂-arilo, en particular -CH₂-fenilo sustituido, al estar colocado el sustituyente en la posición orto del grupo fenilo, en donde el sustituyente es preferentemente halógeno, especialmente Cl.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R6: N-acil-(2-clorofenil)alaninoilo.

En algunas modalidades de la invención, "opcionalmente sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno del grupo hidrocarbonado se reemplazan por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno (preferentemente flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, amina (preferentemente -NH₂, -NHCH₃), -NO₂ y -alquilo, en donde el alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; preferentemente están presentes 1, 2, 3 o 4 sustituyentes opcionales. Estas modalidades de la "sustitución opcional" se aplican a todas las modalidades que nombran y/o comprenden el término "opcionalmente sustituido".

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R1: un residuo R de un aminoácido que se deriva de un aminoácido con configuración D o L natural (canónico) o no natural.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R2: CH₂OMe, CH₂SMe, CH₂CH₂OR, CH₂CH₂SR (R: C₁-C₄ alquilo o H), bencilo, CH₂-bencilo, o CH₂CH₂-bencilo. En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R2: C₁-C₄ alquilo, preferentemente metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo. En una modalidad, el etilo está excluido del alcance de protección como R2.

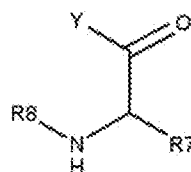
En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R2: metilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo.

En modalidades preferidas de la invención, R2 es iso butilo o propilo, por ejemplo en los derivados ProM-17 (R2: Iso-butilo) o PROM-21 (R2: propilo) descritos en la presente descripción. Las sustancias y ejemplos correspondientes se enumeran más abajo. Tales compuestos se diferencian del ProM-15 en la posición R2 (en ProM-15 R2: etilo). En modalidades preferidas adicionales, en los soportes R1 de ProM-15, ProM-17 y/o ProM-21: H, R3: OMe y R4: H o Boc (terc-butiloxicarbonilo; grupo protector Boc).

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque cuando R3: OH, el compuesto está presente como una sal.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque R4, R6: pueden ser iguales o diferentes, H, alquilo, arilo, acilo, peptidilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula II-a, II-b, o II-c, caracterizado porque R6:



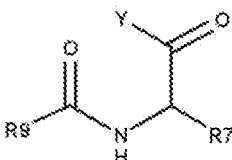
Y: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula II-a o II-b,

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

5 R8: H, alquilo, arilo, acilo, peptidilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilo, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula II-a, II-b, o II-c, caracterizado porque R6:

10



15

en donde

Y: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula II-a o II-b,

20

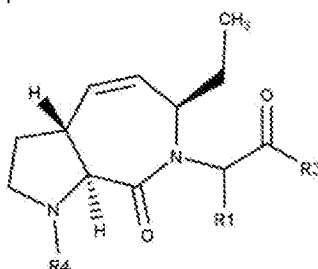
R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

25

R9: H, alquilo o un residuo alquilo opcionalmente sustituido.

En una modalidad de la invención, el compuesto de acuerdo con la invención, que contiene ProM-15, tiene una estructura de acuerdo con la fórmula I-a, específicamente:

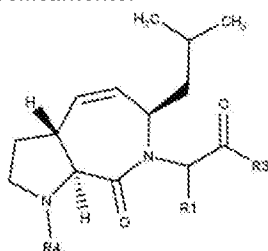
30



35

En una modalidad de la invención, el compuesto de acuerdo con la invención, que contiene ProM-17, tiene una estructura de acuerdo con la fórmula I-b, específicamente:

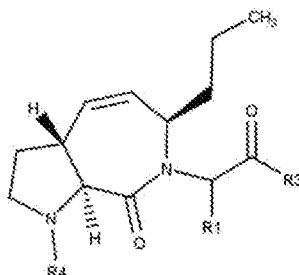
40



45

En una modalidad de la invención, el compuesto de acuerdo con la invención, que contiene ProM-21, tiene una estructura de acuerdo con la fórmula I-c, específicamente:

50



55

60

En otras modalidades de la invención con estructuras de acuerdo con las fórmulas I-a, I-b y I-c, las definiciones de los grupos R4, R1 y R3 se aplican como para modalidades con estructuras de acuerdo con la fórmula I, como se describe anteriormente.

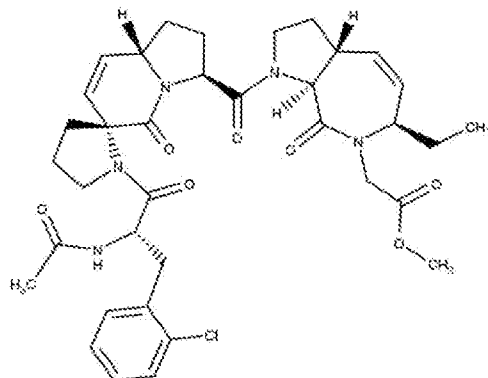
65

En otras modalidades de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención tienen estructuras de acuerdo con las fórmulas II-a o II-b, en donde R2 es etilo, *iso*-butilo o propilo, por ejemplo, como en los derivados ProM-15 (R2: etilo), ProM-17 (R2: *iso*-butilo) o PROM-21 (R2: propilo) descritos en la presente descripción. Estas modalidades corresponden a las fórmulas I-a, I-b y I-c.

5

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula III:

10



15

20

El compuesto de acuerdo con la fórmula III se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción como "Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-2]-[ProM-15]-OMe", donde de acuerdo con la fórmula II-a o II-b R6: Ac-[2Cl-Phe] o Ac-[L-2Cl-F], R1: H, R2: etilo, y R3: OMe. En los ejemplos, este compuesto se denomina 247.

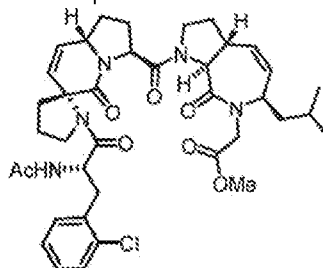
25

La invención también se refiere a otros compuestos que tienen la estructura básica de ProM-15 (por ejemplo, fórmula I) y están acoplados a otros soportes de ProM (ProM-1 a 10, preferentemente ProM-1, -2, -4, -6 y -9, o derivados de los mismos). Más abajo se mencionan ejemplos de otros soportes de ProM. Un acoplamiento de este tipo se realiza preferentemente mediante el mismo enlace que se muestra en las fórmulas II-a, -b, -c- y III. Otras estructuras de acuerdo con la invención están representadas por las fórmulas IV a VIII.

30

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula IV:

35



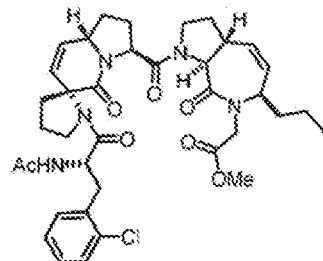
40

El compuesto de acuerdo con la fórmula IV se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción "Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-17]-OMe".

45

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula V:

50

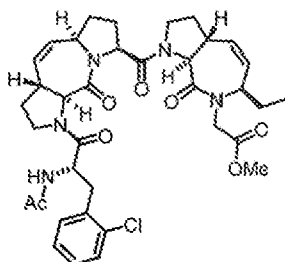


55

El compuesto de acuerdo con la fórmula V se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción como "Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-21]-OMe".

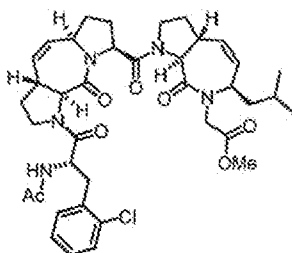
60

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula VI:



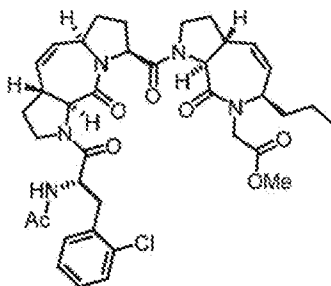
El compuesto de acuerdo con la fórmula VI se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción como "Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-1]-[ProM-15]-OMe".

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula VII:



El compuesto de acuerdo con la fórmula VII se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción como "Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-1]-[ProM-17]-OMe".

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula VIII:



El compuesto de acuerdo con la fórmula VIII se denomina con la nomenclatura sistemática usada en la presente descripción como "Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-1]-[ProM-21]-OMe".

Los ejemplos de aplicación enumerados más abajo muestran que los compuestos de acuerdo con la invención tienen una mayor afinidad de unión al dominio Ena/VASP-EVH1. Esto podría deberse a una mayor flexibilidad del extremo C de ProM-1 y a una posible formación de enlaces de hidrógeno. Las estructuras de la presente invención (al menos compuestos de acuerdo con la fórmula III, IV, V, VI, VII y VIII; Tablas 2 y 3) tienen una mayor afinidad por el objetivo Ena/VASP-EVH1 en comparación con la técnica anterior (por ejemplo [ProM-2]-[ProM-1] como en el documento WO 2016/092069).

Las estructuras de acuerdo con ProM-15, -17, -21 y posiblemente otras configuraciones similares ofrecen la posibilidad de "imitar" el sustituyente metilo de ProM-9 mientras se reduce el peso molecular y, por tanto, se usa el bolsillo de unión hidrófobo abordado con éxito anteriormente. En consecuencia, las estructuras de acuerdo con la invención se caracterizan porque las propiedades de unión positiva de ProM-9 se combinan con una reducción del peso molecular y un aumento de la flexibilidad C-terminal. A la luz de la técnica anterior, a un experto en la técnica no le habría sido posible predecir estas mejoras funcionales en base a las estructuras de acuerdo con la invención.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente descripción, caracterizado porque funciona o se usa como ligando para un dominio Ena/VASP-EVH1.

En una modalidad, la invención se refiere a un compuesto, como se describe en la presente descripción, que inhibe una interacción proteína-proteína mediada por Ena/VASP-EVH1.

En una modalidad, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza porque el compuesto tiene una constante de disociación (K_d) en el complejo con un dominio Ena/VASP-EVH1 de $\leq 5 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 2 \mu\text{M}$, con mayor preferencia $\leq 500 \text{ nM}$.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en la presente descripción, y preferentemente con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La invención se refiere además a un compuesto o composición como se describe en la presente descripción para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales. En una modalidad la enfermedad tumoral es cáncer de mama.

10 La invención se refiere además a un compuesto o composición como se describe en la presente descripción para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, caracterizado porque el compuesto inhibe la metástasis de un tumor.

15 La invención se refiere además a un compuesto o composición como se describe en la presente descripción para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, caracterizado porque la metástasis de un tumor se inhibe mediante la inhibición de la quimiotaxis y/o la motilidad de las células tumorales en base a una alteración de la síntesis de filamentos de actina.

20 La invención se refiere a compuestos como ligando para un dominio Ena/VASP-EVH1. El dominio EVH1 consta de alrededor de 115 aminoácidos y se encuentra en una gran cantidad de proteínas multidominio de señalización. Además de algunas otras, también incluye la familia de proteínas Ena/VASP, que actúan como adaptadores moleculares y modulan la dinámica de la actina del citoesqueleto. Los dominios EVH1 se dividen en tres clases de acuerdo con su preferencia de ligando. La primera clase reconoce específicamente, en particular, un motivo central [F/W/L]PPPP, que se encuentra en proteínas de adhesión focal como vinculina, zyxina o RIAM, en lamellipodina, una proteína importante del borde delantero, en algunas proteínas del complejo WAVE y también en la proteína ActA de la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes*. Las proteínas Ena/VASP también se detectan en filopodios e invadopodios, donde interactúan con forminas con su dominio EVH1.

30 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención como ligando para un dominio seleccionado del grupo que comprende dominios de homología Src 3, dominios WW, dominios GYF, dominios UEV y/o profilina.

35 En una modalidad, el compuesto de la presente invención se caracteriza porque el compuesto inhibe una interacción proteína-proteína mediada por Ena/VASP-EVH1. En consecuencia, la invención también se refiere al uso de nuevos imitadores estructurales de la hélice de poliprolina II como inhibidores sorprendentemente buenos de las interacciones proteína-proteína, en donde están implicados en particular los dominios EVH1, dominios SH3, dominios WW, dominios GYF, dominios UEV y profilina. Las proteínas que contienen estos dominios, tal como, por ejemplo, VASP (dominio EVH1) o YAP (WW), desempeñan un papel importante en la regulación de la motilidad celular (especialmente VASP) y la proliferación celular (especialmente YAP), entre otras. Por ejemplo, VASP está altamente sobreexpresada en células de cáncer de mama altamente invasivas.

40 En una modalidad, el compuesto de la presente invención se caracteriza porque el compuesto tiene una constante de disociación (K_d) en complejo con un dominio Ena/VASP-EVH1 de $\leq 20 \mu\text{M}$, preferentemente ≤ 5 o $2 \mu\text{M}$, con mayor preferencia $\leq 500 \text{ nM}$. Las constantes de disociación particularmente bajas representan un resultado sorprendente. No se conocía ni se mencionaba en la técnica anterior que los miméticos de poliprolina pudieran tener tales propiedades de unión a los dominios EVH1.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de acuerdo con la invención; preferentemente con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticos preferidos son, por ejemplo, rellenos, extensores, aglutinantes, humectantes, retardantes de solución, desintegrantes, aceleradores de absorción, agentes humectantes, absorbentes y/o lubricantes.

50 La invención se refiere al uso de los compuestos mencionados como agentes farmacéuticos. El uso como agente farmacéutico se refiere al uso de los compuestos inventivos para métodos quirúrgicos, terapéuticos o de diagnóstico. En otro aspecto, la invención se refiere a un agente farmacéutico que comprende los compuestos de acuerdo con la invención opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

55 En una forma de modalidad preferida de la invención, los compuestos se usan como miméticos de poliprolina. Ventajosamente, las secuencias de aminoácidos ricas en prolina se encuentran en particular en péptidos que intervienen en procesos de transducción de señales, en particular procesos de transducción de señales intracelulares. En el sentido de la invención, por miméticos también se pueden entender análogos. Se prefiere el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con una modificación de los procesos de transducción de señales intracelulares que están mediados por estructuras de hélice de poliprolina, seleccionadas del grupo que comprende enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas bacterianas y/o enfermedades neurodegenerativas.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención como medicamentos para el tratamiento de enfermedades tumorales. En una modalidad preferida de la invención, la enfermedad tumoral es cáncer de mama.

5 El uso de un compuesto de acuerdo con la invención como medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumoral preferentemente se caracteriza porque el compuesto inhibe la metástasis de un tumor, preferentemente al inhibir la quimiotaxis y/o la motilidad de las células tumorales en base a una alteración de la síntesis de filamentos de actina.

10 Fue completamente sorprendente que los compuestos de acuerdo con la invención mostraran una actividad particularmente buena contra la quimiotaxis y/o la motilidad de las células tumorales. La inhibición de la quimiotaxis y/o de la motilidad de las células tumorales desempeña por tanto un papel en particular en el tratamiento y/o prevención de metástasis tumorales. Esto representa un efecto técnico diferente en comparación con la inhibición de la proliferación celular.

15 La actina es una proteína estructural que se encuentra en todas las células eucariotas. Forma parte del citoesqueleto y una de las cinco proteínas más comunes en los eucariotas. La actina forma filamentos de actina dinámicos como actina F. Estos microfilamentos sirven para la estabilización de la forma exterior de las células, la formación de extensiones celulares, desplazamientos intracelulares y movimientos celulares dirigidos. Muchas células eucariotas tienen un alto grado de movilidad, motilidad celular o, como también se denomina, migración celular, para, por ejemplo, hacer inofensivos a los invasores en el cuerpo (células del sistema inmunológico), para poder curar heridas (por ejemplo, células de la piel) o para mover células en general (en desarrollo u organismos unicelulares como la ameba). La migración celular también juega un papel esencial en las metástasis del cáncer. Esta movilidad se basa principalmente en dos procesos: la polimerización de actina dirigida en la dirección del movimiento (regulada por una serie de reguladores que reaccionan a las señales de la periferia celular) y la interacción actina-miosina en haces de fibrillas (fibras de estrés), cuerdas de tracción contráctiles que atraviesan la celda y sujetan los elementos que dan forma a la base.

20 La perturbación de la síntesis de los filamentos de actina provocada por los compuestos de acuerdo con la invención representa también un efecto técnico nuevo y ventajoso. Al alterar la síntesis de los filamentos de actina, los compuestos de acuerdo con la invención pueden inhibir la motilidad de las células cancerosas y, por tanto, inhibir o prevenir fuertemente la metástasis del cáncer.

25 Las enfermedades tumorales preferidas se seleccionan del grupo que comprende enfermedades tumorales del área de oído, nariz y garganta, los pulmones, el mediastino, el tubo gastrointestinal, el sistema urogenital, el sistema ginecológico, la mama, el sistema endocrino, los sarcomas de piel, hueso y tejidos blandos, mesoteliomas, melanomas, neoplasias del sistema nervioso central, cánceres o enfermedades tumorales en la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis sin un tumor primario conocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneales, malignidades relacionadas con la inmunosupresión y/o metástasis tumorales.

30 En particular, los tumores pueden ser los siguientes tipos de cáncer: adenocarcinoma de mama, próstata e intestino grueso; todas las formas de cáncer de pulmón que se originan en los bronquios; cáncer de médula ósea; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; carcinoma (por ejemplo, carcinoma de Walker, carcinoma de células basales, carcinoma basoescamoso, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma in situ, carcinoma cáncer-2, carcinoma de células de Merkel, carcinoma coloide, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células de avena, carcinoma papilar, carcinoma escirro, carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma bronquial, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición); disfunción histiocítica; leucemia (por ejemplo, relacionada con leucemia de células B, leucemia de células mixtas, leucemia de células nulas, leucemia de células T, leucemia crónica de células T, leucemia asociada a HTLV-II, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de mastocitos y leucemia mieloide); histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, tumor de células plasmáticas solitario; reticuloendoteliosis, condroblastoma; condroma, condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; leucosarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; Sarcoma de Ewing; sinovioma; adenofibroma; adenolinfoma; carcinosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; corioblastoma; adenocarcinoma; adenoma; colangioma; colesteatoma; cilindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células de la granulosa; ginadroblastoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; Tumor de células de teca; leiomioma; leiomiomasarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabiomioma; rabiomiomasarcoma; endinoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafín; angioqueratoma; hiperplasia angioliñoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma, hemangiosarcoma; linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma; pinealoma; cistosarcoma filoides; hemangiosarcoma; linfangiosarcoma; mixosarcoma; cáncer de ovarios; sarcoma (por ejemplo sarcoma de Ewing, experimental, sarcoma de Kaposi y sarcoma de mastocitos); neoplasias (por ejemplo neoplasias óseas, neoplasias de mama, neoplasias del sistema digestivo, neoplasias colorrectales, neoplasias hepáticas, neoplasias

pancreáticas, neoplasias hipofisarias, neoplasias testiculares, neoplasias orbitarias, neoplasias de cabeza y cuello, del sistema nervioso central, neoplasias del órgano auditivo, pelvis, tracto respiratorio y tracto urogenital); neurofibromatosis y displasia de células escamosas cervicales.

5 En una modalidad preferida adicional, el cáncer o el tumor se selecciona del grupo: tumores del área del oído, nariz y garganta que comprende tumores de la parte interna de la nariz, senos paranasales, nasofaringe, labios, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, oído, glándulas salivales y paragangliomas, tumores del pulmón que comprenden carcinoma bronquial de células no pequeñas, carcinoma bronquial de células pequeñas, tumores del mediastino, tumores del tubo gastrointestinal, incluidos tumores del esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos de bilis, carcinomas de intestino delgado, colon y recto y carcinomas anales, tumores urogenitales que comprenden tumores de riñones, uréteres, vejiga, próstata, uretra, pene y testículos, tumores ginecológicos que comprenden tumores del cuello uterino, vagina, vulva, carcinoma de cuerpo, carcinoma trofoblástico maligno enfermedad, cáncer de ovario, tumores de las trompas de Falopio (tuba faloppii), tumores de la cavidad abdominal, carcinomas de mama, tumores de órganos endocrinos que incluyen tumores de la glándula tiroidea, glándula paratiroides, corteza suprarrenal, tumores pancreáticos endocrinos, tumores carcinoides y síndrome carcinoide, neoplasias endocrinas múltiples, sarcomas de huesos y tejidos blandos, mesoteliomas, tumores de la piel, melanomas que comprenden melanomas cutáneos e intraoculares, tumores del sistema nervioso central, tumores infantiles que comprenden retinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, linfomas que incluyen linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfomas primarios del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin, leucemias que incluyen leucemias agudas, leucemias crónicas, mieloides y linfáticas, neoplasias de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, síndromes paraneoplásicos, metástasis sin un tumor primario conocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneal, neoplasia maligna relacionada con la inmunosupresión que comprende neoplasias malignas asociadas al SIDA como el sarcoma de Kaposi, linfomas asociados al SIDA, linfomas del sistema nervioso central asociados al SIDA, enfermedad de Hodgkin asociada al SIDA y tumores anogenitales asociados al SIDA, neoplasias malignas relacionadas con trasplante, tumores metastásicos que comprenden metástasis cerebrales, metástasis pulmonares, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis pleurales y pericárdicas y ascitis maligna.

30 En una modalidad preferida adicional el cáncer o tumor se selecciona del grupo que comprenden enfermedades cancerígenas o enfermedades tumorales de los carcinomas de la mama, de tumores gastrointestinales, que incluyen carcinomas de colon, carcinomas gástricos, carcinomas pancreáticos, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, carcinomas de ovario, carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales y/o metástasis del hígado.

35 En el tratamiento de las enfermedades mencionadas, se prefiere particularmente preparar y/o usar el agente farmacéutico que comprende los compuestos de acuerdo con la invención, como un gel, polvos de diversos tipos, comprimidos, comprimidos retardantes, premezclas, emulsiones, formulaciones para infusión, gotas, concentrado, granulado, jarabe, píldora, bolos, cápsulas, aerosol, spray y/o inhalante.

40 El agente farmacéutico que comprende los compuestos de acuerdo con la invención se encuentra preferentemente en una concentración de 0,1 a 99,5, preferentemente de 0,5 a 95,0, de particularmente preferentemente de 20,0 a 80,0 % en peso en una preparación.

45 Esta preparación se aplica preferentemente por vía oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y/o tópica.

El agente farmacéutico que contiene los compuestos de acuerdo con la invención se usa preferentemente en cantidades totales de 0,05 a 500 mg por kg, preferentemente de 5 a 100 mg por kg de peso corporal, cada 24 horas.

50 El compuesto de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica se administra al paciente preferentemente por vía oral, mediante inyección, por vía tópica, vaginal, rectal y/o nasal.

55 La invención también se refiere a un kit que contiene al menos uno de los compuestos de acuerdo con la invención y/o uno de los agentes farmacéuticos de acuerdo con la invención, opcionalmente con información para combinar el contenido del kit, por ejemplo, un prospecto o una dirección de Internet que remite a páginas de inicio con más información, etc. La información para manipular el kit puede comprender, por ejemplo, un régimen de terapia para las enfermedades mencionadas anteriormente, en particular para las enfermedades preferidas. Sin embargo, la información también puede comprender detalles sobre cómo deben usarse los productos de acuerdo con la invención en el diagnóstico de las enfermedades mencionadas. El kit de acuerdo con la invención también puede usarse en la investigación básica.

60 La invención también se refiere al uso del kit para la profilaxis y/o terapia de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas bacterianas o enfermedades tumorales.

65 De acuerdo con la invención, por "alquilo" se entiende un residuo hidrocarbonado saturado, de cadena lineal o ramificada, de cadena abierta, que es opcionalmente mono o polisustituido. Los sustituyentes preferidos son átomos

de halógeno, grupos alcoxi, haloalcoxi, ciano, alquiltio, haloalquiltio, amino o nitro, particularmente son preferidos metoxi, metilo, fluoroalquilo, ciano, nitro, flúor, cloro, bromo o yodo. "Haloalquilo", "-alquenilo" y "-alquinilo" significan alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido parcial o completamente con átomos de halógeno iguales o diferentes, por ejemplo, monohaloalquilo.

5 El término "arilo" significa un sistema aromático mono, bi- o policíclico opcionalmente sustituido con preferentemente de 6 a 14, en particular de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo, por ejemplo fenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y similares, preferentemente fenilo. El término "arilo opcionalmente sustituido" abarca también sistemas multicíclicos, tales como tetrahidronaftilo, indenilo, indanilo, fluorenilo, bifenililo, al estar el sitio de unión en el sistema aromático.
10 Desde un punto de vista sistemático, "arilo" generalmente también se incluye en el término "fenilo opcionalmente sustituido".

De acuerdo con la invención, el término "heteroarilo" significa compuestos heteroaromáticos, es decir compuestos heterocíclicos aromáticos completamente insaturados, preferentemente anillos de 5 a 7 miembros con 1 a 4, preferentemente 1 o 2 heteroátomos iguales o diferentes, preferentemente O, S o N. Ejemplos de heteroarilo son también los anillos benzocondensados de 5 o 6 miembros.

El término "cicloalquilo" significa un sistema de anillos carbocíclico saturado con preferentemente 3-8 átomos de carbono en el anillo, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En el caso de cicloalquilo opcionalmente sustituido, están comprendidos sistemas cíclicos con sustituyentes, al estar también comprendidos sustituyentes con un doble enlace en el residuo cicloalquilo, por ejemplo, un grupo alquilideno tal como metilideno. En el caso de cicloalquilo opcionalmente sustituido también se incluyen sistemas alifáticos multicíclicos.

El término "alcoxi" significa un residuo alquilo unido mediante un átomo de oxígeno, alqueniloxi significa un residuo alquenilo unido mediante un átomo de oxígeno, alquiniloxi significa un residuo alquinilo unido mediante un átomo de oxígeno, cicloalquiloxi significa un residuo cicloalquilo unido mediante un átomo de oxígeno y cicloalqueniloxi significa un residuo de cicloalquenilo unido mediante un átomo de oxígeno.

De acuerdo con la invención, "hidroxialquilo" significa un grupo alquilo como se define anteriormente que está sustituido con un grupo hidroxilo.

De acuerdo con la invención, "arilalquilo" significa un grupo arilo como se define anteriormente que está sustituido con un grupo alquilo.

De acuerdo con la invención, "alquilheteroarilo" significa un grupo alquilo como se define anteriormente que está sustituido con un grupo heteroarilo.

El término "aminoalquilo" denota un grupo amino que está unido mediante un grupo alquilo. Ejemplos representativos pero no limitantes de aminoalquilo son aminometilo, 2-(amino)etilo, bencil-(metil)aminometilo y dimetilaminometilo.
40 El término "aminocarbonilo" denota un grupo amino que está unido mediante un grupo carbonilo. Ejemplos representativos, pero no limitantes de aminocarbonilo son dietilaminocarbonilo, bencilaminocarbonilo y etilaminocarbonilo.

El término "alquilaminocarbonilo" denota un grupo aminocarbonilo que está unido mediante un grupo alquilo. Ejemplos representativos, pero no limitantes de aminocarbonilalquilo son 2-amino-2-oxoetilo, 2-(bencilamino)-2-oxoetilo, 2-(metilamina)-2-oxoetilo, 4-amino-4-oxobutilo, 4-(dimetilamino)- 4-oxobutilo.

El término "alquilcarbonilo" denota un grupo alquilo que está unido mediante un grupo carbonilo. Ejemplos representativos, pero no limitantes de alquilcarbonilo son acetilo, 1-oxopropilo, 2,2-dimetil-1-oxopropilo, 1-oxobutilo, 1-oxopentilo.

El término "halógeno" significa, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo. Si el término se usa para un residuo, "halógeno" significa, por ejemplo, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

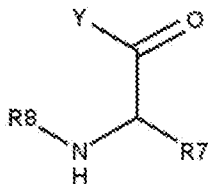
De acuerdo con la invención, "mercaptoalquilo" significa un grupo alquilo que tiene un sustituyente mercaptano (tiol).

De acuerdo con la invención, "sulfidoalquilo" significa un derivado alquilo de sulfuro de hidrógeno (H₂S). Tales sulfuros de alquilo tienen la estructura R-S-R', donde al menos R o R' es alquilo. También se les conoce como tioéteres.

De acuerdo con la invención, "alquilsulfonilo" o "arilsulfonilo" significa un grupo alquilo o un grupo arilo que contiene un grupo sulfonilo (-SO₂-). Este grupo también se conoce como grupo sulfona. Los compuestos de sulfonilo pertenecen a los derivados orgánicos de los ácidos oxigenados del azufre, en donde los dos residuos orgánicos están unidos directamente al átomo de azufre.

El término "peptidilo" significa, por ejemplo, un residuo formado a partir de un péptido, por ejemplo, al retirar un grupo NH₂ de un grupo amida, o de parte de un péptido o por varios aminoácidos acoplados, por ejemplo, un polipéptido.

