

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 210**

51 Int. Cl.:

C07D 513/08 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

A61K 31/427 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2017 PCT/US2017/025448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17173313**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2017 E 17776804 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 3436007**

54 Título: **Derivados de beta-amino pataamina A y procedimientos para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica**

30 Prioridad:

31.03.2016 US 201662316299 P

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

01.06.2022

73 Titular/es:

**THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (100.0%)
3369 Tamu College Station
Bryan, Texas 77843-3369, US**

72 Inventor/es:

**ROMO, DANIEL;
HULL, KENNETH;
ZHU, MINGZHAO y
ROBLES, OMAR**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 913 210 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de beta-amino pateamina A y procedimientos para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a derivados de β -amino pateamina A, tal como se reivindican, y los mismos para su uso en procedimientos para tratar la leucemia linfocítica crónica utilizando los derivados de β -amino pateamina A.

10

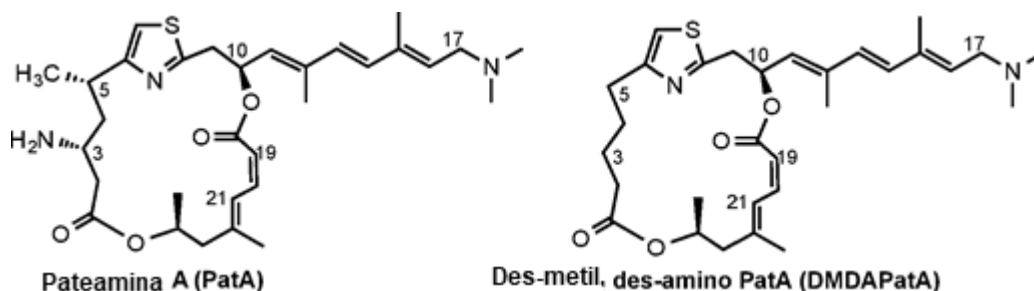
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se han desarrollado nuevas terapias efectivas contra el cáncer basadas en agentes con mecanismos de acción novedosos que se dirigen especialmente a la fisiopatología de tumores malignos. La mayoría de estas enfermedades muestran un defecto pronunciado en mecanismos de muerte celular de linfocitos normales debido a la sobreexpresión de proteínas prosupervivientes. Ahora se reconoce que un aspecto crítico del metabolismo de tumores malignos de células B se dirige al reabastecimiento de las proteínas prosupervivientes que evitan que estas células mueran por apoptosis. Esto es necesario debido a motivos de secuencias intrínsecas de la estructura de proteína primaria de estas proteínas prosupervivientes, señal para la rotación rápida de estas proteínas (por ejemplo, Mcl-1, XIAP). Esto es un sello de la fisiopatología de tumores malignos de células B. De manera importante, incluso la inhibición transitoria de la traducción disminuye rápidamente estas proteínas clave hasta un nivel que no puede prevenir la apoptosis. Una vez iniciado, este proceso letal es irreversible. Debido a que las células linfoides normales no muestran esta dependencia, parece que las células de CLL son «adictas» a la expresión continua de las proteínas antiapoptóticas para la supervivencia.

25

[0003] La Pateamina A (PatA) se aisló inicialmente de la esponja marina *Mycale sp.* mediante fraccionamiento guiado por bioensayo basado en su actividad citotóxica contra células de leucemia murinas P388 (IC_{50} , 0,27 nmol/l). En concordancia con su citotoxicidad, posteriormente se mostró que PatA inducía la apoptosis en varias líneas celulares de cáncer. Des-metil, des-amino Pateamina A (DMDAPatA) es un análogo simplificado del producto natural que es más fácil de sintetizar y un agente antiproliferativo potente *in vitro* contra >30 líneas celulares de cáncer humano.

30



[0004] PatA y DMDAPatA inhiben el inicio de la traducción dependiente de cap mediante la secuenciación de eIF4A que previene la formación del complejo eIF4F o mediante la paralización del complejo de iniciación en ARNm. Los estudios con xenoinjertos en ratones mostraron que DMDAPatA tiene alta actividad en modelos de leucemia y melanoma humano, lo que conduce a una reducción significativa de tumor, demostrando así una buena biodisponibilidad. La síntesis de > 20 derivados de PatA condujo a la identificación de DMDAPatA que también se encontró que era significativamente más estable que el producto natural. La sobreexpresión de proteína resistente a multifármacos no afectó a esta actividad. De manera importante, la DMDAPatA reduce los niveles de proteínas antiapoptóticas con vida intrínsecamente corta en células de CLL primarias e inicia apoptosis. Sin embargo, los datos preliminares sobre DMDAPatA sugieren que se une fuertemente a proteínas en plasma humano y puede carecer de potencia *in vivo* suficiente necesaria para el desarrollo como agente terapéutico eficaz.

35

40

45

[0005] Aunque PatA y DMDAPatA parecen ser candidatos atractivos para el desarrollo de agentes terapéuticos, existe la necesidad de derivados de PatA mejorados que tengan eficacia terapéutica, baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas ventajosas. La presente invención busca cubrir estas necesidades y proporciona ventajas relacionadas adicionales. El documento US7230021B2 describe derivados de pateamina A. Low et al. (Bioorg Med Chem. 2014 Enero 1;22(1):116-25) describe derivados de la pateamina A que reconocen eIF4A como agentes contra el cáncer potenciales. Polakis et al. (Pharmacol Rev. Enero de 2016 68:3-9) describe conjugados anticuerpo-fármaco para la terapia contra el cáncer.

50

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55

[0006] Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas relacionadas de la presente invención se entenderán con más facilidad a medida que se entiendan mejor con referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se considera en conjunto con los dibujos que la acompañan.

FIGURA 1 es una ilustración esquemática de la preparación de un intermedio sintético útil en la preparación de derivados de amida de β -amino pateamina A representativos de la presente invención.

FIGURA 2 es una ilustración esquemática de la preparación de derivados de amida de β -amino pateamina de la presente invención.

FIGURA 3A es un diagrama de flujo que muestra el mecanismo de acción de DMDAPatA en un estudio de múltiples CLL primarias.

FIGURA 3B muestra la inhibición por DMDAPatA de la síntesis de proteínas medida mediante la incorporación de [3 H]leucina (incorporación de [3 H]leucina como porcentaje de control en función de la concentración de DMDAPatA).

FIGURA 3C muestra que DMDAPatA reduce la proteína antiapoptótica de vida corta Mcl-1 y no afecta al nivel de Bcl-2.

FIGURA 3D muestra que la eliminación de Mcl-1 con DMDAPatA induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), tal como se demuestra mediante la pérdida de unión del colorante catiónico DiOC6.

FIGURA 3E compara el porcentaje de supervivencia de CLL en función de la concentración de DMDAPatA.

FIGURA 4A compara los valores de IC_{50} de DMDAPatA (muestras de pacientes con CLL con características de pronóstico favorable o desfavorable) que no muestran diferencias importante entre las muestras en cada grupo.

FIGURA 4B muestra un análisis de reducción de la dosis y compara los valores IC_{50} , IC_{75} y IC_{90} de DMDAPatA y ABT-199, indicando una potenciación mutua.

FIGURA 5 compara la potencia de DMDAPatA con su compuesto original PatA que muestra que DMDAPatA era aproximadamente 30 veces menos potente que PatA. Estos experimentos se realizaron en células de CLL cultivadas en un medio suplementado con 10% de plasma de paciente.

FIGURA 6 compara las estructuras químicas de un derivado de α -amino (2-amino) pateamina A representativo (variante de alfa-amino) y un derivado de β -amino (3-amino) pateamina A representativo (variante de beta-amino).

FIGURAS 7A y 7B comparan la potencia de células de CLL primarias y la unión a proteína plasmática para un derivado de pateamina A representativo (OR-IV-234) con PatA y DMDAPatA como controles para células de CLL cultivadas en un medio suplementado con 10% de FBS o plasma de paciente. El porcentaje de supervivencia en función de la concentración de derivado se muestra en la FIGURA 7A. Los resultados de IC_{50} y unión de proteínas se resumen en la FIGURA 7B.

FIGURAS 8A y 8B comparan la potencia de células de CLL con células B y T de donantes normales (sanos) para un derivado de pateamina A representativo (OR-IV-234) con PatA y DMDAPatA como controles. El porcentaje de supervivencia en función de la concentración de derivado se muestra en la FIGURA 8A y los valores de IC_{50} se resumen en la FIGURA 8B.

FIGURAS 9A y 9B muestran la inhibición de la síntesis de proteínas (análisis de incorporación de leucina) para un derivado de pateamina A representativo (OR-IV-234)

(FIGURA 9A) y comparado con DMDAPatA y PatA. Todos los derivados que demostraron una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas y la reducción del nivel de Mcl-1 se confirmó mediante inmunotransferencias (FIGURA 9B). La apoptosis se demostró mediante la reducción de la supervivencia de células de CLL mostrada por debajo de las inmunotransferencias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0007] La presente invención se define en las reivindicaciones.

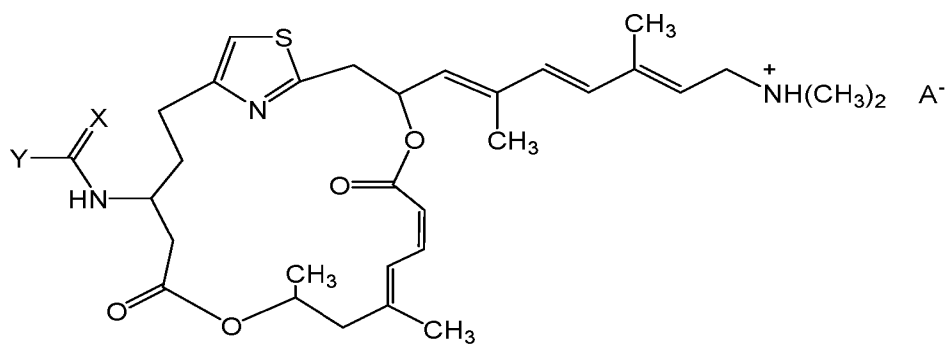
[0008] La presente invención da a conocer derivados de β -amino pateamina A, tal como se reivindican, composiciones farmacéuticas que incluyen los derivados y los derivados para su uso en los procedimientos, tal como se reivindican.

[0009] Los compuestos de la presente invención son análogos simplificados de pateamina A que carecen del grupo metilo C5. Los compuestos de la presente invención son derivados de β -amino (3-amino) pateamina A.

[0010] Los compuestos de la presente invención son derivados de la pateamina A inhibidora de traducción y como derivados de pateamina A, se espera que los compuestos de la presente invención proporcionen efectos anticancerígenos y antiproliferativos mediante la inhibición del inicio de traducción dependiente de eIF4A.

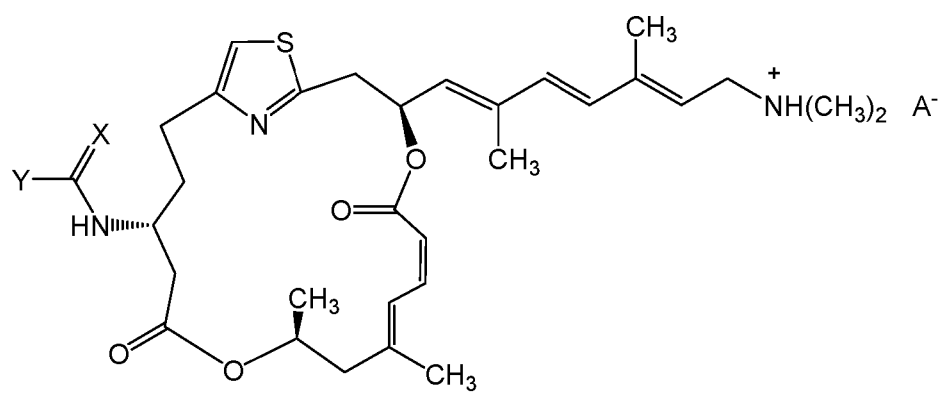
[0011] Los compuestos de la presente invención muestran una potente actividad inhibitoria contra células de leucemia linfocítica crónica (CLL) y unión de proteínas plasmáticas (PPB) en plasma humano. La combinación de potencia y baja PPB hace que los compuestos sean candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de CLL.

[0012] La inhibición de traducción en células de CLL tiene el potencial para el desarrollo clínico de terapias para neoplasias de células B y para superar la resistencia a fármacos de agentes terapéuticos estándar de atención. Las CLL refractarias en recidiva sigue siendo un problema clínico asociado a la supervivencia general deficiente. Debido a su modo único de acción, la inhibición de traducción y la biosíntesis de proteínas, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para combatir formas resistentes de CLL.



15 en la que X e Y son tal como se describen anteriormente para las fórmulas (I) y (II), y A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable. Los contraiones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, oxalato, citrato, malato, benzoato, toluenosulfonato, metanosulfonato y bencenosulfonato.

20 **[0017]** En una realización, las sales representativas de la presente invención tienen la fórmula (IV):



40 en la que X e Y son tal como se describen anteriormente para las fórmulas (I) y (II), y A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable. Los contraiones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, oxalato, citrato, malato, benzoato, toluenosulfonato, metanosulfonato y bencenosulfonato.

45 **[0018]** Para los compuestos de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV), los grupos alquilo C1-C6 incluyen grupos de cadena lineal (es decir, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo y n-hexilo), ramificada (por ejemplo, s-propilo, s-butilo, t-butilo, s-pentilo y s-hexilo) y cicloalquilo (es decir, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo);
 grupos haloalquilo C1-C6 que incluyen grupos alquilo C1-C6 que se sustituyen adicionalmente con uno o más grupos halo (por ejemplo, flúor o cloro) (por ejemplo, trifluorometilo o triclorometilo);
 grupos arilo C6-C10 que incluyen grupos fenilo sustituidos opcionalmente con uno o más grupos alquilo (por ejemplo, metilo, etilo);
 50 grupos alquilo C3-C12 hacen referencia a grupos alquilo C3-C12 en los que uno o más carbonos están reemplazados por átomos de O o N que incluyen grupos que contienen éter y grupos que contienen amina que pueden transmitir una mayor solubilidad en agua a los compuestos. Los grupos representativos que contienen éter incluyen -CH₂-O-CH₃, -CH₂CH₂-O-CH₃ y -CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₃. Los grupos representativos que contienen amina incluyen -CH₂-NH-CH₃, -CH₂-N(CH₃)₂, -CH₂CH₂-NH-CH₃ y -CH₂CH₂-N(CH₃)₂.

55 **[0019]** La presente invención da a conocer los compuestos de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV) que incluyen las siguientes realizaciones:

X es O e Y es R (amidas), en determinadas de estas realizaciones, R es metilo, trifluorometilo o t-butilo;

X es O e Y es OR¹ (carbamatos), en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo;

60 X es O e Y es N(R¹)R² (ureas), en determinadas de estas realizaciones, R¹ es hidrógeno y R² es hidrógeno o R¹ es hidrógeno y R² es metilo;

X es O e Y es SR¹, en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo;

X es S e Y es R (tioamidas), en determinadas de estas realizaciones, R es metilo;

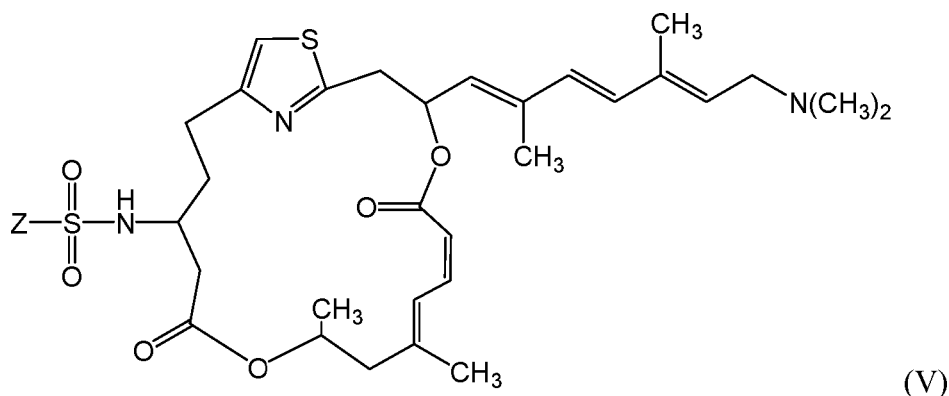
X es S e Y es OR¹ (tiocarbamatos), en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo;

65 X es S e Y es N(R¹)R² (tioureas), en determinadas de estas realizaciones, R¹ es hidrógeno y R² es hidrógeno o R¹ es hidrógeno y R² es metilo;

X es S e Y es SR¹, en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo;
 X es NH e Y es R, en determinadas de estas realizaciones, R es metilo, trifluorometilo o t-butilo;
 X es NH e Y es OR¹, en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo;
 X es NH Y es N(R¹)R², en determinadas de estas realizaciones, R¹ es hidrógeno y R² es hidrógeno o R¹ es hidrógeno y R² es metilo; y
 X es NH Y es SR¹, en determinadas de estas realizaciones, R¹ es metilo o t-butilo.

