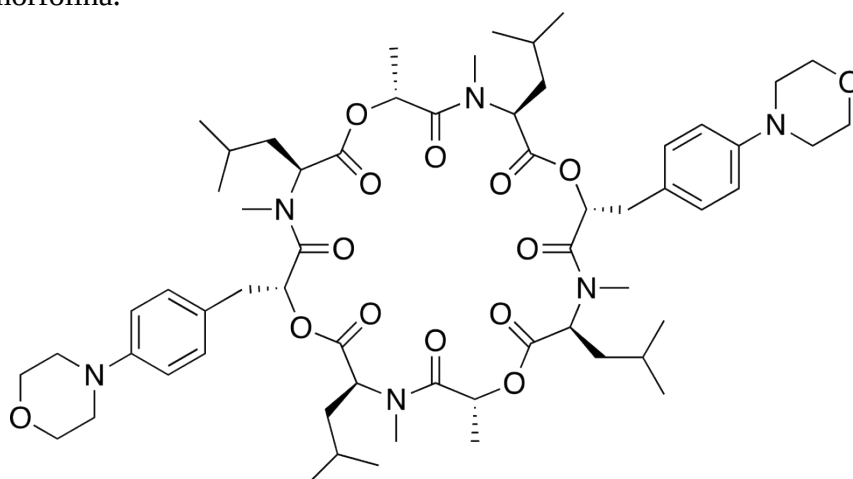


MÉTODO PARA LA SÍNTESIS DE DEPSIPÉPTIDOS CÍCLICOS

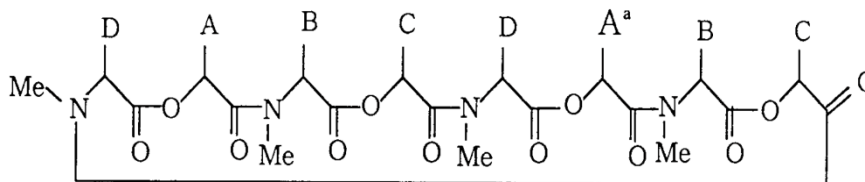
La presente invención se refiere a un método para la síntesis de depsipéptidos cíclicos, en particular, emodepsida, que implica etiquetas protectoras de grupos de ácido carboxílico específicas.

Emodepsida (ciclo[(*R*)-lactoil-*N*-metil-L-leucil-(*R*)-3-(*p*-morfolinofenil)lactoil-*N*-metil-L-leucil-(*R*)-lactoil-*N*-metil-L-leucil-(*R*)-3-(*p*-morfolinofenil)lactoil-*N*-metil-L-leucil) es un fármaco antelmíntico que es eficaz contra una cantidad de nematodos gastrointestinales. Su estructura molecular que se describe más adelante puede describirse como octadepsipéptidos cíclicos, donde un depsipéptido es un péptido donde uno o más de sus grupos amida se remplazan por los correspondientes grupos éster. En una escala técnica emodepsida puede obtenerse por derivación de la sustancia de origen natural PF1022A donde dos átomos de hidrógeno se intercambian por anillos de morfolina.



(Emodepsida)

WO 93/19053 A1 (EP 0 634 408 A1) divulga un compuesto de la fórmula general:



donde A es grupo bencilo que tiene sustituyentes adecuados o grupo fenilo que puede tener sustituyentes adecuados, A^a es grupo bencilo que puede tener sustituyentes adecuados o grupo fenilo que puede tener sustituyentes adecuados, B y D son cada uno alquilo inferior, C es hidrógeno o alquilo inferior, y una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

WO 2005/055973 A2 divulga agentes transdérmicamente aplicables que

contienen depsipéptidos cíclicos y/o praziquantel, además de la producción de estos y al uso de estos para combatir endoparásitos. Combinaciones de emodepsida y praziquantel o epsiprantel y también 1,2-isopropilidenglicol como endoparasitcidas se divulgan en WO 2006/094664 A1.