Por lo tanto, el grupo peptídico puede comprender COCHR_xNHR_y, donde R_x es preferentemente un residuo R de un aminoácido (opcionalmente sustituido) y R_y puede ser preferentemente H, o un grupo peptídico adicional o parte del mismo (opcionalmente sustituido). El grupo peptídico es preferentemente una estructura comprendida por la siguiente fórmula:



Y: enlace a la estructura adyacente (por ejemplo, de acuerdo con R5 de fórmula I),

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos,

R8: H, alquilo, arilo, acilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptídico, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos.

En varias formas de modalidad de la invención se proporcionan como posibles sustituyentes residuos R de un aminoácido, al estar los residuos mencionados opcionalmente sustituidos. Los residuos R de un aminoácido se seleccionan preferentemente de la lista expuesta más abajo. También es posible una sustitución opcional de los residuos R, por ejemplo, por halógeno (preferentemente flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, amina (preferentemente -NH₂, -NHCH₃), -NO₂, o -alquilo, con alquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; preferentemente en donde están presentes 1, 2, 3 o 4 sustituyentes opcionales, preferentemente de la lista expuesta anteriormente. Estas modalidades de la "sustitución opcional" se aplican a todas las modalidades que nombran y/o comprenden el término "opcionalmente sustituido".

Residuo de aminoácido	Abr.	Código	Cadena lateral (residuo R del aminoácido)
Alanina	Ala	A	-
Arginina	Arg	R	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-C(NH)NH ₂
Asparagina	Asn	N	-CH ₂ CONH ₂
Ácido aspártico	Asp	D	-CH ₂ COOH
Cisteína	Cys	C	-CH ₂ SH
Ácido glutámico	Glu	E	-CH ₂ CH ₂ COOH
Glutamina	Gln	Q	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂
Glicina	Gly	G	-H
Histidina	His	H	-CH ₂ (C ₃ H ₃ N ₂)
Isoleucina	Ile	I	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Leucina	Leu	L	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Lisina	Lys	K	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
Metionina	Met	M	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃
Fenilalanina	Phe	F	-CH ₂ (C ₆ H ₅)
Prolina	Pro	P	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -
Serina	Ser	S	-CH ₂ OH
Treonina	Thr	T	-CH(OH)CH ₃
Triptófano	Trp	W	-CH ₂ (C ₈ H ₆ N)
Tirosina	Tyr	Y	-CH ₂ (C ₆ H ₄)OH
Valina	Val	V	-CH(CH ₃) ₂

Figuras

Figura 1: Estructura esquemática de las proteínas Ena/VASP.

Figura 2: Dominio EVH1. El dominio EVH1 consta de una estructura β -sándwich retorcida, que está cerrada por un lado por una hélice α .

Figura 3: Concepto para la producción de análogos de diprolina conformacionalmente fijos en conformación PPII ideal.

Figura 4: Miméticos de estructura secundaria de PPII sintetizados (ProM). Las publicaciones que han aparecido hasta la fecha corresponden a todos los componentes básicos de ProM que se muestran. 58: J. Zamminer, C. Brockmann, P. Huy, R. Opitz, C. Reuter, M. Beyermann, C. Freund, M. Müller, H. Oschkinat, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Angew. Chem.* 2010, 122, 7265-7269., 80: C. Reuter, P. Huy, J.-M. Neudörfl, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 12037-12044, 77: C. Reuter, R. Opitz, A. Soicke, S. Dohmen, M. Barone, S. Chiha, M. T. Klein, J.-M. Neudörfl, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 8464-8470. 90: C. Reuter, M. Kleczka, S. d. Mazancourt, J.-M. Neudörfl, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 2664-2667, 91: A. Soicke, C. Reuter, M. Winter, J.-M. Neudörfl, N. Schlörer, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 6467-6480, 89: V. Hack, C. Reuter, R. Opitz, P. Schmieder, M. Beyermann, J.-M. Neudörfl, R. Kühne, H.-G. Schmalz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 9539-9543, 73: P. Huy, dissertation, University of Cologne, 2011, 62: A. Soicke, dissertation, University of Cologne, 2014.

Figura 5: Desarrollo de un inhibidor de Ena/VASP-EVH1. (K_d = constante de unión, LE = "eficiencia del ligando", Da = Dalton). Parte superior derecha: FPPPP (verde) de 1evh superpuesto con 43 (naranja) de rayos X de EnaH-EVH1 en el complejo con 43.

Figura 6: Inhibidor 43 de Ena/VASP-EVH1 (R. Opitz, M. Müller, C. Reuter, M. Barone, A. Soicke, Y. Roske, K. Piotukh, P. Huy, M. Beerbaum, B. Wiesner, M. Beyermann, P. Schmieder, C. Freund, R. Volkmer, H. Oschkinat, H.-G. Schmalz, R. Kühne, *PNAS* 2015, 112, 5011-5016).

Figura 7: Modelos de los ligandos. Modelos de los ligandos Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-15 (R = Bn)]-OH (izquierda; la flecha roja apunta al bolsillo hidrófobo también abordado por ProM-9) y Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-15 (R = (CH₂)₂CO₂H)]-OH (derecha) en el dominio EnaH-EVH1 (en base a la estructura cristalina de Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (43) con EnaH- EVH1).

Figura 8: La estructura secundaria del PPII a base de glicina y L-fenilalanina imita a Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OH y Boc-R, S, R, S-Phe-[ProM-15]-OH. Las letras se incluyen para aclarar la nomenclatura.

Figura 9: Nuevo inhibidor 115 de Ena/VASP-EVH1 a base de ProM-15.

Figura 10: Varias alilaminas sintetizadas con ésteres de α -aminoácidos. La ilustración muestra las alilaminas sintetizadas mediante N-alilación catalizada por Pd de varios ésteres de α -aminoácidos y los excesos diastereoméricos logrados en condiciones optimizadas cuando se usan los ligandos quirales de bisfosfina 168 o ent-168 de acuerdo con el Esquema 4.15 (en los valores dados se consideraron dos diastereómeros resultantes de la catálisis, en donde se definió el estereocentro del aminoácido mediante la elección del N-nucleófilo correspondiente).

Figura 11: Estructuras cristalinas de los compuestos bicíclicos Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OtBu y Boc-S,R,S-Gly-[ProM-15]-OtBu encima de las fórmulas correspondientes.

Figura 12: Estructuras cristalinas de los compuestos bicíclicos diastereoméricos Phe-[ProM-15] encima de las fórmulas correspondientes.

Figura 13: Estructura cristalina del dipéptido dia-214-b en dos vistas junto a la fórmula correspondiente.

Figura 14: Estructura cristalina del compuesto bicíclico Boc-R,S,R,S-Ala-[ProM-15]-OMe junto a la fórmula correspondiente.

Figura 15: Superposición de las estructuras cristalinas de los ligandos 247 y 252 en el complejo con el dominio EnaH-EVH1. Izquierda: Vista completa de la ranura de unión. Derecha: Vista superior detallada de ProM-15 y ProM-9.

Figura 16: Estructura cristalina del ligando 247 de ProM-15 en el complejo con el dominio EnaH-EVH1. Se muestra la densidad electrónica de los átomos individuales. Se incluyó el enlace de hidrógeno central y estabilizador del soporte ProM-2 a Trp23, y el presunto nuevo enlace de hidrógeno se muestra con una línea discontinua.

Figura 17: Se muestran todas las alilaminas sintetizadas en el contexto de la invención mediante N-alilación catalizada por Pd de diversos ésteres de α -aminoácidos de acuerdo con el Esquema 5.3 y los excesos enantioméricos o diastereoméricos y los rendimientos aislados logrados en condiciones optimizadas.

Ejemplos

Dominios de homología 1 de Ena/VASP (EVH1)

Los dominios EVH1, que constan de alrededor de 115 aminoácidos, desempeñan un papel en numerosos procesos biológicos y se encuentran en una gran cantidad de proteínas multidominio de señalización. Hasta la fecha se conocen tres familias de dominios EVH1, en base a su clasificación en la preferencia de ligando.

La primera clase está formada por las proteínas Ena/VASP, que participan significativamente en la formación y degradación del citoesqueleto de actina. Los dominios EVH1 de clase II (familia Homer/Vesl) se encuentran en proteínas asociadas a receptores postsinápticos, y la tercera clase de dominios EVH1 son las proteínas del síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP) implicadas en la agregación de actina de manera reguladora.

El dominio Ena/VASP EVH1 (EVH1 de clase 1)

Las proteínas Ena/VASP (Ena, Mena, VASP, Evi) modulan la dinámica de la actina en el citoesqueleto y, por tanto, desempeñan un papel clave en el ámbito de la motilidad celular. Como un resultado, ellas afectan un número de procesos fisiológicos importantes, como por ejemplo el desarrollo del sistema nervioso o el funcionamiento del sistema inmunológico. Como un resultado, también desempeñan un papel crítico en procesos relacionados con enfermedades, como la metástasis de tumores, y por lo tanto representan un "objetivo" farmacológico muy interesante, por ejemplo, para desarrollar un inhibidor de metástasis.

Todas las proteínas de la familia Ena/VASP tienen la misma estructura básica que se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

El dominio EVH1 está ubicado en el extremo N de una proteína Ena/VASP. Su estructura fue dilucidada mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X y espectroscopía de RMN y muestra una gran similitud con las estructuras de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y de unión a fosfotirosina (PTB), aunque las respectivas secuencias de aminoácidos solo coinciden ligeramente.

El dominio EVH1 consta de una estructura β -sándwich retorcida que está cerrada en un lado por una hélice α (Figura 2).

Después del dominio EVH1 hay una región rica en prolina que sirve para unirse a proteínas que contienen los dominios SH3 y WW y a la profilina.

Un dominio EVH2 que contiene una actina G y un sitio de unión de actina F se encuentra en el extremo C-terminal. También tiene un motivo de "hélice superenrollada" que media en la tetramerización del sistema.

Es evidente que es concebible una modulación de la función en todas las subunidades. Este estudio se centró en abordar la interacción PRM-EVH1, que se considera con más detalle más abajo.

Los dominios EVH1 de las proteínas Ena/VASP reconocen específicamente la secuencia rica en prolina "FPPPP", que se encuentra, por ejemplo, en todas las proteínas de adhesión focal (por ejemplo, zyxina y vinculina) o en lamellipodina. Estos socios de unión del dominio EVH1 asociados al citoesqueleto sirven para localizar las proteínas Ena/VASP en los sitios de acción requeridos (por ejemplo, adherencias focales o lamellipodios).

Una deslocalización de las proteínas Ena/VASP de estos sitios por la hélice PRM o PPII que imita ligandos peptídicos representa un concepto de modulación potencial.

Otro socio de unión del dominio Ena/VASP-EVH1 es la proteína de superficie ActA del patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*, que también contiene el motivo de unión "FPPPP". Como un resultado, la bacteria es capaz de localizar las proteínas Ena/VASP en su superficie y por tanto usar su función, la formación de filamentos de actina, para la locomoción.

Sin embargo, se ha demostrado que al inhibir esta interacción PRM-EVH1, por ejemplo, al retirar el motivo FPPPP de la proteína ActA o inyectando péptidos que contienen FPPPP en el citoplasma, se podría reducir drásticamente la motilidad del patógeno.

Diseño de los soportes ProM

El concepto detrás de los miméticos de diprolina desarrollados por Schmalz y Kühne se ilustra en la Figura 3.

El modelado molecular asistido por ordenador realizado por Kühne y Brockmann demostró que la introducción de un puente "rígido" de vinilideno C2 (mostrado en verde) entre dos prolinas vecinas (2) en una forma estereodefinida da como resultado un triciclo (ProM-1, "módulo rico en prolina"), que se fija en una conformación PPII casi perfecta. En el marco de sus investigaciones, modelaron una segunda estructura espirocíclica (ProM-2), que también imita una hélice PPII casi ideal.

Síntesis y uso de ProM-1.

El primer mimético de diprolina sintetizado se produjo como una variante N-terminal protegida por Fmoc (Fmoc-[ProM-1]-OH) (Esquema 1)

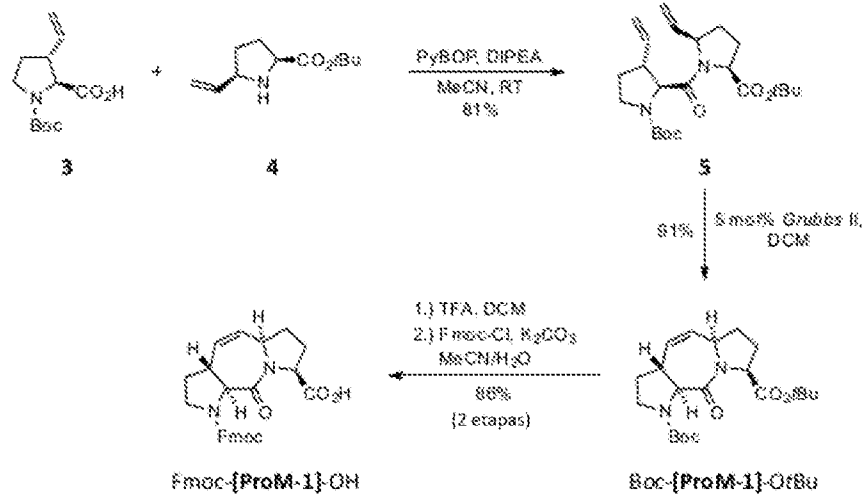
5

10

15

20

25



Esquema 1: Síntesis de Fmoc-[ProM-1]-OH.

A partir de los dos bloques de construcción de vinilprolina enantioméricamente pura 3 y 4, el triciclo Boc-[ProM-1]-OtBu protegido con Boc y terc-butilo se obtuvo primero después del acoplamiento peptídico y la subsecuente metátesis de cierre de anillo catalizada por rutenio. La manipulación subsecuente de los grupos protectores proporcionó el Fmoc-[ProM-1]-OH deseado que era adecuado para posteriores síntesis de péptidos en fase sólida.

30

Síntesis de ProM-2

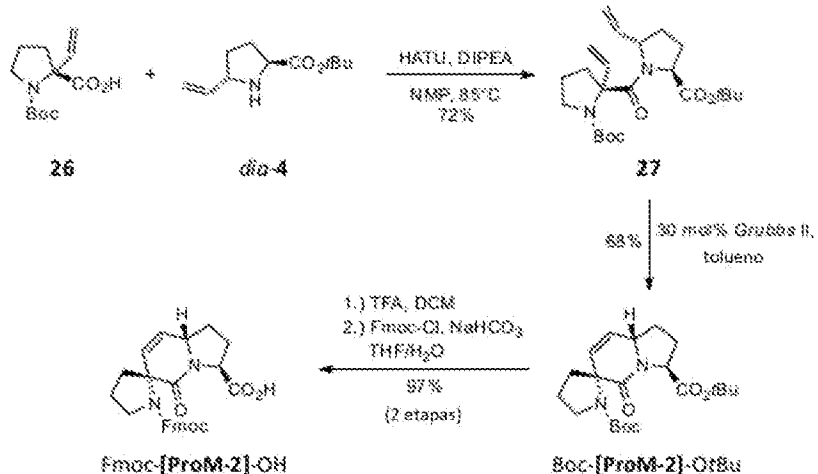
La preparación del análogo de diprolina espirocíclico Fmoc-[ProM-2]-OH es posible de forma análoga a la síntesis de Fmoc-[ProM-1]-OH (Esquema 2)

35

40

45

50



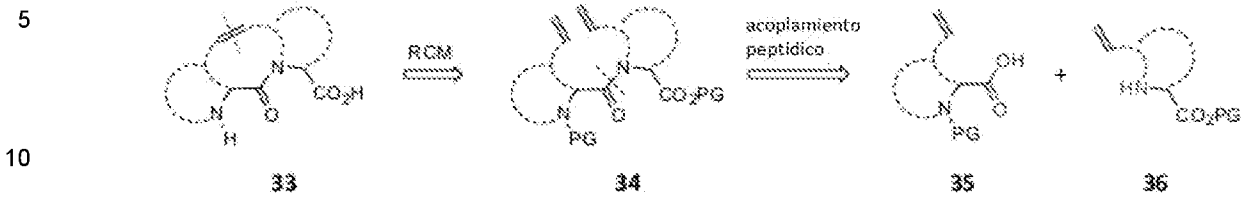
Esquema 2: Síntesis de Fmoc-[ProM-2]-OH

A partir de las vinilprolinas 26 y dia-4, se pudo obtener primero el dipéptido 27 después del acoplamiento peptídico y, después de la metátesis de cierre del anillo, se pudo obtener el triciclo Boc-[ProM-2]-OtBu. Sin embargo, el mayor impedimento estérico del bloque de construcción 27 en comparación con el 5 en la síntesis de ProM-1 requirió condiciones de acoplamiento algo más duras y el uso de mayores cantidades de catalizador de metátesis. La manipulación final del grupo protector proporcionó también aquí el Fmoc-[ProM-2]-OH deseado que es adecuado para la síntesis de péptidos en fase sólida.

60

Bloques de construcción modulares de ProM - biblioteca ProM

La estrategia de síntesis general de los bloques de construcción 33 de ProM se puede ver sobre la base de las síntesis de ProM-1 y ProM-2 (Esquema 3).

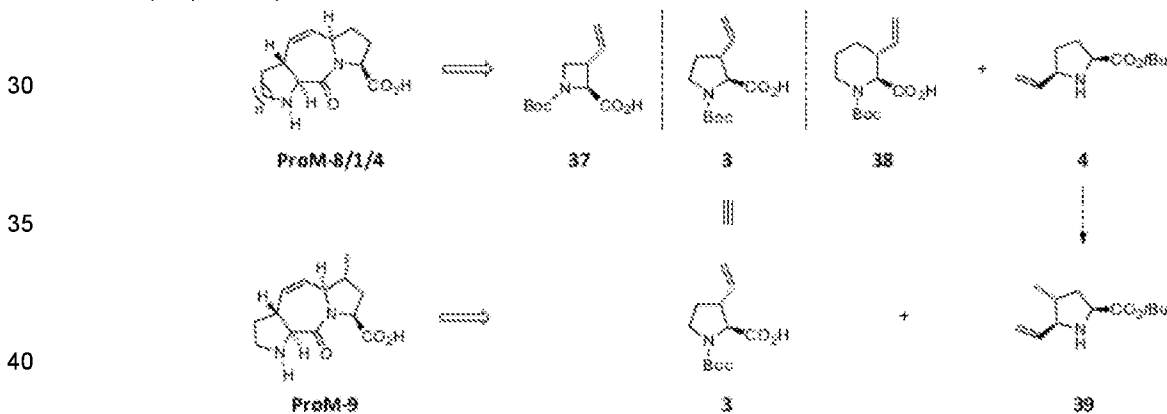


Esquema 3: Desmontaje retrosintético general de los soportes ProM.

15 Retrosintéticamente, se pueden rastrear hasta un dipéptido 34 mediante metátesis de cierre de anillo (RCM) y descomponerse en un bloque de construcción de ácido vinilado 35 enantioméricamente puro y un bloque de construcción de amina vinilada enantioméricamente pura 36 mediante acoplamiento peptídico. Por lo tanto, mediante la variación estructural de los bloques de construcción 35 y 36 también debería ser posible adaptar u optimizar los miméticos de diprolina ProM finales a las necesidades de la superficie proteica respectiva.

20 Además de los miméticos ProM-1 y ProM-2 discutidos, ya se han sintetizado nueve soportes ProM más (Figura 4). Las publicaciones que han aparecido hasta la fecha se refieren a todos los componentes básicos del ProM que se muestran.

25 Las series ProM-8, ProM-1, ProM-4 y el soporte ProM-9 son ejemplos específicos de la variabilidad estructural de los ProM (Esquema 4).



Esquema 4: Retrosíntesis de los componentes básicos ProM-8, ProM-1, ProM-4 y ProM-9.

45 A través de la síntesis dirigida de la serie homóloga de bloques de construcción ácidos 37, 3 y 38, el concepto de reducción o expansión del anillo podría usarse para abordar surcos de unión más superficiales y más profundos en la superficie de PBD.

50 Sin embargo, la introducción selectiva de un grupo metilo adicional en el bloque de construcción de amina 4 permitió el acceso a un derivado de ProM-1 con un sitio de interacción hidrófobo adicional.

55 Algunos de estos miméticos de diprolina ProM (ProM-1 a ProM-4) ya se han usado para desarrollar un inhibidor de Ena/VASP-EVH1 de bajo peso molecular, altamente selectivo, peptídico, pero totalmente sintético (imitador de estructura secundaria de PPII).

Desarrollo de un inhibidor de Ena/VASP-EVH1

60 Opitz y otros informó en una publicación publicada en 2015 (R. Opitz, M. Müller, C. Reuter, M. Barone, A. Soicke, Y. Roske, K. Piotukh, P. Huy, M. Beerbaum, B. Wiesner, M. Beyermann, P. Schmieder, C. Freund, R. Volkmer, H. Oschkinat, H.-G. Schmalz, R. Kühne, PNAS 2015, 112, 5011-5016) sobre el uso exitoso de estructuras ProM como miméticos de diprolina en el desarrollo de un inhibidor de Ena/VASP-EVH1 de "molécula pequeña" (Figura 5).

65 A partir del ligando peptídico derivado de ActA Ac-SFEFPPPTDEL-NH₂ (40) que se une al dominio Ena/VASP-EVH1 en el intervalo micromolar, las cuatro prolina en el motivo central (FPPPP) del ligando fueron reemplazadas sistemáticamente por los soportes rígidos ProM-1 a ProM-4. Los mejores resultados resultaron de la sustitución del

primer par de prolina por ProM-2 (FPPPP) y el segundo par de ProM-1 (FPPPP). En estudios posteriores también se demostró que la sustitución de la fenilalanina (F) por el aminoácido no natural L-2-clorofenilalanina (L-2Cl-F) conducía a una drástica ganancia de afinidad. El compuesto resultante 41 representó el primer ligando peptídico con un motivo central completamente sintético (modo de unión canónica), que se une al dominio Ena/VASP-EVH1 en el intervalo nanomolar.

Sin embargo, para desarrollar una "molécula pequeña" fue necesario reducir significativamente el peso molecular del compuesto 41. Curiosamente, fue posible eliminar los epítomos flanqueantes (SFE y TEDEL) sin una pérdida significativa de la afinidad de unión de 41, mientras que en el caso del ligando wt 40 esto condujo a una pérdida casi completa de la capacidad de unión (ver 42 y 43). El ligando Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (43) fue el inhibidor de molécula pequeña más eficaz para abordar los tres dominios Ena/VASP-EVH1. El compuesto 43 mostró una afinidad de unión aumentada 180 veces (EVL- y Ena-EVH1) o incluso 280 veces (VASP-EVH1) en comparación con el péptido natural 42, que se redujo a la secuencia de unión. Además, el modo de unión canónico del ligando 43 podría demostrarse mediante estructuras cristalinas y podría producirse una sustancia 44 permeable a las células mediante esterificación del ácido libre.

El desarrollo exitoso de un inhibidor de Ena/VASP-EVH1 también podría confirmarse en estudios biológicos. Se ha demostrado que el compuesto 44 deslocaliza la proteína VASP de las adherencias focales y la saca del "borde delantero", lo que reduce la formación de filamentos de actina y, por tanto, reduce drásticamente la motilidad de las células de cáncer colorrectal y de mama altamente metastásicas.

En resumen, los miméticos de diprolina ProM son componentes básicos útiles, modulares y diseñados racionalmente para el desarrollo de miméticos de péptidos específicos para abordar las interacciones PRM-PBD.

Objetivo y concepción de la presente invención.

La presente invención se basa en los estudios mencionados anteriormente en el área del desarrollo mimético de la estructura secundaria de PPII, por ejemplo, la producción de análogos modulares de diprolina en conformación PPII (ProM) y su uso como equivalente Pro-Pro en el motivo central de un PRM para la síntesis de un altamente selectivo inhibidor 43 de Ena/VASP-EVH1 (Figura 6).

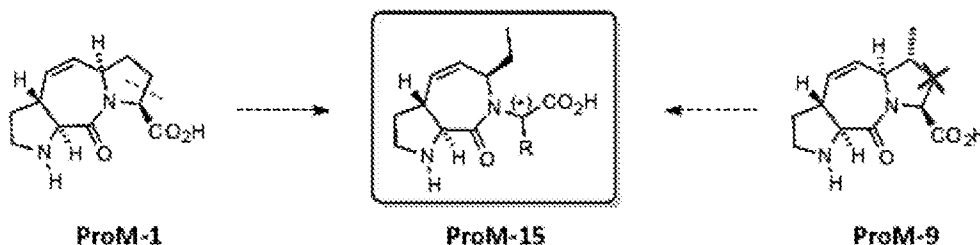
Con el objetivo de aumentar aún más la afinidad de unión del ligando peptídico al dominio EVH1 o abordar otros PBD, en los últimos años se han sintetizado numerosos soportes ProM "estructuralmente optimizados" (ProM-1 a ProM-10) mediante el análisis de los resultados obtenidos y estudios de modelización posteriores. A partir de ProM-1, todos estos se deben a un cambio en la estereoconfiguración o una modificación de la estructura del carbono (variación de tamaño y sustituyentes) para abordar específicamente más bolsillos de unión en el dominio o para cumplir con los requisitos estéricos.

El derivado ProM-9 sustituido con metilo ProM-1 es un ejemplo relevante para este trabajo.

Como reemplazo de ProM-1 en el inhibidor de Ena/VASP-EVH1 Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (43), produjo una afinidad de unión que aumentó en un factor de 5 - 10.

El sustituyente metilo añadido se dirigió a un bolsillo hidrófobo del dominio y, por tanto, contribuyó positivamente a la unión.

Como resultado de estas investigaciones, creció el interés en las estructuras bicíclicas derivadas de ProM-1 y ProM-9 del tipo ProM-15 (Esquema 5):

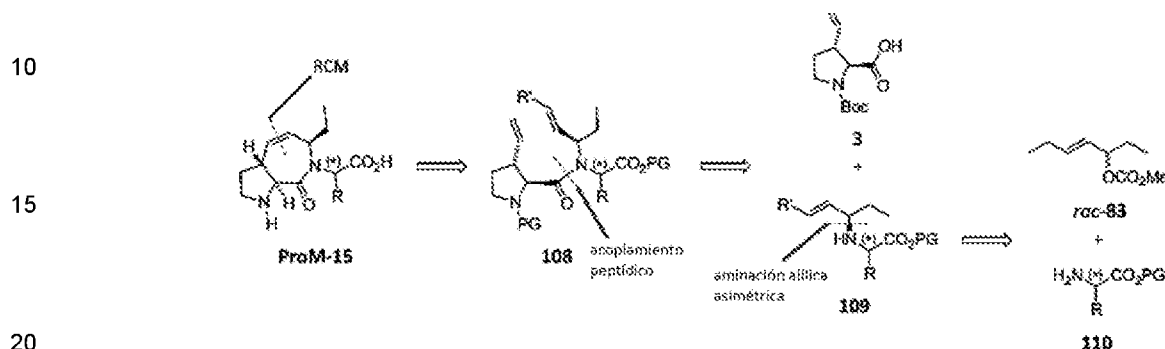


Esquema 5: Derivación del soporte ProM-15 a partir de las estructuras conocidas ProM-1 y ProM-9.

En el caso de R = H, ProM-15 puede considerarse como un derivado de ProM-1 con "anillo este abierto" o como un derivado de ProM-9 reducido por un átomo de carbono. Por un lado, los estudios de modelado por computadora mostraron que una mayor flexibilidad del extremo C de ProM-1 en 43 representaría una opción prometedora para aumentar la afinidad de unión al dominio Ena/VASP-EVH1 mediante la posible formación de enlaces de hidrógeno.

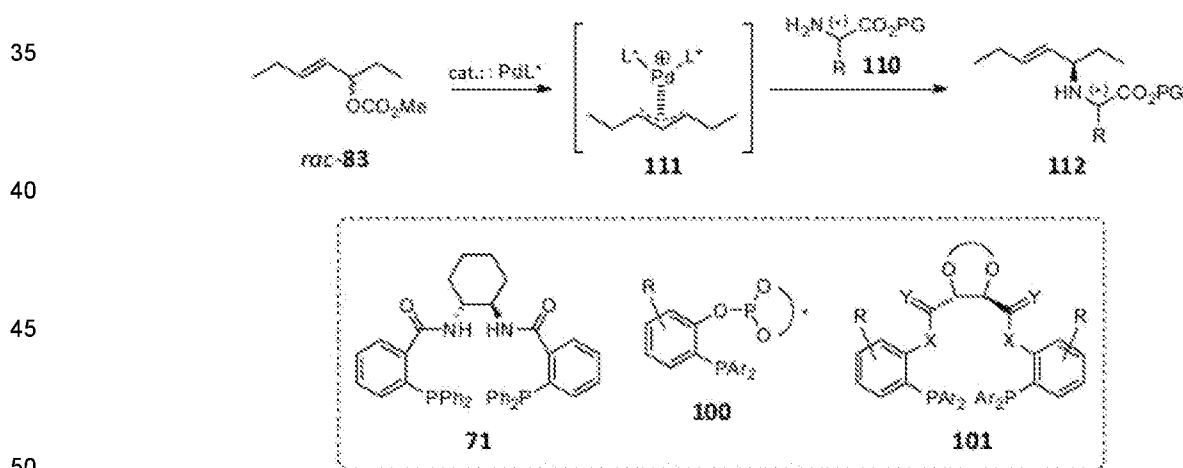
Por otro lado, ProM-15 ofrecería la posibilidad de "imitar" el sustituyente metilo de ProM-9 al mismo tiempo que se reduce el peso molecular y, por tanto, también usar el bolsillo de unión hidrófobo abordado con éxito anteriormente. En consecuencia, ProM-15 debería combinar las propiedades de unión positiva de ProM-9 con una reducción del peso molecular y un aumento de la flexibilidad del C-terminal.