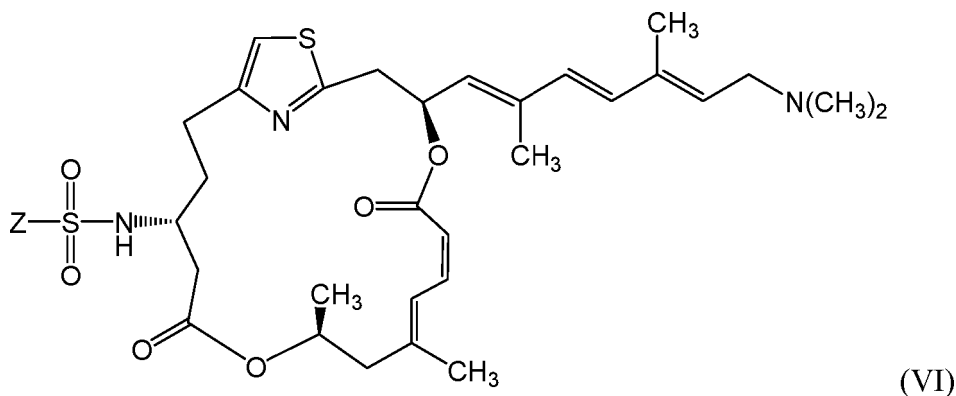
[0020] La preparación de derivados de amida de β-amino pateamina A representativos de la presente invención se describe en el Ejemplo 1 y se ilustra en la FIGURA 1 (preparación del intermedio sintético 9) y la FIGURA 2 (preparación de derivados de amida de β-amino pateamina A representativos 13 (OR-IV-211), 14 (MZ732) y 15 (OR-IV-234).

[0021] En otra realización, la presente invención da a conocer derivados de pateamina A que tienen la fórmula (V), estereoisómeros, racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



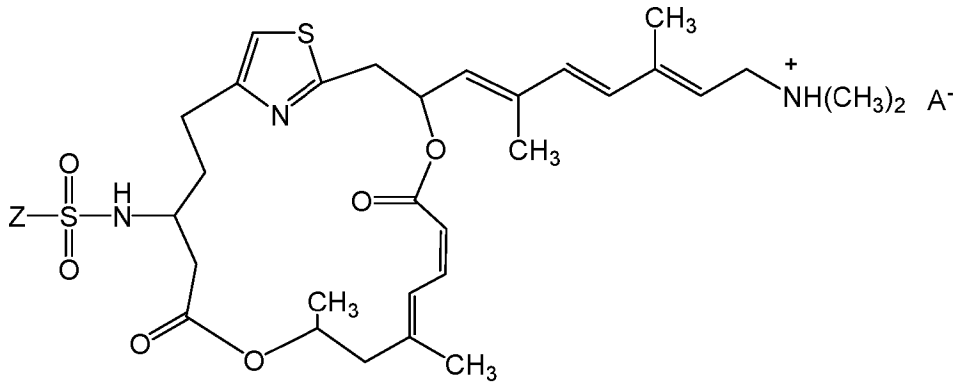
en la que
 Z se selecciona entre R y OR¹, en donde R y R¹ son tales como se describen anteriormente para las fórmulas (I)-(IV).

[0022] En determinadas realizaciones, la presente invención da a conocer derivados de pateamina A que tienen la fórmula (VI) y racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



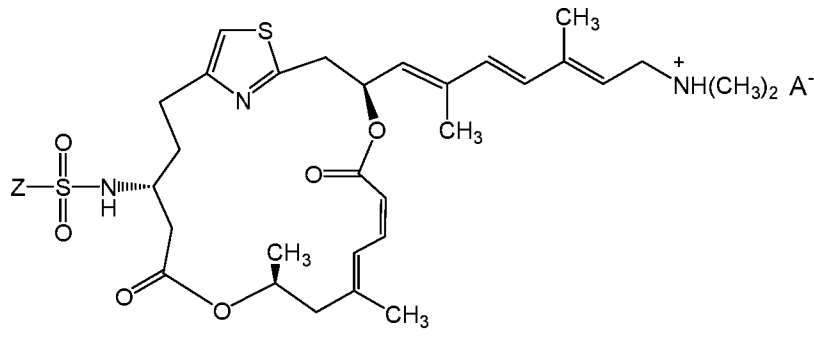
en la que Z es tal como se describe anteriormente para la fórmula (V).

[0023] Las sales representativas de la presente invención incluyen aquellas que tienen la fórmula (VII):



15 en la que Z es tal como se describe anteriormente para la fórmula (V) y A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable. Los contraiones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, oxalato, citrato, malato, benzoato, toluenosulfonato, metanosulfonato y bencenosulfonato.

20 **[0024]** En una realización, las sales representativas de la presente invención tienen la fórmula (VIII):



35 en la que Z es tal como se describe anteriormente para la fórmula (V) y A⁻ es tal como se describe anteriormente para la fórmula (VII).

40 **[0025]** La presente invención da a conocer los compuestos de las fórmulas (V), (VI), (VII) y (VIII) que incluyen las siguientes realizaciones:

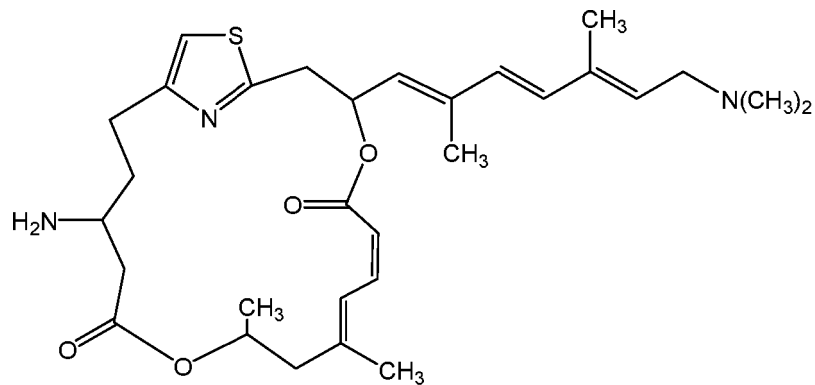
Z es alquilo C1-C6 (por ejemplo, metilo);

Z es haloalquilo C1-C6 (por ejemplo, trifluorometilo);

Z es arilo C6-C10 (por ejemplo, fenilo); y

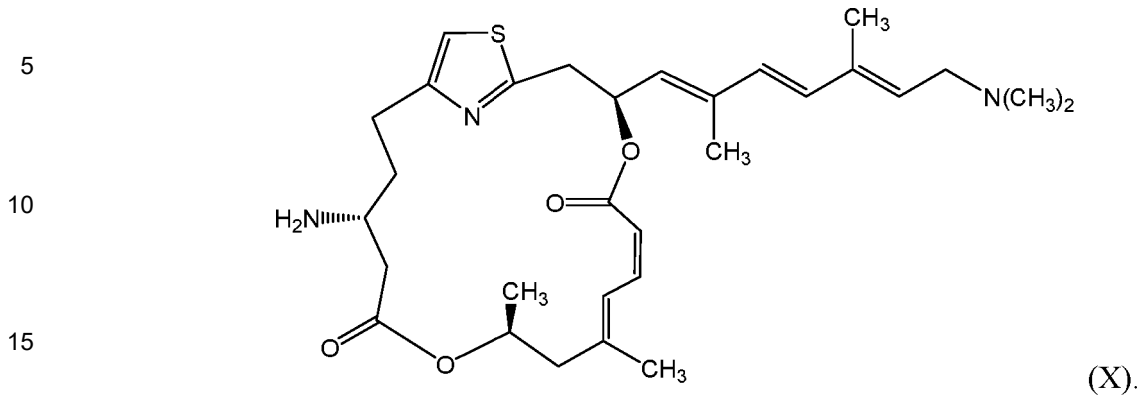
Z es alquilo C3-C12 en el que uno o más carbonos están reemplazados por átomos de O o N (por ejemplo, -CH₂-O-CH₃, -CH₂CH₂-O-CH₃, y -CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₃, o -CH₂-NH-CH₃, -CH₂-N(CH₃)₂, -CH₂CH₂-NH-CH₃ y -CH₂CH₂-N(CH₃)₂).

50 **[0026]** En una realización, la presente invención da a conocer derivados de pateamina A que tienen fórmula (IX) y estereoisómeros, racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

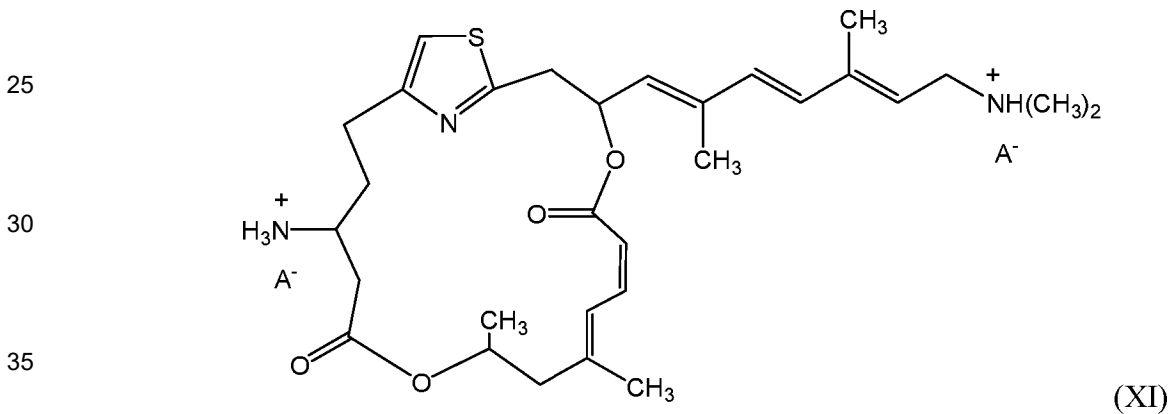


65 **[0027]** En otra realización, la presente invención da a conocer derivados de pateamina A que tienen la fórmula (X) y

racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

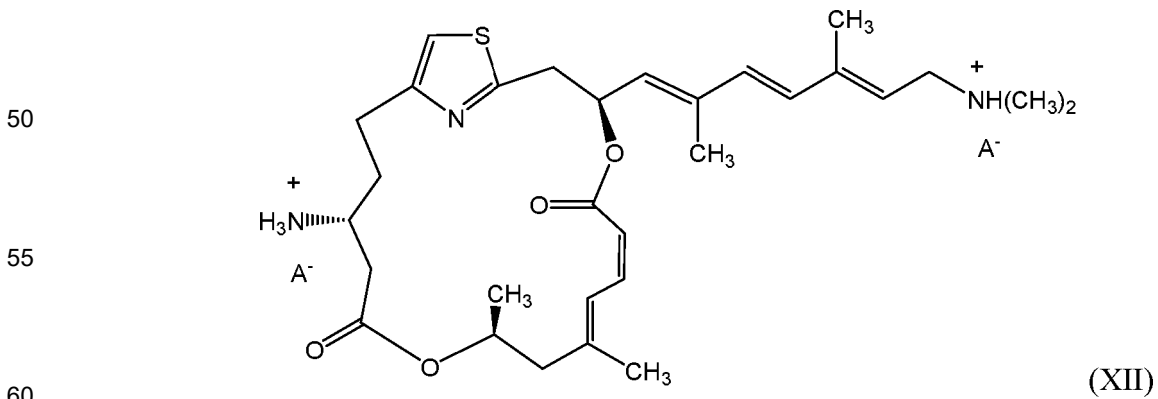


20 **[0028]** Las sales de amina libres representativas de la presente invención incluyen aquellas que tienen la fórmula (XI):



40 en la que A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable. Los contraiones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, oxalato, citrato, malato, benzoato, toluenosulfonato, metanosulfonato y bencenosulfonato. En una realización, A⁻ es formiato.

45 **[0029]** En una realización, las sales representativas de la presente invención tienen la fórmula (XII):



en la que A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable. Los contraiones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, oxalato, citrato, malato, benzoato, toluenosulfonato, metanosulfonato y bencenosulfonato. En una realización, A⁻ es formiato.

65 **[0030]** Los derivados de β-amino pateamina de la presente invención (es decir, los compuesto de las fórmulas (I)-

(VIII)) pueden prepararse haciendo reaccionar el grupo 3-amino (es decir, grupo β -amino) del macrociclo con un reactivo reaccionante adecuado (por ejemplo, reactivo que acila en N o que sulfona en N) para proporcionar una variedad de derivados de β -amino pateamina.

- 5 **[0031]** Los derivados de amina libre de β -amino pateamina de la presente invención (es decir, los compuestos de las fórmulas (IX)-(XII)) pueden prepararse tal como se describen en el Ejemplo 1.

Conjugados de Anticuerpos

- 10 **[0032]** En otro aspecto, la presente invención da a conocer conjugados anticuerpo-fármaco para el suministro de los derivados de β -amino pateamina de la presente invención. Los conjugados anticuerpo-fármaco se preparan fácilmente a partir de los derivados de β -amino pateamina utilizando química de conjugación conocida en la técnica. En determinadas realizaciones, los derivados de β -amino pateamina se conjugan con el anticuerpo a través del grupo 3-amino (es decir, grupo β -amino). En determinadas realizaciones, los derivados de β -amino pateamina se conjugan directamente con el anticuerpo. En determinadas realizaciones, los derivados de β -amino pateamina se conjugan con el anticuerpo a través de una unidad enlazadora.

- 15 **[0033]** En determinadas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco es un conjugado Anticuerpo-Enlazador-Fármaco de la fórmula: $Ab-(LU-D)_p$ o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde Ab es una unidad de anticuerpo, LU es una unidad enlazadora, D es una unidad de fármaco y p es un número entero de 1 a aproximadamente 20. Para los conjugados anticuerpo-fármaco, D incluye un derivado de β -amino pateamina de la presente invención. Las unidades enlazadoras adecuadas para los conjugados anticuerpo-fármaco son conocidas por los expertos en la técnica.

- 20 **[0034]** Los anticuerpos adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos o un fragmento de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, la unidad de anticuerpo comprende una región de unión a antígeno que se une a un antígeno diana.

- 25 **[0035]** En algunas realizaciones, una cantidad sustancial de la unidad de fármaco no se escinde del conjugado hasta que el conjugado entre en una célula con un receptor de la superficie celular específico para la unidad de anticuerpo, y la unidad de fármaco se escinde de la unidad de anticuerpo cuando el conjugado entra en la célula. En algunas realizaciones, una cantidad sustancial de la enlazador-unidad de fármaco no se escinde del conjugado hasta que el conjugado entre en una célula con un receptor de la superficie celular específico para la unidad de anticuerpo, y el enlazador-unidad de fármaco se escinde de la unidad de anticuerpo cuando el conjugado entra en la célula.

- 30 **[0036]** El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno de una diana de interés o una parte de la misma, incluyendo tales dianas, pero sin limitación, células cancerígenas. El anticuerpo puede ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD y IgA), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) de la molécula de inmunoglobulina. El anticuerpo puede derivar de cualquier especie. En un aspecto, el anticuerpo es de origen humano, murino o de conejo. En otro aspecto, el anticuerpo es policlonal, monoclonal, biespecífico, multiespecífico, humano, humanizado o un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen de manera inmuno-específica a un antígeno diana.

- 35 **[0037]** El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos (es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en menores cantidades). Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos cuando se dirigen contra un sitio antigénico único.

- 40 **[0038]** Los anticuerpos monoclonales incluyen de manera específica anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o una subclase de anticuerpos particulares, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de tales anticuerpos, que muestran la actividad biológica deseada. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivarse de la región variable de un anticuerpo de ratón y la región constante de un anticuerpo humano.

- 45 **[0039]** Un "fragmento de anticuerpo" hace referencia a una parte de un anticuerpo intacto, que típicamente comprende la región de unión a antígeno o variable de la misma. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; un scFv; una IgG Δ CH₂, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un dsFv; un sc-Fv-Fc; un (scFv)₂; un fragmento producido por una biblioteca de expresión Fab; un anticuerpo anti-idiotipo (anti-Id); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpo.

5 **[0040]** Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como también un dominio constante de cadena ligera (CO) y dominios constantes de cadena pesada, CHI, CH2 y CH3). Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

10 **[0041]** El término "diacuerpos" hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. Mediante la utilización de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

15 **[0042]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. De manera general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de como mínimo uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos de los FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente como mínimo una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

20 **[0043]** Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, humano-ratón u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden crearse utilizando cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en el sector.

25 **[0044]** El anticuerpo puede ser también un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes.

40 Composiciones Farmacéuticas

[0045] En otro aspecto, la presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de la presente invención (es decir, un compuesto de las fórmulas (I) - (XII)) y un portador farmacéuticamente aceptable.

45 **[0046]** La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas que incluyen un conjugado de anticuerpo de la presente invención (es decir, un conjugado de anticuerpo que suministra un compuesto de las fórmulas (I) - (XII)) y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 **[0047]** Los portadores adecuados incluyen aquellos para la administración a un animal (por ejemplo, un sujeto humano). Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (por ejemplo, solución salina, dextrosa) y dispersiones.

55 **[0048]** Los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden administrarse por la vía oral, por ejemplo, con un diluyente o portador inerte, encapsulado en una cápsula de gelatina de capa dura o blanda o en comprimidos. Para la administración terapéutica oral, los compuestos y las composiciones pueden combinarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos que se pueden ingerir, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, siropes, obleas y similares. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones útiles terapéuticamente es tal que se obtiene una dosis adecuada.

60 **[0049]** Los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden administrarse por la vía parental o intraperitoneal. Las soluciones de los compuestos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con aditivos, tales como tensioactivos. Las dispersiones pueden prepararse también en aceites.

65 **[0050]** En los procedimientos de la presente invención, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a una cantidad eficaz, en dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico

deseado, tal como niveles reducidos de expresión de gen rod o sus productos proteicos. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del sujeto y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto administrado es compensando por los efectos ventajosos terapéuticamente.