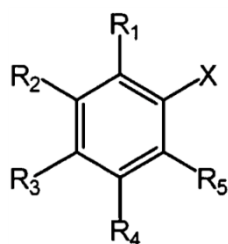
5 WO 2006/053641 A1 se refiere al uso de depsipéptidos endoparasitcidas para producir farmacéuticos para prevenir la infección vertical con endoparásitos.

La síntesis total de, entre otros, PF1022A y su derivación se describen en el artículo de revisión "Cyclodepsipeptides: A Rich Source of Biologically Active Compounds for Drug Research" por Sivatharushan Sivanathan y Jürgen Scherkenbeck,
10 *Molecules* **2014**, 19, 12368-12420; doi:10.3390/molecules190812368. Se han establecido varias síntesis totales de ciclodepsipéptidos tanto en solución como en fase sólida, permitiendo la producción de librerías combinatorias. Además, la biosíntesis de ciclodepsipéptidos específicos se aclaró y usó para la preparación quimioenzimática de análogos no naturales. El artículo de revisión también resume la literatura reciente
15 acerca de tetra a decadepsipéptidos cíclicos, compuestos exclusivamente de α -amino- y α -hidroxi ácidos.

En la síntesis de polipéptidos una estrategia de fase sólida tiene la ventaja de la fácil separación de los productos de reacción, mientras que una estrategia de fase líquida tiene la ventaja de condiciones de reacción homogéneas. Un enfoque híbrido es
20 una estrategia asistida por etiquetas donde los compuestos que tienen un grupo de etiqueta se separan fácilmente de las moléculas no etiquetadas.

Con respecto a esto, JP 2000/044493 A1 divulga un grupo protector para sintetizar una librería de compuestos que consiste en compuestos capaces de enlazarse con un compuesto a proteger en una relación 1:1, que tiene una sola estructura
25 molecular y también tiene ≥ 500 peso molecular, y consiste en 3,4,5-tris-(n-octadeciloxi)bencil alcohol, 3,4,5-tris-(n-octadeciloxi)bencil cloruro o metil 3,4,5-tris-(n-octadeciloxi)benzoato.

EP 2 003 104 A2 se refiere a un reactivo para la síntesis orgánica con la que una reacción química puede realizarse en una fase líquida y compuestos innecesarios pueden
30 separarse fácilmente a bajo costo de la fase líquida luego de completarse la reacción. Se reporta que el reactivo para la síntesis orgánica que se describe más adelante cambia reversiblemente de un estado de fase líquida a un estado de fase sólida con cambios en la composición de la solución y/o temperatura de la solución, y es para uso en reacciones de síntesis orgánica.



R₁ a R₅ pueden ser iguales o diferentes, y representan hidrógeno, halógeno, grupo alquilo con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo alcoxilo con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo arilo con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo acilo con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo tioalquilo con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo dialquilamino con un número de carbono de 1 a 30 que puede tener un grupo sustituyente, grupo nitro, o grupo amino; y al menos dos de R₁ a R₅ son grupos con un número de carbono de 18 a 30, y X representa un sitio activo al reactivo que tiene uno o más átomos que se seleccionan del grupo que consiste en un átomo de carbono, átomo de oxígeno, átomos de azufre y átomo de nitrógeno.

La publicación "Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis Using Hydrophobic Benzyl Alcohols as Supports" por Yohei Okada, Hideaki Suzuki, Takashi Nakae, Shuji Fujita, Hitoshi Abe, Kazuo Nagano, Toshihide Yamada, Nobuyoshi Ebata, Shokaku Kim, y Kazuhiro Chiba, *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 320-327; doi: 10.1021/jo302127d; reporta que una síntesis de péptidos de fase líquida asistida por etiquetas se estableció satisfactoriamente en función de bencil alcoholes hidrofóbicos simples, que pueden prepararse fácilmente a partir de materiales naturalmente abundantes. Se reporta que se obtienen excelentes resultados de precipitación en cada paso, combinando las mejores propiedades de las técnicas de fase sólida y fase líquida. Se reporta que este enfoque puede aplicarse eficientemente a acoplamientos de fragmentos, permitiendo la síntesis química de varios péptidos bioactivos.