De acuerdo con la estrategia de síntesis general establecida de la estructura ProM, ProM-15 se remonta a los bloques de construcción de amina y ácido enantioméricamente puro 3 y 109 (Esquema 6).



Esquema 6: Síntesis retrosintética de análogos de diprolina del tipo ProM-15.

La estructura objetivo ProM-15 resulta de la metátesis de cierre de anillo (RCM) catalizada por rutenio de un dipéptido del tipo 108, que a su vez se remonta al ya conocido "ácido de Zaminer" (3) y a una alilamina 109 mediante acoplamiento peptídico. La síntesis estereoselectiva de alilaminas del tipo 109 plantea un desafío particular. Para este propósito, podría usarse una aminación alílica asimétrica catalizada por metales de transición de sustratos simétricamente disustituídos en 1,3 (para evitar regioisómeros) mediante el uso de aminoácidos N nucleófilos. A partir del carbonato racémico rac-83 y de un éster de aminoácido simple 110, disponibles en ambas configuraciones absolutas, se podrían preparar en principio los cuatro estereoisómeros de forma selectiva mediante el uso de ligandos quirales. En base a los pocos ejemplos bibliográficos (moderadamente exitosos), se planeó desarrollar las primeras condiciones confiables para la síntesis eficiente y estereoselectiva de ésteres de aminoácidos N-alilados del tipo 112 bajo catálisis con paladio (Esquema 7).



Esquema 7: Síntesis prevista de ésteres de aminoácidos N-alilados de tipo 112 mediante el uso de ligandos quirales.

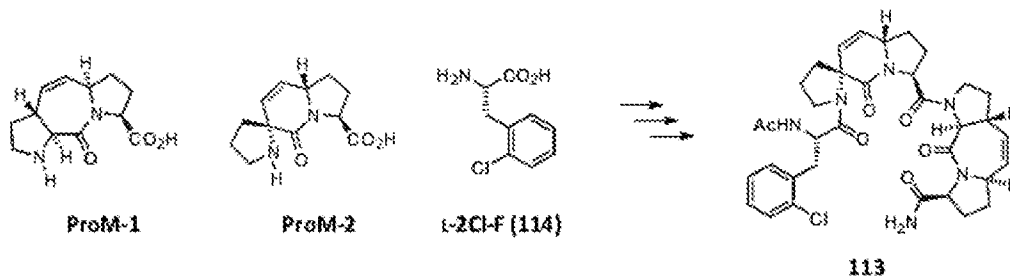
Fue particularmente importante identificar ligandos quirales adecuados que permitan controlar la configuración del nuevo estereocentro de una manera altamente selectiva, independientemente de la configuración absoluta del bloque de construcción de aminoácidos 110 usado. En este contexto, además de los ligandos establecidos como el ligando de Trost, también se planeó probar los ligandos de fosfino-fosfito desarrollados 100 y los ligandos de bifosfina simétricos C2 del tipo 101, cuya estructura modular permite una optimización simple comparativa (individual) de la estructura. El uso de varios ésteres de aminoácidos 110 podría proporcionar acceso a una gran cantidad de derivados de ProM-15, que podrían entrar en interacciones adicionales con el dominio a través de sustituyentes adicionales (Figura 7).

Los estudios de modelización realizados revelaron que además de la glicina (R = H), la fenilalanina (R = Bn) o los aminoácidos funcionalizados como el ácido glutámico (R = (CH₂)₂CO₂H) también sería de interés. Los derivados de ProM-15 a base de L-fenilalanina podrían entrar en interacciones hidrófobas adicionales con el dominio EVH1. El ácido L-glutámico parecía ser beneficioso porque se imitaría el residuo "TEDEL" del péptido ActA y, por tanto, sería posible

la formación de enlaces de hidrógeno con los aminoácidos circundantes. Además, los derivados ProM-15 de L-tirosina podrían abrir una manera de abordar los dominios WW con un motivo central "PPXY". En consecuencia, el objetivo era sintetizar los análogos de diprolina deseados del tipo ProM-15 (por ejemplo, como variante protegida por Boc) a base de glicina y, por ejemplo, L-fenilalanina, después de la producción exitosa de ailaminas del tipo 112 (Figura 8).

En caso necesario, se planeó optimizar las últimas etapas de síntesis ya establecidas (acoplamiento peptídico, metátesis de cierre de anillos) para los sistemas especiales. La nomenclatura de los compuestos objetivo se define de la siguiente manera: N-terminal - configuración de los centros a, b, c, d - aminoácido [ProM-15]-C-terminal.

Debido a los resultados tan positivos en el desarrollo de un inhibidor de Ena/VASP-EVH1, se propusieron realizar experimentos in vivo. Esto requirió el suministro de grandes cantidades de sustancia (> 2 g) del ligando peptídico seleccionado Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-NH₂ (113), a los que no se podía acceder a través de la síntesis de péptidos en fase sólida usada anteriormente para desarrollar el inhibidor (<5 % de rendimiento en 2 etapas para formar el ácido libre 43). Por lo tanto, un enfoque adicional de esta invención fue el desarrollo de una estrategia eficiente para unir los bloques de construcción de ProM en la fase líquida y el establecimiento de una síntesis de múltiples gramos del ligando 113 (Esquema 8).



Esquema 8: Estructura del ligando peptídico 113 de los componentes básicos ProM-1, ProM-2 y L-2Cl-F (114).

Además del soporte ProM-1, que se entregó en cantidades suficientes, se planeó producir ProM-2 en una escala de varios gramos mediante la conocida ruta de síntesis, de acuerdo con Reuters y Soicke.

A este respecto, las etapas finales relativamente ineficientes del acoplamiento peptídico (rendimiento del 55 %) y la metátesis de cierre del anillo (se requiere un 30 % en moles de catalizador de Grubbs II) tuvieron que ser reexaminadas y optimizadas.

Además, existía el desafío de producir el ligando peptídico 113 con una función amida C-terminal. Hasta la fecha, el ácido libre 43 resultante de la síntesis del péptido en fase sólida se ha convertido en el éster etílico 44 para hacer que el ligando sea permeable a las células. Sin embargo, se esperaba que el derivado de amida 113 tuviera una mayor estabilidad metabólica con una afinidad de unión y una permeabilidad similares y, por tanto, pudiera suministrar resultados aún mejores en los experimentos in vivo planificados.

Por último, pero no menos importante, después del desarrollo exitoso de una síntesis de ligando en fase líquida para el ligando 113 a base de ProM-1, se planeó usar este método subsecuentemente también para la síntesis de ligandos 115 que contienen ProM-15 (Figura 9).

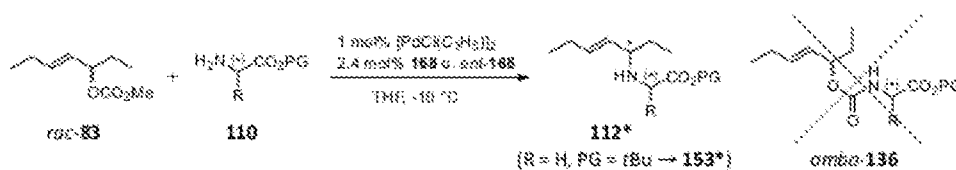
Al medir finalmente la afinidad de unión de los nuevos ligandos 115 al dominio EVH1 y cristalizar 115 con él, los efectos postulados in silico de una sustitución de ProM-1 o ProM-9 por ProM-15 tuvieron que evaluarse experimentalmente.

Resultados

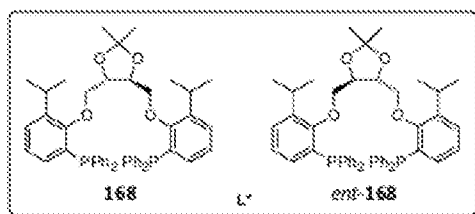
Resultados de la catálisis

En el marco de la invención se ha desarrollado con éxito una metodología altamente selectiva para la síntesis de ailaminas del tipo 112* mediante aminación alílica asimétrica catalizada por paladio del carbonato rac-83 y el uso de varios ésteres de α -aminoácidos 110 como N-nucleófilos. desarrollado (Esquema 9).

5



10



15

20

Esquema 9: Síntesis de alilaminas de tipo 112* o 153* mediante la aminación alílica asimétrica catalizada por paladio del carbonato rac-83 mediante el uso de varios ésteres de α -aminoácidos 110 como N-nucleófilos, como se desarrolló en este estudio. En las condiciones de reacción optimizadas, la formación de subproductos carbamato ambo-136 podría suprimirse por completo.

25

En los primeros experimentos se obtuvieron sorprendentemente carbamatos alílicos del tipo ambo-136 mediante el uso de un procedimiento de la literatura, cuya formación se podía suprimir mediante un aumento drástico de la concentración de la solución de reacción. Después de la selección de ligandos y etapas adicionales de optimización, se encontraron condiciones que, mediante el uso de solo 1 % molar de una fuente de Pd y 2,4 % molar de un ligando quiral (168 o ent-168), conducen a la formación de la alilamina 153* a base de glicina en 95 % ee y con un rendimiento de 74 - 84 %. El control de la configuración del nuevo estereocentro fue posible mediante la elección del ligando quiral correspondiente (168 \rightarrow S; ent-168 \rightarrow R).

30

Incluso cuando se usan nucleófilos quirales 110, la diastereoselectividad inducida por el sustrato demostrada previamente podría anularse. No se observó la aparición de combinaciones coincidentes/no coincidentes, por lo que fue posible un acceso equivalente a los cuatro estereoisómeros. Las selectividades y los rendimientos obtenidos estuvieron todos en un intervalo excelente y superaron claramente los pocos ejemplos conocidos en la literatura para transformaciones similares.

35

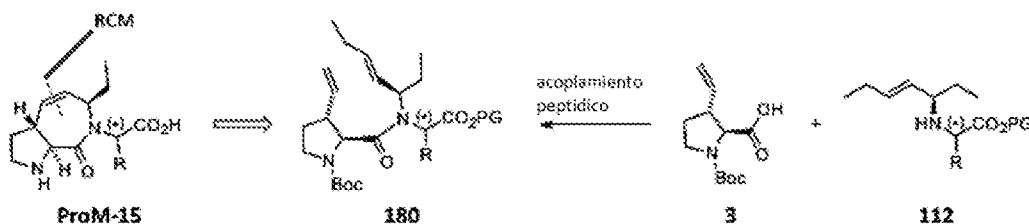
Las alilaminas sintetizadas y las selectividades conseguidas en la catálisis se muestran nuevamente de forma resumida en la Figura 10:

40

Síntesis de estructuras dipeptídicas de tipo 180.

De acuerdo con la síntesis retrosintética de ProM-15 presentada anteriormente, las estructuras dipeptídicas de tipo 180 tuvieron que generarse al unir el bloque de construcción ácido de Zaminer (3) y las aminas alílicas 112 producidas por las aminaciones alílicas (Esquema 10).

45



50

55

Esquema 10: Para la síntesis de la estructura objetivo ProM-15, es importante la preparación de estructuras dipeptídicas de tipo 180 mediante acoplamiento peptídico de los bloques de construcción 3 y 112.

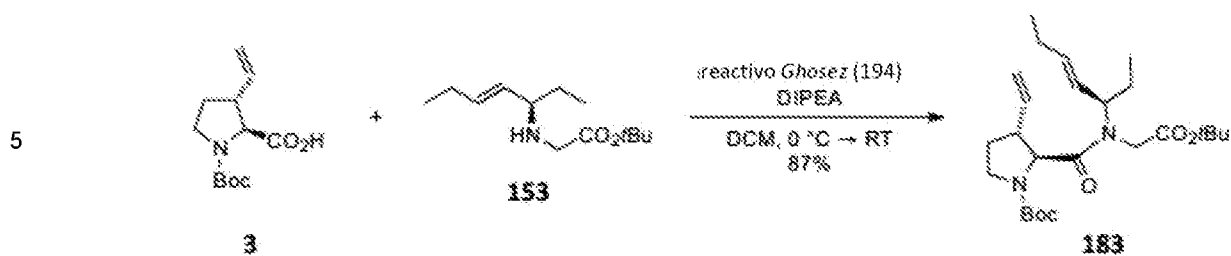
60

En el contexto de las diversas síntesis de ProM, generalmente se usaron dos reactivos de acoplamiento diferentes para lograr tales acoplamientos peptídicos. En la mayoría de los casos, se logró un enlace en condiciones de reacción suaves (a rt) mediante el uso de PyBOP (181) en combinación con la base de Hünig (DIPEA).

Síntesis del mimético dipéptido Boc-Gly-[ProM-15]-OMe

65

Para la síntesis del derivado ProM-15 a base de glicina, el componente ácido de Zaminer enantioméricamente puro (3) tuvo que acoplarse con la amina alílica 153, a la que se podía acceder con un ee del 95 % mediante aminación alílica catalizada por paladio (Esquema 11).



Esquema 11: Síntesis de la estructura dipeptídica 183 mediante el uso del reactivo de Ghosez.

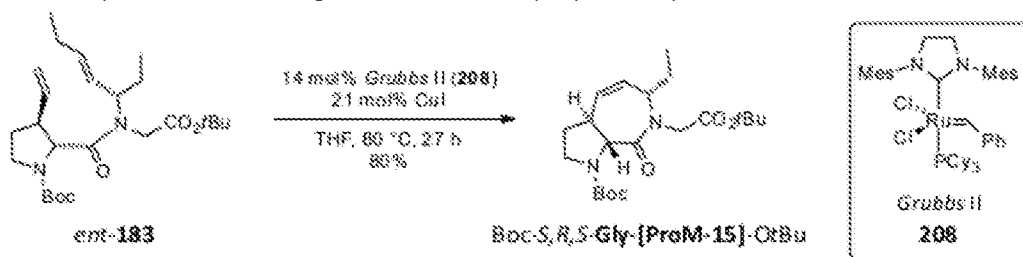
Mediante el uso de la estrategia de acoplamiento desarrollada anteriormente, se preparó el dipéptido 183 deseado después de la activación del ácido 3 mediante el reactivo de Ghosez, así como también mediante el uso de 1,1 eq. de amina 153 y DPEA con un muy buen rendimiento del 87 %. Además de las condiciones de reacción significativamente más suaves y del mayor rendimiento en comparación con el acoplamiento descrito anteriormente mediante el uso del reactivo de acoplamiento HATU, aquí tuvo lugar una conversión casi cuantitativa de la alilamina 153 (determinada mediante TLC). La eliminación de la pequeña cantidad del bloque de construcción de amina 153 restante ya no era un problema y, después de lavar con HCl diluido, se podía lograr mediante cromatografía en columna sin pérdidas importantes.

El enantiómero correspondiente ent-183 podría prepararse en las mismas condiciones y con un rendimiento comparable. Dicho enantiómero luego se usó para optimizar las siguientes etapas de síntesis, ya que el enantiómero 2R,3S del ácido de Zaminer (ent-3) requerido para la preparación, a diferencia del propio 3, estaba disponible en grandes cantidades al momento de desarrollarse la síntesis.

Los espectros H-NMR de ambos diastereómeros difieren significativamente entre sí, de modo que se pudo demostrar claramente la pureza diastereomérica de las sustancias sintetizadas selectivamente. La determinación de la relación diastereomérica a partir de mezclas de estereoisómeros previamente sintetizadas no tuvo éxito porque no había señales completamente aisladas de los diastereómeros individuales.

Además, los espectros mostraron una complejidad muy alta debido a la aparición de múltiples conjuntos de señales, que mediante espectroscopía 2D H, H-NOESY se pudo rastrear claramente hasta la presencia de rotámeros (es posible la diferenciación entre NOE y señales de intercambio). Curiosamente, los dipéptidos 183 y ent-dia-183 formaron cada uno cuatro rotámeros, mientras que para todos los demás dipéptidos a base de otros aminoácidos sólo se pudieron observar dos rotámeros. Dado que siempre fueron evidentes desplazamientos químicos muy diferentes para los dos "protones de glicina" (en la posición α con respecto al átomo de nitrógeno y al carbono del éster carbonílico), se supone que los dos rotámeros adicionales se deben a la formación de un enlace de hidrógeno probablemente intramolecular.

En la siguiente etapa de la síntesis, se planeó formar la estructura bicíclica ProM-15 mediante metátesis de cierre de anillo (RCM) catalizada por rutenio. En la preparación de todos los soportes ProM anteriores, la reacción de metátesis se llevó a cabo mediante el uso del catalizador Grubbs II (208), en donde la alta carga de catalizador requerida de 10-30 % en moles era un problema que aún no se había resuelto. Sin embargo, durante la síntesis de reposición del bloque de construcción ProM-2, que se llevó a cabo dentro del alcance de este trabajo, se desarrolló un procedimiento de síntesis ligeramente optimizado que permitió reducir la cantidad de Grubbs II. Estas condiciones mejoradas ahora se han aplicado al sistema ProM-15, inicialmente se realizan intentos de síntesis con la forma enantiomérica del dipéptido ent-183, que es accesible en grandes cantidades (Esquema 12).



Esquema 12: RCM de ent-183 para formar Boc-S,R,S-Gly-[ProM-15]-OtBu mediante el uso del catalizador Grubbs II (208).

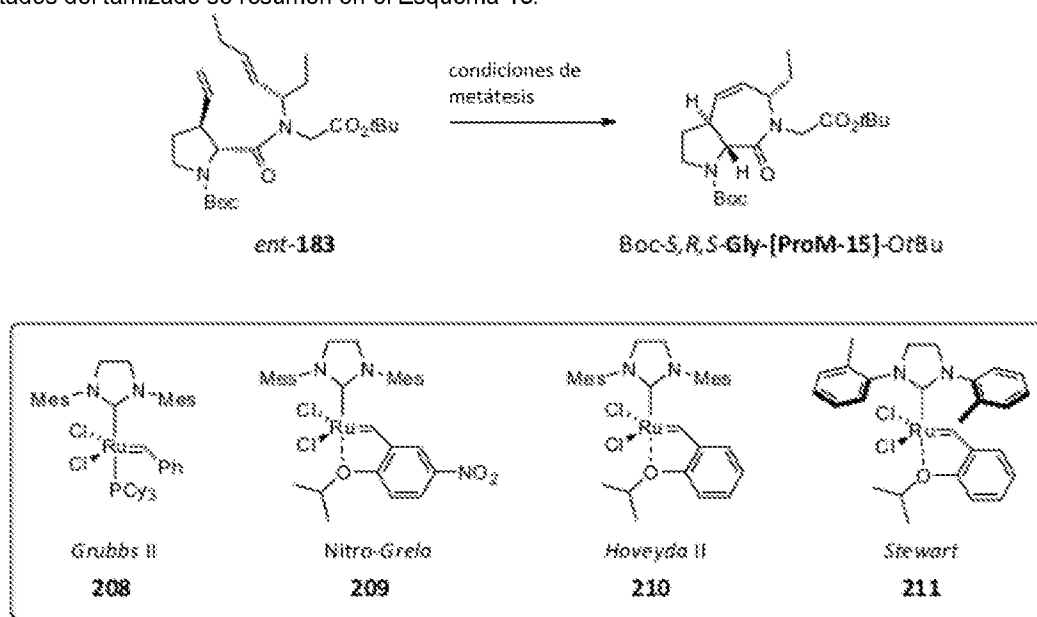
Al añadir un total de 14 % en moles de catalizador Grubbs II (208) y 21 % en moles de yoduro de cobre (I) (CuI) al dipéptido ent-183 en porciones y hacer refluir la mezcla de reacción en THF durante 27 h, se podría obtener el producto deseado aislado con un buen rendimiento del 80 %. A partir de los resultados de la metátesis de ProM-2, se abandonó la optimización de Grubbs II (208) para reducir la alta carga de catalizador, que también es necesaria en este caso, y en su lugar se buscó una selección posterior de varios catalizadores de metátesis. Durante la búsqueda bibliográfica

para identificar candidatos a catalizadores adecuados, se encontró que la reacción es muy compleja y la elección racional del catalizador suele ser difícil. El éxito de la metátesis depende en gran medida de la interacción de todos los parámetros de la reacción (solvente, concentración de la mezcla de reacción, temperatura, tiempo de reacción), que deben adaptarse de forma muy específica a cada sustrato.

Como regla general, los mejores resultados para metátesis estéricamente exigentes se lograron con el catalizador nitro Grela (209) o el catalizador Hoveyda II (210) en tolueno a 70 °C. Estos parámetros sirvieron como punto de partida para la optimización pretendida del RCM de ent-183, en donde se retuvo inicialmente la concentración de sustrato de 0,1 mol/l. Otro catalizador fue el compuesto 211 desarrollado por Stewart y otros, que resultó particularmente convincente en la compleja formación de dobles enlaces tetrasustituídos mediante RCM.

El catalizador se añadió siempre en porciones, ya que se pudieron lograr mejores rendimientos en relación con la optimización de la metátesis de ProM-2. Como carga de catalizador máxima tolerable se definió una cantidad del 6 % en moles.

Los resultados del tamizado se resumen en el Esquema 13.



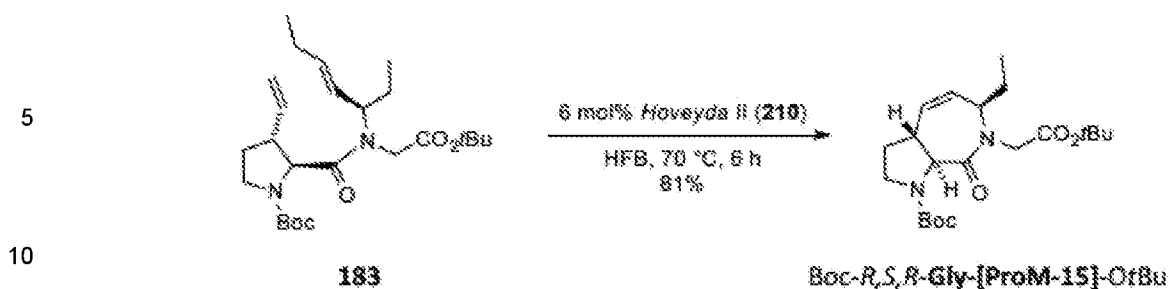
Esquema 13: El tamizado de varios catalizadores en la metátesis de cierre de anillo del dipéptido ent-183 y optimización de las condiciones de reacción.

En las condiciones estándar elegidas, los catalizadores nitro Grela y Hoveyda II recomendados por Bieniek y otros mostraron los mejores resultados.

Con solo un 6 % en moles de catalizador y un tiempo de reacción significativamente más corto de solo 5 h, se pudo aislar el 78 % y el 80 %, respectivamente, del producto ciclado Boc-S,R,S-Gly-[ProM-15]-OtBu. La ampliación del tiempo de reacción a 22,5 h no produjo ningún aumento significativo del rendimiento. Se sabe que el cambio de tolueno a solventes aromáticos perfluorados da como resultado un aumento sustancial en la actividad de muchos catalizadores de metátesis. Esto podría confirmarse aquí mediante el uso de hexafluorobenceno (HFB). Para los dos mejores catalizadores hasta la fecha, 209 y 210, se logró un aumento en el rendimiento de alrededor del 10 %, el catalizador Hoveyda II fue el que proporcionó el mejor resultado con un 91 %. Sin embargo, tampoco en este caso un tiempo de reacción prolongado condujo a una mejora del rendimiento. Puesto que las metátesis se llevaron a cabo en mezclas de reacción claramente más diluidas, la solución de reacción se diluyó entonces a la mitad.

Sin embargo, el rendimiento mínimamente incrementado resultante de esto no tenía ninguna relación con el valor del solvente usado. Finalmente, se encontró que en comparación con la adición del catalizador 210 en porciones tres veces al 2 % molar cada una después de 0 h, 2 h y 3,5 h, se lograron los mismos resultados con una adición del 4 % molar al principio y una vez más 2 % molar después de 3,5 h.

Las mejores condiciones de reacción obtenidas del tamizado se usaron subsecuentemente para la síntesis del estereoisómero deseado Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OtBu (Esquema 14).



Esquema 14: Síntesis de Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OtBu mediante RCM de 183 en condiciones optimizadas.

15 En el lote de reacción significativamente mayor se obtuvo el producto de ciclación deseado con un rendimiento algo reducido pero todavía muy bueno del 81 %. Este rendimiento no fue mayor que cuando se usó Grubbs II como catalizador, pero sí una reducción significativa en la cantidad de catalizador del 14 % molar al 6 % molar y el tiempo de reacción de 27 h a 6 h, así como también una simplificación drástica de se podría lograr el procedimiento de reacción. Después de la purificación mediante cromatografía en columna, los residuos de rutenio se eliminaron por

20 agitación mediante el uso de QuadraSil AP, un eliminador de metales a base de sílice. Esta purificación final se llevó a cabo al final de todas las metátesis descritas en este trabajo y proporciona los productos como sólidos casi blancos.

25 Los dos enantiómeros Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OtBu y Boc-S, R,S-Gly-[ProM-15]-OtBu podrían cristalizarse en una mezcla de n-heptano/EtOAc = 1/1 en esta etapa y, por tanto, por primera vez se pudo obtener información sobre la configuración del estereocentro generado en la aminación alílica catalizada por Pd. La calidad de los cristales producidos fue suficiente para una determinación clara de la configuración relativa mediante análisis de la estructura cristalina con rayos X.

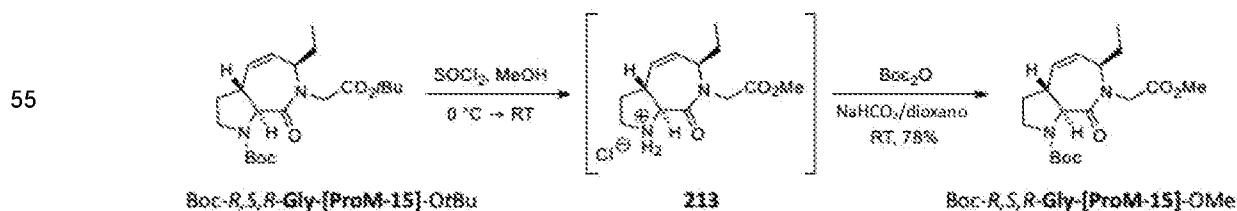
En la Figura 11, las estructuras cristalinas se muestran encima de las fórmulas correspondientes.

30 Finalmente, se debe señalar que los intentos siempre se hicieron para volver a aislar el dipéptido 183 o ent-183 que no había reaccionado. Curiosamente, esto no se pudo lograr en ningún caso, sino que la sustancia aislada tenía el mismo R_f valor (0,52, sílice, cHex/EtOAc = 1/1) como el sustrato. No fue posible dilucidar completamente la estructura de este compuesto, sin embargo, mediante análisis de RMN se pudo identificar claramente una relación estructural con el sustrato original 183, ya que las señales "características" del dipéptido 183 todavía estaban presentes. Sin embargo, se observaron importantes cambios de señal en la zona de los protones del doble enlace, que probablemente se deben a una isomerización de la olefina, una reacción secundaria bien conocida del RCM.

40 Aparentemente, el compuesto resultante no cicló o lo hizo significativamente más lentamente que el compuesto 183 original porque no se pudieron detectar cantidades significativas de otros subproductos. También se hicieron observaciones similares con respecto al reisolamiento del material de partida en las metátesis posteriores para la preparación de derivados de ProM-15, en donde también se obtuvieron pequeñas cantidades de un subproducto que era difícil de separar del producto.

45 Para la próxima síntesis de un ligando peptídico que contiene ProM-15, Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OtBu tuvo que convertirse en un éster metílico al manipular el grupo protector en una etapa de síntesis final. Esta transesterificación se llevó a cabo de acuerdo con un procedimiento de dos etapas ligeramente modificadas de Reuters.

50 Mediante el uso de cloruro de tionilo en MeOH, primero se eliminaron todos los grupos protectores y se formó el éster metílico. A esto le siguió otra protección Boc N-terminal del intermedio 213 con dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O) en una solución acuosa alcalina (Esquema 15).