[0051] Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Para cualquier sujeto particular, se pueden ajustar pautas de dosificación específicas durante un periodo de tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los intervalos de dosificación establecidos en el presente documento sirven solamente de ejemplo y no limitan los intervalos de dosificación que pueden seleccionarse por un médico. La cantidad de compuesto activo en la composición puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del sujeto. Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas durante un periodo de tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente según se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

[0052] En los procedimientos, la administración del compuesto puede ser administración sistémica al sujeto. El término «sujeto» pretende incluir organismos mamíferos. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos humanos y no humanos. En realizaciones específicas de la presente invención, el sujeto es un humano.

[0053] Los términos "administrar" "poner en contacto" o "tratar" incluyen cualquier compuesto tal como se reivindica para su uso en un procedimiento de administración de un compuesto o una composición farmacéutica que comprende el compuesto en un sistema del sujeto.

Derivados de β -amino pateamina para su uso en procedimientos de tratamiento

[0054] En determinadas realizaciones, los compuestos de β -amino pateamina de la presente invención retienen la potencia ventajosa de la pateamina A (por ejemplo, actividad inhibitora contra células de leucemia linfocítica crónica (CLL)) y tiene una biodisponibilidad mejorada en comparación con pateamina A (por ejemplo, unión a proteína plasmática (PBB) más baja en plasma humano).

[0055] En un aspecto, la presente invención da a conocer un derivado de beta-amino pateamina, tal como se reivindica, para usar en un procedimiento para inhibir el crecimiento de células de leucemia linfocítica crónica (CLL). En el procedimiento, el crecimiento de células de CLL se inhibe al poner en contacto las células de CLL con un compuesto de β -amino pateamina de la presente invención (o un conjugado de anticuerpo de la presente invención, o una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto de β -amino pateamina o un conjugado de anticuerpo). En determinadas realizaciones, el procedimiento es eficaz para inhibir el crecimiento de células de leucemia linfocítica crónica (CLL) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano).

[0056] En otro aspecto, la presente invención da a conocer un derivado de β -amino pateamina, tal como se reivindica, para usar en un procedimiento para tratar la leucemia linfocítica crónica (CLL). En el procedimiento, la CLL se trata administrando una cantidad eficaz de un compuesto de β -amino pateamina de la presente invención (o un conjugado de anticuerpo de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto de β -amino pateamina o un conjugado de anticuerpo) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesita.

Mecanismo de Acción de DMDAPatA en CLL

[0057] El mecanismo de acción de DMDAPatA se estudió en múltiples muestras de CLL primaria (Figura 3A). Se mostró que DMDAPatA inhibía la síntesis de proteínas medida mediante el análisis de incorporación de [3 H]leucina (Figure 3B). Las células de CLL se incubaron con DMDAPatA durante 4 y 24 horas, a continuación, se marcaron a pulsos con [3 H]leucina durante 1 hora. La cantidad de incorporación de [3 H]leucina en los materiales insolubles en ácido (ADN, ARN y proteínas) se midió utilizando contador por centelleo. Estos datos apoyan la inhibición de DMDAPatA de iniciación de la traducción de proteínas en células de CLL. Además, DMDAPatA redujo la proteína antiapoptótica Mcl-1 de vida corta. Esto es consistente en 3 muestras tal como se cuantifica en la Figura 3C. El nivel de Bcl-2 no fue afectado por DMDAPatA, lo que es coherente con su semivida más larga (Figura 3C). Dado que Mcl-1 bloquea la apoptosis evitando que Bax y Bak haga agujeros en la membrana mitocondrial, la eliminación de Mcl-1 con DMDAPatA indujo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). Esto se demostró mediante la pérdida de unión del colorante catiónico DiOC6 (Figura 3D). MOMP facilita la liberación de citocromo c de las mitocondrias para formar el apoptosoma, que activó la caspasa-3 e indujo apoptosis. Como PARP está un sustrato de caspasa-3, un aumento de PARP escindida en la Figura 3C indicó la activación de caspasa 3. La apoptosis se midió utilizando doble tinción de anexina V y yoduro de propidio (PI), seguido de citometría de flujo. Finalmente, la IC₅₀ promedio de DMDAPatA fue de 2,8 μ M medido en 13 muestras de CLL (Figura 3E).

[0058] Debido a las respuestas clínicas heterogéneas de pacientes con CLL, se han identificado marcadores celulares

y moleculares para predecir la tendencia de la enfermedad o el resultado de la terapia. Se han utilizado ampliamente los sistemas de clasificación Rai y Binet para evaluar el estado de la enfermedad y las opciones de tratamiento, con las etapas III y IV de Rai consideradas de riesgo alto y enfermedad agresiva. La alta expresión de beta 2 macroglobulina (B2M) es un pronóstico desfavorable para la quimioterapia estándar que contiene agentes alquilantes y análogos de nucleósidos de purina. La ausencia de gen IgVH de mutación somática o alta expresión de ZAP-70 se asocia también con enfermedad agresiva. Los valores de IC₅₀ de DMDAPatA se compararon en muestras de pacientes con CLL con características de pronóstico favorables o desfavorables, no existió ninguna diferencia importante entre las muestras de cada grupo (Figura 4A). Estos resultados indican que DMDAPatA induce apoptosis mediante un mecanismo que es independiente de estas variables, lo que sugiere que DMDAPatA puede tener el potencial para superar resistencia a fármacos en terapia con CLL.

[0059] Tanto Bcl-2 como Mcl-1 son proteínas prosupervivencia que regulan la apoptosis mediante la interacción con los motivos de BH3 de sus compañeros proapoptóticos. Los miméticos de BH3, tales como ABT-199, se unen con alta afinidad a Bcl-2 y bloquean esta interacción, pero no a Mcl-1. La resistencia a miméticos de BH3 está asociada con regulación positiva de Mcl-1. Dado que DMDAPatA disminuyó Mcl-1 sin afectar la expresión de Bcl-2, su combinación debería reconocer los dos brazos paralelos de control de la apoptosis y destruir las células de CLL de manera sinérgica. De hecho, un análisis de la mediana del efecto en cuatro muestras con CLL demostró que DMDAPatA y ABT-199 mostraron fuerte sinergia (índice de combinación inferior a 1). El análisis de reducción de la dosis mostró que las combinaciones disminuyeron ampliamente los valores de IC₅₀, IC₇₅ y IC₉₀ de cada compuesto, indicando la potenciación mutua (Figura 4B). Estos resultados apoyan las combinaciones clínicas de DMDAPatA y análogos con inhibidores que se antagonizan la actividad de Bcl-2.

Limitaciones de DMDAPatA

[0060] Una comparación directa de DMDAPatA con su compuesto original PatA mostró que DMDAPatA era aproximadamente 30 veces menos potente que PatA (Figura 5). Estos experimentos se realizaron en células de CLL cultivadas en un medio suplementado con 10 % de plasma de paciente. Aunque se mimetizaba el entorno *in vivo*, descubrimos que esta condición era beneficiosa para mantener la supervivencia celular. Una posible razón para la potencia reducida en presencia de plasma humano es la estabilidad. Para probar esta teoría, se estudió la estabilidad de DMDAPatA en FBS y plasma humano a dos concentraciones diferentes. De manera interesante, la presencia de suero estabilizó mucho DMDAPatA (Tabla 1) y no se observó ninguna diferencia importante entre las semividas de DMDAPatA en FBS o suero humano, excluyendo la influencia del plasma sobre la estabilidad de DMDAPatA.

Tabla 1.

Condiciones de prueba	Tiempo de semivida (horas)	
	DMDAPatA 1 uM	DMDAPatA 10 uM
RPMI puro	3	3,2
Suero Bovino Fetal	16	11,5
Plasma Humano	18	14

[0061] Se conoce bien que la unión de proteína plasmática impacta enormemente sobre la disponibilidad y la eficacia del fármaco *in vivo*. Para evaluar el efecto del plasma del paciente sobre la toxicidad de los análogos de PatA, las IC₅₀ de PatA y DMDAPatA se compararon en un medio de RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 10 % de plasma de paciente o 50 % de plasma de paciente. Los resultados demostraron que el aumento del contenido de plasma humano en el medio redujo ampliamente la potencia de DMDAPatA, pero no tenía tanta influencia sobre PatA, sugiriendo que DMDAPatA puede unirse fuertemente a proteínas plasmáticas del paciente (Figura 5). Por tanto, los esfuerzos sintéticos se dirigieron hacia la síntesis de nuevos análogos que se espera que tengan mejor potencia y una unión menor a proteína plasmática (*vide infra*).

Diseño y Síntesis de Análogos de PatA

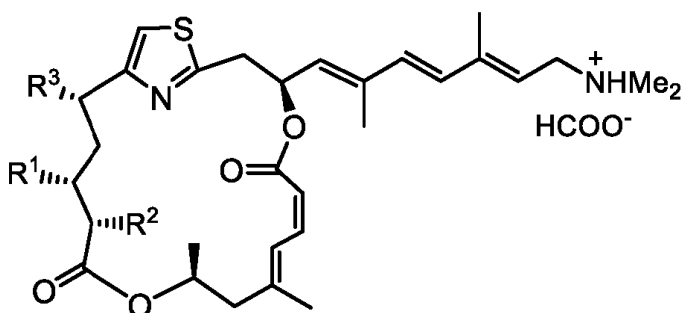
[0062] En la figura 6 se muestra una estrategia para mejorar la potencia citotóxica de CLL y simultáneamente disminuir la unión a proteína plasmática (PPB). La estrategia incluía introducir un grupo amino en la posición C2 o C3 del macrociclo para mejorar la potencia de CLL dado que los nuevos análogos poseen una funcionalidad similar a PatA, que se ha demostrado que es aproximadamente 30 veces más potente que DMDAPatA contra las células de CLL primarias. Esta modificación de la estructura química condujo a una lipofilicidad más baja (LogD) basada en cálculos. Dado que se ha demostrado previamente en la literatura que la lipofilicidad de moléculas pequeñas se correlaciona con la unión a proteína plasmática, el nuevo grupo amino y otra funcionalidad polar unida al mismo disminuye la lipofilicidad de las nuevas variantes y disminuye potencialmente la PPB en plasma humano. La disminución de la lipofilicidad de un fármaco candidato puede conducir a otras propiedades físicas beneficiosas, tales como una solubilidad acuosa aumentada. Por lo tanto, los derivados de las series alfa-amino (2-amino, des-metil PatA) y de las series beta-amino (des-metil PatA) son atractivos desde una perspectiva de diseño farmacológico.

[0063] Se representa la síntesis de las variantes de beta-amino des-metil PatA (DMPatA) (OR-IV-234 o 15), MZ732 (14) y OR- IV-211 (13) (Figuras 1 y 2). El éster 4-terc-butílico del ácido Boc-L-aspártico disponible comercialmente permitió la preparación de los tres compuestos. La secuencia lineal más larga en la síntesis de DMPatA es también de 18 etapas y es escalable para la preparación de cantidades más grandes necesarias para el desarrollo preclínico.

Tabla de Relación Estructura-Actividad (SAR)

[0064] La relación estructura-actividad de las tres variantes de beta-amino en comparación con PatA y DMDAPatA se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Relaciones de estructura-actividad de derivados



Compuesto	Estructura			IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	R ¹	R ²	R ³	10% FBS	10% Plasma
PatA	NH ₂	H	Me	0.20	0.20
DMDAPatA	H	H	H	0.65	6.42
OR-IV-211	NHTCBoc	H	H	3.50	6.65
OR-IV-234	NH ₂	H	H	0.33	0.35
MZ732	NHAc	H	H	4.58	6.80

[0065] El más potente es la amina libre (OR-IV-234, R¹ = NH₂) con actividad similar en FBS y plasma humano. Esto no es sorprendente dado que estructuralmente es el derivado que es más comparable a PatA. Los derivados de la amina (OR- IV-211 y MZ732) con un grupo funcional carbamato o acetamida son significativamente menos activos que la amina en sí. Por lo tanto, la amina libre es el análogo más potente en las series beta-amino.

Cribado Biológico de los Análogos de PatA

[0066] Para el cribado de los análogos PatA con mayor potencia y menor unión a proteína plasmática, se midió la toxicidad de los análogos a células de CLL primarias después de 24 horas de incubación utilizando tinción doble con anexina/PI seguido de citometría de flujo. Esto se comparó entre células de CLL cultivadas en un medio suplementado o con FBS al 10% o plasma de paciente para evaluar la influencia del plasma. Se evaluó la unión a proteína plasmática utilizando el procedimiento de diálisis en equilibrio (Figura 7B). Los resultados mostraron que la DMDAPatA está unida

a proteína plasmática en un 99,7%, en concordancia con una potencia inferior en plasma. La recuperación baja de DMDAPatA en plasma puede sugerir la unión no específica, poca solubilidad acuosa o unión irreversible a proteína. OR-IV-234 demostró unión a proteína plasmática (PPB) mucho más baja que PatA y DMDAPatA con una recuperación moderada.

[0067] Para predecir la ventana terapéutica de los análogos de PatA, se comparó su toxicidad celular con células de CLL y con células B y T de donantes normales (Figuras 8A y 8B). Los datos mostraron que PatA era tóxico de manera similar a células de CLL, así como también a células B y T normales. Originalmente PatA se identificó como una sonda biológica que inhibe la activación de células T, conforme a su toxicidad a células T. Es interesante que todos los análogos de PatA demostraron mucho menos toxicidad a células T, así como también menos destrucción hacia células B normales, indicando una mejoría significativa de la ventana terapéutica.

[0068] Para confirmar que los análogos retienen la inhibición de la síntesis de proteínas, se realizó un análisis de incorporación de leucina sobre los análogos (Figura 9A) y se comparó con DMDAPatA y PatA. En las tres muestras con CLL analizadas, todos los análogos demostraron una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas y la reducción del nivel de Mcl-1 se confirmó mediante inmunotransferencias (Figura 9B). La apoptosis se demostró mediante la reducción de la supervivencia de células de CLL mostrada por debajo de las transferencias.

[0069] El análogo de PatA DMDAPatA indujo la apoptosis en células de CLL primarias a través de la ruta intrínseca independiente de caracteres de pronóstico del paciente y redujo la proteína antiapoptótica de vida corta Mcl-1, pero no Bcl-2. DMDAPatA y ABT-199 reconocen dos brazos paralelos de regulación de la apoptosis e inducen la muerte celular de manera sinérgica, indicando que podrían utilizarse de manera eficaz combinados para tratar CLL. Tal como se esperaba, DMDAPatA se unió en >99% en plasma humano. Una serie de derivados de PatA se sintetizó y varios de ellos mostraron mayor potencia citotóxica hacia las células de CLL y menor unión a proteína plasmática humana. Estos estudios demuestran que la inhibición de la traducción de proteína a través de la alteración de eIF4A por los análogos de PatA es una estrategia terapéutica válida para CLL ya sea sola o en combinaciones basadas en mecanismos. En conjunto, se han identificado tres nuevos análogos de PatA candidatos con potente inhibición de traducción de proteínas. Estos análogos retenían toxicidad hacia las células de CLL primarias y mostraron selectividad mejorada sobre linfocitos normales y unión a proteína plasmática reducida. Estos compuestos representan una esperanza prometedora para la aplicación de enfermedades específicas en pacientes con el contexto biológico adecuado, tal como CLL, en el que las células de leucemia dependen de la expresión sostenida de Mcl-1 para la supervivencia.

[0070] Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ilustración, pero no para limitar la presente invención.

EJEMPLOS

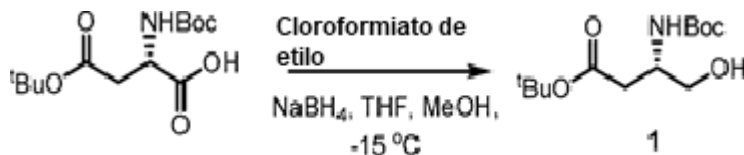
Procedimientos Generales

[0071] Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno en objetos de cristal secados a la llama. El acetonitrilo, diclorometano, metanol y tetrahydrofurano se purificaron pasando a través de tamices moleculares o alúmina (sistema de disolventes). La dimetilformamida (DMF) se compró y se secó sobre tamices moleculares de 4Å. Se utilizaron todos los reactivos comerciales tal como se recibieron. Los espectros de ¹H RMN se registraron en INOVA-500. Los desplazamientos químicos de ¹H RMN se indican como valores δ en ppm en relación con CDCl₃ (7,26 ppm), las constantes de acoplamiento (J) se indican en Hercios (Hz) y multiplicidad sigue la convención. Se llevó a cabo la cromatografía en columna "flash" utilizando gel de sílice de 60Å como fase estacionaria utilizando un sistema de disolventes en gradiente (EtOAc/hexanos como eluyentes, a menos que se especifique lo contrario). Se llevó a cabo la purificación mediante HPLC preparativa en el Sistema de Purificación a Escala Preparativa Agilent 1260 Infinity utilizando una columna de HPLC Gemini (C18, 5 micras, 100 x 21,20 mm). Se obtuvieron los espectros de masas en el centro para la Caracterización y Análisis Químicos (Texas A&M University). Se realizó la cromatografía en capa fina (CCF) utilizando gel de sílice sobre fibra de vidrio 60F₂₅₄.

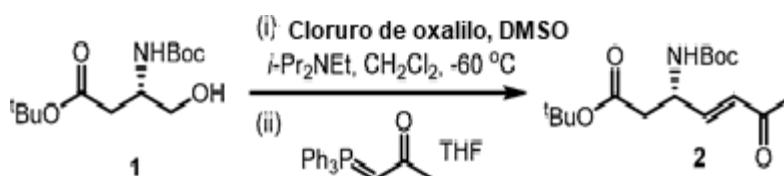
Ejemplo 1:

La Preparación de Derivados de β-Amino Pateamina A Representativos

[0072] En este ejemplo, se describen las preparaciones de derivados de β-amino pateamina A representativos de la presente invención, Compuestos 13 (OR-IV-211), 14 (MZ732) y 15 (OR-IV-234). La preparación se ilustra de manera esquemática en las FIGURAS 1 y 2.