La publicación "A Novel Protecting Group for Constructing Combinatorial Peptide Libraries" por Hitoshi Tamiaki, Tomoyuki Obata, Yasuo Azefu y Kazunori Toma, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2001**, 74, 733-738; doi <http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.74.733>; divulga 3,4,5-tris(octadeciloxi)bencil alcohol, HO-Bzl(OC₁₈)₃ que se preparó a partir de ácido gálico y estearil bromuro. Usando elongación convencional en pasos, se sintetizaron péptidos N,C-protectados, Fmoc-AA_n-...-AA₁-OBzl(OC₁₈)₃. Los bencil ésteres sustituidos se escindieron selectivamente por un tratamiento con 4 M cloruro de hidrógeno en acetato de etilo para proporcionar Fmoc-AA_n-...-AA₁-OH y HO-Bzl(OC₁₈)₃. Por ende, se reporta que el grupo bencilo

10

The diagram shows a 14-membered macrocyclic lactam. The ring consists of four amide bonds (N-C=O) and ten methylene groups. The substituents are as follows:

- Top-left amide nitrogen:** Substituted with R^b (dashed bond) and R^1 (wedged bond). The carbonyl carbon is also bonded to $R^{1'}$ (dashed bond).
- Top-right amide nitrogen:** Substituted with R^1 (wedged bond) and $R^{1'}$ (dashed bond). The carbonyl carbon is also bonded to $R^{1'}$ (dashed bond).
- Bottom-right amide nitrogen:** Substituted with R^2 (wedged bond) and $R^{2'}$ (dashed bond). The carbonyl carbon is also bonded to $R^{2'}$ (dashed bond).
- Bottom-left amide nitrogen:** Substituted with R^3 (wedged bond) and $R^{3'}$ (dashed bond). The carbonyl carbon is also bonded to $R^{3'}$ (dashed bond).
- Left amide nitrogen:** Substituted with R^4 (wedged bond) and $R^{4'}$ (dashed bond). The carbonyl carbon is also bonded to $R^{4'}$ (dashed bond).
- Other substituents:** R^a is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^b is on a methylene group adjacent to the top-left amide. R^c is on a methylene group adjacent to the top-right amide. R^d is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^e is on a methylene group adjacent to the bottom-left amide. R^f is on a methylene group adjacent to the left amide. R^g is on a methylene group adjacent to the top-left amide. R^h is on a methylene group adjacent to the top-right amide. R^i is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^j is on a methylene group adjacent to the bottom-left amide. R^k is on a methylene group adjacent to the left amide. R^l is on a methylene group adjacent to the top-left amide. R^m is on a methylene group adjacent to the top-right amide. R^n is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^o is on a methylene group adjacent to the bottom-left amide. R^p is on a methylene group adjacent to the left amide. R^q is on a methylene group adjacent to the top-left amide. R^r is on a methylene group adjacent to the top-right amide. R^s is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^t is on a methylene group adjacent to the bottom-left amide. R^u is on a methylene group adjacent to the left amide. R^v is on a methylene group adjacent to the top-left amide. R^w is on a methylene group adjacent to the top-right amide. R^x is on a methylene group adjacent to the bottom-right amide. R^y is on a methylene group adjacent to the bottom-left amide. R^z is on a methylene group adjacent to the left amide.