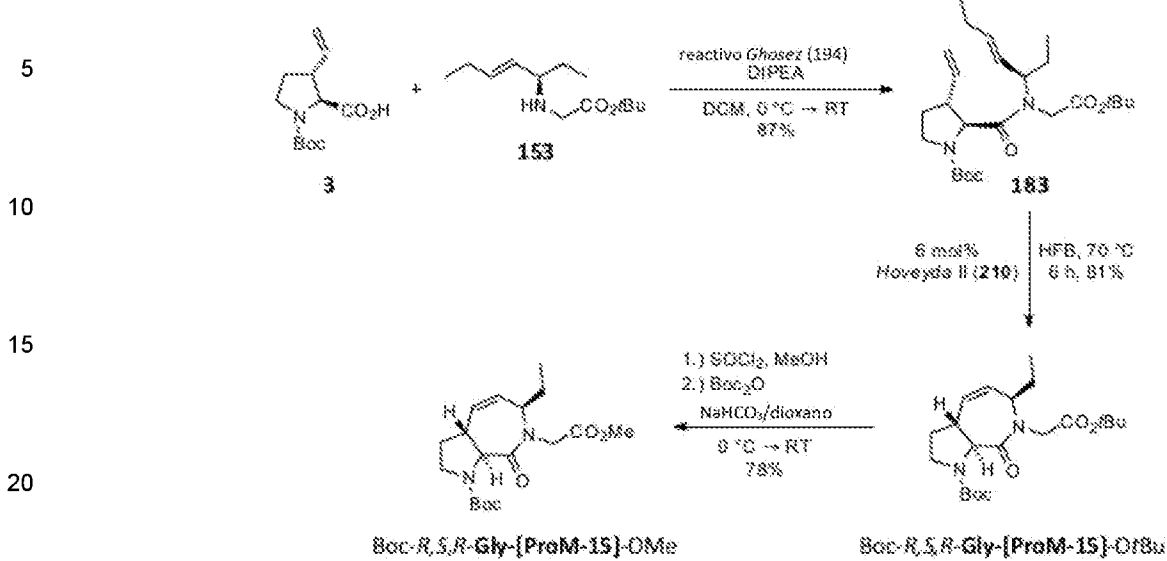


Esquema 15: Manipulación final del grupo protector para la síntesis de Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OMe.

Después de la purificación mediante cromatografía en columna (sílice, DCM/EtOAc = 1,5/1), se obtuvo la estructura objetivo final deseada Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OMe con un rendimiento del 78 % como una sustancia incolora y altamente aceite viscoso.

65

Finalmente, se resume claramente la síntesis en tres etapas del análogo de diprolina Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OMe, a partir de los componentes básicos enantioméricamente puros ácido de Zaminer 3 y alilamina 153 (Esquema 16).

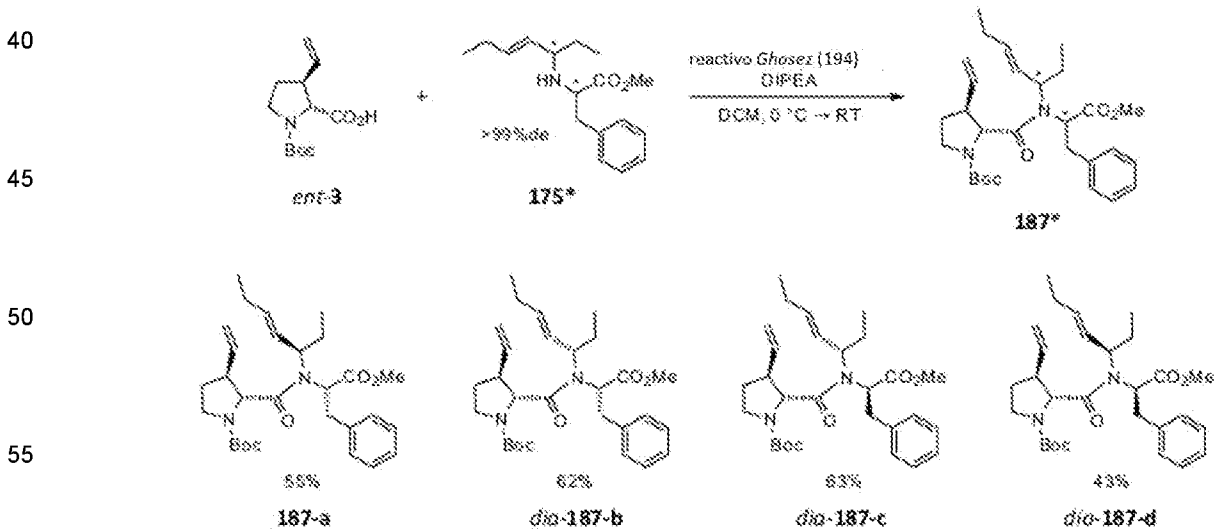


Esquema 16: Síntesis de Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OMe a partir del ácido de Zaminer (3) y la alilamina 153

25 Síntesis del mimético dipéptido Boc-Phe-[ProM-15]-OMe

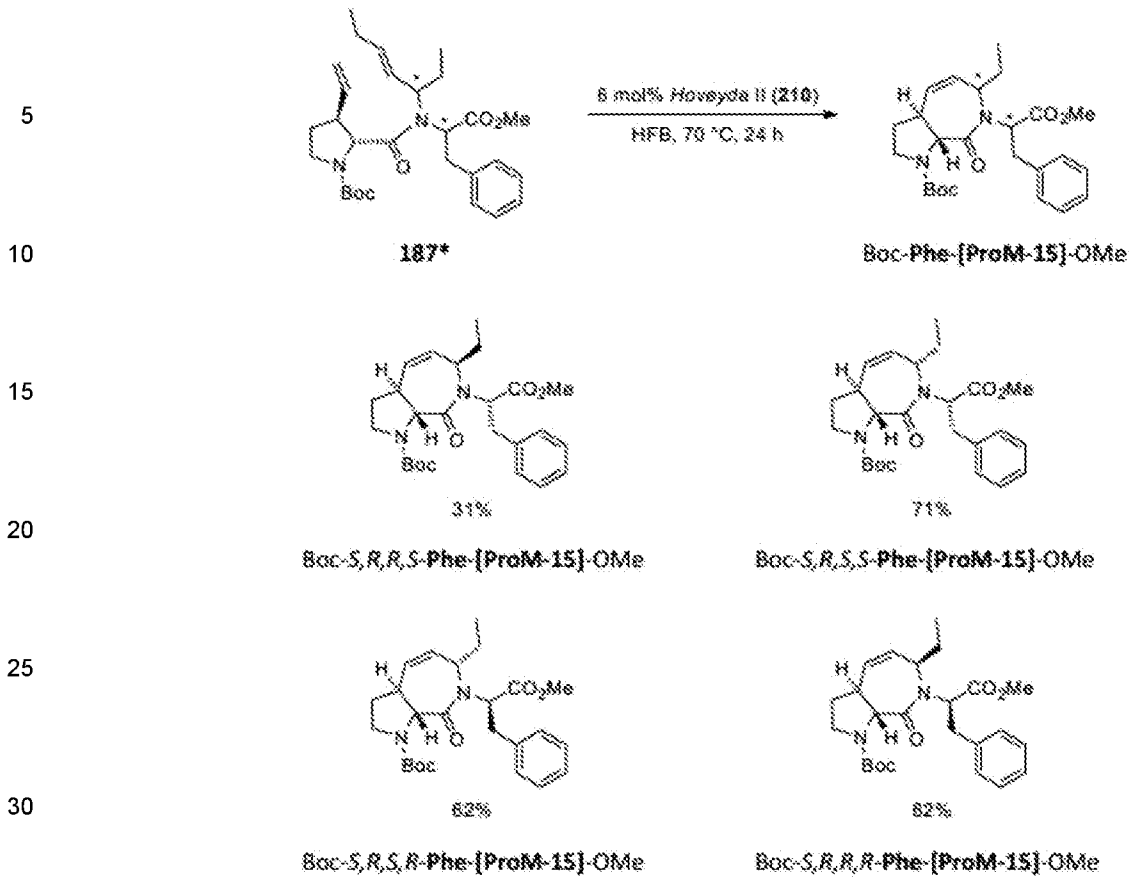
30 Como se describió anteriormente, además de la R,S,R-Gly-[ProM-15] a base de glicina, también era de interés un derivado a base de L-fenilalanina con, de cualquier otra manera la misma configuración relativa. Sin embargo, dado que el ácido 3 2S,3R-Zaminer necesario para la preparación de este componente básico no estaba disponible en el momento del desarrollo de la síntesis, se decidió sintetizar primero el compuesto enantiomérico S, R, S, R-Phe-[ProM-15]-OMe del ácido 2R,3S-Zaminer ent-3 disponible en grandes cantidades. Además, dado que los cuatro estereoisómeros de la alilamina 175* a base de fenilalanina eran accesibles de manera específica a través de la aminación alílica catalizada por Pd previamente desarrollada, los tres diastereómeros restantes de este compuesto se prepararon además de la estructura objetivo deseada.

Los resultados del acoplamiento peptídico de los estereoisómeros individuales de 175* con el enantiómero 2R,3S del ácido de Zaminer ent-3 se resumen en el Esquema 17:



Esquema 17: Acoplamiento peptídico del ácido de Zaminer (ent-3) con los dipéptidos diastereoisómeros puros 175* después de la activación con el reactivo de Ghosez (194). Los rendimientos aislados de los cuatro diastereómeros se proporcionan después de la purificación mediante cromatografía en columna.

En consecuencia, fue posible preparar de forma selectiva los dipéptidos 187-a a dia-187-d como sustancias enantiomérica y diastereoméricamente puras. En la siguiente etapa, los bloques de construcción Phe-[ProM-15] deseados podrían prepararse con éxito mediante metátesis de cierre de anillo mediada por Hoveyda II (Esquema 18).



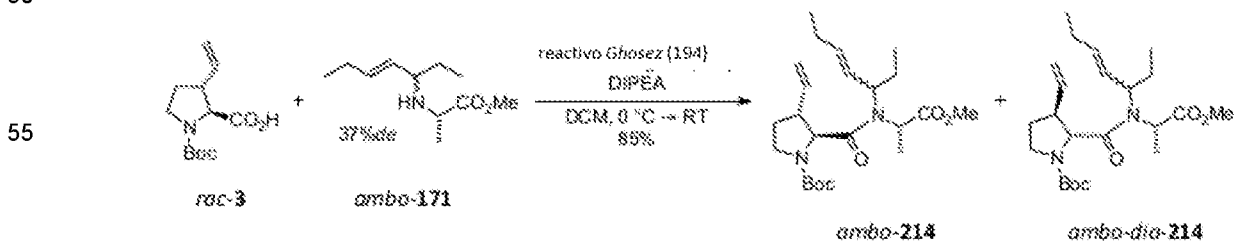
35 Esquema 18: RCM de dipéptidos **187*** mediante el uso del catalizador Hoveyda II (**210**) en hexafluorobenceno (HFB). Se proporcionan los rendimientos aislados de los productos de ciclación **Boc-Phe-[ProM-15]-OMe** después de la purificación mediante cromatografía en columna y la eliminación de los residuos de rutenio mediante QuadraSil AP.

40 En las condiciones de metátesis desarrolladas previamente para el derivado Gly-[ProM-15], los cuatro diastereómeros de Phe-[ProM-15] se prepararon con rendimientos de moderados a buenos mediante el uso del catalizador de rutenio **210** al 6 % en moles en hexafluorobenceno a 70 °C.

45 Para los cuatro diastereómeros fue posible hacer crecer monocristales de calidad suficiente para confirmar la configuración relativa de los estereocentros mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X (Figura 12).

45 Síntesis del mimético dipéptido **Boc-R,S,R,S-Ala-[ProM-15]-OMe**

50 Debido a que el acoplamiento de **rac-3** con la alilamina **ambo-171** a base de L-alanina inicialmente no era posible en "condiciones HATU", el acoplamiento se probó mediante el uso de la metodología recientemente desarrollada (Esquema 19).

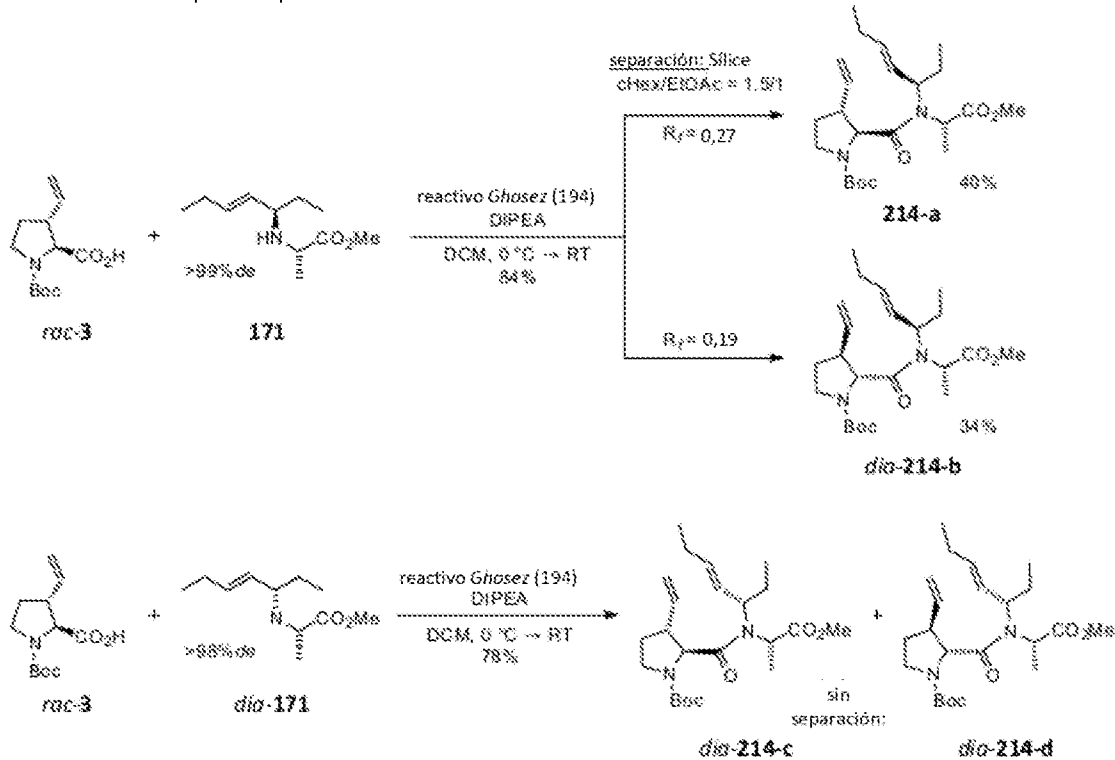


60 Esquema 19: Acoplamiento peptídico del ácido de Zaminer racémico (**rac-3**) con la mezcla de diastereoisómeros **ambo-171**.

65 De hecho, la síntesis de los compuestos dipépticos **ambo-214** y **ambo-dia-214** también tuvo éxito aquí con un muy buen rendimiento del 85 %. La relación de los cuatro diastereómeros no pudo determinarse en este momento, pero se observó una separación parcial de los estereoisómeros mediante cromatografía en capa fina y en columna (3 puntos).

Sin embargo, inicialmente no fue posible identificar el par separable de diastereómeros. Por esta razón, el ácido de Zaminer racémico (*rac*-3) se hizo reaccionar individualmente con las dos alilaminas diastereoméricamente puras 171 y *dia*-171, respectivamente, a las que se puede acceder de forma selectiva a través de la aminación alílica catalizada por Pd (Esquema 20).

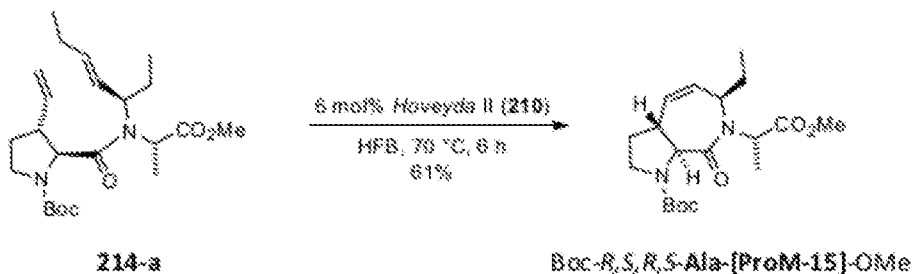
En el caso de la alilamina 171 configurada con R,S, se logró una buena separación cromatográfica en columna de los diastereómeros resultantes 214-a y *dia*-214-b, mientras que los productos del acoplamiento de *rac*-3 con el S,S-alilamina *dia*-171 no se pudo separar.



Esquema 20: acoplamiento peptídico del ácido de Zaminer racémico (*rac*-3) con la alilamina 171 configurada con R, S (arriba); y con la alilamina *dia*-171 configurada con S, S (abajo).

El compuesto *dia*-214-b era el único de los cuatro diastereómeros que era un sólido incoloro en lugar de un aceite viscoso e incoloro. Después de la cristalización de *dia*-214-b, las configuraciones relativas de los estereocentros de 214-a y *dia*-214-b podrían identificarse mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X (Figura 13).

Esta afortunada coincidencia abrió la posibilidad de sintetizar otro derivado de ProM-15 con la configuración relativa correcta de los estereocentros. La metátesis de cierre de anillo del dipéptido 214-a en las condiciones establecidas con catalizador Hoveyda II en HFB a 70 °C produjo la estructura objetivo deseada Boc-R, S, R, S-Ala-[ProM-15]-OMe después de la purificación por cromatografía en columna con un rendimiento del 61 % (Esquema 21).



Esquema 21: RCM del dipéptido 214-a mediante el uso del catalizador Hoveyda II (210) en hexafluorobenceno (HFB).

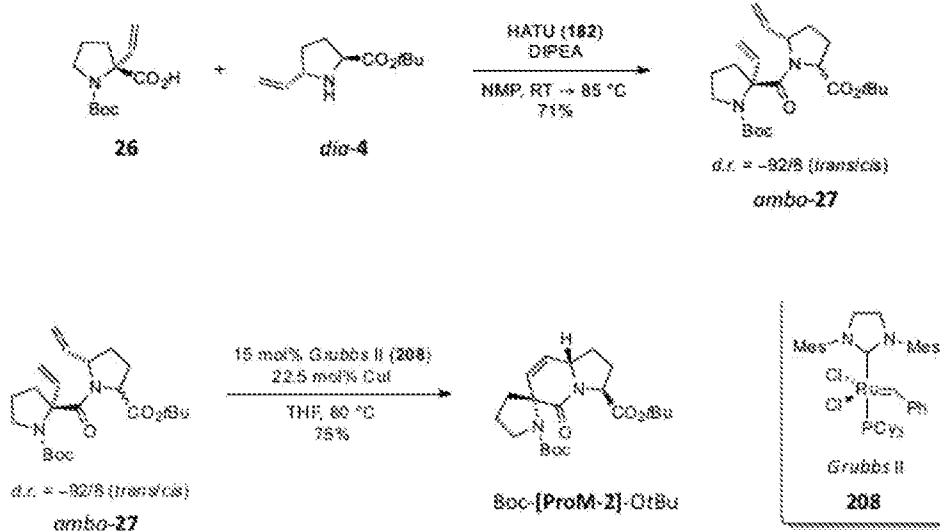
Finalmente, también fue posible cristalizar el compuesto final y confirmar la configuración relativa mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X (Figura 14).

Síntesis del dipéptido mimético ProM-2.

Preparación de Fmoc-[ProM-2]-OH

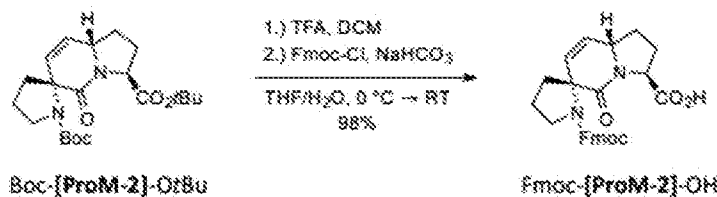
Durante el desarrollo previsto de la síntesis de ligandos en fase líquida, se necesitaron mayores cantidades de la estructura ProM-2. La síntesis del Fmoc-[ProM-2]-OH conocido por la literatura se llevó a cabo básicamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Para construir la estructura dipeptídica ambo-27, los dos bloques de construcción 26 y dia-4 se acoplaron con HATU y DIPEA en NMP a 85 °C en condiciones conocidas en la literatura. La ciclación del bloque de construcción espiro ambo-27 mediante metátesis de cierre de anillo ha requerido grandes cantidades de catalizador Grubbs II (30 % en moles) en el pasado. Se pudo lograr un aumento en el rendimiento de hasta el 75 % con una reducción simultánea de la cantidad de catalizador hasta el 50 % cuando la reacción se llevó a cabo en THF a reflujo y también se agregó yoduro de cobre (I) (CuI) en cantidades catalíticas (Esquema 22).



Esquema 22: Metátesis de cierre de anillo mediada por Grubbs II (208) del espirodipeptido ambo-27 con la adición de cantidades catalíticas de CuI.

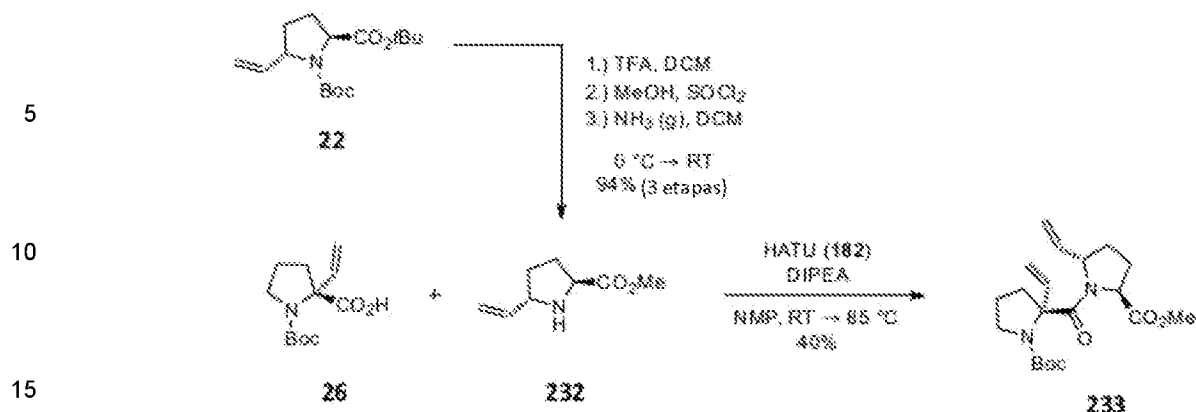
La manipulación final de los grupos protectores para la preparación de Fmoc-[ProM-2]-OH ya ha dado buenos rendimientos del 80-90 %. Sin embargo, en colaboración con Reuters fue posible aumentarlo aún más, llevando a cabo la protección N-terminal Fmoc no sólo en condiciones saturadas, sino añadiendo más NaHCO₃ sólido en solución acuosa sobresaturada NaHCO₃. Después de la desprotección ácida global con TFA, la protección básica con Fmoc y la posterior purificación cromatográfica en columna del producto crudo mediante el uso un sistema de cromatografía en columna ultrarrápida de Reveleris (DCM/MeOH), el Fmoc-[ProM-2]-OH mimético objetivo se pudo aislar con un rendimiento casi cuantitativo (Esquema 23).



Esquema 4.23: Manipulación final del grupo protector para la formación de Fmoc-[ProM-2]-OH.

Preparación de Boc-[ProM-2]-OH

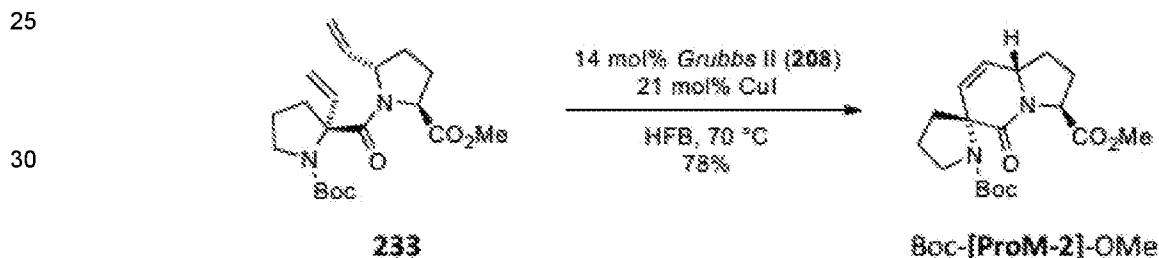
Para optimizar la síntesis de ligandos desarrollada en este trabajo en fase líquida, existía una demanda de una versión N-terminal protegida con Boc- en lugar de Fmoc del ácido libre de ProM-2. Sin embargo, los primeros intentos de sintetizar este compuesto a partir de Boc-[ProM-2]-OtBu, mediante el uso de una estrategia similar a la usada para la preparación del derivado Fmoc, no arrojaron resultados satisfactorios. Por esta razón, se desarrolló una estrategia para formar el dipéptido 233 esterificado con metilo (Esquema 24).



Esquema 24: Síntesis del espirodipéptido 233 esterificado con metilo a partir del espiroácido 26 y el bloque de construcción trans-5-vinilprolina 22 totalmente protegido.

20

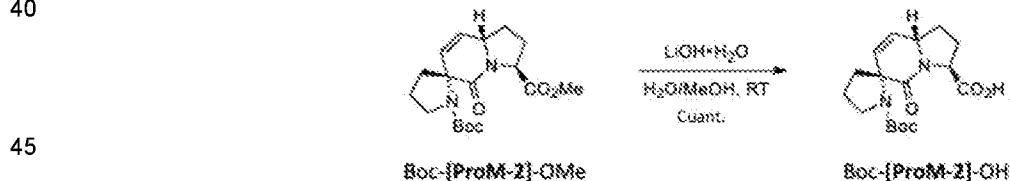
En condiciones similares a las anteriores para el derivado de éster terc-butílico ambo-27, la ciclación del bloque de construcción espiro 233 se llevó a cabo al añadir Grubbs II (208) y Cul en porciones a la mezcla de reacción. Sin embargo, por el contrario, se usó el solvente hexafluorobenceno (HFB) en lugar de tolueno (Esquema 25), ya que este cambio en la síntesis de ProM-15 dio como resultado resultados de metátesis significativamente mejores.



Esquema 25: RCM mediada por Grubbs II (208) del espirodipéptido 233 con la adición de cantidades catalíticas de Cul.

40

La saponificación final de la funcionalidad éster metílico se pudo realizar sin problemas y con rendimiento cuantitativo en un medio alcalino acuoso (Esquema 26).



Esquema 26: saponificación del éster metílico de Boc-[ProM-2]-OMe.

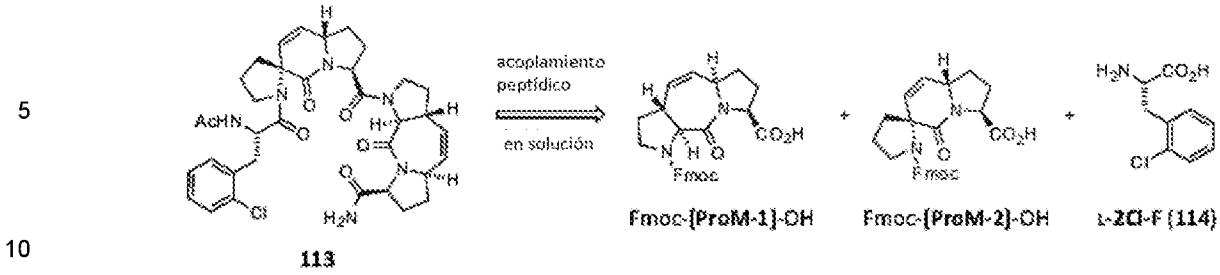
50

Síntesis de ligandos en fase líquida.

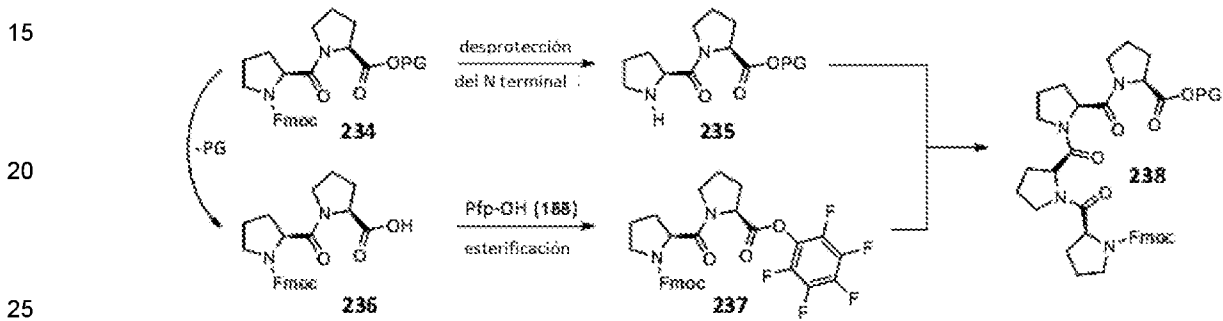
Desarrollo de la metodología de acoplamiento – "Ruta Fmoc"

55

Después de que el inhibidor Ena/VASP-EVH1 a base de ProM desarrollado arroja resultados biológicos convincentes y notables en estudios in vitro, se planeó examinar sus propiedades in vivo. Por esta razón se necesitaron grandes cantidades de sustancia (> 2 g) del ligando peptídico 113. Los bloques de construcción conocidos Fmoc-[ProM-1]-OH, Fmoc-[ProM-2]-OH y la L-2-cloro-fenilamina (L-2Cl-F) comercialmente disponible tuvieron que ser usados en orden de desarrollar una síntesis eficiente del ligando en la fase líquida y para proporcionar cantidades suficientes del inhibidor 113 (Esquema 27).