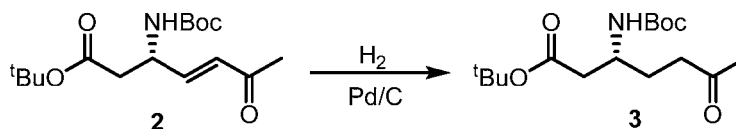


[0073] (S)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-hidroxi-butanoato de *tert*-butilo (1). Los derivados de ácido aspártico (5,0 g, 17,28 mmol) se disolvieron en THF anhidro (100 ml) y, a continuación, la solución se enfrió hasta -15 °C. A continuación, se añadió lentamente gota a gota trietilamina (2,41 ml, 17,28 mmol), seguido del cloroformiato de etilo (1,65 ml, 17,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 15 minutos, y, a continuación, se añadió borohidruro de sodio (1,96 g, 51,84 mmol), seguido de la adición lenta de metanol (100 ml) durante un periodo de tiempo de 30 minutos a -15 °C. La solución se agitó adicionalmente durante 30 minutos y, a continuación, se neutralizó con HCl 0,5 N (hasta pH 7). Los disolventes orgánicos se eliminaron bajo presión reducida y, a continuación, el residuo se diluyó con agua (100 ml), se extrajo con acetato de etilo (3 X 150 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se secó al vacío y proporcionó el producto deseado 1 como un aceite incoloro (4,76 g) y se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5,47 (bs, 1H), 5,23 (bs, 1H), 3,99-3,93 (m, 1H), 3,68 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H), 2,57-2,47 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,43 (s, 9H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 171,2, 155,9, 81,1, 79,6, 64,3, 49,7, 37,5, 28,4 (3C), 28,0 (3C). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₁₃H₂₅NNaO₅⁺ ([M+Na]⁺): 298,1625. Encontrado: 298,1611.

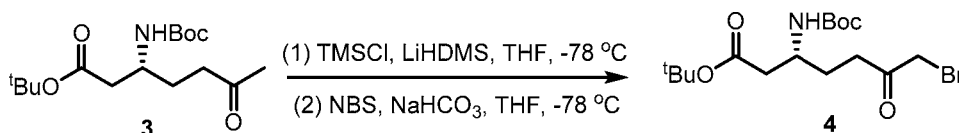


[0074] (S,E)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-6-oxohept-4-enoato de *tert*-butilo (2). El cloruro de oxalilo (2,49 ml, 28,51 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (50 ml) y, a continuación, la solución se enfrió hasta -60 °C. A continuación, se añadió lentamente gota a gota una solución de sulfóxido de dimetilo anhidro (4,05 ml, 57,01 mmol, en 10 ml de diclorometano) durante un periodo de 15 minutos. A continuación, se añadió lentamente el aminoalcohol (4,76 g, 17,28 mmol) durante un periodo de 10 minutos. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos a -60 °C y, a continuación, se añadió gota a gota la diisopropilamina (18,06 ml, 103,66 mmol, en 50 ml de diclorometano) durante un periodo de 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a -60 °C y, a continuación, se detuvo al añadir 5 ml de agua. La emulsión resultante se vertió en 300 ml de dietil éter y se lavó con una solución acuosa al 20 % de KHSO₄ (2 X 100 ml). La fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir el aldehído en bruto, que se utilizó de inmediato para la siguiente reacción con ninguna purificación adicional.

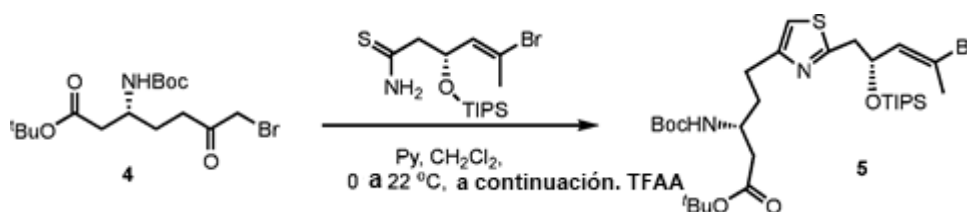
[0075] El aldehído en bruto se disolvió en THF anhidro (100 ml) y, a continuación, la solución se enfrió hasta 0 °C. A continuación, se añadió el trifenilfosforanilideno y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta 22 °C y se agitó a esta temperatura durante 12 horas. A continuación, la mezcla se concentró bajo presión reducida y se volvió a suspender en dietil éter (100 ml) y se filtró a través de celite para eliminar el producto secundario de óxido de trifenilfosfina y, a continuación, el filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó utilizando MPLC en gel de sílice utilizando un gradiente de hexanos y acetato de etilo (9:1 → 1:9) y se produjo el producto deseado 2 como un aceite incoloro (2,78 g, 51 %, para las tres etapas). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,69 (dd, *J* = 16,0, 5,0 Hz, 1H), 6,14 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 5,38 (bs, 1H), 4,70-4,55 (m, 1H), 2,58 (dd, *J* = 15,5, 5,5 Hz, 1H), 2,51 (dd, *J* = 15,5, 6,0 Hz, 1H), 2,22 (s, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,40 (s, 9H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 198,1, 170,0, 155,0, 145,8, 130,2, 81,9, 80,0, 60,5, 48,4, 39,8, 28,4 (3C), 28,1 (3C). LRMS (APCI): Calculado para C₁₆H₂₆NO₅⁻ ([M-H]⁻), 312,18. Encontrado: 311,99.



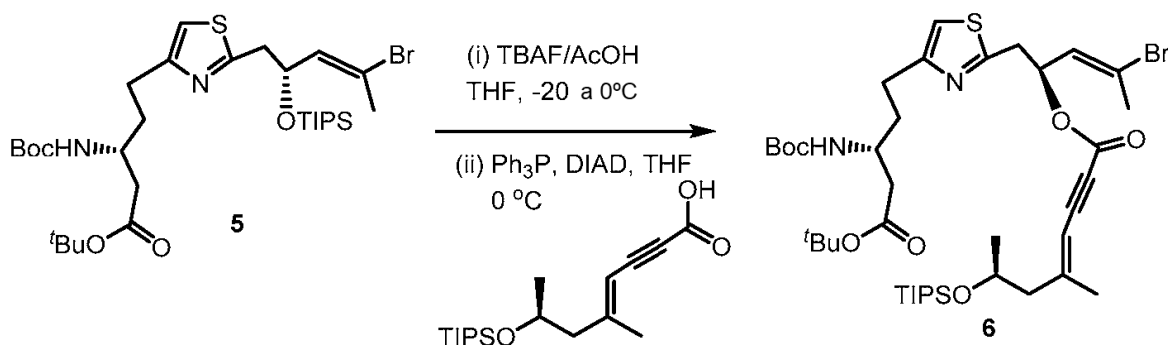
[0076] (R)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-6-oxoheptanoato de *tert*-butilo (3). La enona (2,5 g, 7,98 mmol) se disolvió en acetato de etilo (54 ml) y EtOH (6 ml). A continuación, se añadió el catalizador de paladio (0,25 g, Pd/C al 10% p/p) y, a continuación, la mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno (globo) a 22 °C durante 15 horas. La mezcla se purgó con nitrógeno y, a continuación, se filtró a través de una almohadilla corta de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó utilizando MPLC en gel de sílice utilizando un gradiente de hexanos y acetato de etilo (8:2 → 1:9) y se produjo el producto deseado 3 como un aceite incoloro (1,36 g, 54%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4,99 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,92-3,80 (m, 1H), 2,56-2,49 (m, 2H), 2,43-2,35 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,75-1,66 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,42 (s, 9H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 208,3, 170,9, 155,6, 81,2, 79,3, 47,5, 41,1, 40,3, 30,2, 28,5 (3C), 28,2 (3C). LRMS (APCI⁺): Calculado para C₁₆H₂₉NNaO₅⁺ ([M+Na]⁺), 338,19. Encontrado: 338,31.



[0077] (R)-7-bromo-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-6-oxoheptanoato de *tert*-butilo (4). Se añadió lentamente *n*-butil litio (3,24 ml, 8,09 mmol, 2,5 M en hexanos) a una solución de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (1,70 ml, 8,09 mmol) en THF (50 ml) a -78 °C. La solución se agitó durante 15 minutos a -78 °C y, a continuación, durante 20 minutos a 0 °C. La mezcla se enfrió hasta -78 °C y, a continuación, se añadió lentamente clorotrimetilsilano (1,4 ml, 11,03 mmol), seguido de la metil cetona 3 (1,16 g, 3,68 mmol, en 20 ml de THF). Después de 20 minutos se añadió lentamente trietilamina anhidra (8 ml). La mezcla siguió agitándose durante 5 minutos y, a continuación, se desactivó con 50 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con acetato de etilo (3 X 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml de THF y se añadió la solución a una suspensión agitada de *N*-bromosuccinimida (0,655 g, 3,68 mmol) y NaHCO₃ (0,340 g, 4,05 mmol) en THF (60 ml) a -78 °C. Después de la agitación durante 1,5 horas a -78 °C, la reacción se detuvo al añadir 30 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 X 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo en bruto se purificó utilizando MPLC en gel de sílice utilizando un gradiente de hexanos y acetato de etilo (9:1 → 1:1) y se produjo el producto deseado **4** como un aceite amarillo claro (0,668 g, 46%, para las dos etapas). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5,04 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,93 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 3,90 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 3,89-3,82 (m, 1H), 2,78-2,66 (m, 2H), 2,46 (dd, *J* = 15,5, 5,5 Hz, 1H), 2,38 (dd, *J* = 15,5, 6,0 Hz, 1H), 1,90-1,83 (m, 1H), 1,77-1,70 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,42 (s, 9H). LRMS (ESI⁺): Calculado para C₁₆H₂₈BrNNaO₅⁺ ([M+Na]⁺): 416,1043. Encontrado: 416,1024.

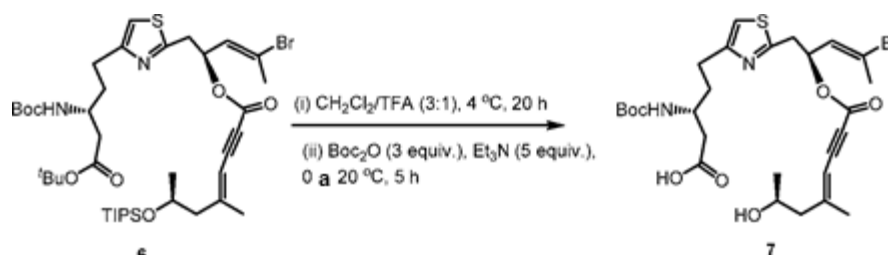


[0078] (R)-5-(2-((*R,E*)-4-bromo-2-((triisopropilsilil)oxi)pent-3-en-1-il)tiazol-4-il)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)pentanoato de *tert*-butilo (5). El α-bromoceto éster **4** (0,636 g, 1,61 mmol) se disolvió en diclorometano (16 ml) y, a continuación, la solución se enfrió hasta 0 °C. Se añadió el tioamida (0,614 g, 1,61 mmol), seguido de la piridina (0,325 ml, 4,03 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta 22 °C y, a continuación, se agitó durante 18 horas a 22 °C. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y, a continuación, se añadió anhídrido trifluoroacético (0,273 ml, 1,94 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta 22 °C y, a continuación, se agitó durante 3 horas a 22 °C, a continuación, se desactivó con 15 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con diclorometano (3 X 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo en bruto se purificó utilizando MPLC sobre gel de sílice utilizando un gradiente de hexanos y acetato de etilo (9:1 → 1:1) y proporcionó el producto deseado **5** como un aceite amarillo claro (0,540 g, 50%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,83 (s, 1H), 5,87 (dd, *J* = 9,0, 1,5 Hz, 1H), 5,09 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,77 (dt, *J* = 9,0, 6,5 Hz, 1H), 4,00-3,92 (m, 1H), 3,23 (dd, *J* = 14,0, 6,0 Hz, 1H), 3,09 (dd, *J* = 14,0, 6,5 Hz, 1H), 2,85-2,72 (m, 2H), 2,47 (dd, *J* = 15,0, 5,0 Hz, 1H), 2,41 (dd, *J* = 15,0, 6,0 Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,92-1,82 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,04-1,00 (m, 21H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 170,9, 165,2, 156,0, 155,4, 134,9, 121,3, 113,6, 80,8, 78,9, 70,2, 47,5, 41,9, 40,7, 34,4, 28,4 (3C), 28,1, 28,0 (3C), 23,9, 18,0 (3C), 17,8 (3C), 12,3 (3C). LRMS (APCI⁺): Calculado para C₃₁H₅₆BrN₂O₅SSi⁺ ([M+H]⁺), 675,28. Encontrado: 675,22.

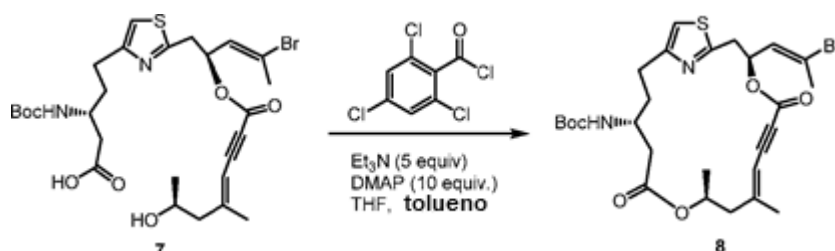


[0079] (*S,E*)-4-Bromo-1-(4-((*R*)-5-(*tert*-butoxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentil)tiazol-2-il)pent-3-en-2-il (*S,E*)-5-metil-7-((triisopropilsilil)oxi)oct-4-en-2-inoato (6). El éster de tiazol **5** (0,510 g, 0,755 mmol) se disolvió en THF (10 ml) y, a continuación, la solución se enfrió hasta -20 °C. Una solución premezclada de fluoruro de tetrabutilamonio (1,13 ml, 1,13 mmol, 1M en THF) y ácido acético (13 μl, 0,226 mmol) se añadió gota a gota y, a continuación, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 6 horas. La mezcla se diluyó con diclorometano (20 ml) y se lavó con 15 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃. La fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró

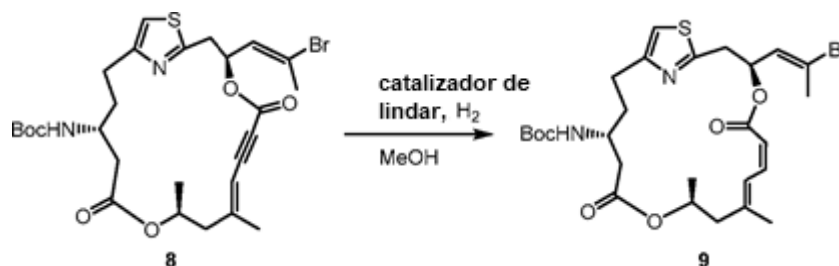
bajo presión reducida. El residuo se disolvió en THF (10 ml) y, a continuación, se añadió ácido de enina (0,318 g, 0,981 mmol), seguido de la trifenilfosfina (0,495 g, 1,89 mmol). La mezcla se enfrió hasta 0 °C y, a continuación, se añadió gota a gota el DIAD (0,444 ml, 2,26 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta 22 °C y, a continuación, la mezcla de reacción se agitó a 22 °C durante 8 horas. La reacción se detuvo con 15 ml de una solución tampón de pH 7 y se extrajo con diclorometano (3 X 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo en bruto se purificó utilizando MPLC en gel de sílice utilizando un gradiente de hexanos y acetato de etilo (9:1 → 1:1) y proporcionó el producto deseado **6** como un aceite amarillo claro (0,437 g, 70%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,88 (s, 1H), 5,87 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,77 (dt, *J* = 9,5, 6,7 Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 5,05 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,14-4,09 (m, 1H), 3,98-3,92 (m, 1H), 3,38 (dd, *J* = 14,7, 6,9 Hz, 1H), 3,25 (dd, *J* = 14,7, 6,6 Hz, 1H), 2,85-2,73 (m, 2H), 2,48-2,41 (m, 2H), 2,41 (dd, *J* = 13,2, 6,0 Hz, 1H), 2,27 (s, 3H), 2,25 (dd, *J* = 13,2, 7,0 Hz, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,91-1,86 (m, 2H), 1,43 (s, 18H), 1,15 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H), 1,05 (s, 21H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 171,1, 164,0, 159,3, 156,1, 155,6, 153,2, 128,5, 128,1, 114,5, 105,0, 86,2, 83,5, 81,2, 79,3, 71,4, 67,2, 49,7, 47,5, 40,9, 37,7, 34,4, 28,6 (3C), 28,2 (3C), 28,1, 24,5, 23,6, 21,2, 18,28 (3C), 18,26 (3C), 12,6 (3C). LRMS (APCI⁺): Calculado para C₄₀H₆₆BrN₂O₇SSi ([M+H]⁺), 825,34. Encontrado: 825,34.