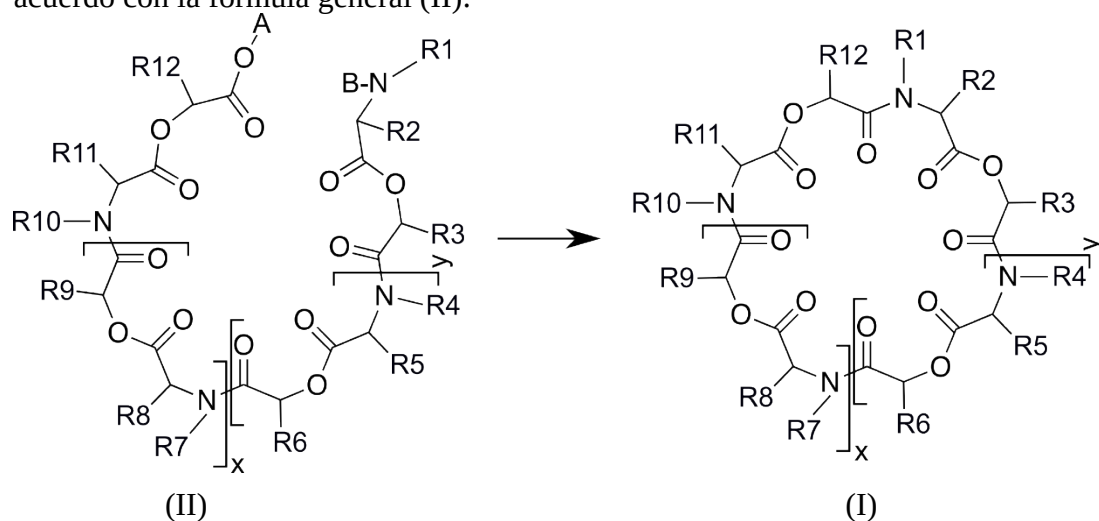
15

La presente invención tiene el objeto de proveer una mejor ruta sintética a emodepsida y depsipéptidos cíclicos relacionados. Otro objeto de la invención es

proveer depsipéptidos novedosos que pueden sintetizarse usando esta ruta.

Este objeto se logra por un método de acuerdo con la reivindicación 1 y depsipéptidos de acuerdo con la reivindicación 22. Modalidades ventajosas de la invención son la materia de las reivindicaciones dependientes. Pueden combinarse libremente salvo que el contexto diga lo contrario.

Por ende, la presente invención provee un método para la síntesis de depsipéptidos cíclicos de acuerdo con la fórmula general (I) a partir de depsipéptidos de acuerdo con la fórmula general (II):



donde B es un grupo protector amino y A es un grupo protector ácido carboxílico,

el método comprende los pasos de:

- desproteger el grupo amino que se protege por el grupo B, obteniendo así un grupo amino desprotegido;
- desproteger el ácido carboxílico que se protege por el grupo A, obteniendo así un grupo ácido carboxílico desprotegido;
- condensación de los grupos amino y ácido carboxílico desprotegidos, obteniendo así el depsipéptido cíclico (I)

por lo que x e y son, independientemente uno del otro, 0, 1 o 2 con la condición de que $x+y \geq 1$ (preferentemente, x e y son 1) y R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 cada uno, independientemente uno del otro, representan hidrógeno, alquilo-C1-C8 de cadena recta o ramificada, en particular, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, hexilo, isohexilo, sec-hexilo, heptilo, isoheptilo, sec-heptilo, terc-heptilo, octilo, isooctilo, sec-octilo, alquilo C1-C8 halogenado de cadena recta o ramificada, en particular, sec-butilo fluorinado, hidroxialquilo-C1-C6, en particular, hidroximetilo, 1-

hidroxietilo, alcanoiloxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, acetoximetilo, 1-acetoxietilo, alcoxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metoximetilo, 1-metoxietilo, aril-alquilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, benciloximetilo, 1-benciloxietilo, mercapto-alquilo-C1-C6, en particular, mercaptometilo, alquiltio-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metiltioetilo, alquilsulfinilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfiniletilo, alquilsulfonilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfoniletilo, carboxi-alquilo-C1-C6, en particular, carboximetilo, carboxietilo, alcoxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metoxicarbonilmetilo, etoxicarboniletilo, arilalcoxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, benciloxicarbonilmetilo, carbamoil-alquilo-C1-C6, en particular, carbamoilmetilo, carbamoiletilo, amino-alquilo-C1-C6, en particular, aminopropilo, aminobutilo, alquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilaminopropilo, metilaminobutilo, dialquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, dimetilaminopropilo, dimetilaminobutilo, guanidino-alquilo-C1-C6, en particular, guanidinopropilo, alcoxicarbonilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, terc-butoxicarbonilaminopropilo, terc-butoxicarbonilaminobutilo, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)amino-alquilo-C1-C6, en particular, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)aminopropilo, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)aminobutilo, alquenilo-C2-C8, en particular, vinilo, alilo, butenilo, cicloalquilo-C3-C7, en particular, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, cicloalquilo-C3-C7-alquilo-C1-C4, en particular, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, cicloheptilmetilo, bencilo, bencilo sustituido, fenilo, fenil-alquilo-C1-C4, en particular, fenilmetilo que puede estar opcionalmente sustituido por radicales del grupo que consiste en halógeno, en particular, flúor, cloro, bromo o yodo, hidroxilo, alcoxi-C1-C4, en particular, metoxi o etoxi, alquilo-C1-C4, en particular, metilo.