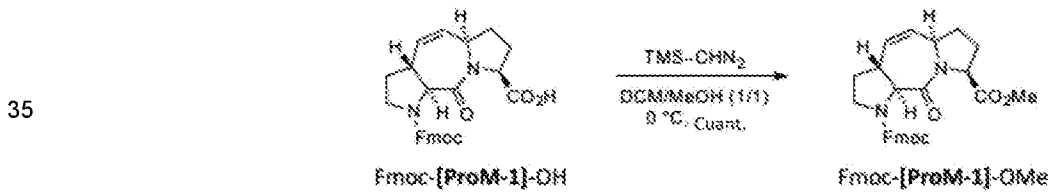


Estrategia de acoplamiento de Dai y otros:^[60]



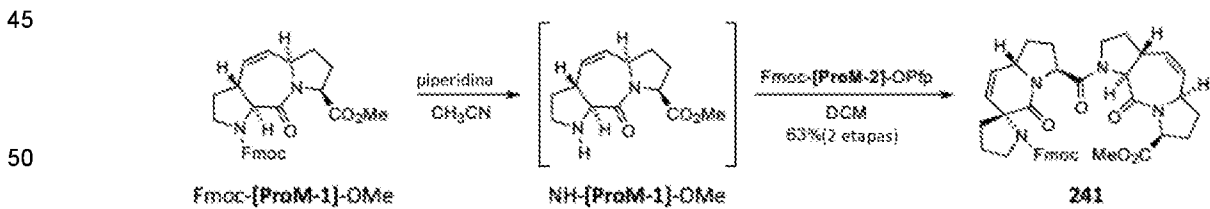
Esquema 27: Arriba: Desmontaje retrosintético del ligando 113. Abajo: Estrategia de acoplamiento peptídico.

Al seguir esta estrategia, tenía sentido construir el ligando desde el extremo C, como en la síntesis de péptidos en fase sólida. Para este propósito, primero se protegió el soporte ProM-1 en el extremo C al convertirlo en el bloque de construcción esterificado con metilo Fmoc-[ProM-1]-OMe (Esquema 28).



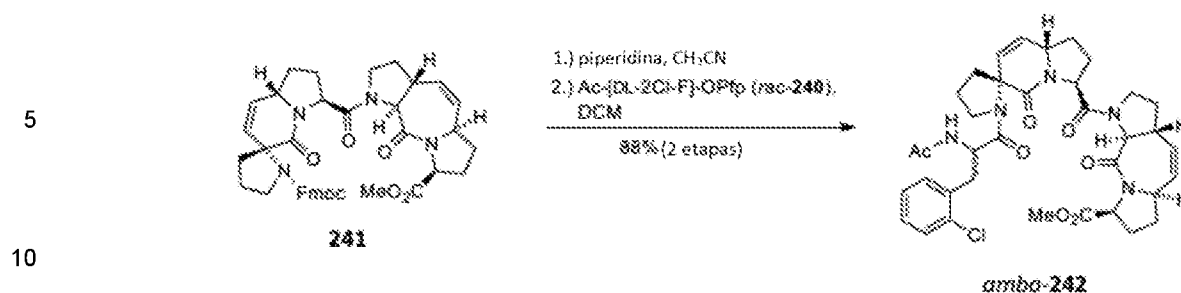
Esquema 28: Esterificación metílica de Fmoc-[ProM-1]-OH mediante el uso de TMS-diazometano.

Después de que los bloques de construcción de ligandos individuales pudieran proporcionarse con buenos rendimientos y en una escala de varios gramos, los dos soportes de ProM se vincularon de acuerdo con la metodología descrita por Dai y otros (Esquema 29).



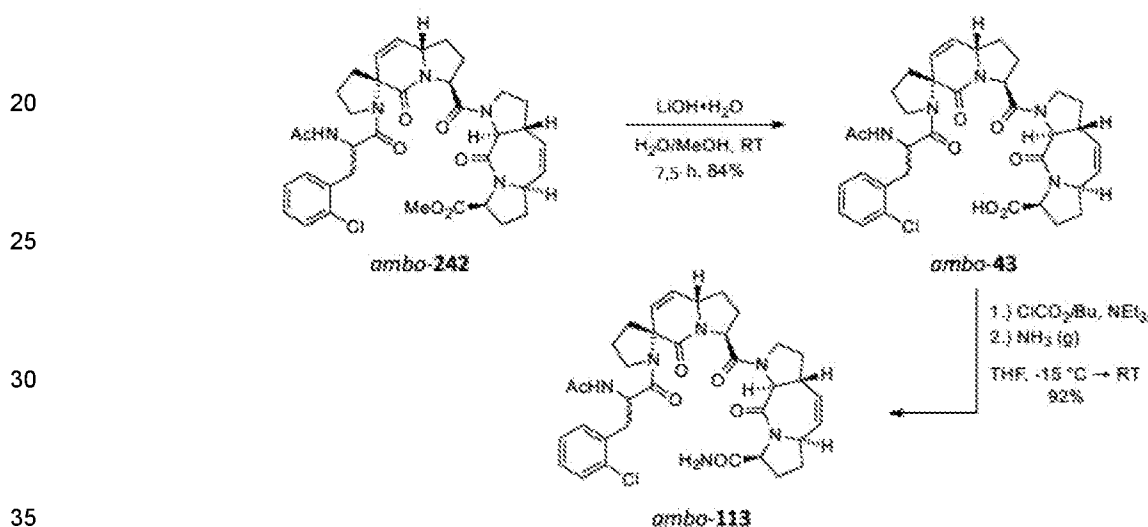
Esquema 29: Desprotección N-terminal de Fmoc-[ProM-1]-OMe con piperidina y posterior acoplamiento peptídico de la amina libre NH-[ProM-1]-OMe con Fmoc-[ProM-2]-OPfp para la síntesis del tetrapéptido 241.

El acoplamiento final para construir el ligando peptídico ambo-242 se llevó a cabo mediante el uso de un procedimiento idéntico (Esquema 30).



Esquema 30: Acoplamiento peptídico final para construir el ligando peptídico ambo-242.

15 La conversión final del éster metílico ambo-242 en la amida ambo-113 se logró en dos etapas y con un rendimiento global del 77 % (Esquema 31).



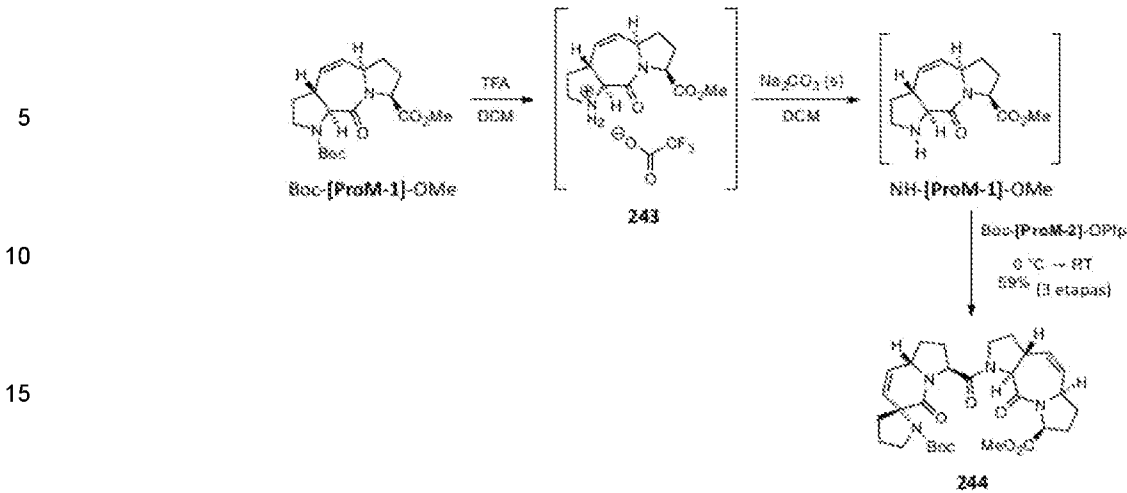
Esquema 31: Síntesis de la amida ambo-113 mediante saponificación del éster metílico ambo-242 y posterior amidación del ácido libre ambo-43.

40 En resumen, por primera vez fue posible unir los componentes básicos de ProM en la fase líquida y así realizar la síntesis del inhibidor de Ena/VASP-EVH1 ambo-113 a escala preparativa.

Optimización de las condiciones de acoplamiento - "Ruta Boc"

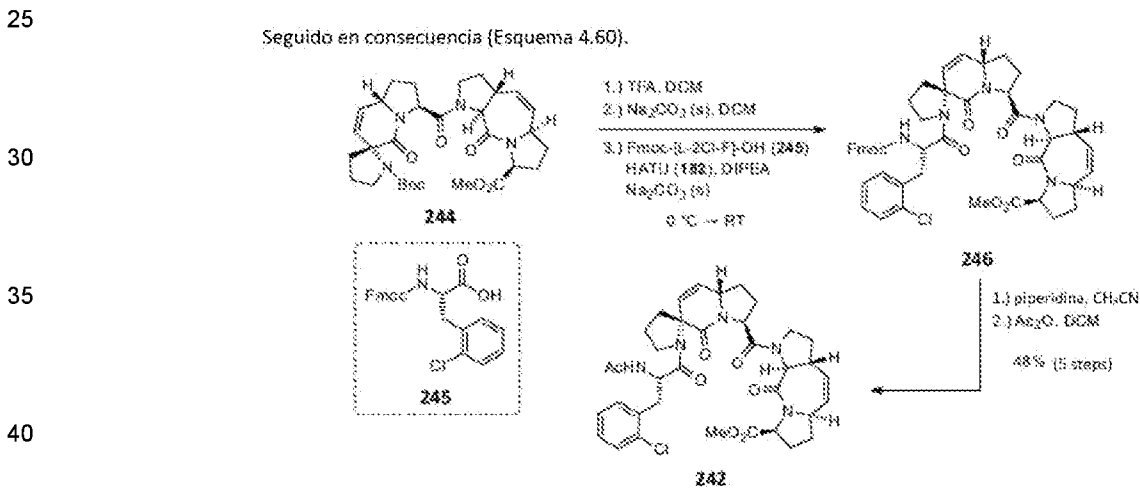
45 Aunque la metodología desarrollada proporciona un acceso eficiente a los inhibidores Ena/VASP-EVH1 Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OMe/OH/NH₂ ambo-242, ambo-43 y ambo-113, respectivamente, hubo varias razones para optimizar la secuencia de acoplamiento. Por lo tanto, se intentó desarrollar una secuencia de acoplamiento lo más libre posible de bases sin desviarse demasiado de la estrategia real del éster de Pfp. Para este fin, parecía apropiado un cambio N-terminal "simple" del grupo protector de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), escindible en condiciones básicas, a terc-butiloxicarbonilo (Boc), eliminable en condiciones ácidas. La vinculación de los soportes de ProM podría implementarse subsecuentemente mediante el uso de una estrategia en base a la "ruta Fmoc" (Esquema 32).

50



Esquema 32: Desprotección ácida N-terminal de Boc-[ProM-1]-OMe con TFA, desprotonación del catión amonio resultante con Na₂CO₃ sólido y vinculación final de los componentes básicos del ProM.

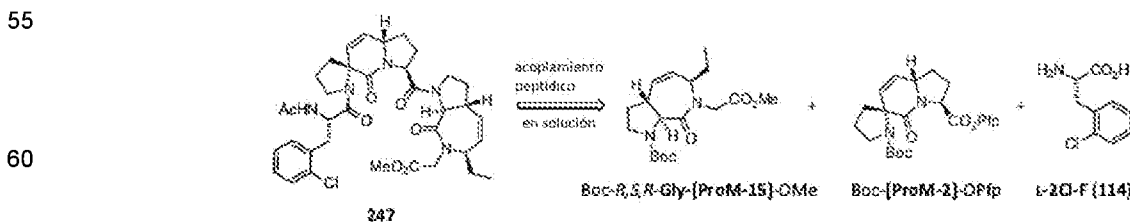
Además, fue posible un acceso libre de epimerización a Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OMe. La metodología desarrollada se siguió en consecuencia en este punto (Esquema 33).



Esquema 33: Acoplamiento peptídico final para construir el ligando peptídico 242 diastereoisómero puro al unir el tetrapéptido 244 con Fmoc-[L-2Cl-F]-OH y el subsecuente cambio de grupos protectores.

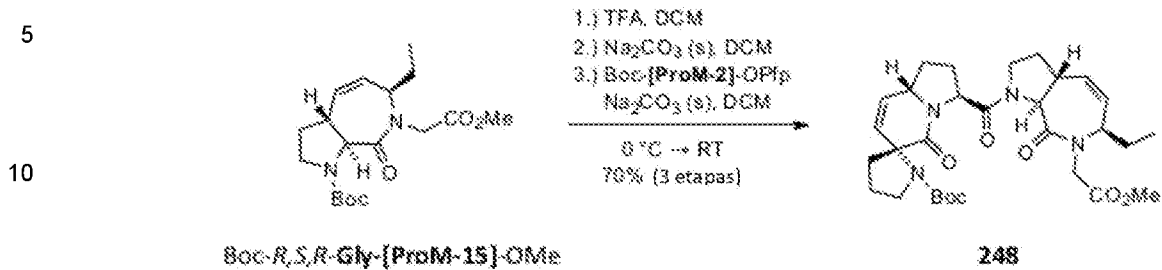
Síntesis de ligandos que contienen ProM-15.

Después del desarrollo de una síntesis eficiente de ligandos en fase líquida, finalmente fue necesario sintetizar también ligandos peptídicos que contienen ProM-15 y evaluar su afinidad de unión al dominio EVH1. Como ya se explicó en detalle en el Capítulo 3, se planeó usar el bloque de construcción ProM-15 como reemplazo del soporte ProM-1 usado hasta ahora. Inicialmente se eligió deliberadamente el derivado de glicina de ProM-15 para excluir la influencia de otro sustituyente sobre la afinidad de unión y poder realizar una comparación óptima con los ligandos que contienen ProM-1 o ProM-9 (esquema 34).



Esquema 34: Consideraciones retrosintéticas para la construcción del ligando 247 que contiene ProM-15.

La estructura objetivo resultante Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247) se creó por primera vez al unir los dos soportes de ProM (Esquema 35).

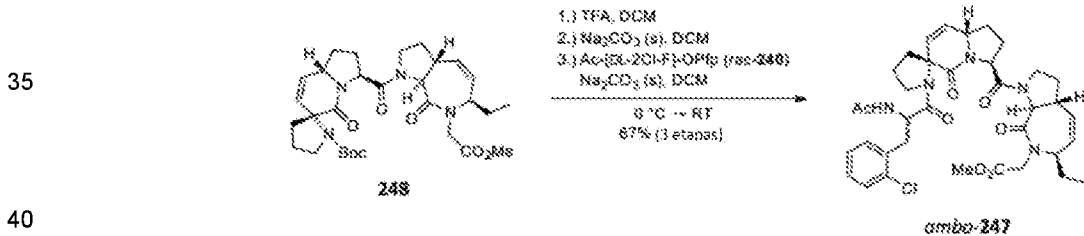


Esquema 35: Vincular los soportes ProM para construir el tetrapéptido 248 en condiciones establecidas.

El tetrapéptido 248 deseado se pudo preparar sin complicaciones en las condiciones establecidas y, después de la purificación mediante cromatografía en columna, se aisló como un sólido blanco con un rendimiento del 70 % en 3 etapas. También en este punto, los conjuntos dobles de señales visibles en la RMN se atribuyeron a la presencia de rotámeros mediante espectroscopia H,H-NOESY. En particular, las dos señales del protón C1 en el soporte ProM-2 (4,79 ppm y 4,93 ppm) podría identificarse claramente como señales de intercambio.

Por tanto, en este caso también se puede suponer como muy probable una pureza diastereomérica del péptido 248, lo que corrobora de nuevo la suposición de que el acoplamiento se desarrolla sin epimerización en las condiciones seleccionadas.

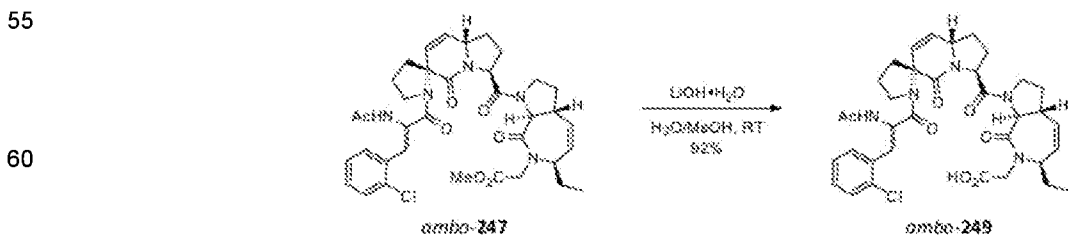
La síntesis del ligando 247 de ProM-15 coincidió en el tiempo con el descubrimiento de la racemización de 2-clorofenilalanina, momento en el que no se pudo determinar si se podría encontrar una solución rápida a este problema. Con el fin de proporcionar material para las investigaciones biológicas previstas (mediciones de unión y cristalización con el dominio EVH1), en donde la presencia de una mezcla diastereomérica no tenía importancia, el tetrapéptido 248 se acopló inicialmente con el éster racémico activo rac-240 (Esquema 36).



Esquema 36: Acoplamiento peptídico final para construir el ligando peptídico ambo-247 al unir el tetrapéptido 248 con Ac-[L-2Cl-F]-OPfp racémico (rac-240).

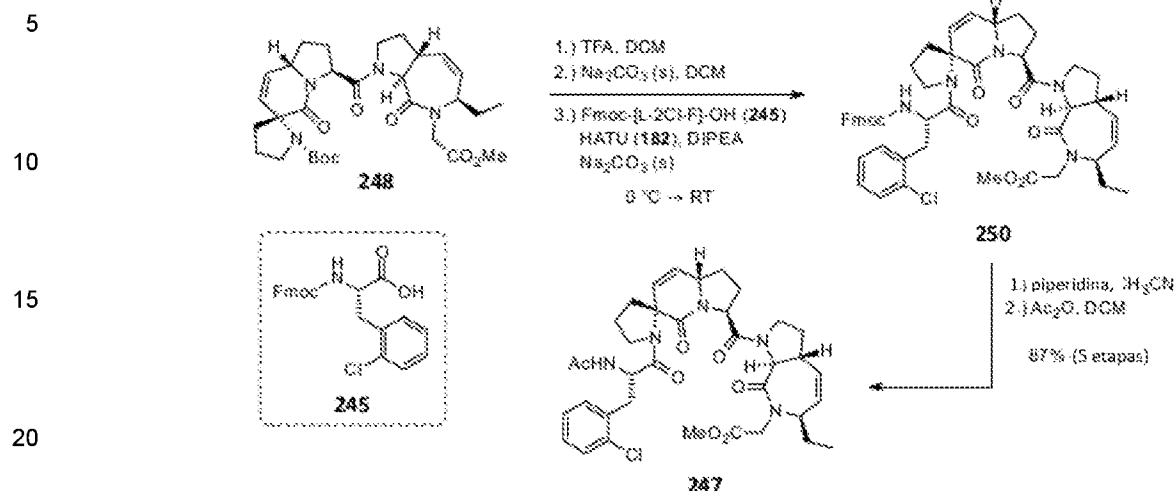
Mediante el uso de la misma metodología que para la primera etapa de acoplamiento, el ligando final ambo-247 se sintetizó como una mezcla de diastereómeros con un rendimiento comparable del 67 % en 3 etapas. No se pudo determinar una relación diastereomérica a partir del espectro de RMN complejo. Además, el espectro ¹H y ¹³C NMR de ambo-247 y la sustancia pura 247 sintetizada más tarde, como en el caso de los ligandos de ProM-1 ambo-242 y 242, eran congruentes.

Además del éster metílico ambo-247, también se planeó poner a disposición para las investigaciones biológicas el ácido libre del compuesto ambo-249. Esta saponificación se logró sin problemas mediante el uso de hidróxido de litio en solución acuosa-metanólica a rt en solo 4 h (Esquema 37).



Esquema 37: Saponificación del éster metílico ambo-247 para la síntesis del ácido libre ambo-249.

El producto deseado ambo-249 se obtuvo con un rendimiento del 92 % como un sólido casi blanco que ya no requirió ninguna purificación adicional. Al final, sin embargo, la síntesis del ligando diastereoisómero puro 247 pudo realizarse dentro del alcance de este trabajo (Esquema 38).



Esquema 38: Acoplamiento peptídico final para construir el ligando peptídico 247 diastereoisómero puro al unir el tetrapéptido 248 con Fmoc-[L-2Cl-F]-OH (245) y el posterior cambio de grupos protectores.

Como ya se describió para el ligando 242 de ProM-1, aquí también a la desprotección N-terminal del tetrapéptido 248 le siguió un acoplamiento mediado por HATU con L-2-clorofenilalanina 245 protegida con Fmoc. La separación del derivado de urea resultante tampoco fue posible en este caso mediante cromatografía en columna, pero tampoco supuso ningún problema para el cambio posterior del grupo protector y finalmente pudo separarse del ligando final 247 sin complicaciones. La acetilación final del ligando se llevó a cabo con anhídrido acético, después de lo cual el compuesto objetivo final de este trabajo, el inhibidor 247 de Ena/VASP-EVH1, se pudo aislar diastereoisoméricamente puro con un rendimiento del 87 % en 5 etapas como un sólido ligeramente pardusco. El rendimiento significativamente mejorado en comparación con la síntesis del ligando 242 de ProM-1 (48 %) se debió a una etapa de lavado con acetonitrilo.

El Na₂CO₃ añadido a la reacción parecía unir mayores cantidades de la amina libre del tetrapéptido desprotegido 248, que en consecuencia ya no estaba disponible para el acoplamiento. Mediante el uso de acetonitrilo se pudo evitar esto y el rendimiento aumentó significativamente. Esta etapa de lavado debería realizarse consecuentemente en el futuro para todos los acoplamientos con el fin de minimizar posibles pérdidas de rendimiento.

Estudios biológicos

Después de la síntesis exitosa de varios ligandos nuevos de Ena/VASP-EVH1, finalmente fue necesario evaluar su afinidad de unión por el dominio EVH1. El ligando Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt sirvió como sustancia de referencia.

Los datos de unión de los ligandos al dominio se determinaron por medio de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) o titulación de fluorescencia (FT) y se presentaron en forma de constante de disociación (K_d) o la energía libre (ΔG⁰). Una unión más fuerte del ligando al dominio se expresa mediante un valor ms pequeño de K_d o un valor de ΔG⁰ correspondientemente más negativo. La relación entre los dos parámetros se muestra en la ecuación (a):

$$K_d = \frac{[\text{ligando}][\text{dominio}]}{[\text{complejo}]} = e^{\frac{\Delta G^0}{RT}}$$

Los primeros estudios de unión se llevaron a cabo para el ligando 113 de EVH1, que se produjo mediante síntesis de péptidos en fase líquida en el alcance de este trabajo y, en comparación con el "ligando inicial" 44, tenía una función amida en el extremo C-terminal. Se esperaba que este cambio generara un compuesto con una afinidad de unión similar a la del éster etílico 44 usado hasta la fecha, pero que podría tener una mayor estabilidad metabólica. En consecuencia, primero fue necesario investigar la afinidad del derivado de amida 113 para el dominio EVH1 (Tabla 1).

Tabla 1: Afinidades de unión de varios ligandos a base de ProM-1 con respecto al dominio EnaH-EVH1. Las constantes de disociación (K_d) determinadas mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se indican con los errores estándar correspondientes entre paréntesis:

#	Ligando	ITC K_d [μ M]
1	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt (44)	7,8 (0,4)
2	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OMe (242)	6,8 (0,7)
3	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-NH ₂ (113)	7,0 (0,7)

Se encontró que el cambio en el enmascaramiento del C-terminal, como se esperaba in silico, no tenía influencia sobre la afinidad de unión. Tanto el éster metílico 242 obtenido primero durante la síntesis del péptido en fase líquida como el derivado de amida final 113 producido a partir del mismo tenían afinidades de unión casi idénticas a las del éster etílico 44.

Como investigaciones posteriores también revelaron que las permeabilidades celulares, pero también las estabilidades metabólicas de los tres derivados 44, 242 y 113 eran casi idénticas, se tomó la decisión para futuros trabajos de eliminar el cambio final en la funcionalización del éster metílico 242 que forma 113, y como resultado, la secuencia de síntesis se acortó en dos etapas.

Como ya se explicó, los estudios de modelado por computadora realizados sugirieron que el ligando peptídico 247 a base de ProM-15, en donde la estructura de ProM-1 fue reemplazada por un bloque de construcción de ProM-15, podría tener una afinidad de unión significativamente mayor al dominio EVH1. Debido a su pronunciada flexibilidad C-terminal, el derivado 247 de ProM-15 debería poder formar un enlace de hidrógeno adicional y por tanto proporcionar una ganancia de afinidad. Además, el diseño del ProM-15 se basó en el soporte ProM-9 relacionado con el ProM-1, pero, al introducir un grupo metilo adicional, "estructuralmente optimizado". Con una drástica ganancia de afinidad, abordó un bolsillo hidrófobo del dominio, que también debería ser abordado por el sustituyente etilo flexible en ProM-15. En combinación con el enlace de hidrógeno adicional, se esperaba un aumento adicional en la afinidad de unión al dominio EVH1, que podría incluso superar la del ligando ya avanzado a base de ProM-9.

Después de la síntesis exitosa del soporte ProM-15 y también del ligando Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247) estos efectos postulados in silico ahora finalmente podrían investigarse experimentalmente.

La Tabla 2 resume las afinidades de unión de los ligandos relevantes.

De hecho, al reemplazar ProM-1 con ProM-15, se podría lograr una notable ganancia en afinidad por un factor de 9 a 10 en comparación con los ligandos 44 y 242 predecesores a base de ProM-1. El valor nanomolar de K_d sin embargo, aquí se encuentra en un intervalo similar al del ligando 251 que contiene ProM-9, lo que significa que inicialmente no se alcanzó la ganancia adicional esperada en afinidad.

Tabla 2: Afinidades de unión de varios ligandos a base de ProM con respecto al dominio EnaH-EVH1. Las constantes de disociación (K_d) determinadas por titulación de fluorescencia (FT) y la energía libre (ΔG^0) se indican con los errores estándar correspondientes entre paréntesis:

#	Ligando	FT	
		K_d [μ M]	ΔG^0 [kJ/mol]
1	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt (44)	4,1 (0,3)	-30,8 (0,2)
2	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OMe (242)	4,4 (0,7)	-30,6 (0,4)
3	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247)	0,47 (0,03)	-36,1 (0,1)
4	Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-9]-OEt (251)	0,38 (0,05)	-36,6 (0,3)

Se probaron las afinidades de unión de otros ligandos a base de ProM con respecto al dominio EnaH-EVH1. En particular, se analizaron otros derivados que se basan en los soportes ProM-15, ProM-17 y ProM-21. Las combinaciones de ProM-1 o ProM-2 junto con ProM-15, ProM-17 o ProM-21 muestran afinidades particularmente buenas con respecto al dominio EnaH-EVH1 y tienen mayores afinidades por el objetivo preferido que ProM-2-ProM-1 derivados de generaciones anteriores.

Tabla 3: Afinidades de unión de otros ligandos a base de ProM con respecto al dominio EnaH-EVH1. Las constantes de disociación (K_d) determinadas mediante titulación de fluorescencia (FT).

Ligando	K_D
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-2]-[ProM-15]-OMe	$k_D = 0,47 \mu\text{M}$
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-1]-[ProM-15]-OMe	$k_D = 0,9 \mu\text{M}$
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-2]-[ProM-17]-OMe	$k_D = 0,54 \mu\text{M}$
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-1]-[ProM-17]-OMe	$k_D = 2,2 \mu\text{M}$
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-2]-[ProM-21]-OMe	$k_D = 0,26 \mu\text{M}$
Ac-[2Cl-Phe]-[ProM-1]-[ProM-21]-OMe	$k_D = 2,1 \mu\text{M}$

También fue posible cristalizar Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247) en un complejo con EnaH-EVH1 y obtener una estructura cristalina del complejo del dominio del ligando. La Figura 15 muestra una superposición de los dos ligandos 247 y 252 sobre la superficie de la proteína, lo que permite sacar conclusiones sobre la situación de unión.