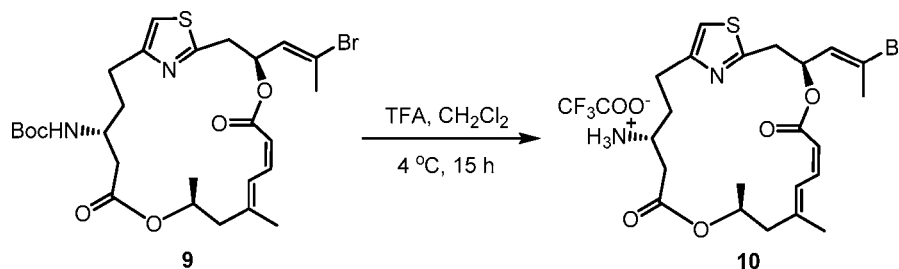
[0080] Ácido (*R*)-5-(2-(((*S,E*)-4-bromo-2-(((*S,E*)-7-hidroxi-5-metiloct-4-en-2-inoil)oxi)pent-3-en-1-il)-3-(4-tiazol-4-il)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)pentanoico (**7**)). A una solución de **6** (108 mg, 0,131 mmol, 1,0 equivalentes) en 2,5 ml de DCM se añadió lentamente 1,0 ml de TFA a 0 °C bajo N₂. Se mantuvo la solución a 4 °C durante 20 horas, se diluyó con 10 ml de tolueno y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 5 ml de dioxano y 0,5 ml de H₂O, se enfrió hasta 0 °C, a continuación, se añadieron Boc₂O (85 µl, 0,392 mmol, 3 equivalentes) y Et₃N (92 ml, 0,655 mmol, 5 equivalentes). La solución se agitó a 20 °C durante 15 horas, se diluyó con 100 ml de EtOAc, se transfirió a un embudo de separación, se acidificó mediante la adición de 1 ml de HCl acuoso (1M) y se lavó con salmuera (5 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo se purificó utilizando cromatografía flash (hexanos:acetona = 5:1 → 5:2) para proporcionar el producto deseado **7** como un aceite incoloro (41 mg, 51%). *R_f* = 0,41 (hexanos:acetona=5:3) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, COOH y OH no se observaron) δ 6,90 (s, 1H), 5,88 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,82-5,76 (m, 1H), 5,46 (s, 1H), 5,32-5,29 (m, 1H), 4,05-4,00 (m, 1H), 3,97-3,90 (m, 1H), 3,39 (dd, *J* = 14,7, 7,4 Hz, 1H), 3,30 (dd, *J* = 14,7, 5,5 Hz, 1H), 2,88-2,74 (m, 2H), 2,58 (brs, 2H), 2,31-2,25 (m, 2H), 2,30 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,97-1,90 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,22 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 174,8, 164,5, 158,5, 156,2, 155,9, 153,2, 128,5, 128,1, 114,5, 105,1, 85,8, 83,6, 79,7, 71,5, 65,9, 48,8, 47,4, 39,5, 37,6, 34,2, 29,9, 28,6 (3C), 24,5, 23,6, 20,7. LRMS (ESI⁻): Calculado para C₂₇H₃₇BrN₂O₇S ([M-H]⁻), 611,1. Encontrado: 611,1.



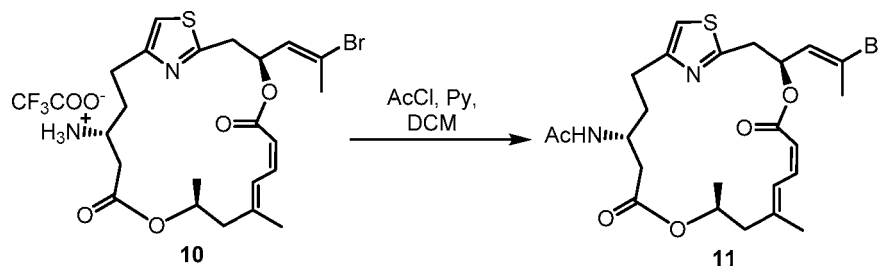
[0081] (((12*Z*,3*S*,8*E*,11*S*,15*R*)-3-((*E*)-2-bromoprop-1-en-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxo-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6-in-8-en-15-il)carbamato de *tert*-butilo (**8**)). A una solución de **7** (38 mg, 0,0169 mmol, 1 equivalente) en 6 ml de THF se añadieron cloruro de 2,4,6-triclorobenzoyl (48 µl, 0,310 mmol, 5 equivalentes), seguido de Et₃N (43 µl, 0,310 mmol, 5 equivalentes). Después de agitar durante 30 minutos, la solución se transfirió a una solución de DMAP (76 mg, 0,619 mmol, 10 equivalentes) en 150 ml de tolueno y la agitación se mantuvo durante 48 horas a 20 °C. La mezcla se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El residuo se purificó utilizando cromatografía flash (hexanos:acetato de etilo = 5:1) para proporcionar el producto deseado **8** como un aceite incoloro (27 mg, 73%). *R_f* = 0,55 (hexanos:acetato de etilo = 2:1) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,83 (s, 1H), 6,04-6,01 (m, 1H), 5,85 (td, *J* = 8,8, 3,8 Hz, 1H), 5,34 (s, 1H), 5,31-5,26 (m, 1H), 4,55 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,97-3,91 (m, 1H), 3,33 (dd, *J* = 15,3, 3,9 Hz, 1H), 3,37 (dd, *J* = 15,3, 8,4 Hz, 1H), 2,85-2,79 (m, 1H), 2,75-2,69 (m, 2H), 2,39 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H), 2,31-2,26 (m, 3H), 2,00-1,95 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,25 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 170,3, 163,6, 158,3, 156,7, 155,5, 153,4, 128,9, 127,3, 144,0, 105,8, 85,1, 84,0, 79,7, 70,8, 67,1, 47,8, 46,7, 40,2, 37,8, 34,7, 29,1, 28,6 (3C), 34,6, 21,0, 20,2. HRMS (ESI⁺): Calculado para C₂₇H₃₆BrN₂O₆S [M+H]⁺, 595,1477. Encontrado: 595,1451.



[0082] ((12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-3-((E)-2-bromoprop-1-en-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxo-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dien-15-il)carbamato de terc-butilo (9). Un matraz con fondo redondo se cargó con eneína **8** (25 mg, 0,042 mmol), catalizador de lindlar (17,5 mg, 70% p/p) y metanol (2 ml). Se colocó un globo con hidrógeno en la parte superior del matraz y la mezcla se agitó a 20 °C durante 4 horas hasta que no quedó ningún material inicial visible en la CCF. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de algodón que se enjuagó con 5 ml de EtOAc. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo en bruto se purificó en cromatografía en gel de sílice (CH₂Cl₂:Et₂O = 8:1) para producir el producto **9** como un aceite incoloro (18 mg, 72%). *R_f* = 0,45 (hexanos:acetato de etilo = 3:1) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,98 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,70 (t, *J* = 11,8 Hz, 1H), 6,05 (td, *J* = 9,4, 4,7 Hz, 1H), 5,96 (dq, *J* = 9,5, 1,3 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,14-5,08 (m, 1H), 4,67 (brs, 1H), 3,62 (brs, 1H), 3,21-3,14 (m, 2H), 2,81 (dt, *J* = 14,5, 6,1 Hz, 1H), 2,70 (dt, *J* = 14,5, 7,7 Hz, 1H), 2,48 (s, 3H), 2,41-2,30 (m, 3H), 2,15 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 1,98-1,88 (m, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,25 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 170,6, 164,9, 164,7, 156,7, 155,5, 146,4, 141,4, 129,9, 127,0, 123,9, 114,9, 113,7, 79,3, 69,0, 68,0, 48,1, 47,5, 40,1, 38,4, 36,8, 33,9, 28,6 (3C), 24,7, 21,4, 17,1. HRMS (ESI⁺): Calculado para C₂₇H₃₈BrN₂O₆S ([M+H]⁺), 597,1634. Encontrado: 597,1667.

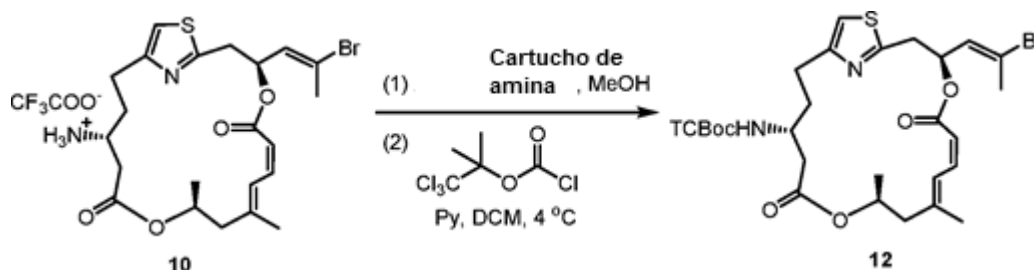


[0083] (12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-15-amino-3-((E)-2-bromoprop-1-en-1-il)-9,11-dimetil-4,12-dioxo-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dieno-5,13-diona (10). Una solución de ácido trifluoroacético (0,3 ml) en DCM (1,2 ml) se enfrió hasta 0 °C y se añadió al carbamato **9** (8,0 mg, 0,013 mmol) a 0 °C bajo N₂. La reacción se mantuvo en una nevera a 4 °C durante 15 horas, a continuación, se añadieron 10 ml de CHCl₃ y los disolventes se evaporaron mientras el matraz se mantuvo a 0 °C. El residuo en bruto se purificó utilizando cromatografía en gel de sílice (diclorometano:MeOH = 20:1) para producir el producto **10** como un aceite incoloro en forma de una sal de TFA (9 mg, 99%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,96 (brs, 3H), 7,19 (s, 1H), 6,80 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,71 (t, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,12 (t, *J* = 11,4 Hz, 1H), 5,94 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 5,36 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 5,20-5,17 (m, 1H), 3,26-3,31 (m, 1H), 3,22-3,14 (m, 2H), 3,03-2,95 (m, 2H), 2,85-2,80 (m, 1H), 2,64-2,60 (m, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,35-2,31 (m, 1H), 2,22-2,15 (m, 1H), 2,15 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H), 2,08-2,00 (m, 1H), 1,84 (s, 3H), 1,28 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₂₂H₃₀BrN₂O₄S ([M+H]⁺), 497,1104. Encontrado: 497,1099.

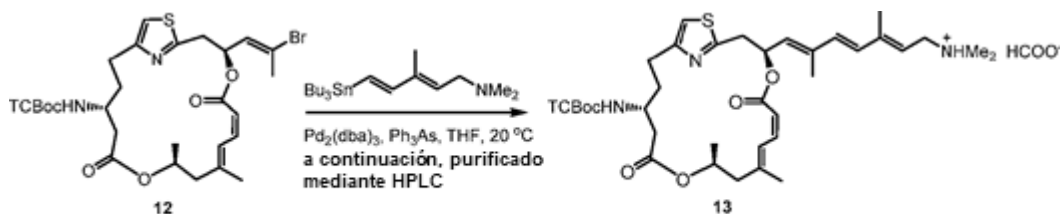


[0084] N-((12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-3-((E)-2-bromoprop-1-en-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxo-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dien-15-il)acetamida (11). A una solución de amina **10** (10,0 mg, 0,0164 mmol, 1 equivalente) en 0,5 ml de CH₂Cl₂ se añadieron piridina (0,25 ml, exceso) y AcCl (5,9 µl, 0,0828 mmol, 5 equivalentes) a 0 °C. El matraz de reacción se mantuvo en una nevera a 4 °C durante 15 horas. La mezcla se diluyó con 25 ml de EtOAc, se lavó con H₂O y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo se

purificó utilizando cromatografía flash (hexanos: acetona = 2:1) para proporcionar el producto deseado **11** como un aceite incoloro (6,5 mg, 74%). Rf = 0,41 (hexanos: acetona = 2:1) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,01 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,74 (t, J = 11,7 Hz, 1H), 6,06 (td, J = 9,3, 5,5 Hz, 1H), 5,97 (dt, J = 9,3, 1,1 Hz, 1H), 5,77 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,39 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 5,13-5,07 (m, 1H), 3,96 (sextete, J = 7,0 Hz, 1H), 3,19-3,18 (m, 2H), 2,79-2,68 (m, 2H), 2,51 (dd, J = 15,7, 7,4 Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,41 (dd, J = 15,7, 5,7 Hz, 1H), 2,36 (dd, J = 13,4, 10,8 Hz, 1H), 2,16 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 1,93 (s, 3H), 1,89-1,83 (m, 2H), 1,85 (s, 3H), 1,25 (d, J = 6,4 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₂₄H₃₂BrN₂O₅S ([M+H]⁺), 539,1210. Encontrado: 539,1198.

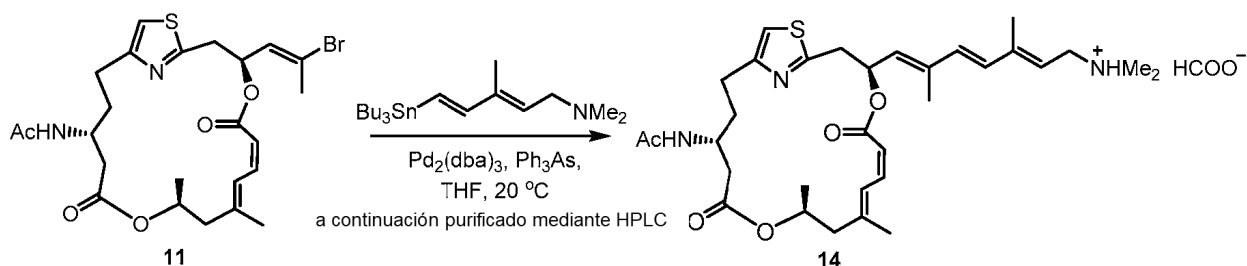


[0085] ((12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-3-((E)-2-bromoprop-1-en-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxa-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dien-15-il)carbamato de 1,1,1-tricloro-2-metilpropan-2-il (**12**). Siguiendo el procedimiento publicado, (Romo, D., Rzasas, R. M., Shea, H. A., Park, K., Langenhan, J. M., Sun, L., Akhiezer, A., y Liu, J. O. (1998) Total Synthesis and Immunosuppressive Activity of (-)-Pateamine A and Related Compounds: Implementation of a β-Lactam-Based Macrocyclization, J. Am. Chem. Soc. 120, 12237-12254) el compuesto **10** (4,3 mg, 0,0074 mmol) produjo el producto deseado **12** como un aceite incoloro (5,3 mg, 71%). Rf = 0,28 (hexanos: acetato de etilo = 4:1) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,00 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,72 (t, J = 11,8 Hz, 1H), 6,06 (td, J = 9,0, 5,3 Hz, 1H), 5,96 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 5,15-5,09 (m, 2H), 3,68-3,64 (m, 1H), 3,20-3,18 (m, 2H), 2,85-2,79 (m, 1H), 2,74-2,68 (m, 1H), 2,57 (dd, J = 16,3, 8,3 Hz, 1H), 2,46 (s, 3H), 2,41-2,34 (m, 2H), 2,15 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 1,90 (s, 6H), 1,89-1,83 (m, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,25 (d, J = 6,3 Hz, 3H). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 165,7, 164,7, 160,9, 156,0, 153,8, 146,6, 141,7, 129,6, 127,4, 124,0, 114,7, 114,1, 106,8, 88,1, 68,9, 68,1, 48,0, 47,9, 40,0, 38,1, 33,5, 28,5, 24,8, 21,9 (2C). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₂₇H₃₅BrCl₃N₂O₆S ([M+H]⁺), 699,0465. Encontrado: 699,0437.



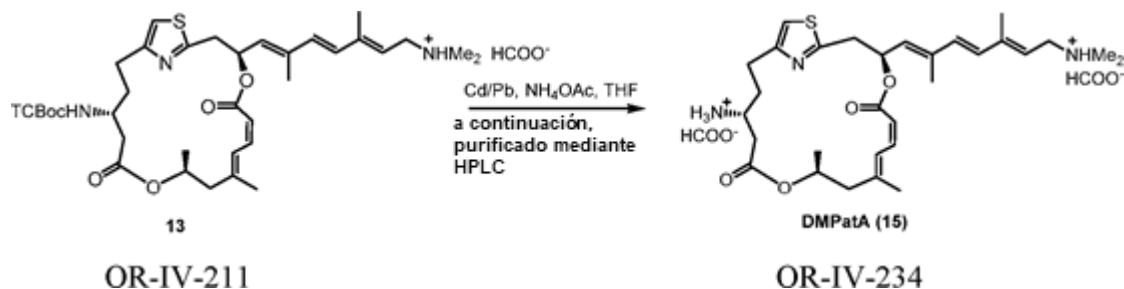
OR-IV-211

[0086] ((12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-3-(1E,3E,5E)-7-(dimetilamino)-2-metilhepta-1,3,5-trien-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxa-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dien-15-il)carbamato de 1,1,1-tricloro-2-metilpropan-2-ilo (**13** o OR-IV-211). El acoplamiento entre **12** (4,5 mg, 0,0064 mmol, 1 equivalente) y (2E,4E)-N,N,3-trimetil-5-(tributylestanil)penta-2,4-dien-1-amina (5,3 mg, 0,0128 mmol, 2 equivalentes) siguió el procedimiento conocido. Low, W. K., Li, J., Zhu, M., Kommaraju, S. S., Shah-Mittal, J., Hull, K., Liu, J. O., y Romo, D. (2014) Second-generation derivatives of the eukaryotic translation initiation inhibitor pateamine A targeting eIF4A as potential anticancer agents, Bioorg. Med. Chem. 22, 116-125. La mezcla de reacción se mantuvo a 20 °C durante 15 horas y se transfirió directamente a cromatografía en gel de sílice para purificación (diclorometano:MeOH:triethylamina = 20:1:0.1). El producto se purificó adicionalmente utilizando HPLC preparativa (disolvente A: H₂O tamponada con 8 mM de HCOOH y 12 mM de NH₃·H₂O, pH = 9,0; disolvente B: CH₃CN/H₂O (9:1 v/v) tamponada con 8 mM de HCOOH y 12 mM de NH₃·H₂O; elución isocrática, disolvente A/disolvente B = 1:4). Las fracciones recogidas se concentraron para producir una mezcla del producto y formiato de amonio sólido, tras lo cual se añadió DCM (10 ml) y la suspensión se filtró a través de un embudo de cristal de Buchner sintetizado. Los precipitados se enjuagaron con diclorometano extra (2 X 5 ml). Después de la concentración al vacío se obtuvo el producto **13** (OR-IV-211) como un aceite incoloro en forma de una sal con ácido fórmico (2,8 mg, 56%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,52 (s, 1H), 7,02 (d, J = 11,9 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,71 (t, J = 11,7 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 6,28-6,25 (m, 1H), 5,67 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 5,59 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 5,39 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 5,16-5,11 (m, 1H), 5,08 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,69-3,63 (m, 1H), 3,43 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 3,21-3,19 (m, 2H), 2,83 (dt, J = 15,0, 6,3 Hz, 1H), 2,77-2,70 (m, 1H), 2,59 (dd, J = 15,7, 8,3 Hz, 1H), 2,49 (s, 6H), 2,42-2,34 (m, 2H), 2,16 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 2,07-2,02 (m, 1H), 1,99 (d, J = 1,0 Hz, 3H), 1,93-1,89 (m, 1H), 1,91 (s, 6H), 1,84 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,25 (d, J = 6,1 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₅H₄₉Cl₃N₃O₆S ([M+H]⁺), 744,2408. Encontrado: 744,2429.