Los grupos protectores A y B pueden ser ortogonales en el sentido que cuando el grupo B está desprotegido, el grupo A está estable; sin embargo, es también una modalidad de la presente invención que A y B estén desprotegidos simultáneamente.

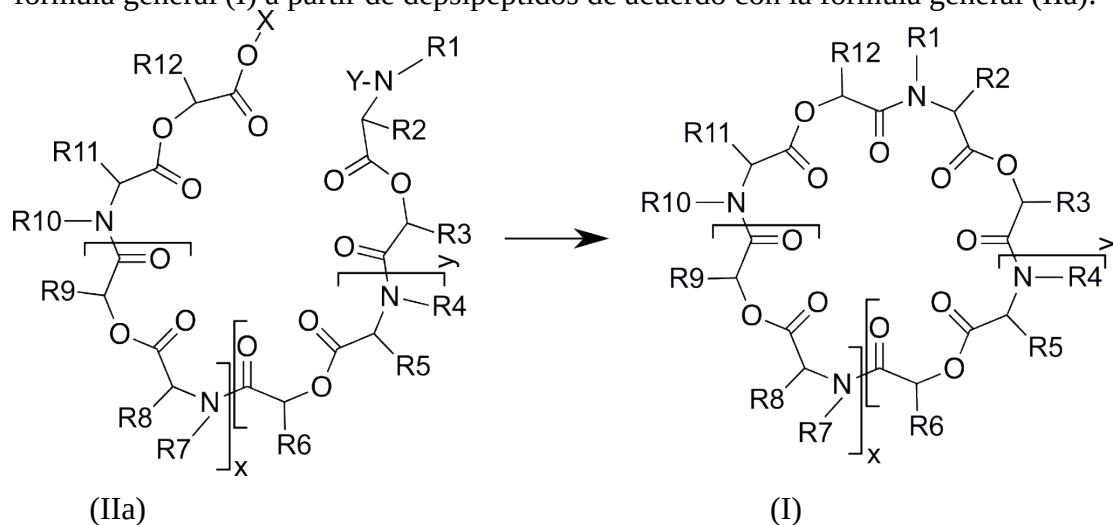
En el método de acuerdo con la invención se encontró sorprendentemente que los depsipéptidos cíclicos (I), en particular, emodepsida y estructuras estrechamente relacionadas, pueden sintetizarse en grandes rendimientos totales.

Luego de la desprotección los grupos amino y ácido carboxílico se hacen reaccionar para formar un enlace peptídico. Agentes de acoplamiento adecuados junto con una base como N,N-Diisopropiletilamina incluyen PyBOP (benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato), BOP ((Benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato), BOP-Cl (Cloruro Bis(2-oxo-3-

oxazolidinil)fosfínico), EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), DEPBT (3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona), HATU (1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) y, más preferido, T3P® (anhídrido propilfosfónico, 2,4,6-Tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosforinano-2,4,6-trióxido, PPACA).