Como se puede ver a la izquierda en la Figura 15, el ligando 247 de ProM-15 se une canónicamente en la ranura de unión y las estructuras de los ligandos 247 y 252 son casi idénticas en la superficie. Curiosamente, sin embargo, se puede observar una orientación claramente diferente de la función carbonilo C-terminal (flecha roja), que en el caso del compuesto ProM-15 247 apunta en dirección a la superficie de la proteína, mientras que en el caso del ligando ProM-9 252 está orientado en dirección opuesta a él.

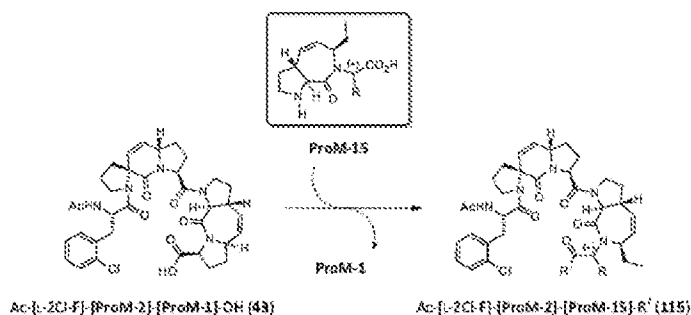
La imagen de la derecha muestra una vista más detallada de ProM-15 y ProM-9. Sorprendentemente, el grupo etilo de ProM 15 apunta a lo largo del anillo de pirrolidina de ProM-9 y no, como se esperaba, en la dirección de los sustituyentes metilo de PROM 9 (flecha roja). El ProM-15 reproduce el anillo de prolina original en lugar de abordar también el bolsillo hidrófobo abordado por ProM-9. En conclusión a partir de estas observaciones, la drástica ganancia en afinidad lograda por el ligando 247 de ProM-15 básicamente no puede atribuirse a los mismos efectos que con ProM-9, aunque está en el mismo intervalo. Dado que la región hidrófoba aparentemente no está dirigida por el sustituyente etilo, el extremo C terminal es presumiblemente el principal responsable de la ganancia de afinidad. En la Figura 16 se muestra una mirada más cercana a la densidad electrónica del ligando 247 en el bolsillo de unión.

La forma de la densidad electrónica alrededor del oxígeno carbonilo C-terminal sugiere que la función carbonilo en la orientación que se muestra descansa sobre el epítipo y apunta en consecuencia al átomo de nitrógeno del triptófano 23 (Trp23) más abajo. Las mediciones de la distancia entre los dos átomos revelaron que la distancia entre estas dos funcionalidades sería óptima para la formación de un enlace de hidrógeno a través de una molécula de agua, lo que también correspondería a la ganancia de afinidad. Por último, pero no menos importante, el diseño in silico del ProM-15 con su mayor flexibilidad C-terminal dio lugar a especulaciones sobre la formación de dicho enlace de hidrógeno, por lo que hasta ahora se suponía que esta interacción es responsable de la drástica ganancia en afinidad. En el momento de terminación de este trabajo no había sido posible resolver completamente la estructura cristalina, pero los primeros refinamientos parecen confirmar la presencia de una molécula de agua entre Trp23 y la función carbonilo y, por tanto, soportan la conjetura postulada. Evaluaciones detalladas están en progreso y deben comunicarse lo antes posible.

En términos de idea conceptual, el bloque de construcción ProM-15 parece representar la optimización estructural más prometedora del soporte inicial ProM-1 hasta la fecha. Aunque el direccionamiento in silico predicho del bolsillo de unión hidrófobo por el sustituyente etilo no ocurrió, probablemente fue posible por primera vez formar un enlace de hidrógeno adicional con el dominio debido a la mayor flexibilidad del C-terminal. Esto resultó en una ganancia significativa en afinidad por un factor de 9 a 10 y una unión de ligando en el intervalo nanomolar (superior) de 247. Debido a la estructura modular simple de ProM-15, la aminación alílica catalizada por paladio recientemente desarrollada debería permitir una modificación simple del sustituyente etilo y, por tanto, también permitir abordar el bolsillo de unión hidrófobo no abordado anteriormente. De esta manera, aún se podría lograr la combinación de efectos de unión originalmente buscada y se podría generar una ganancia adicional en la afinidad por el dominio EVH1.

Resumen

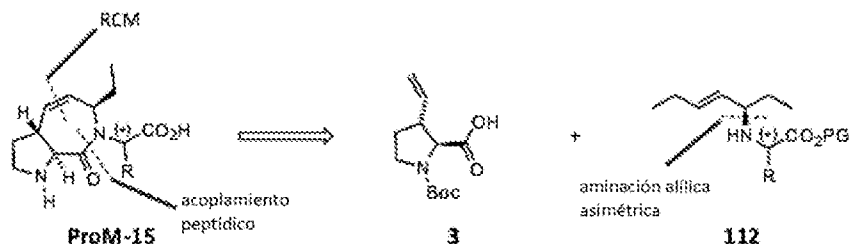
Las interacciones proteína-proteína mediadas por la hélice de poliprolina tipo 2 (hélice PPII) entre los llamados motivos ricos en prolina (PRM) y los dominios de unión correspondientes (PBD) desempeñan un papel importante en muchos procesos biológicos esenciales, por lo que su modulación de gran interés científico y farmacológico. En este contexto, los inventores desarrollaron análogos de diprolina estructurados modularmente y diseñados racionalmente en conformación PPII (ProM), cuyo uso como equivalente de Pro-Pro en el motivo central de un PRM permitió la inhibición dirigida de las interacciones mencionadas anteriormente. El presente trabajo contribuye a la optimización del inhibidor 43 altamente selectivo de Ena/VASP-EVH1 resultante de estos estudios (Esquema 39).



Esquema 39: Desarrollo estructural del inhibidor Ena/VASP-EVH1 43.

La sustitución del soporte ProM-1 por la estructura bicíclica ProM-15 debería conducir a un péptido mimético 115 que es significativamente más flexible en el extremo C, que podría formar interacciones hidrófobas e hidrófilas adicionales con el dominio EVH1 y, por tanto, tener un efecto afinidad de unión significativamente aumentada con él. Además de la mayor flexibilidad, el bloque de construcción ProM-15 diseñado *in silico* ofrece otro sitio de interacción variable "R", a través del cual también son posibles interacciones con el dominio, pero que también representa una opción para abordar nuevos PBD.

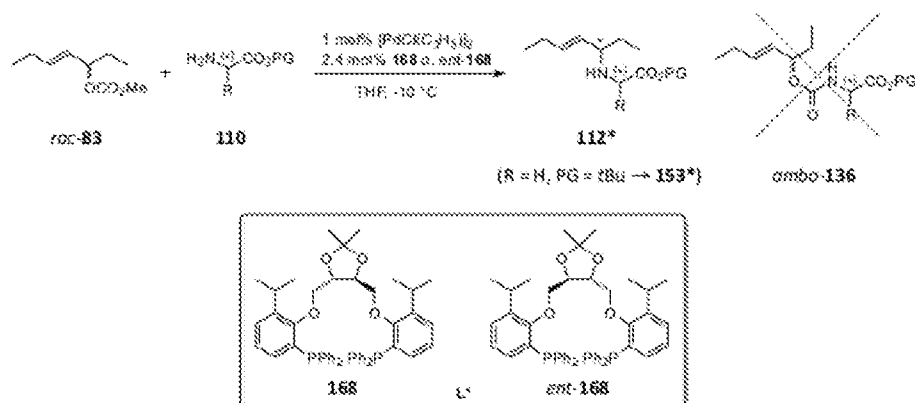
Al seguir una estrategia sintética establecida, probada y comprobada para construir bloques de construcción de ProM, ProM-15 podría derivarse del bloque de construcción ácido 3 ya conocido y de las alilaminas 112, hasta ahora poco investigadas, mediante metátesis de cierre de anillo y acoplamiento peptídico (Esquema 40).



Esquema 40: Consideraciones retrosintéticas para la construcción del soporte ProM-15.

Aminaciones alílicas asimétricas catalizadas por paladio

En consecuencia, la síntesis estereoselectiva de ésteres de aminoácidos N-alilados del tipo 112 fue un desafío y el requisito previo esencial para la provisión de ProM-15, que podría lograrse con éxito mediante el desarrollo de una nueva aminación alílica asimétrica, altamente selectiva, mediante el uso del carbonato racémico rac-83 y varios ésteres de α -aminoácidos 110 (Esquema 41).



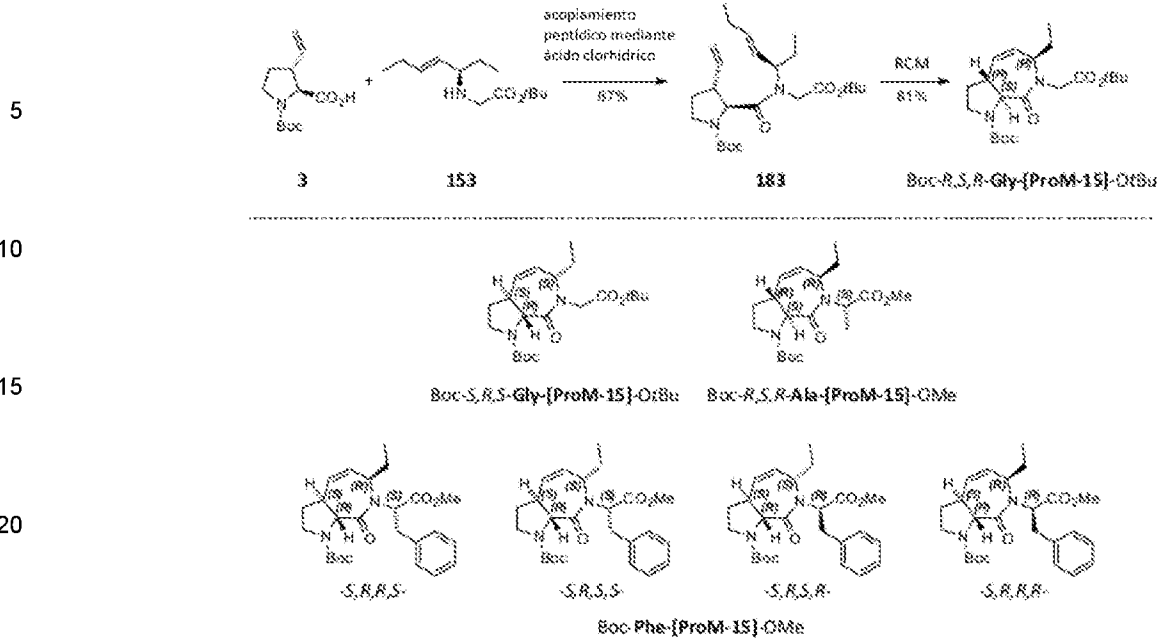
Esquema 41: Síntesis de alilaminas de tipo 112* o 153* mediante la N-alilación asimétrica catalizada por paladio de ésteres de α -aminoácidos 110 desarrollada en este trabajo. En las condiciones de reacción optimizadas, la formación de subproductos carbamato ambo-136 podría suprimirse por completo.

Después de optimizar las condiciones de reacción, mediante el uso de solo 1 % en moles de una fuente de paladio y 2,4 % en moles de los ligandos de bisfosfina quirales 168 o ent-168, se llevó a cabo la síntesis de un total de 19 (nuevas) alilaminas 112* y su caracterización completa con éxito por primera vez (Figura 17). Las condiciones encontradas permitieron no sólo preparar el compuesto a base de glicina 153* en 95 % ee, sino también lograr excelentes selectividades y buenos rendimientos cuando se usan nucleófilos quirales 110, los pocos ejemplos de transformaciones similares descritos en la literatura son claramente excedidos.

Síntesis estereoselectiva de nuevos miméticos dipéptidos.

A partir de las alilaminas 112* producidas estereo selectivamente, se logró subsecuentemente la síntesis de siete nuevos soportes ProM-15 mediante el uso de la estrategia establecida, al adaptarse u optimizarse las etapas finales al nuevo sistema.

El esquema 42 muestra un ejemplo de la síntesis de ProM-15 a base de glicina con la configuración absoluta objetivo, así como también los otros nuevos análogos de dipéptidos:



Esquema 42: Estrategia de síntesis para la construcción del ProM-15 y las estructuras producidas en este trabajo.

30

35

Dado que el acoplamiento peptídico de 3 y 153 sólo dio resultados insatisfactorios bajo las "condiciones estándar" usadas hasta ahora y fracasó por completo al usar las alilaminas 112* estéricamente aún más exigentes con R ≠ H (ver esquema 5.2), la modalidad de este vínculo planteó un problema desafiante. La solución al problema del acoplamiento sólo se logró después de un examen intensivo de varios reactivos de activación y una interpretación precisa de los resultados. Las condiciones encontradas (acoplamiento a través del cloruro de ácido de 3) no sólo permitieron la síntesis del dipéptido 183 con un rendimiento excelente, sino que también permitieron la unión muy exitosa del ácido de Zaminer (3) con los bloques de construcción de aminas estéricamente impedidas 112* (R ≠ H). El cierre final del anillo también se optimizó significativamente variando varios parámetros de reacción de modo que la metátesis estéricamente exigente pudiera lograrse con rendimientos de moderados a buenos en todos los casos con solo un 6 % en moles de catalizador.

40

Finalmente, todos los soportes ProM-15 recién producidos también podrían cristalizarse y verificarse la configuración relativa de los estereocentros mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X.

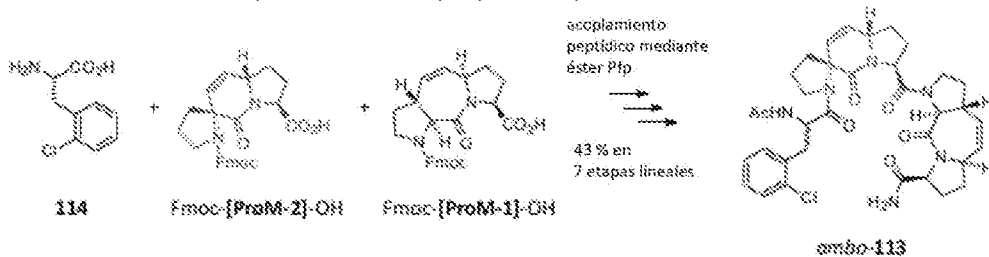
45

Síntesis de ligandos en fase líquida.

50

55

En el contexto de esta invención, la síntesis de los miméticos peptídicos PPII finales a base de ProM también podría realizarse en fase líquida. El interés en tal ruta de síntesis que pueda llevarse a cabo en una escala de varios gramos se basó en la necesidad de proporcionar grandes cantidades de sustancia para los experimentos in vivo deseados, que no eran accesibles a través de la síntesis de péptidos en fase sólida usada anteriormente. Al partir de la L-2-clorofenilalanina comercialmente disponible (114) y de los componentes básicos ya conocidos Fmoc-[ProM-2]-OH (cuya síntesis también se ha optimizado) y Fmoc-[ProM-1]-OH, se ha desarrollado una metodología eficiente de acoplamiento en base a ésteres de pentafluorofenol (Esquema 43).

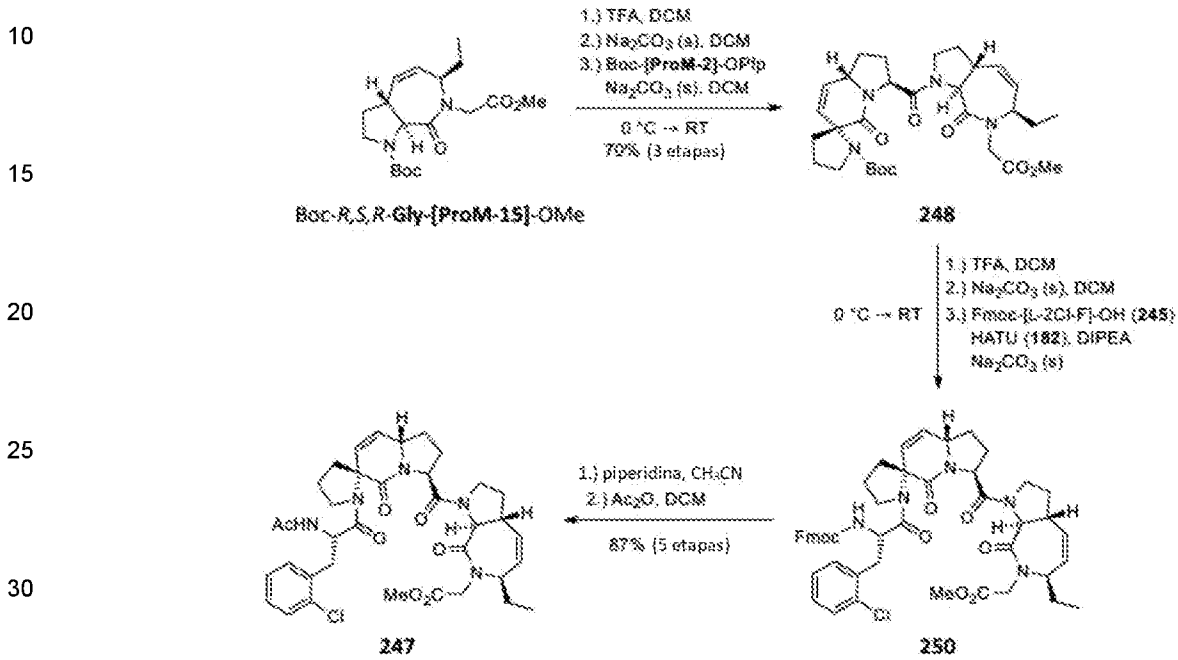


Esquema 43: Estructura del ligando peptídico ambo-113 a partir de L-2-clorofenilalanina (114) y los dos soportes ProM Fmoc-[ProM-2]-OH y Fmoc-[ProM-1]-OH.

El ligando 113 se construyó en condiciones suaves después de la esterificación metílica de la estructura ProM-1 y la provisión de los socios de acoplamiento activados, al comenzar desde el extremo C, seguido del cambio de funcionalidad. Sin embargo, la metodología encontrada resultó no ser óptima por varias razones, la epimerización del estereocentro de 2-clorofenilalanina es la mayor desventaja. Sin embargo, con un rendimiento total del 43 % en siete

etapas lineales a partir del bloque de construcción ProM-1, inicialmente un total de aproximadamente 2,5 g del ligando peptídico ambo-113, como una mezcla de diastereómeros, se pudo sintetizar y hacer disponible para los experimentos in vivo específicos.

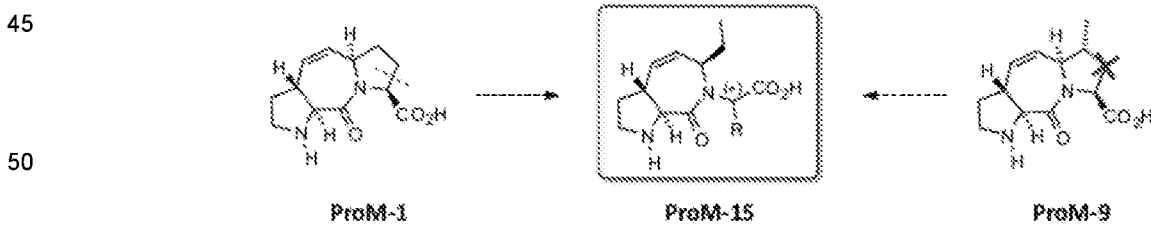
5 Luego se logró una primera optimización de la secuencia de síntesis, que incluyó un cambio a grupos protectores Boc y una combinación de éster de Pfp y activación de HATU, de modo que ahora el ligando deseado estaba disponible en forma diastereoméricamente pura. Luego se usó la metodología mejorada para preparar un ligando 247 que contiene ProM-15, cuya síntesis se muestra en el Esquema 44:



35 Esquema 44: Síntesis del ligando Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247) en condiciones de acoplamiento optimizadas.

Investigaciones biológicas del ligando que contiene ProM-15 247

40 Como ya se indicó en la introducción de este capítulo, los estudios de modelado por computadora llevados a cabo sugirieron que un ligando peptídico basado en ProM-15, debido a su pronunciada flexibilidad C-terminal, podría tener una afinidad de unión significativamente mayor al dominio EVH1 que versión rígida anterior que contiene ProM-1. Además, los hallazgos del soporte ProM-9 relacionado con ProM-1, pero "estructuralmente optimizado", se incorporaron al diseño de ProM-15 (Esquema 45).



Esquema 45: Derivación del soporte ProM-15 a partir de las estructuras conocidas ProM-1 y ProM-9.

55 Al introducir un grupo metilo adicional, ProM-9 pudo abordar un bolsillo hidrófobo en el dominio y así se creó un ligando peptídico con una afinidad de unión impresionantemente aumentada.

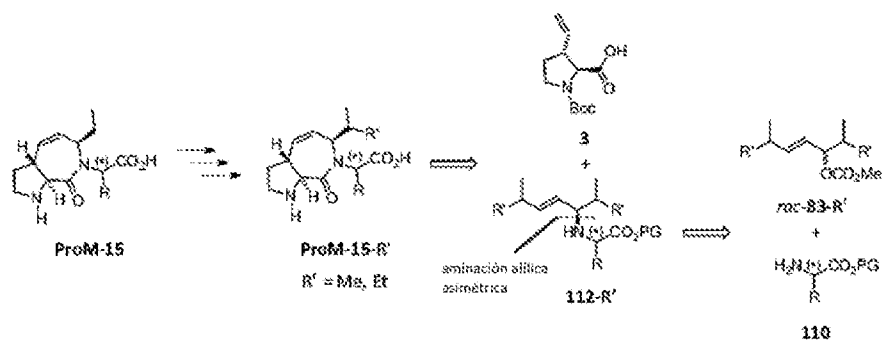
60 El sustituyente etilo flexible en ProM-15 también debería abordar esta superficie de interacción y, en combinación con un enlace de hidrógeno recién formado adicional, conducir a un aumento adicional de la afinidad.

Después de encontrar con éxito el acceso a ProM-15 y sintetizar el ligando peptídico 247, los efectos postulados in silico pudieron comprobarse experimentalmente en la FMP de Berlín.

65 El nuevo compuesto Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247) mostró, en comparación con los ligandos predecesores a base de ProM-1 44 y 242, en realidad tenía una afinidad de unión impresionantemente aumentada

para el dominio EVH1 en un factor de 9 - 10 y, por tanto, estaba en el mismo intervalo que la versión 251 de ProM-9, que tenía la mejor unión hasta la fecha.

Debido a la orientación de la función carbonilo C-terminal, la drástica ganancia de afinidad se atribuyó a la formación del enlace de hidrógeno deseado, aunque no se pudo lograr la segunda interacción del sustituyente etilo con el bolsillo hidrófobo del dominio. Aunque la combinación de ambos efectos fracasó, ProM-15 todavía parece representar la optimización estructural más prometedora del soporte ProM-1 en términos de idea conceptual. La formación del nuevo enlace de hidrógeno y el consiguiente aumento significativo de afinidad pueden considerarse inicialmente como un gran éxito, en donde la aminación alílica catalizada por paladio desarrollada dentro del alcance de este trabajo debería permitir una derivatización de ProM-15 de manera sencilla (Esquema 46).

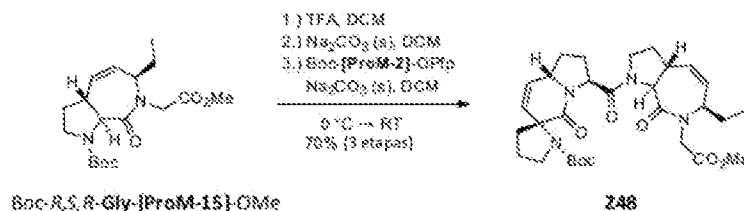


Esquema 46: Se podría lograr un mayor desarrollo del soporte ProM-15 ramificando el sustituyente etilo. Esta derivatización debería ser accesible de manera sencilla mediante el uso de un sustrato catalítico ligeramente modificado rac-83-R'.

Al elegir un sustrato catalítico adecuadamente modificado, rac-83-R', debería ser posible una introducción selectiva de diferentes sustituyentes. Los nuevos derivados de ProM-15-R' podrían, por ejemplo, llevar un grupo isopropilo o isobutilo ramificado como propuestas estructurales útiles, que deberían permitir abordar el bolsillo hidrófobo

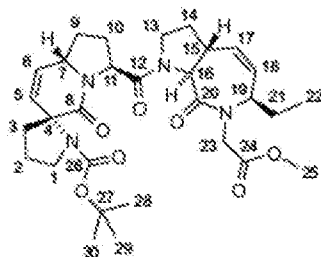
Síntesis del ligando peptídico Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]- [R, S, R-Gly-ProM-15]-OMe (247)

Síntesis de Boc-[ProM-2]- [R, S, R-Gly-ProM-15]-OMe (248)



En condiciones no inertes, se trató gota a gota una solución de 220 mg (0,624 mmol, 1 eq.) de Boc-R, S, R-Gly-[ProM-15]-OMe en 1,4 ml de DCM a 0 °C con 0,72 ml (9,36 mmol, 15 eq.) de TFA. Se retiró el baño de hielo, se agitó durante 1,5 h a rt, después se eliminaron todos los constituyentes volátiles a presión reducida, se concentraron dos veces de nuevo en DCM y finalmente se secaron al vacío. El residuo obtenido se recogió en 12,5 ml de DCM, 3 espátulas de Na₂CO₃ sólido (el material sólido se pegó un poco) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Luego se filtró, el solvente se eliminó bajo presión reducida y se secó a vacío.

El residuo obtenido se recogió en 12,5 ml de abs. DCM bajo atmósfera de argón, otras 3 espátulas de Na₂CO₃ sólido se añadieron y luego se añadieron 376 mg (0,749 mmol, 1,2 eq.) de Boc-[ProM-2]-OPfp. Después de agitar durante la noche (15 h) a rt, la mezcla se filtró y el solvente se eliminó bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 20/1) y secado al vacío a 60 °C permitió aislar 250 mg (0,438 mmol, 70 % en 3 etapas) del tetrapéptido 248 deseado en forma de un sólido blanco.



C₃₀H₄₂N₄O₇

M: 570,68 g/mol.

5 TLC: R_f = 0,22 (sílice, DCM/MeOH = 20/1), KMnO₄ reactivo.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, mezcla de rotámeros 95): δ [ppm] = 1,01 (t, ³J = 7,2 Hz, 3H, H-22) 1,35, 1,44 (2 × s, 9H, H-28/29/30); 1,52 – 1,63 (m, 1,55H, H-9rot1/21); 1,69 – 1,82 (m, 2,45H, H-2/9rot2/21'); 1,84 – 1,93 (m, 2H, H-3/14); 1,95 – 2,03 (m, 1H, H-2); 2,12 – 2,22 (m, 3H, H-9/10/14'); 2,26 – 2,31 (m, 1H, H-3'); 2,40 – 2,46 (m, 1H, H-10'); 2,94 – 3,03 (m, 1H, H-15); 3,43 – 3,52 (m, 1H, H-1); 3,56 – 3,70 (m, 4,45H, H-1'rot2/13/25); 3,73 – 3,78 (m, 1,55H, H-1'rot1/23); 4,24 (Ψt, J = 8,8 Hz, 0,45H, H-13'rot2); 4,30 (Ψt, J = 8,7 Hz, 0,55H, H-13'rot1); 4,35 – 4,39 (m, 1H, H-7); 4,68 – 4,81 (m, 2,55H, H-11rot1/19/23'); 4,93 (Ψt, J = 8,1 Hz, 0,45H H-11rot2); 5,11 (Ψt, J = 11,9 Hz, 1H, H-16); 5,56 – 5,59 (m, 1H, H-17); 5,74 – 5,79 (m, 1,1H, H-5rot1/6rot1); 5,83 – 5,89 (m, 1,9H, H-5rot2/6rot2/18).

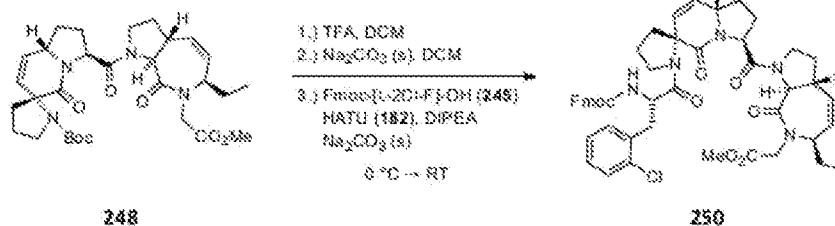
15 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, mezcla de rotámeros 95): δ [ppm] = 11,7 (C-22); 22,7, 23,1 (C-2); 26,2, 26,2 (C-21); 28,3 (C-10); 28,5, 28,7 (C-28/29/30); 31,1, 31,1 (C-14); 31,4, 31,5 (C-9); 38,6, 39,8 (C-3); 42,3 (C-15); 43,2 (C-23); 47,6, 47,7 (C-13); 48,1, 48,5 (C-1); 52,1, 52,1 (C-25); 55,4, 55,5 (C-19); 56,3, 56,3 (C-11); 58,9, 59,0 (C-7); 60,3, 60,3 (C-16); 64,1, 64,3 (C-4); 79,5, 79,7 (C-27); 121,9, 123,1 (C-5 o. C-6); 130,7, 130,7, 130,8 (C-17/18); 133,0, 133,6 (C-5 o. C-6); 154,2, 154,4 (C-26); 168,2, 168,4 (C-8); 170,4, 170,4 (C-24); 171,7, 171,9 (C-12); 172,2 (C-20).