MZ732

[0087] *N*-((12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-3-((1E,3E,5E)-7-(dimetilamino)-2,5-dimetilhepta-1,3,5-trien-1-il)-9,11-dimetil-5,13-dioxo-4,12-dioxa-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dien-15-il)acetamida (**14** o MZ732). El acoplamiento entre **11** (3,4 mg, 0,0063 mmol, 1 equivalente) y (2E,4E)-*N,N*,3-trimetil-5-(tributilestanil)penta-2,4-dien-1-amina (5,2 mg, 0,0126 mmol, 2 equivalentes) se basó en el procedimiento conocido. Low, W. K., Li, J., Zhu, M., Kommaraju, S. S., Shah-Mittal, J., Hull, K., Liu, J. O., y Romo, D. (2014) Second-generation derivatives of the eukaryotic translation initiation inhibitor pateamine A targeting eIF4A as potential anticancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 22, 116-125. El procedimiento de purificación fue el mismo que el de **13** (OR-IV-211) para producir el producto **14** (MZ732) en forma de sal con ácido fórmico como un aceite incoloro (1,8 mg, 49%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,23 (s, 1H), 7,03 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,74 (t, *J* = 11,3 Hz, 1H), 6,39 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 6,34 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 6,29-6,25 (m, 1H), 5,84 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,69 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,63 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 5,43 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 5,13-5,09 (m, 1H), 4,01-3,98 (m, 1H), 3,68 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,21-3,19 (m, 2H), 2,79-2,74 (m, 2H), 2,67 (s, 6H), 2,50-2,46 (m, 2H), 2,35-2,32 (m, 1H), 2,16 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 1,99 (d, *J* = 1,0 Hz, 3H), 1,97-1,93 (m, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,87 (s, 3H), 1,86 (s, 3H), 1,25 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₂H₄₆ N₃O₅S ([M+H]⁺), 584,3158. Encontrado: 584,3139.



[0088] (12Z,3S,6Z,8E,11S,15R)-15-amino-3-((1E,3E,5E)-7-(dimetilamino)-2,5-dimetilhepta-1,3,5-trien-1-il)-9,11-dimetil-4,12-dioxa-1(2,4)-tiazolacicloheptadecafano-6,8-dieno-5,13-diona, Des-Metil-Pateamina A (DMPa-tA) (**15** o OR-IV-234). Una mezcla de carbamato **13** (OR-IV-211) (1,2 mg, 1,5 μmol), par de Cd-Pb (4,8 mg), solución acuosa de NH₄OAc (1 M, 50 μl), H₂O (150 μl) y THF (150 μl) se agitó a 20 °C bajo N₂. 1 hora después se añadió una parte extra de par de Cd-Pb (1,2 mg) y la mezcla se continuó agitándose durante 1 hora adicional. Los disolventes se evaporaron y se añadió CHCl₃ (5 ml) al residuo. La suspensión se filtró a través de un embudo de cristal de Buchner sinterizado y el disolvente se concentró. El residuo en bruto se purificó utilizando HPLC preparativa siguiendo el mismo procedimiento que en **13** (OR-IV-211) para proporcionar el producto **15** (OR-IV-234) en forma de una sal con ácido fórmico (0,57 mg, 59%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,41 (brs, 2H), 7,10 (s, 1H), 6,87 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 6,39 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 6,34-6,29 (m, 1H), 6,32 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 5,68 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,57 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 5,37 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,19-5,12 (m, 1H), 3,86-3,25 (brs, 4H), 3,64 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,20 (dd, *J* = 14,6, 3,4 Hz, 1H), 3,15 (dd, *J* = 14,6, 10,7 Hz, 1H), 3,07-3,01 (m, 1H), 2,92-2,89 (m, 1H), 2,77-2,72 (m, 1H), 2,63 (s, 6H), 2,63-2,59 (m, 1H), 2,52 (dd, *J* = 17,5, 11,7 Hz, 1H), 2,32 (dd, *J* = 13,0, 11,1 Hz, 1H), 2,12 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 2,10-2,07 (m, 1H), 2,02 (s, 3H), 1,99-1,96 (m, 1H), 1,86 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,27 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₀H₄₄ N₃O₄S ([M+H]⁺), 542,3053. Encontrado: 542,3044.

Ejemplo 2:

Ensayo de Unión a Proteína Plasmática

[0089] En este ejemplo, se describe el ensayo de unión a proteína plasmática utilizado para proporcionar los datos de unión a proteína plasmática.

[0090] El ensayo incluye las siguientes etapas.

1. El plasma congelado se descongeló y se centrifugó a 1120g durante 10 minutos para eliminar cualquier partícula. El plasma se decantó, se midió el pH y, si fuera necesario, se ajustó a pH 7,4 con ácido láctico.

ES 2 913 210 T3

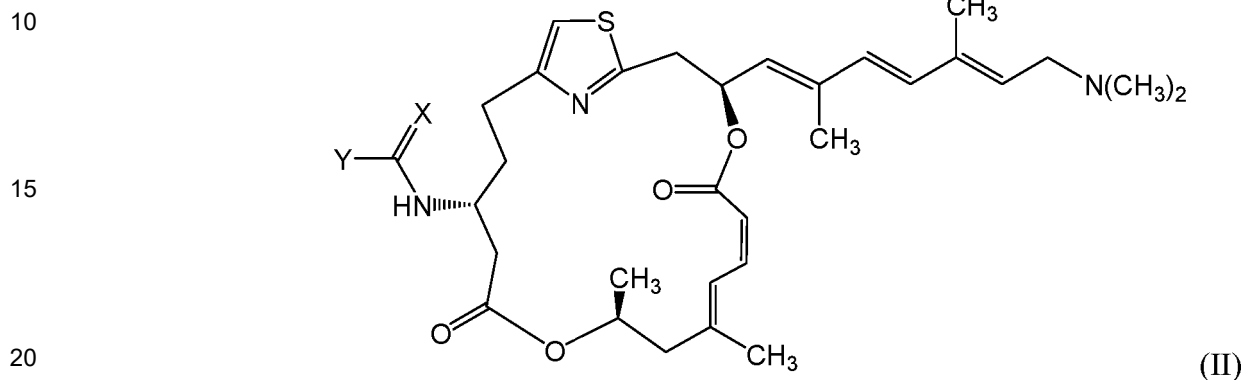
2. Todos los compuestos se prepararon a una concentración de 10 mM en DMSO. Las soluciones se agitaron en vórtice con cuidado para asegurar que los componentes se disolviesen. Las soluciones de DMSO 10 mM se diluyeron a soluciones de MeOH (5+95 μ l) 500 μ M.
 3. En una placa de 96 pocillos de 2 ml (DWP), se pipetearon 1000 μ l de plasma en cada pocillo en las Columnas 1-4.
 4. Se pipetearon 10 μ l de la solución de compuesto 500 μ M en 1000 μ L de plasma correspondiente. (DMSO final = 0,05%). La solución se tapó y se agitó en vórtice con cuidado durante 5 minutos.
 5. Se añadieron 200 μ l de tampón PBS a cada pocillo receptor de la placa de diálisis (primero se añadió tampón al Receptor).
 6. La parte inferior de la placa de diálisis se tapó y se le dio una vuelta a la parte donante naranja (parte superior) de la placa de diálisis.
 7. La parte donante naranja de la placa de diálisis se destapó y se transfirieron 200 μ l de muestras de fármaco/plasma desde 96-DWP de 2 ml a los pocillos donante correspondientes en la placa de diálisis. A continuación, la parte donante naranja de la placa de diálisis se tapó.
 8. La placa de diálisis se colocó sobre el rotador de placas en un horno a 37 °C con una velocidad de rotación a 20 rpm durante 22 horas.
 9. A una 96-DWP de 1 ml, se pipetearon 50 μ L/pocillo de las muestras de fármaco/plasma 5 μ M desde la 96-DWP de 2 ml por triplicado. Se añadieron 50 μ l/pocillo de PBS y, a continuación, 300 μ l de ACN/IS. La placa se mantuvo a 4 °C. Esta placa sirve como placa de recuperación.
 10. Dos 96-DWP de 1 ml se prepararon y se marcaron como Placa Donante y Placa Receptora.
 11. La placa de diálisis se extrajo del horno a 37 °C.
 12. Las tapas se extrajeron de la parte donante de la placa de diálisis.
 13. Se pipetearon 50 μ l de muestras desde la parte donante de la placa de diálisis y se añadieron a la Placa Donante de 96-DWP. Se añadieron 50 μ l de tampón PBS a la Placa Donante de 96-DWP.
 14. La parte donante de la placa de diálisis se tapó y se le dio la vuelta. Las tapas se extrajeron de los pocillos de la parte Receptora. Se pipetearon 50 μ l de muestras desde la parte Receptora de la placa de diálisis y se añadieron a la Placa Receptora de 96-DWP.
 15. Se añadieron 50 μ l de plasma de blanco a la Placa Receptora de 96-DWP.
 16. Se añadieron 300 μ l/pocillo de 1 μ M de imipramina (IS) en acetonitrilo (ACN) a la Placa Donante de 96-DWP, la Placa Receptora de 96-DWP y la Placa de Recuperación.
 17. Las tres placas se taparon y se agitaron en vórtice durante 10 minutos.
 18. Las placas se centrifugaron a 4 °C a 4000 rpm durante 10 minutos.
 19. Se transfirieron 150 μ l de muestras desactivadas desde cada placa a una placa de inyección de 96-DWP correspondiente.
 20. Se añadieron 150 μ l de ácido acético/agua al 0,1% a las placas de inyección.
 21. Las placas de inyección se taparon y se agitaron en vórtice durante 5 minutos.
 22. Las placas se centrifugaron a 4 °C a 4000 rpm durante 5 minutos.
 23. Las muestras en la Placa Receptora, la Placa Donante y la Placa de Recuperación se analizaron mediante LC/MS/MS
- 40 **[0091]** HPLC: Inyector de LC/HTC binario infinito Agilent 1290. Columna: Sigma-Aldrich Supelco Ascentis con núcleo fusionado C18, 2,7 μ m, 2,1 X 20 mm. Disolvente A: de ácido acético/agua al 0,1%. Disolvente B: ácido acético/acetonitrilo al 0,1%. Temperatura de columna: 40 °C. Volumen de inyección: 2 μ l. Tiempo/caudal: 0 min/0,5 ml/min | 1,3 min/0,5 ml/min | 1,31 min/1,0 ml/min | 1,7 min/1,0 ml/min.
- 45 **[0092]** MS/MS: Agilent 6460, Positivo, ESI. Temperatura del gas de impulsión: 400 °C. Flujo del gas de impulsión: 12 l/min. Temperatura de gas: 300 °C. Flujo de gas: 11 l/min. Voltaje capilar: 4000 V. Voltaje de boquilla: 500 V. Nebulizador: 35 psi. Voltaje de acelerador celular: 7 V.
- 50

o un estereoisómero, racemato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que Z se selecciona de R y OR¹,

en la que R se selecciona de grupos alquilo C1-C6, haloalquilo C1-C6, arilo C6-C10 y alquilo C3-C12 en los que uno o más carbonos están reemplazados por átomos de O o N, y

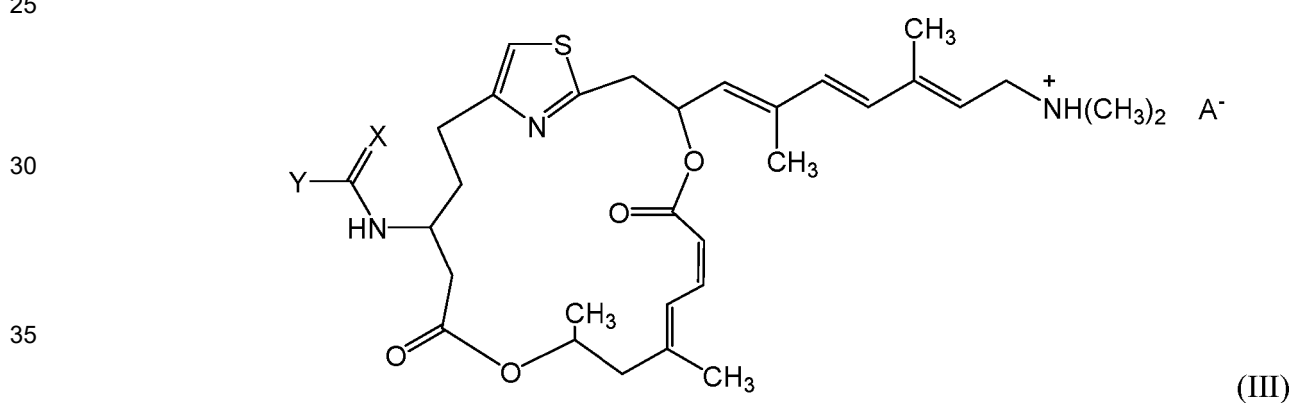
5 en la que R¹ se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1-C6, haloalquilo C1-C6, arilo C6-C10 y alquilo C3-C12, en los que uno o más átomos de carbono están reemplazados por átomos de O o N.

2. Compuesto, según la reivindicación 1(b) que tiene la fórmula (II):



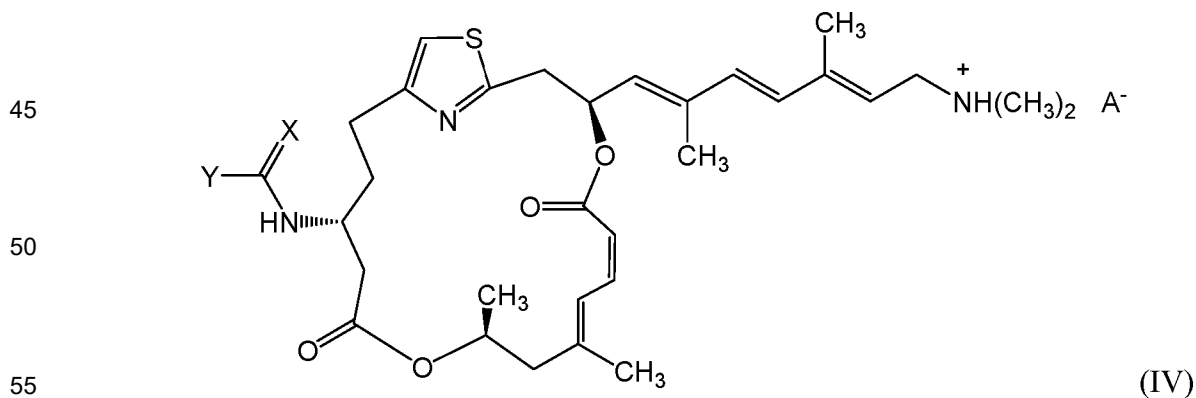
o una sal farmacéuticamente del mismo.

3. Compuesto, según la reivindicación 1(b) que tiene la fórmula (III):



en la que A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable.

4. Compuesto, según la reivindicación 2, que tiene la fórmula (IV):

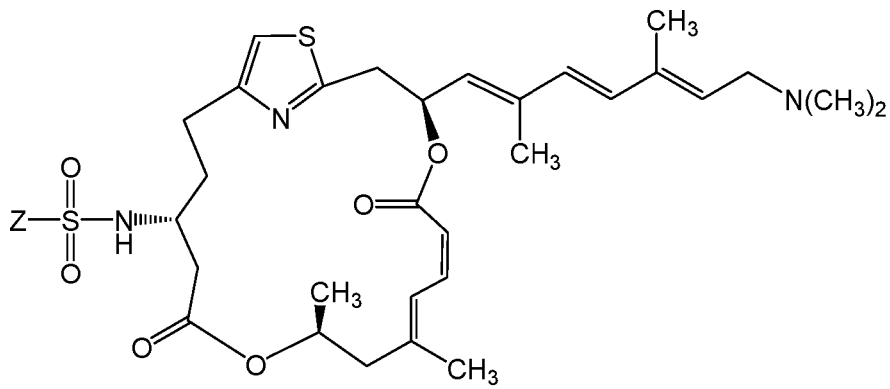


en la que A⁻ es un contraión farmacéuticamente aceptable.