En una modalidad del método de acuerdo con la invención x es 1, y es 1, R1, R4, R7 y R10 son metilo, R6 y R12 son metilo, R5 y R11 son, independientemente uno del otro, alquilo-C1-C4 de cadena recta o ramificada o alquilo-C1-C4 halogenado de cadena recta o ramificada y R3 y R9 son, independientemente uno del otro, bencilo o bencilo sustituido. De acuerdo con una modalidad de la invención preferida, R3 y/o R9 son bencilo sustituido con p-morfolino.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, A es lábil al ácido mientras que B es lábil a la hidrogenólisis. Por ende, es una modalidad de la presente invención proveer un método para la síntesis de depsipéptidos cíclicos de acuerdo con la fórmula general (I) a partir de depsipéptidos de acuerdo con la fórmula general (IIa):



donde Y un grupo protector amino y X es un grupo protector ácido carboxílico, el método comprende las etapas de:

- desproteger el grupo amino que se protege por el grupo Y en presencia de un ácido, obteniendo así un grupo amino desprotegido;
- desproteger el ácido carboxílico que se protege por el grupo X por hidrogenólisis, obteniendo así un grupo ácido carboxílico desprotegido;
- condensación de los grupos amino y ácido carboxílico desprotegidos, obteniendo así el depsipéptido cíclico (I)

En el método de acuerdo con esta modalidad se encontró sorprendentemente que

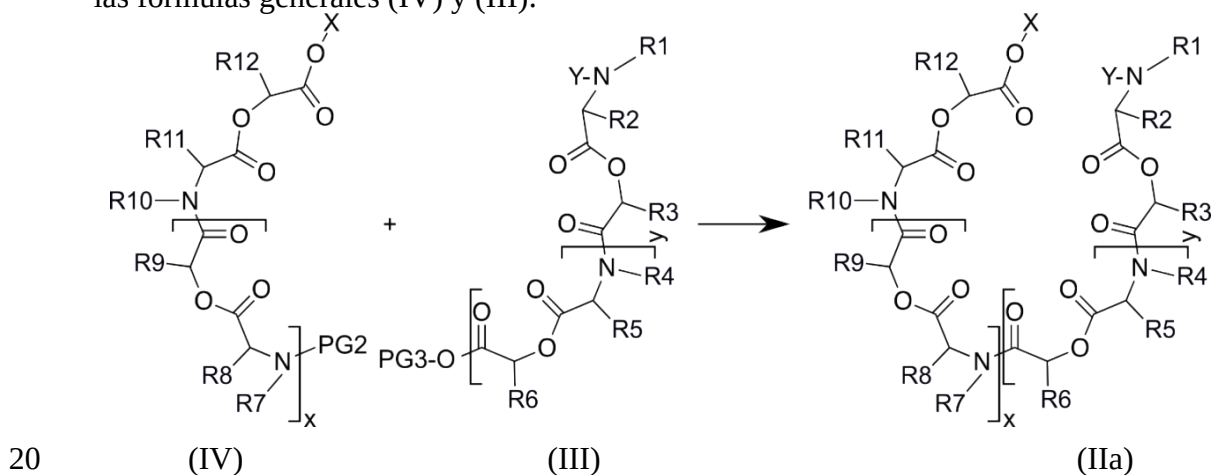
los depsipéptidos cíclicos (I), en particular, emodepsida y estructuras estrechamente relacionadas, pueden sintetizarse en grandes rendimientos totales.

El término “hidrogenólisis” debe entenderse en su sentido más amplio y no se limita explícitamente a una reacción con hidrógeno gaseoso y/o molecular, aunque es una modalidad de la presente invención. Catalizadores adecuados son Pd, Pd/C, Pt, Pt/C. El término “hidrogenólisis” también significa incluir reacciones donde el hidrógeno se forma *in situ* o solo formal y donde se emplean los reactivos de hidrogenólisis como hidrazina o diimida etc.

En una modalidad de la presente invención, X es un grupo -CH₂-Arilo sustituido o insustituido. De acuerdo con una modalidad, X se selecciona del grupo bencilo (Bn), 4-metoxi-bencilo (PMB), 3,4-dimetoxibencilo (DPMB), 4-fenil-bencilo (PPB), 2-naftilmetilo (Nap), Benciloximetil acetal (BOM).

En una modalidad de la presente invención, Y es t-butiloxicarbonilo (Boc), tritilo (Trt), p-metoxibencil carbamato (Moz) o p-Nitrobencil carbamato (PNZ). Más
15 preferentemente, Y es Boc.