20 HR/MS (ESI): calculado para: [M+H]⁺ 571,3126; encontró: 571,3130; calculado para [M+Na]⁺ 593,2946; encontró: 593,2943.

25 Síntesis de Fmoc-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (250)

25

30



35 1.) Síntesis del éster activo: En atmósfera de argón, se añadió una solución de 318 mg (0,753 mmol, 2 eq.) de Fmoc-[L-2Cl-F]-OH (245) y 358 mg (0,942 mmol, 2,5 eq.) de HATU en 4,7 ml abs. Se trató DCM a rt con 0,13 ml (0,753 mmol, 2 eq.) de DIPEA y la mezcla se agitó durante 45 min (solución turbia, ligeramente amarillenta).

40 2.) Síntesis del ligando 250: Se disolvieron 215 mg (0,377 mmol, 1 eq.) del tetrapéptido 248 en 0,87 ml de DCM en condiciones no inertes y se añadieron gota a gota 0,44 ml (5,65 mmol, 15 eq.) de TFA a 0 °C. Se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó a rt durante 1 h, luego se eliminaron todos los constituyentes volátiles a presión reducida, se concentraron dos veces en DCM y finalmente se secaron al vacío. El residuo obtenido se recogió en 5 ml de DCM, 3 espátulas de Na₂CO₃ sólido (el material sólido se pegó un poco) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Luego se filtró, la torta de filtración de color marrón se lavó con un poco de CH₃CN (la decoloración marrón se disuelve), el solvente se eliminó a presión reducida y se secó al vacío. El residuo ahora obtenido se recogió en 4,7 ml de DCM abs en atmósfera de argón y se añadieron unas gotas de CH₃CN seco (lo suficiente para que se disolviera el sólido polar). Luego se añadieron 3 espátulas de Na₂CO₃ sólido y luego la solución del éster activo previamente sintetizado (ver arriba).

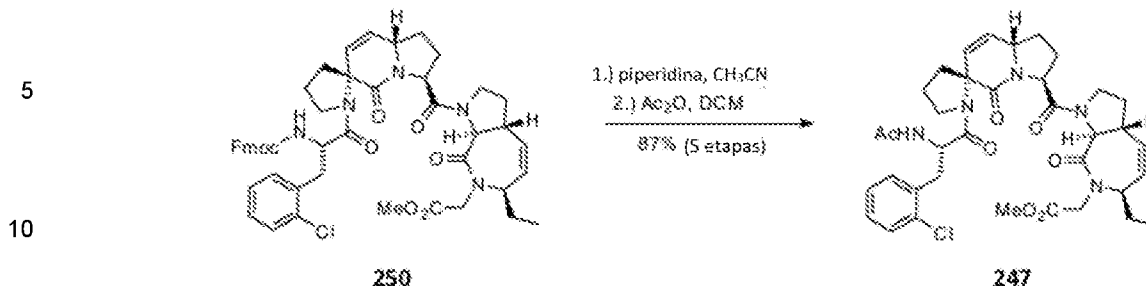
50 Después de agitar durante la noche a rt, el Na₂CO₃ se filtró sobre un poco de sílice (eluyente: DCM/MeOH = 15/1), el solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 15/1). Después de secar al vacío, se pudieron aislar 486 mg (150 %) de un sólido ligeramente pardusco. No fue posible en este punto purificar completamente el producto 250 deseado. Tanto las especies de urea (R_f = 0,35, sílice, DCM/MeOH = 15/1, KMnO₄) y trazas de DIPEA (R_f = 0,22, sílice, DCM/MeOH = 15/1, KMnO₄) no se pudo separar mediante cromatografía en columna. Sin embargo, dado que estas impurezas no influyeron en las reacciones químicas posteriores, no se descartó ninguna fracción del producto contaminada con ellas para evitar pérdidas de rendimiento. El espectro ¹H-NMR del sólido pardusco mostró las señales características esperadas del ligando 250, así como también las señales de las impurezas mencionadas. Por esta razón no se ha realizado aquí una caracterización y determinación completa del rendimiento. Se asumió una reacción cuantitativa para la siguiente etapa.

60

C₄₉H₅₂ClN₅O₈, M: 874,42 g/mol.TLC: R_f = 0,29 (sílice, DCM/MeOH = 15/1), KMnO₄ reactivo.

65 HR/MS (ESI): calculado para: [M+H]⁺ 874,3577; encontró: 874,3591; calculado para [M+Na]⁺ 896,3397; encontró: 896,3403.

Síntesis de Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[R,S,R-Gly-ProM-15]-OMe (247)

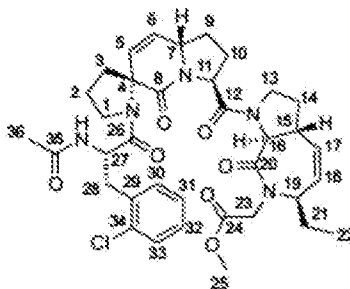


15 El ligando 250 (6.19.2) previamente sintetizado se disolvió en 6,8 ml de CH₃CN bajo atmósfera de argón y se añadieron gota a gota 1,7 ml de piperidina a rt (corresponde a 20 % de piperidina en CH₃CN).

20 Después de agitar durante 1 h a rt, se cambió el solvente en la línea Schlenk: Primero, se eliminaron cuidadosamente el CH₃CN y la piperidina y se evaporaron hasta sequedad. Luego el residuo se recogió en ~2 ml de DCM, se liberaron nuevamente del solvente y de los residuos de piperidina y se repitió este procedimiento una vez más. Luego se recogió el residuo en 15,3 ml de abs. DCM bajo atmósfera de argón y tratado gota a gota con 1,7 ml de anhídrido acético a rt (corresponde a 10 % Ac₂O en DCM). Después de agitar durante la noche, se eliminaron todos los componentes volátiles bajo presión reducida, se concentraron nuevamente en DCM y el producto bruto se purificó subsecuentemente mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 15/1). Después de secar al vacío, se pudieron aislar 227 mg (0,327 mmol, 87 % en 5 etapas) del ligando 247 deseado como un sólido ligeramente pardusco.

25 C₃₆H₄₄ClN₅O₇, M: 694,22 g/mol.

30 TLC: R_f = 0,17 (sílice, DCM/MeOH = 15/1), KMnO₄ reactivo.



40 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, mezcla de rotámeros 98): δ [ppm] = 0,98 – 1,02 (m, 3H, H-22); 1,54 – 1,62 (m, 1H, H-21); 1,68 – 2,22 (m, 12H, H-2/3/9/10/14/21/36); 2,29 (Ψ dt, J = 12,2 Hz, J = 5,9 Hz, 0,3H, H-3'rot2); 2,38 (Ψ dt, J = 12,9 Hz, J = 6,4 Hz, 0,7H, H-3'rot1); 2,45 – 2,50 (m, 0,7H, H-10'rot1); 2,53 – 2,58 (m, 0,3H, H-10'rot2); 2,85 (dd, ²J = 14,2 Hz, ³J = 10,7 Hz, 0,7 H, H-28rot1); 2,92 – 3,03 (m, 1,3H, H-15/28rot2); 3,14 (dd, ²J = 13,0 Hz, ³J = 6,1 Hz, 0,3H, H-28'rot2); 3,36 (dd, ²J = 14,2 Hz, ³J = 3,8 Hz, 0,7H, H-28'rot1); 3,44 – 3,48 (m, 0,3H, H-1rot2); 3,54 – 3,61 (m, 1H, H-13); 3,67, 3,67 (2 x s, 3H, H-25); 3,76 – 3,80 (m, 1H, H-23); 3,89 – 3,96 (m, 1,7H, H-1rot1/1'); 4,10 (Ψt, J = 9,0 Hz, 0,3H, H-13'rot2); 4,19 (Ψt, J = 8,8 Hz, 0,7H, H-13'rot1); 4,32 – 4,36 (m, 0,3H, H-7rot2); 4,38 – 4,41 (m, 0,7H, H-7rot1); 4,67 – 4,76 (m, 2,6H, H-5rot2 o.6rot2/19/23/27rot2); 4,83 (Ψt, J = 8,3 Hz, 0,3H, H-11rot2); 4,96 (Ψt, J = 8,1 Hz, 0,7H, H-11rot1); 5,06 (d, ³J = 12,1 Hz, 0,3H, H-16rot2); 5,11 – 5,17 (m, 1,4H, H-16rot1/27rot1); 5,54 – 5,89 (m, 3,7H, H-5rot1/6 o. H-5/6rot1 y H-17/18); 6,13 (d, ³J = 10,3 Hz, 0,3H, NHrot2); 6,17 (d, ³J = 8,8 Hz, 0,7 H, NHrot1); 7,13 – 7,34 (m, 4H, H-30/31/32/33).

50 ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, mezcla de rotámeros 98): δ [ppm] = 11,7, 11,7 (C-22); 22,2, 24,1 (C-2); 23,0, 23,0 (C-36); 26,2 (C-21); 28,2, 28,5 (C-10); 31,0, 31,0, 31,2, 31,4 (C-9/14); 36,0, 37,9 (C-28); 38,2, 41,1 (C-3); 42,3, 42,3 (C-15); 43,2 (C-23); 47,5 (C-13); 48,7, 48,8 (C-1); 50,5, 50,7 (C-27); 52,1 (C-25); 55,4, 55,6 (C-19); 56,4, 57,0 (C-11); 59,2, 59,6 (C-7); 60,2, 60,3 (C-16); 64,7, 65,5 (C-4); 123,1, 125,6 (C-5 o. C-6); 126,6, 126,8, 128,6, 128,6, 129,4, 129,6 (C-31/32/33); 130,0, 130,6, 130,8, 130,8, 131,3 (C-5 o. C-6/17/18); 131,8, 132,0 (C-30); 134,4, 134,6, 134,7, 135,4 (C-29/34); 166,7, 167,1 (C-8); 169,7, 170,2, 170,4, 171,3, 171,7 (C-12/24/26/35); 172,1, 172,2 (C-20).

60 HR/MS (ESI): calculado para: [M+H]⁺ 694,3002; encontró: 694,3014; calculado para [M+Na]⁺ 716,2821; encontró: 716,2824.

Síntesis adicional de los ligandos de acuerdo con la invención.

65 En el transcurso de este trabajo, se desarrolló una metodología mejorada para ensamblar los componentes básicos de ProM, que no solo requiere menos etapas, sino que, sobre todo, ofrece productos con mayor rendimiento y pureza.

La nueva y mejorada síntesis de ligandos se diferencia de los métodos anteriores en que las sustancias se alinean o se producen "de izquierda a derecha". Primero se vincula la (L)-2-clorofenilalanina protegida con N-Fmoc con el "primer" bloque de construcción de ProM (central), luego, después de la hidrólisis del éster, se une el bloque de construcción de ProM "derecho" (C-terminal). Finalmente, el grupo Fmoc se intercambia por el grupo acetilo (o también por otros residuos acilo).

5

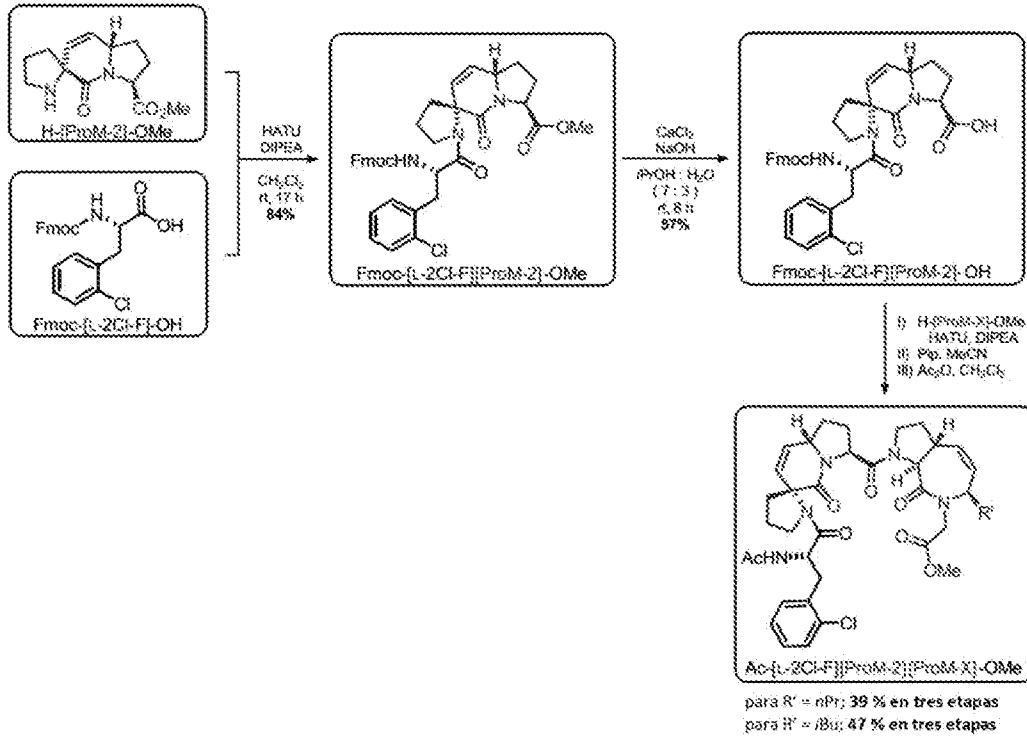
10

15

20

25

30



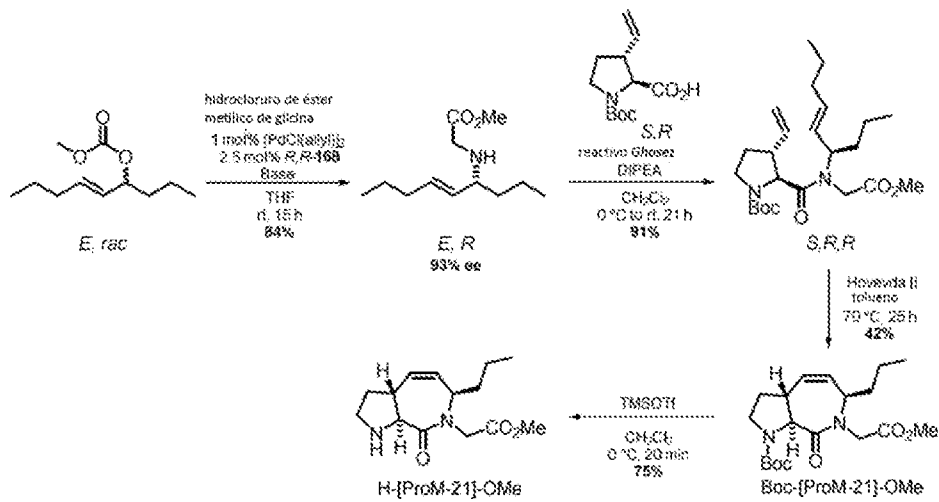
Síntesis del bloque de construcción del ProM 21:

35

40

45

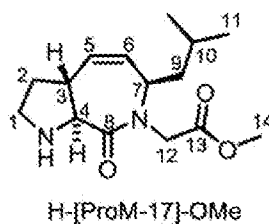
50



Datos característicos de H-[ProM-17]-OMe

55

60



C₁₅H₂₄N₂O₃.

65

280,368 g/mol.

ES 2 964 378 T3

TLC: (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 20:1): R_f = 0,13.

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ = 5,90 (dt, ³J = 11,1, ⁴J = 2,4 Hz, 1H, H5), 5,49 (dt, ³J = 11,1, ⁴J = 3,0 Hz, 1H, H6), 4,75 – 4,70 (m, 1H, H7), 4,46 (d, ³J = 11,9 Hz, 1H, H4), 4,41 (d, ³J = 17,5 Hz, 1H, H12a), 3,99 (d, ³J = 17,6 Hz, 1H, H12b)
 3,71 (s, 3H, H14), 3,22 (dd, ³J = 9,5, ³J = 4,7 Hz, 2H, H1), 3,11 (bs, 1H, -NH), 2,62 – 2,55 (m, 1H, H3), 2,23 – 2,18 (m, 1H, H2a), 1,81 – 1,72 (m, 1H, H2b), 1,63 (dp, ³J = 13,2, ³J = 6,5 Hz, 1H, H10), 1,55 – 1,42 (m, 2H, H9), 0,96 (Ψdd, ³J = 15,8, ³J = 6,5Hz, 6H, H11).

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃) δ = 174,3 (s, C8), 170,3 (s, C13), 131,9 (d, C5), 130,3 (d, C6), 62,1 (d, C4), 52,3 (q, C14), 51,7 (d, C7), 45,4 (d, C3), 45,2 (t, C1), 43,7 (t, C12), 42,1 (t, C9), 32,5 (t, C2), 25,1 (d, C10), 23,2 (q, C11a), 21,8 (q, C11b).

FT-IR: (ATR) ν [cm⁻¹] = 3371 (b), 2954 (m), 2871 (w), 1751 (m), 1657 (s), 1455 (m), 1436 (m), 1384 (m), 1302 (w), 1260 (m), 1201 (s), 1177 (s), 1125 (m), 1076 (w), 1042 (w), 1008 (m), 938 (w), 913 (w), 823 (w), 775 (m), 734 (ancho), 690 (m), 635 (m), 561 (m).

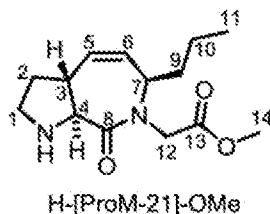
GC-MS: m/z (%) = 280 (12), 251 (5), 223 (17), 195 (44), 179 (5), 158 (100), 137 (5), 122 (44), 106 (24), 91 (19), 69 (29), 41 (26).

HR-MS (ESI):

masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
281,1859 [M+H] ⁺	281,1859 [M+H] ⁺	+ 0,06
303,1679 [M+Na] ⁺	303,1678 [M+Na] ⁺	- 0,23

[α]_D²⁰: (0,50 g/100 ml en CHCl₃): [α]₃₆₅ = -278,6°, [α]₄₃₆ = -175,6°, [α]₅₄₆ = -103,5°, [α]₅₇₉ = -90,8°, [α]₅₈₉ = -88,1°.

Datos característicos de H-[ProM-21]-OMe



C₁₄H₂₂N₂O₃.

266,341 g/mol.

TLC: (SiO₂, CyHex/EtOAc/MeOH 2:2:1): R_f = 0,10.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃) δ = 5,90 (dt, ³J = 11,1 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, 1H, H5), 5,52 (dt, ³J = 11,1 Hz, ⁴J = 3,0 Hz, 1H, H6), 4,65 – 4,62 (m, 1H, H7), 4,44 – 4,35 (m, 2H, H4 y H12a), 4,04 (d, ³J = 17,6 Hz, 1H, H12b), 3,71 (s, 3H, H14), 3,23 – 3,17 (m, 2H, H1), 2,60 – 2,54 (m, 1H, H3), 2,22 – 2,17 (m, 1H, H2a), 1,75 (tt, ³J = 12,3 Hz, ³J = 9,5 Hz, 1H, H2b), 1,70 – 1,50 (m, 2H, H9), 1,50 – 1,30 (m, 2H, H10), 0,98 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, H11).

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃) δ = 174,4 (s, C8), 170,4 (s, C13), 132,0 (d, C5), 130,1 (d, C6), 62,1 (d, C4), 53,8 (d, C7), 52,3 (q, C14), 45,4 (d, C3), 45,1 (t, C1), 43,7 (t, C12), 35,2 (t, C9), 32,6 (t, C2), 20,3 (t, C10), 13,9 (q, C11).

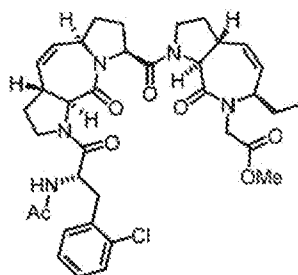
FT-IR: (ATR) ν [cm⁻¹] = 3321 (b), 3020 (w), 2956 (w), 2873 (w), 1751 (m), 1651 (s), 1454 (m), 1436 (m), 1384 (m), 1301 (w), 1253 (m), 1202 (s), 1178 (s), 1163 (s), 1114 (m), 1078 (w), 1047 (w), 1009 (m), 943 (w), 909 (w), 890 (w), 845 (w), 783 (m), 732 (m), 689 (m), 638 (m), 558 (m), 485 (m).

GC-MS: m/z (%) = 266 (27), 237 (16), 223 (49), 209 (10), 195 (53), 179 (5), 165 (10), 144 (100), 122 (31), 108 (26), 94 (15), 80 (24), 56 (6), 41 (11).

HR-MS (ESI):

masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
267,1703 [M+H] ⁺	267,1704 [M+H] ⁺	+ 0,24
289,1522 [M+Na] ⁺	289,1523 [M+Na] ⁺	+ 0,20

Datos característicos de Ac-[I-2Cl-F][ProM-1][ProM-15]-OMe



Ac-[L-2Cl-F][ProM-1][ProM-15]-OMe

$C_{36}H_{44}N_5O_7Cl_1$.

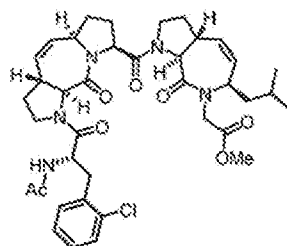
694,226 g/mol.

^{13}C -NMR: (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 172,2, 171,2, 171,0, 170,9, 170,8, 170,5, 170,5, 169,6, 168,8, 168,7, 135,2, 134,8, 134,7, 134,6, 132,2, 132,0, 130,8, 130,7, 130,6, 130,0, 129,5, 129,5, 129,7, 128,8, 128,6, 128,0, 127,9, 126,9, 126,8, 62,8, 62,3, 60,3, 60,2, 59,1, 59,0, 58,0, 55,5, 55,4, 52,1, 51,6, 50,5, 47,9, 47,7, 46,9, 43,2, 42,4, 42,0, 40,6, 38,6, 37,0, 33,4, 33,2, 31,8, 31,1, 29,9, 27,3, 26,2, 23,5, 23,2, 22,8, 14,3, 11,8, 11,8.

HR-MS (ESI):

	masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
25	694,3002 [M+H] ⁺	694,3012 [M+H] ⁺	+ 1,46
	716,2821 [M+Na] ⁺	716,2823 [M+Na] ⁺	+ 0,33

Datos característicos de Ac-[L-2Cl-F][ProM-1][ProM-17]-OMe



Ac-[L-2Cl-F][ProM-1][ProM-17]-OMe

$C_{38}H_{48}N_5O_7Cl_1$.

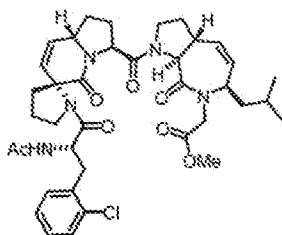
722,280 g/mol.

^{13}C -NMR: (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 172,3, 171,1, 171,0, 170,9, 170,7, 170,0, 168,9, 168,9, 134,7, 134,6, 134,5, 132,2, 132,1, 130,9, 130,8, 130,7, 130,6, 129,9, 129,5, 129,5, 129,2, 128,9, 128,6, 128,1, 128,1, 127,0, 126,9, 62,8, 62,3, 60,3, 59,2, 58,1, 52,2, 51,6, 50,7, 48,0, 47,7, 47,0, 46,1, 43,3, 42,4, 42,2, 40,6, 38,6, 36,8, 33,4, 33,2, 32,1, 31,8, 31,1, 31,0, 29,9, 27,25, 25,1, 23,6, 23,1, 22,7, 22,1, 21,7, 14,3.

HR-MS (ESI):

	masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
50	722,3315 [M+H] ⁺	722,3319 [M+H] ⁺	+ 0,53
	744,3134 [M+Na] ⁺	744,3132 [M+Na] ⁺	- 0,26

Datos característicos de Ac-[L-2Cl-F][ProM-2][ProM-17]-OMe



Ac-[L-2Cl-F][ProM-2][ProM-17]-OMe

ES 2 964 378 T3

$C_{38}H_{48}N_5O_7Cl_1$

722,280 g/mol.

5 ^{13}C -NMR: (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 172,3, 172,2, 171,6, 171,6, 171,1, 170,5, 170,46, 170,2, 169,4, 168,2, 167,2, 166,7, 135,4, 134,9, 134,7, 134,6, 132,2, 132,1, 131,8, 131,5, 131,0, 130,9, 130,7, 130,1, 129,6, 129,4, 128,5, 126,8, 126,6, 125,5, 123,1, 77,4, 77,0, 65,5, 64,6, 60,3, 60,2, 59,6, 59,2, 57,1, 56,4, 52,2, 52,1, 51,5, 51,5, 50,6, 50,4, 48,7, 47,5, 43,3, 42,4, 42,4, 42,2, 41,2, 38,3, 38,0, 36,2, 31,5, 31,0, 29,8, 28,2, 25,1, 24,1, 23,4, 23,3, 23,2, 22,8, 22,2, 21,9, 21,9, 14,3.

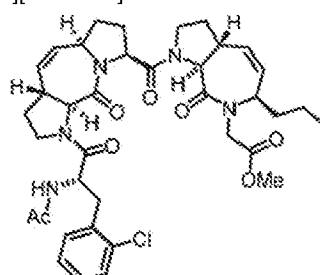
10

HR-MS (ESI):

	masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
15	722,3315 [M+H] ⁺	722,3320 [M+H] ⁺	+ 0,75
	744,3134 [M+Na] ⁺	744,3132 [M+Na] ⁺	- 0,28

Datos característicos de Ac-[l-2Cl-F][ProM-1][ProM-21]-OMe

20



25

Ac-[l-2Cl-F][ProM-1][ProM-21]-OMe

30 $C_{37}H_{46}N_5O_7Cl_1$.

708,253 g/mol.

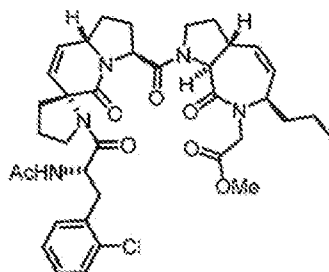
35 ^{13}C -NMR: (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 172,2, 171,1, 171,0, 170,9, 170,5, 170,5, 169,6, 168,8, 168,7, 168,7, 135,1, 134,8, 134,7, 134,6, 132,2, 132,0, 130,9, 130,8, 130,8, 130,7, 130,0, 129,5, 129,5, 129,2, 128,8, 128,6, 128,0, 127,9, 126,9, 126,8, 77,4, 62,8, 62,3, 60,2, 59,1, 59,0, 59,0, 58,1, 58,0, 53,6, 52,1, 52,1, 51,6, 50,5, 47,9, 47,7, 46,9, 43,3, 42,4, 42,0, 40,6, 37,0, 35,4, 33,3, 33,2, 31,8, 31,1, 31,0, 29,9, 27,3, 23,5, 23,2, 23,1, 20,4, 14,0.

40 HR-MS (ESI):

	masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
40	708,3158 [M+H] ⁺	708,3165 [M+H] ⁺	+ 0,95
	730,2978 [M+Na] ⁺	730,2972 [M+Na] ⁺	- 0,75

45 Datos característicos de Ac-[l-2Cl-F][ProM-2][ProM-21]-OMe

50



55

Ac-[l-2Cl-F][ProM-2][ProM-21]-OMe

$C_{37}H_{46}N_5O_7Cl_1$.

60 708,253 g/mol.

65 ^{13}C -NMR: (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 172,2, 172,1, 171,7, 171,5, 171,3, 171,1, 170,4, 170,2, 169,3, 167,1, 166,6, 135,4, 134,9, 134,6, 134,5, 132,0, 131,8, 131,5, 131,1, 130,6, 130,1, 129,5, 129,4, 128,5, 126,7, 126,5, 125,5, 123,0, 77,4, 77,2, 76,9, 65,5, 64,6, 60,3, 60,2, 59,6, 59,2, 57,0, 56,4, 56,3, 53,7, 53,6, 52,9, 52,2, 52,1, 50,6, 50,3, 48,7, 48,7, 47,5, 43,2, 43,1, 42,3, 41,5, 41,2, 38,5, 38,3, 38,0, 36,2, 35,3, 32,1, 31,4, 31,2, 31,1, 29,8, 28,6, 28,2, 24,1, 23,3, 23,2, 22,8, 22,2, 20,3, 19,8, 14,0, 14,0.