5. Compuesto, según la reivindicación 1(c) que tiene la fórmula (VI):

60

5



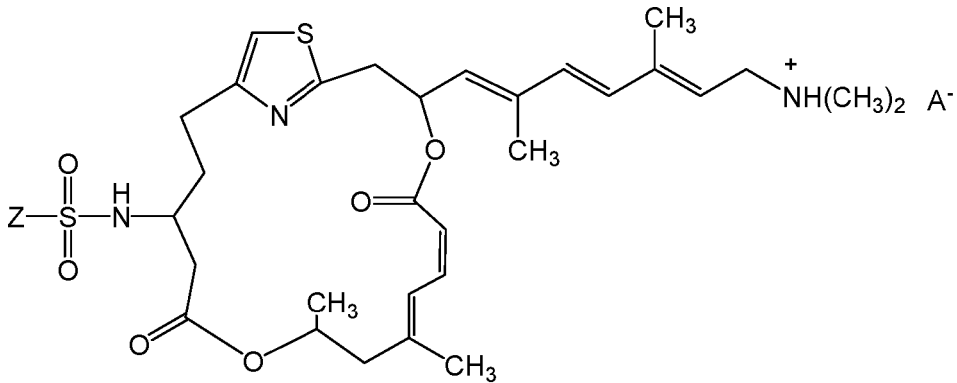
(VI)

o una sal farmacéuticamente del mismo.

15

6. Compuesto, según la reivindicación 1(c), que tiene la fórmula (VII):

20



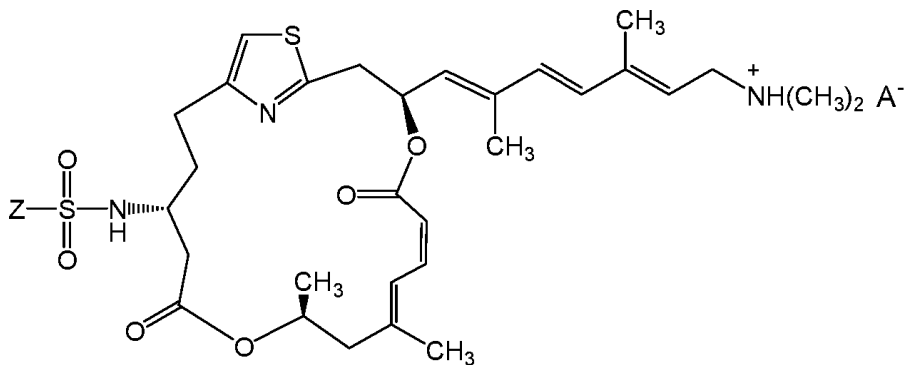
(VII)

en la que A^- es un contraión farmacéuticamente aceptable.

35

7. Compuesto, según la reivindicación 5, que tiene la fórmula (VIII):

40



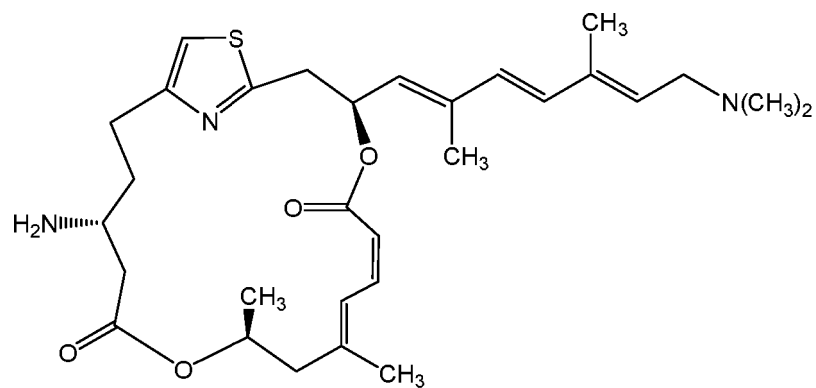
(VIII)

en la que A^- es un contraión farmacéuticamente aceptable.

55

8. Compuesto, según la reivindicación 1(a) que tiene la fórmula (X):

5

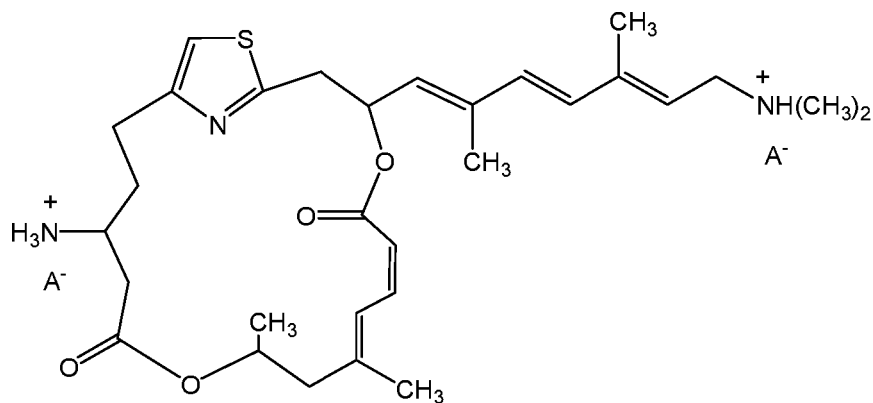


(X).

15 o un racemato o una sal farmacéuticamente del mismo.

9. Compuesto, según la reivindicación 1(a) que tiene la fórmula (XI):

20



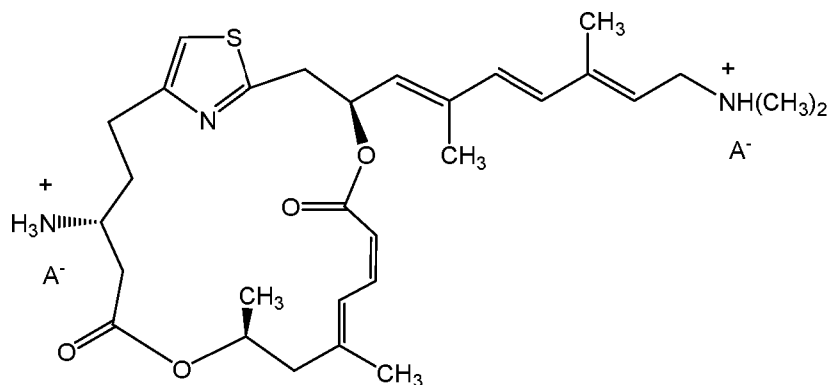
(XI)

35

o un estereoisómero, racemato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que A^- es un contraión farmacéuticamente aceptable.

10. Compuesto, según la reivindicación 8 que tiene la fórmula (XII):

40



(XII)

55

o un racemato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que A^- es un contraión farmacéuticamente aceptable.

60 11. Conjugado de anticuerpo para el suministro de un derivado de β -amino pateamina, que comprende un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, acoplado de manera covalente directamente o a través de una unidad enlazadora a un anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

12. Composición farmacéutica, que comprende:

- (a) un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un portador farmacéuticamente aceptable; o
- (b) el conjugado de anticuerpo, según la reivindicación 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 13. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, conjugado de anticuerpo, según la reivindicación 11, o composición farmacéutica, según la reivindicación 12, para usar en:

(a) un procedimiento para inhibir el crecimiento de células de leucemia linfocítica crónica (CLL), comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células de CLL con dicho compuesto o dicho conjugado de anticuerpo; o

10 (b) un procedimiento para tratar la leucemia linfocítica crónica (CLL), comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto, conjugado de anticuerpo o composición farmacéutica.

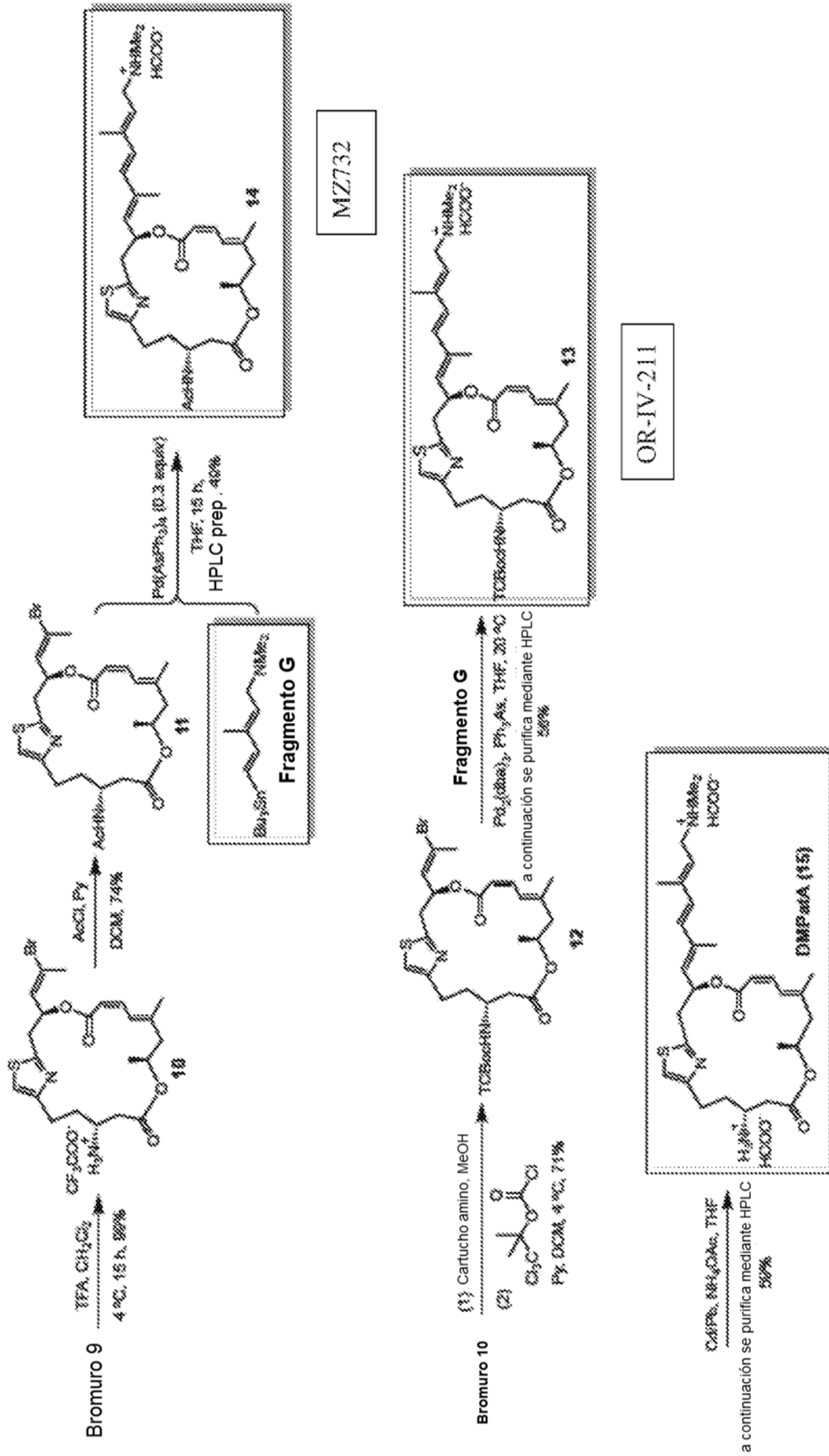


Fig. 2.

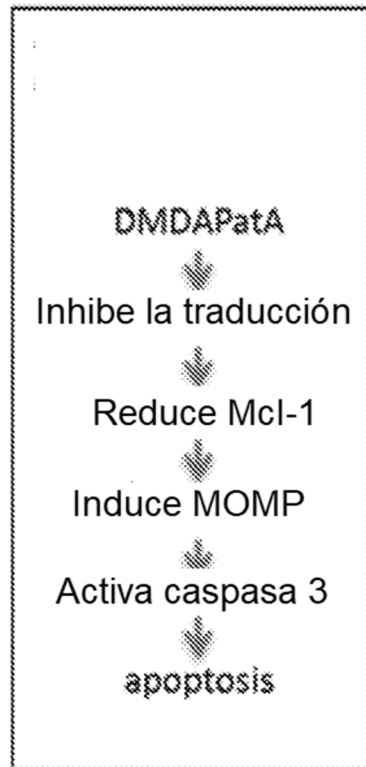


Fig. 3A.

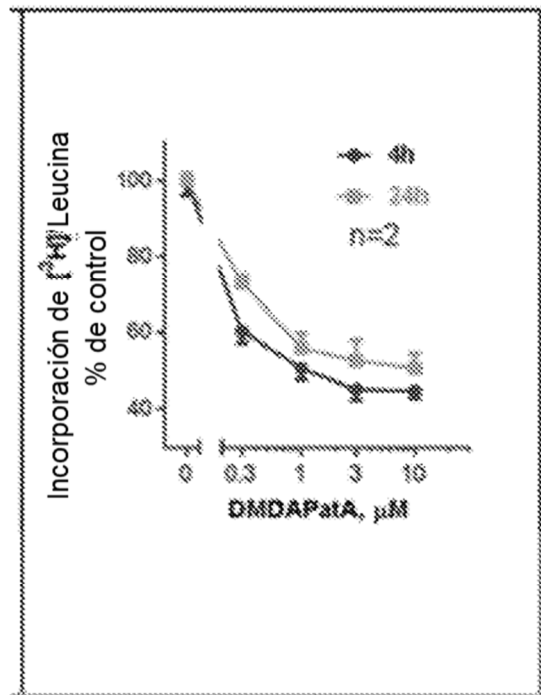


Fig. 3B.

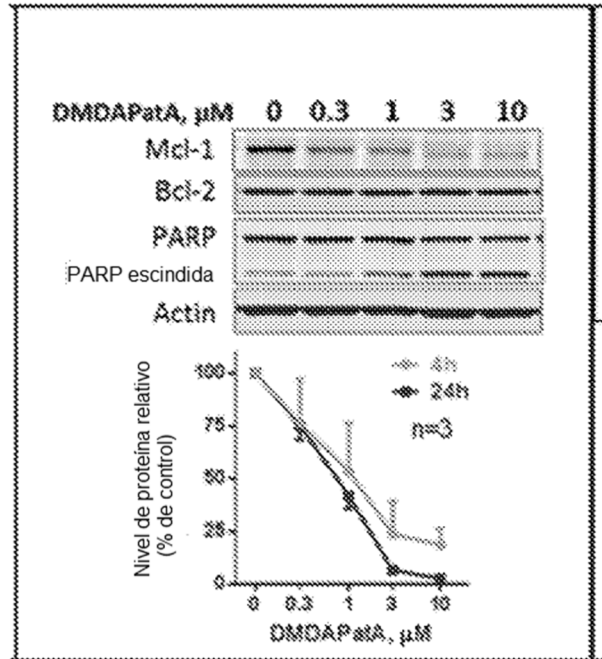


Fig. 3C.

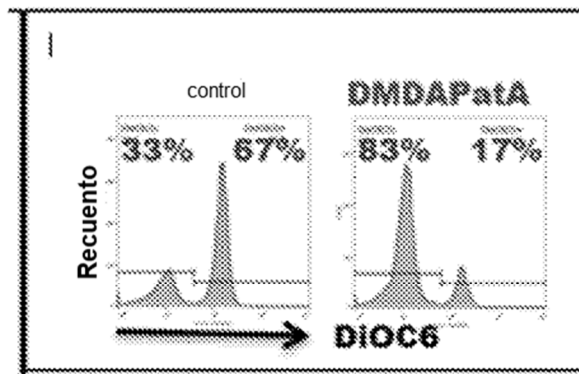


Fig. 3D.

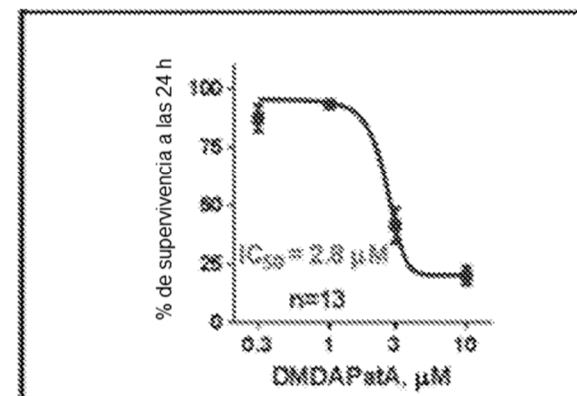


Fig. 3E.

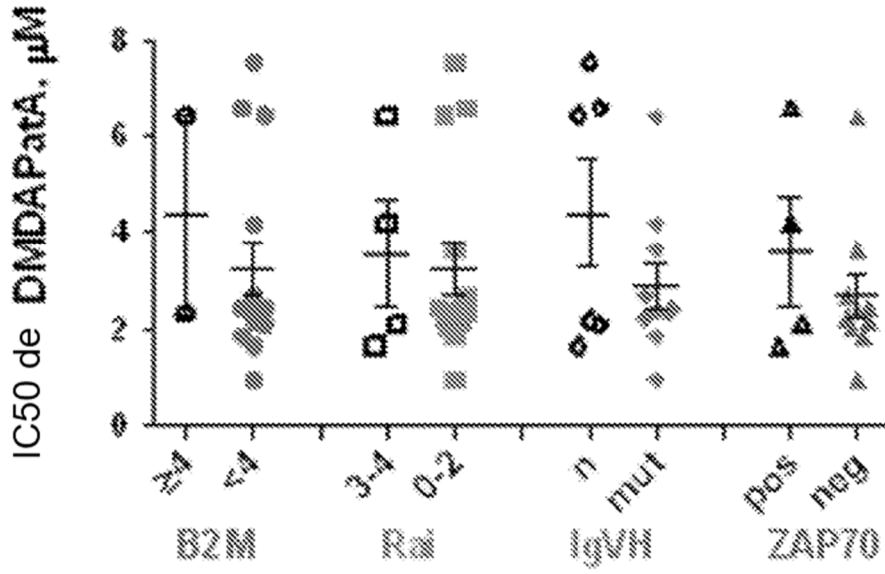


Fig. 4A.

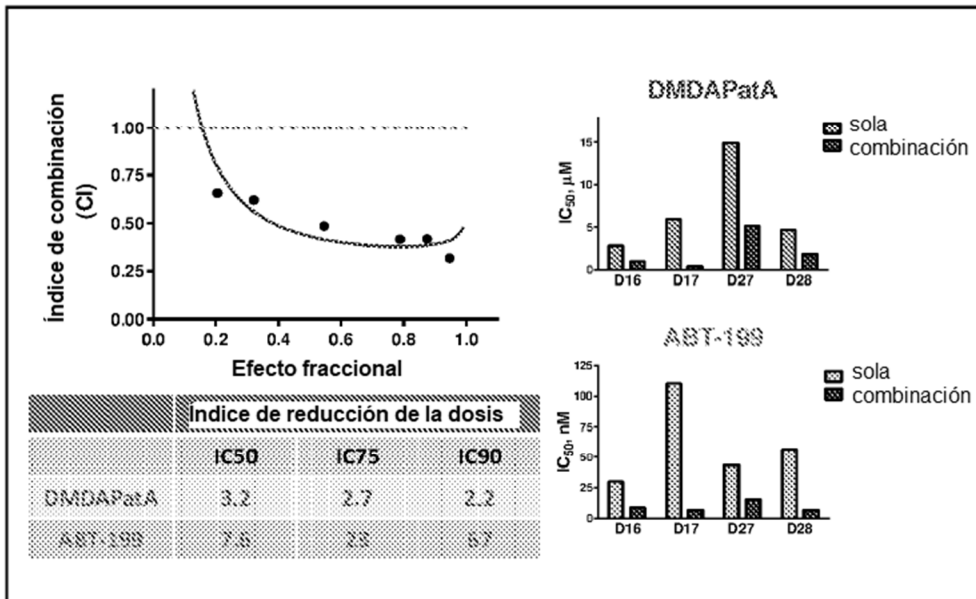


Fig. 4B.

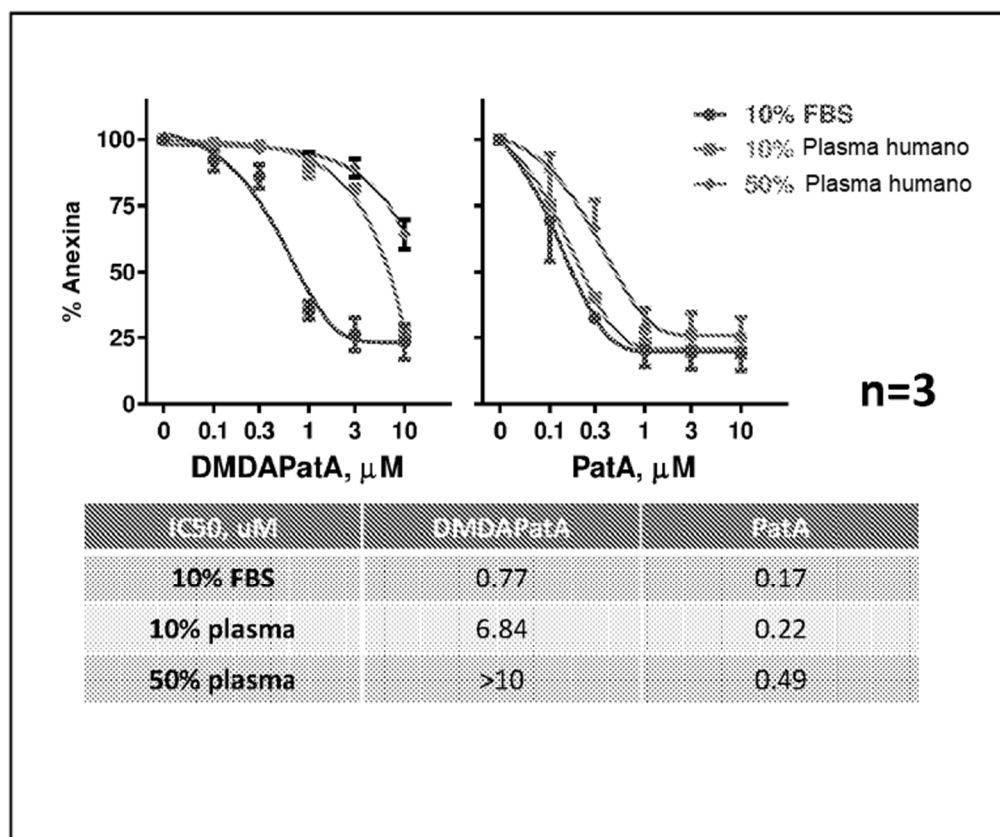


Fig. 5.

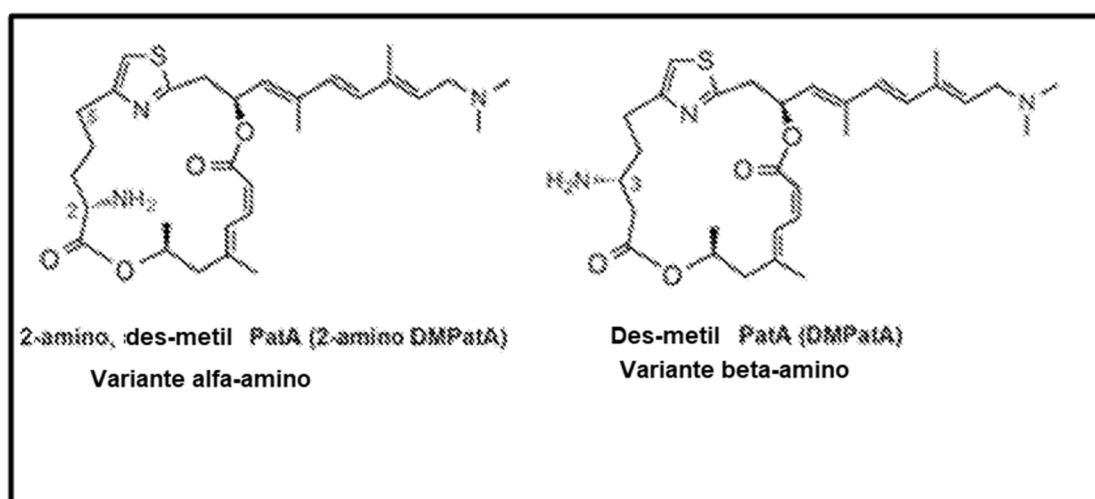


Fig. 6.

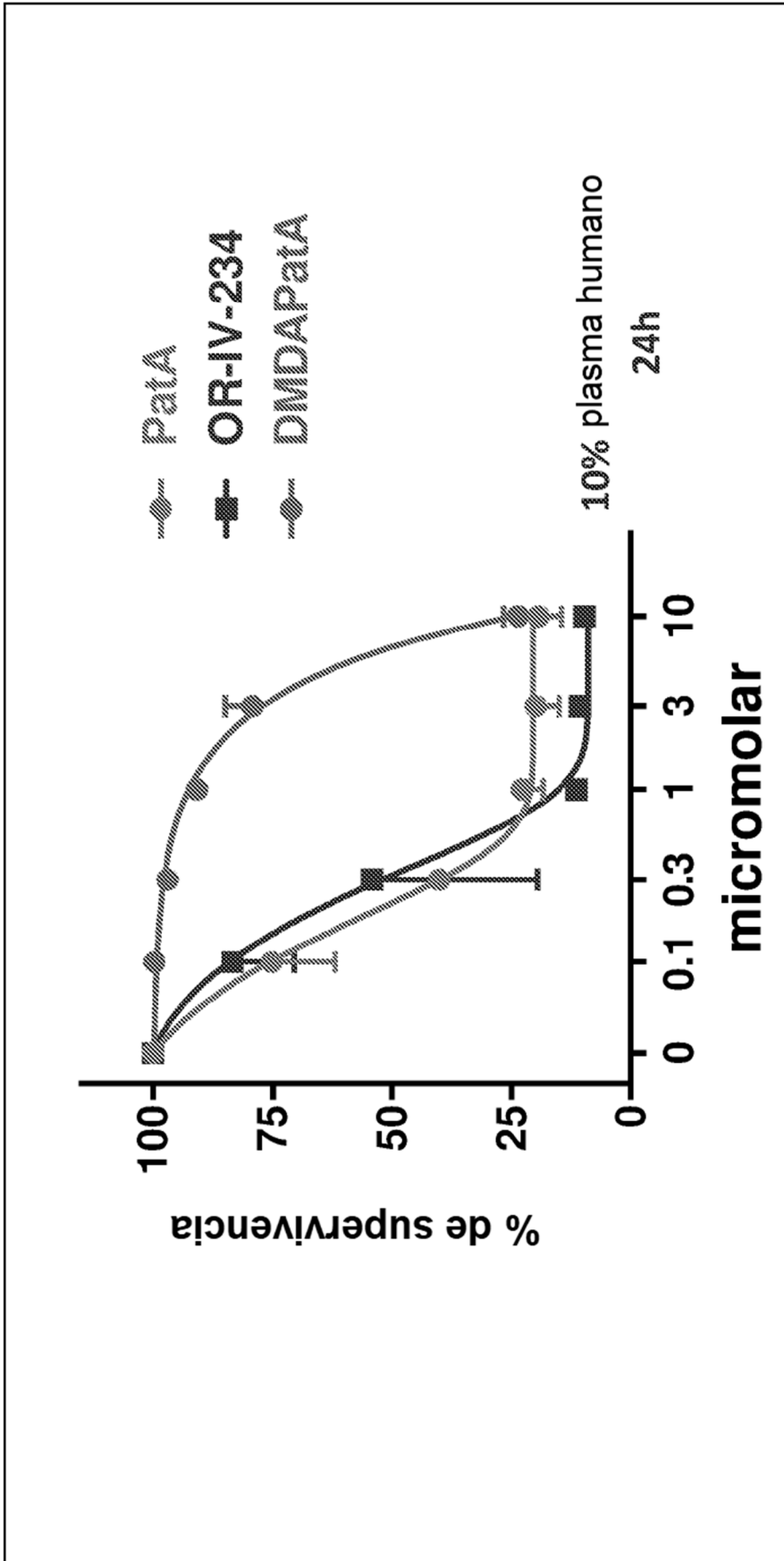


Fig. 7A.

Compuesto	IC50, μM		unión a proteína plasmática humana		unión a proteína FBS	
	Plasma	FBS	Fracción unida (%)	Recuperación (%)	Fracción unida (%)	Recuperación (%)
Pata	0.20	0.20	97.2	89.0	98.2	83.0
OR-IV-234	0.35	0.33	86.4	54.0		
DMDAPata	6.42	0.65	99.7	31.4	99.1	78.3

Fig. 7B.

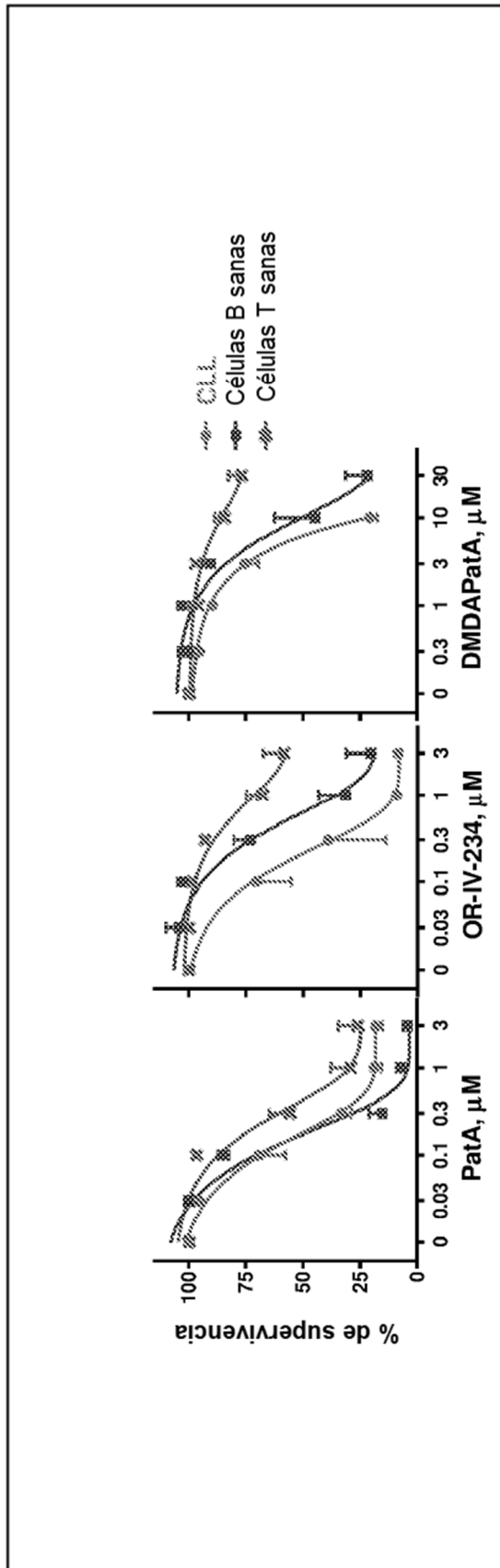


Fig. 8A.

IC50, μM	PatA	OR-IV-234	DMDAPoTA
CLL	0.16	0.21	6.16
B sanas	0.17	0.62	10.15
T sanas	0.42	>3	>30

Fig. 8B.

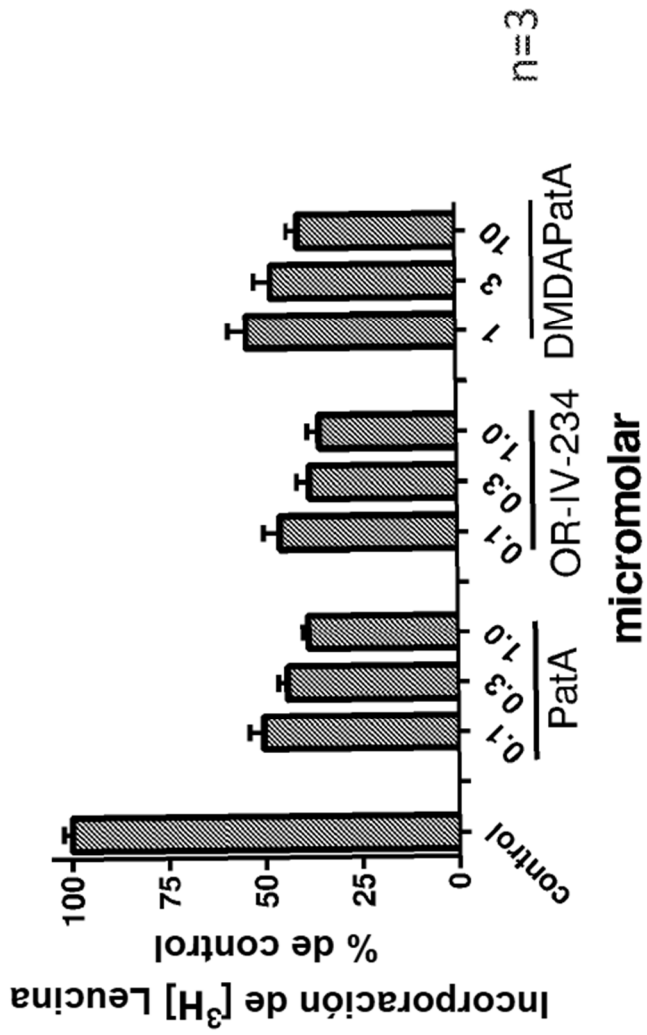


Fig. 9A.

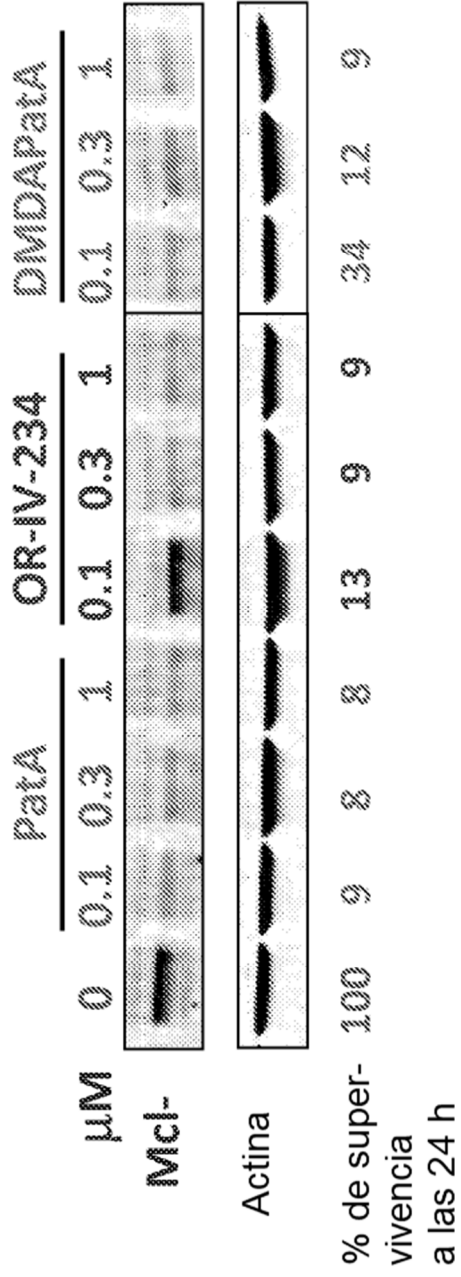


Fig. 9B.