ES 2 964 378 T3

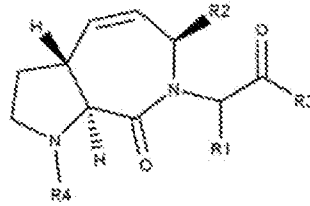
HR-MS (ESI):

	masa exacta [u]	masa medida [u]	error [ppm]
5	708,3158 [M+H] ⁺	708,3162 [M+H] ⁺	+ 0,56
	730,2978 [M+Na] ⁺	730,2974 [M+Na] ⁺	- 0,44

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula I:

5



10

en donde

15

R1: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,

R2: alquilo, arilo, alcoxialquilo, cicloalquilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, arilalquilo, fluoroalquilo.

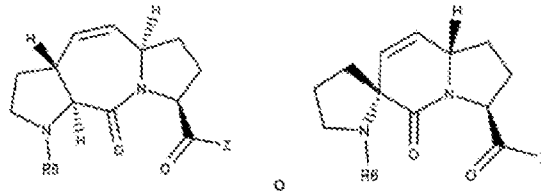
R3: OH, alquilo, O-alquilo, O-arilo, NRR' (R, R': H o alquilo), NROR' (R, R': H, alquilo), heteroarilo,

20

R4: H, alquilo, acilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, o R5, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,

R5:

25



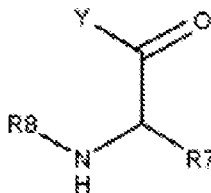
30

Z: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula I,

R6: H, alquilo, arilo, cicloalquilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, arilalquilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos, o

35

40



45

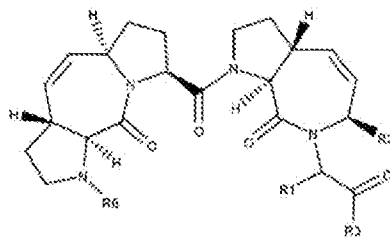
Y: enlace a la estructura de acuerdo con R5,

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,

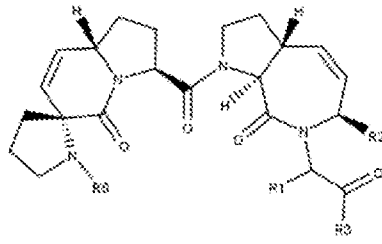
50

R8: H, alquilo, arilo, acilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de acuerdo con la fórmula II-a o la fórmula II-b:



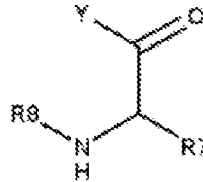
fórmula II-a



fórmula II-b

en donde

R1: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,
 R2: alquilo, arilo, alcoxialquilo, cicloalquilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, arilalquilo, fluoroalquilo,
 R3: OH, alquilo, O-alquilo, O-arilo, NRR' (R, R': H o alquilo), NROR' (R, R': H, alquilo), heteroarilo,
 R6: H, alquilo, arilo, cicloalquilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, arilalquilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos, o

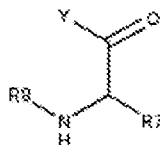


Y: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula II-a o II-b,

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,
 R8: H, alquilo, arilo, acilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilheteroarilo, alquilcarbonilo, arilalquilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminoacilo y/o peptidilo, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos.

3. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque R1: un residuo R de un aminoácido que se deriva de un aminoácido de configuración D o L natural (canónico) o no natural.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado porque
 - R2: CH₂OMe, CH₂SMe, CH₂CH₂OR, CH₂CH₂SR (R: alquilo C1-C4 o H), bencilo, CH₂ bencilo o CH₂CH₂ bencilo,
 - R2: Alquilo C1-C4, preferentemente metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo,
 - R2: metilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo.
5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cuando R3: OH, el compuesto tiene forma de una sal.
6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque R4, R6: pueden ser iguales o diferentes, H, alquilo, arilo, acilo, peptidilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilo, donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque

R6:



Y: enlace a la estructura de acuerdo con la fórmula II-a o II-b,

R7: H, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, aminoalquilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, mercaptoalquilo, sulfidoalquilo, preferentemente un residuo R de un aminoácido, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos,

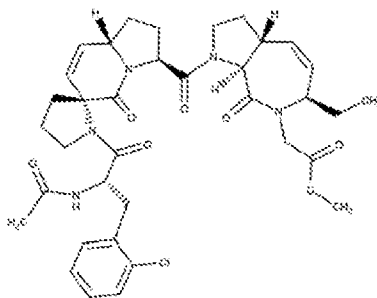
R8: H, alquilo, arilo, acilo, peptidilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilo, en donde dichos residuos están opcionalmente sustituidos.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque R7: es CH₂-arilo, en particular -CH₂-fenilo sustituido, en donde el sustituyente está situado en la posición orto del grupo fenilo, preferentemente en donde el sustituyente es halógeno, en particular Cl.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque R6: N-acil-(2-clorofenil)alaninoilo.

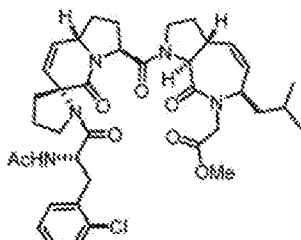
10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde opcionalmente sustituido significa que uno o más átomos de hidrógeno del grupo hidrocarbonado están reemplazados por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno (preferentemente flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, amina (preferentemente -NH₂, -NHCH₃), -NO₂ y -alquilo, en donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; preferentemente en donde están presentes 1, 2, 3 o 4 sustituyentes opcionales.

11. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de acuerdo con la fórmula III:

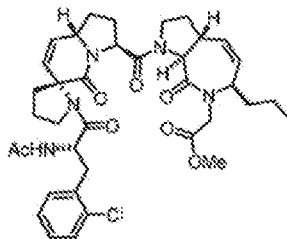


fórmula III

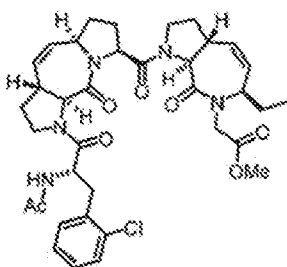
12. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de acuerdo con la fórmula IV, V, VI, VII u VIII:



fórmula IV

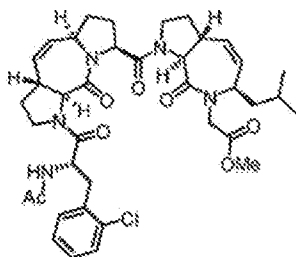


fórmula V



fórmula VI

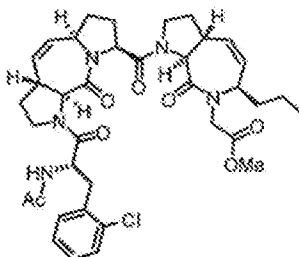
5



10

fórmula VII

15



20

fórmula VIII

13. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, preferentemente con un portador farmacéuticamente aceptable.
14. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, preferentemente en donde la enfermedad tumoral es cáncer de mama.
15. El compuesto o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, caracterizado porque el compuesto inhibe la metástasis de un tumor.

Figura 1

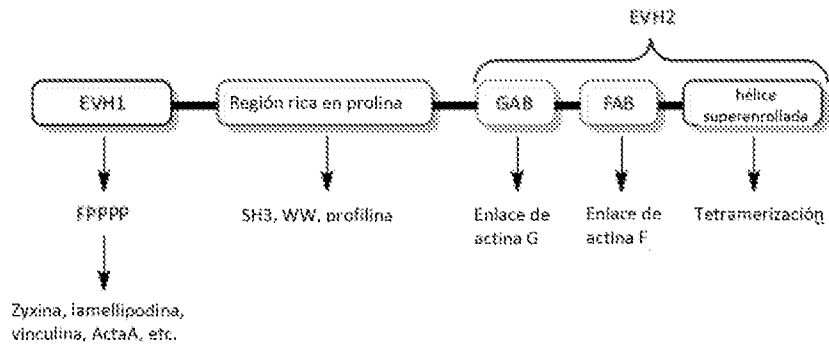


Figura 2

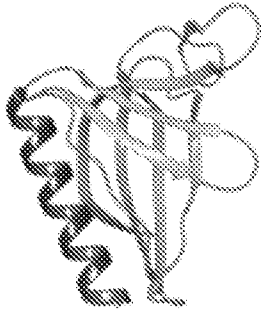


Figura 2.B:
dominio de Ena/VASP-EVH1⁴

Figura 3

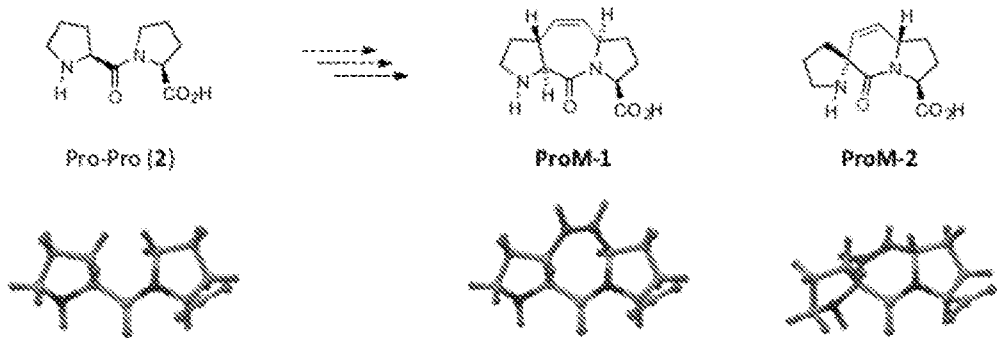


Figura 4

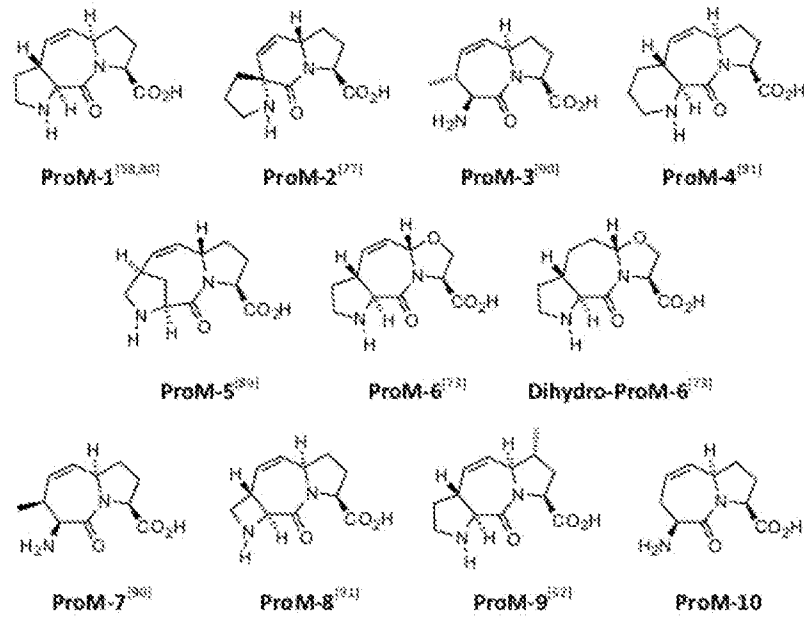


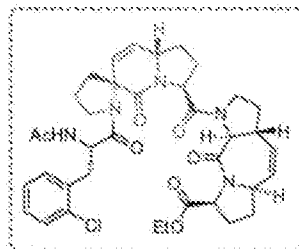
Figura 5

Ac-SFE-FPPPP-TEDEL-NH₂ (40)

$K_d = 20 \mu\text{M}$; $LE = -0,2 \text{ kJ/mol}$; 1546-Da

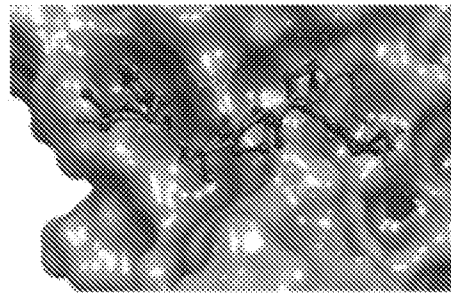
ProMs como
análogos de Pro-Pro

Estudios de unión,
rayos X y modelado



Ac-[L-2Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OEt (44)

$K_d = 9,4 \mu\text{M}$; $LE = -0,6 \text{ kJ/mol}$; 706-Da



Ac-SFE-[L-2Cl-F][ProM-2][ProM-1]-TEDEL-NH₂ (41)

$K_d = 0,6 \mu\text{M}$; $LE = -0,3 \text{ kJ/mol}$

Ac-FPPPP-OH (42)

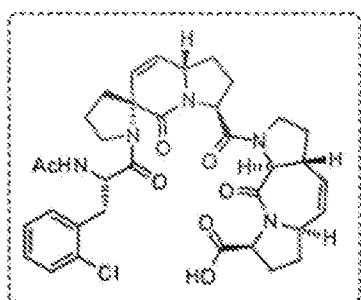
$K_d = 1300 \mu\text{M}$; 596-Da

Ac-[L-2Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OH (43)

$K_d = 4 \mu\text{M}$; $LE = -0,7 \text{ kJ/mol}$; 678-Da

Introducción de solo cinco átomos pesados adicionales!

Figura 6



Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (43)

Figura 7

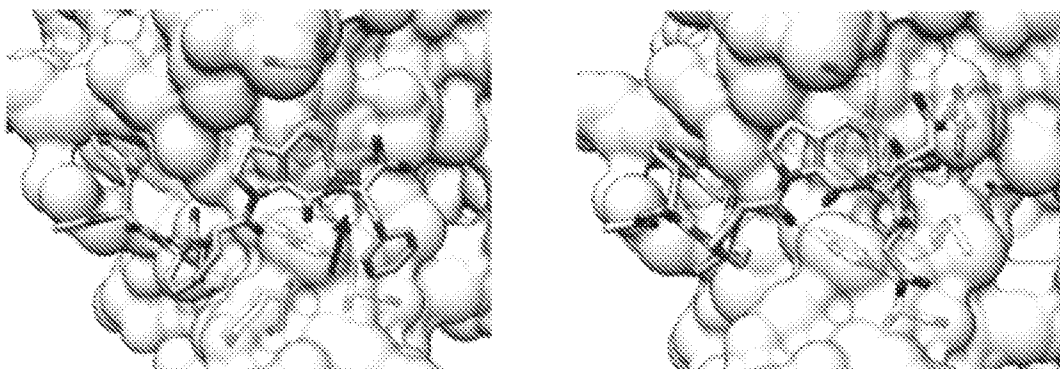
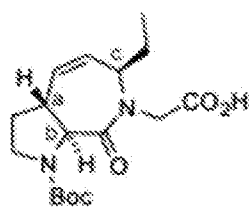
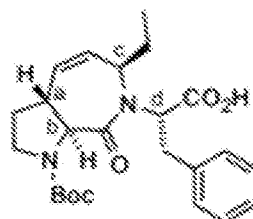


Figura 8

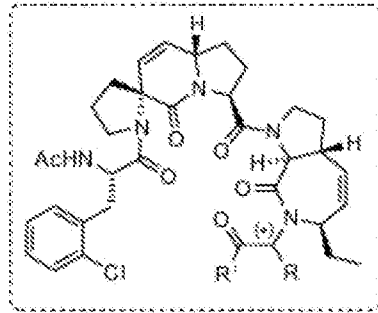


Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OH



Boc-R,S,R,S-Phe-[ProM-15]-OH

Figura 9



Ac-[L-2Cl-F]-[ProM-2]-[ProM-15]-R' (115)

Figura 10

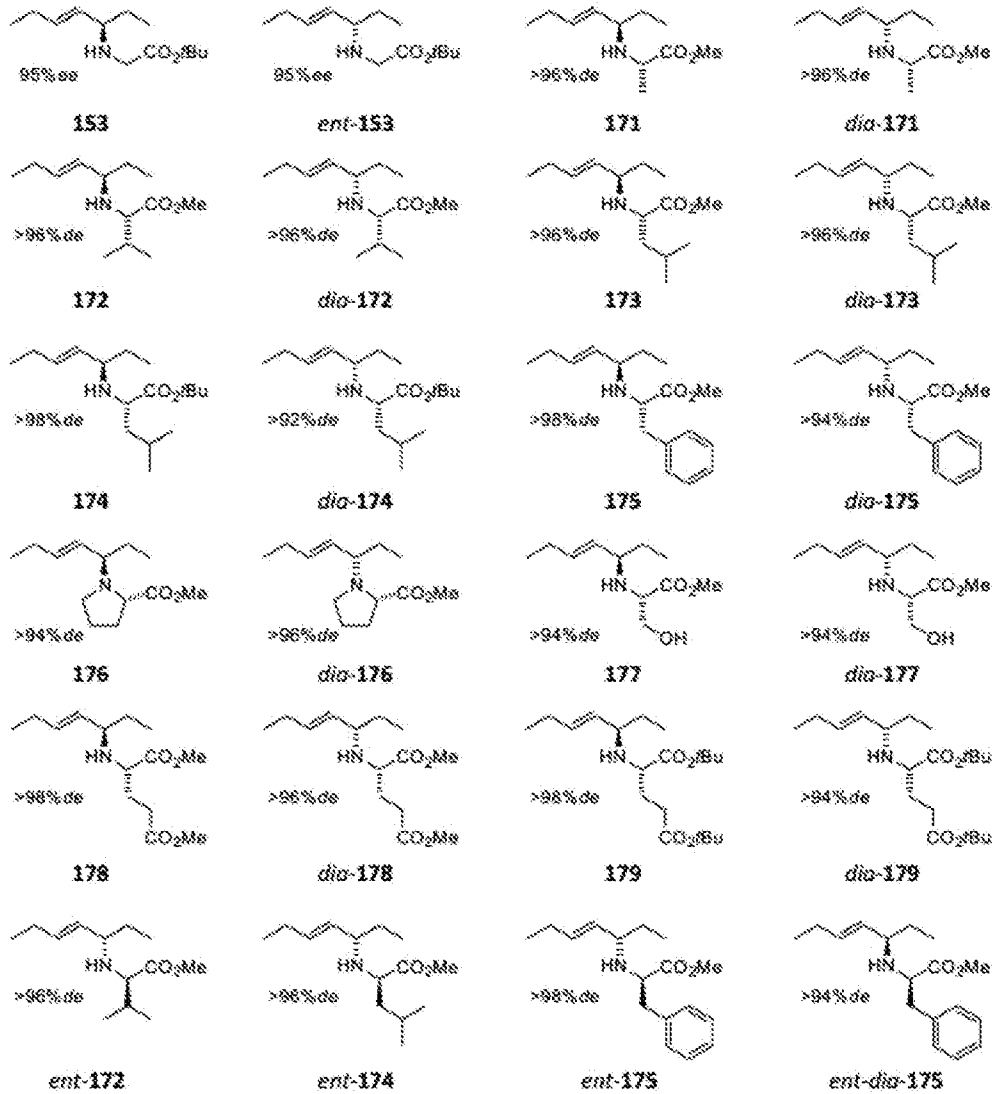
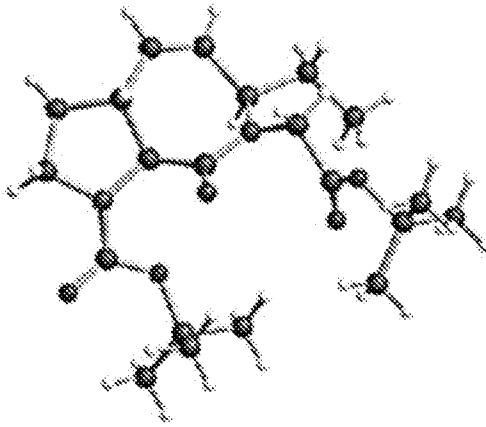
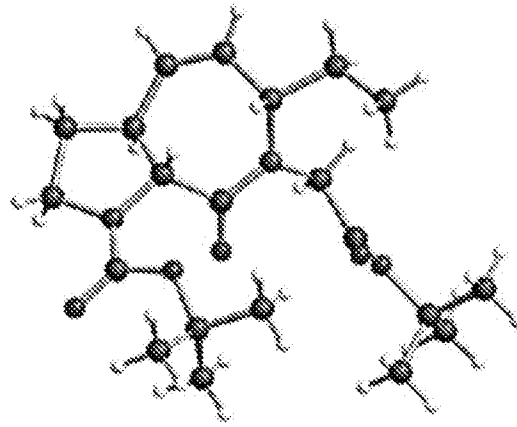


Figura 11

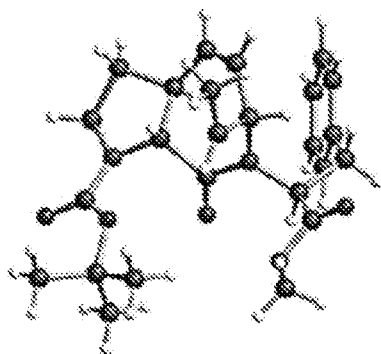


Boc-R,S,R-Gly-[ProM-15]-OtBu

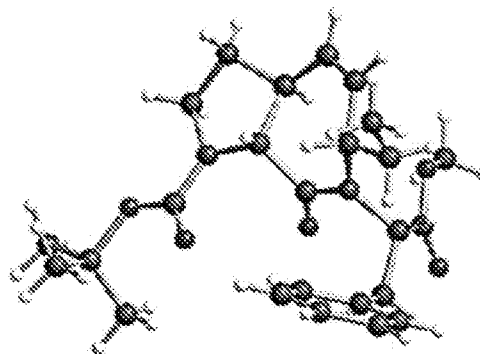


Boc-S,R,S-Gly-[ProM-15]-OtBu

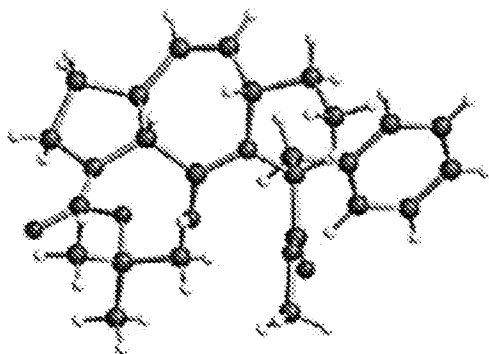
Figura 12



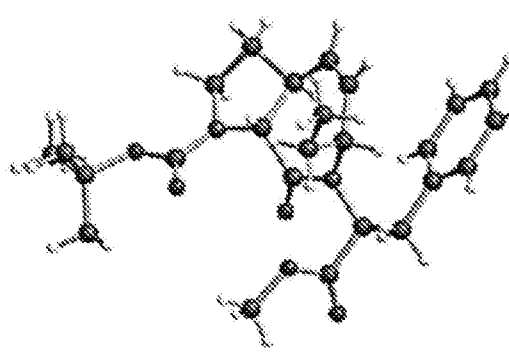
Boc-S,R,R,S-Phe-[ProM-15]-OMe



Boc-S,R,S,S-Phe-[ProM-15]-OMe



Boc-S,R,S,R-Phe-[ProM-15]-OMe



Boc-S,R,R,R-Phe-[ProM-15]-OMe

Figura 13

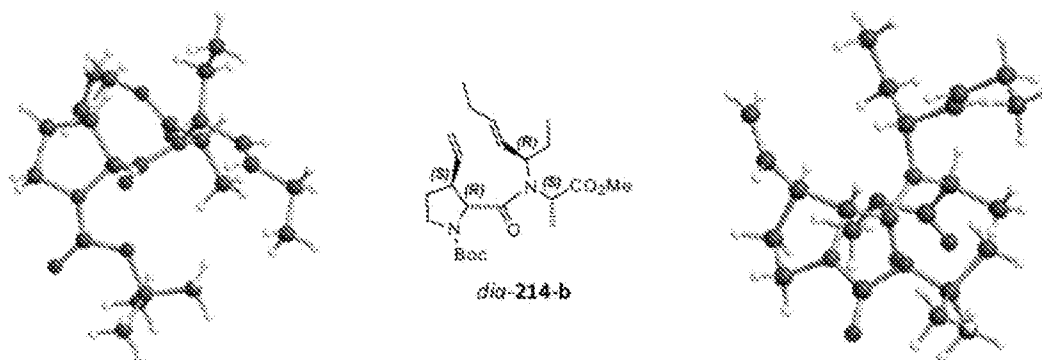


Figura 14

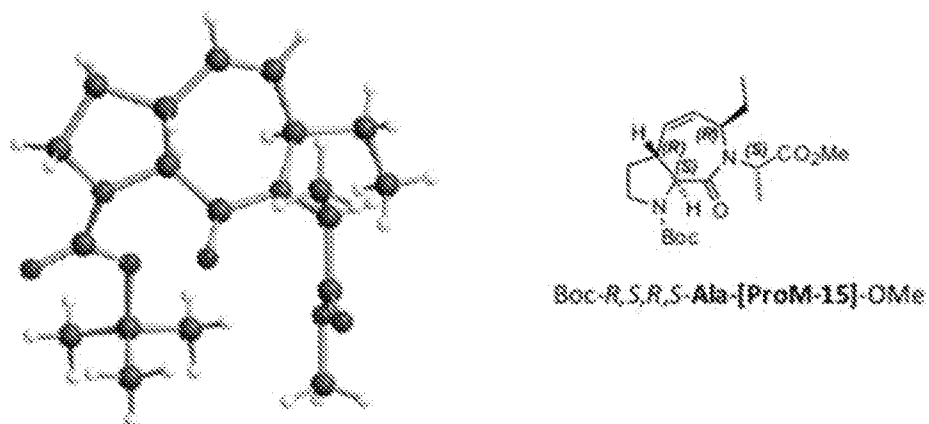


Figura 15

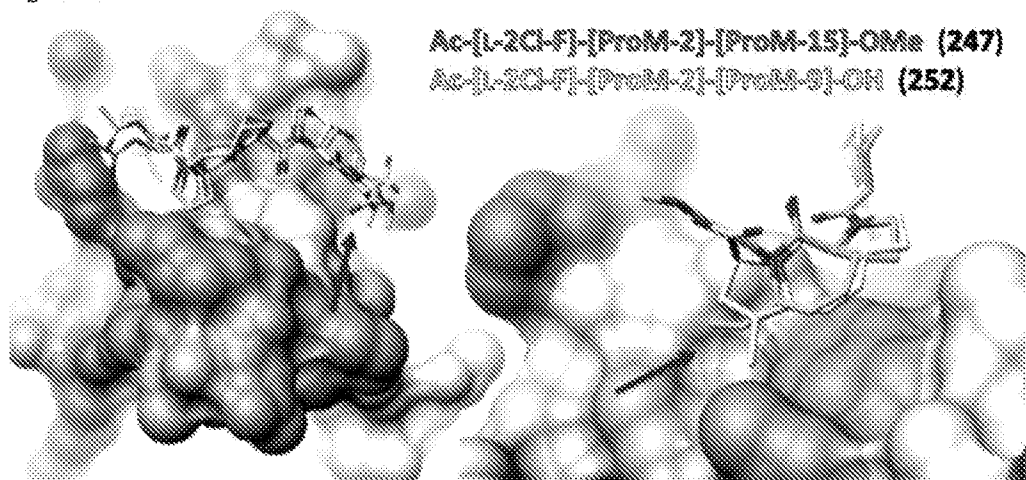


Figura 16:

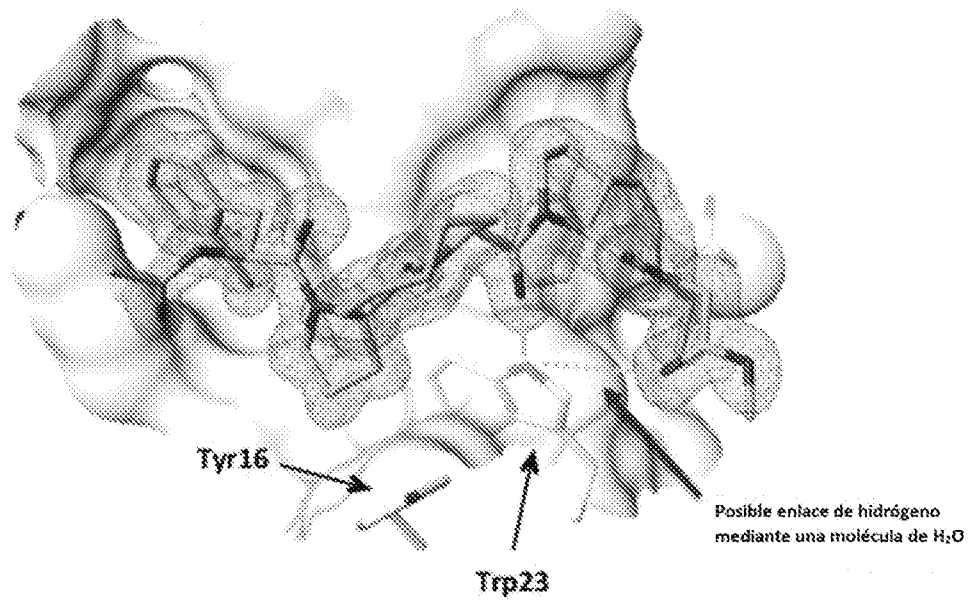


Figura 17