En otra modalidad del método de acuerdo con la invención el depsipéptido de acuerdo con la fórmula general (IIa) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (IV) y (III):



por:

- en el precursor (IV), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG2 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;
- en el precursor (III), desproteger el ácido carboxílico que se protege por el grupo PG3 en presencia de un ácido, obteniendo así un grupo ácido carboxílico desprotegido;
- condensación de los grupos amino y ácido carboxílico desprotegidos, obteniendo así el depsipéptido (IIa);

Preferentemente el precursor de acuerdo con la fórmula general (IV) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (VI) y (V):

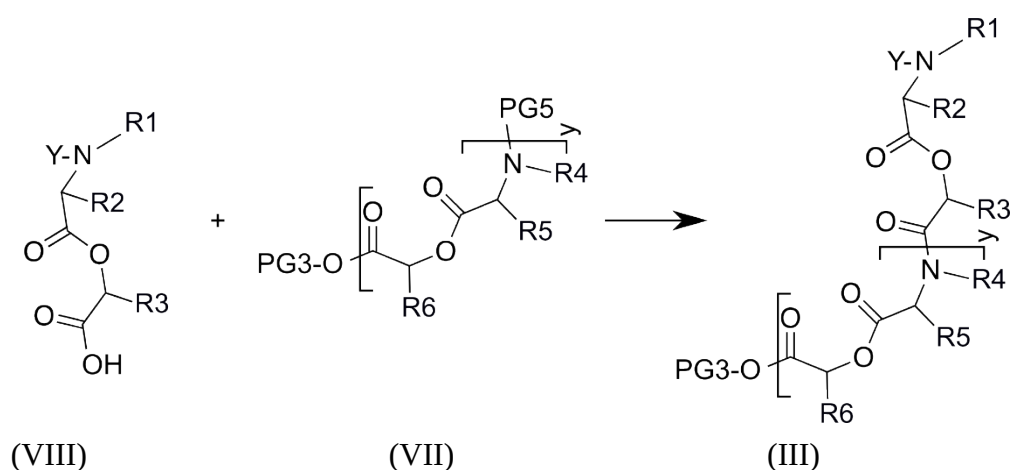


- en el precursor (VI), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG4 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;

- condensación del grupo amino desprotegido del precursor (VI) y grupo ácido carboxílico del precursor (V), obteniendo así el precursor (IV);

donde R7 a R12, X y x tienen un significado como se define anteriormente (en particular, x puede ser 1), PG2 tiene un significado como se define anteriormente y PG4 es un grupo protector amino. Los métodos de desprotección y condensación pueden ser iguales que los señalados con relación a la reacción de compuestos (II) a (I) anteriormente.

También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (III) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (VIII) y (VII):

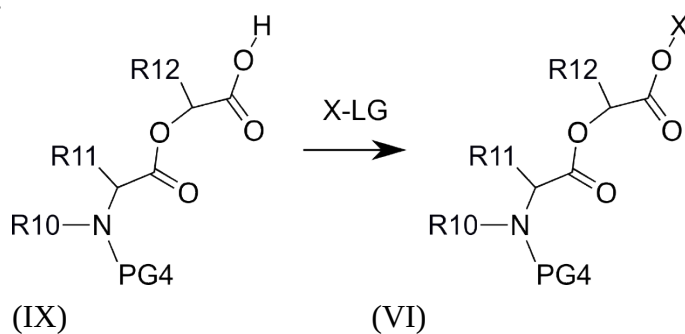


por:

- en el precursor (VII), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG5 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;
- condensación del grupo amino desprotegido del precursor (VII) y grupo ácido carboxílico del precursor (VIII), obteniendo así el precursor (III);

donde R1 a R6, Y e y tienen un significado como se define anteriormente (en particular, y puede ser 1), PG3 tiene un significado como se define anteriormente y PG5 es un grupo protector amino. Los métodos de desprotección y condensación pueden ser iguales que los señalados con relación a la reacción de compuestos (II) a (I) anteriormente.

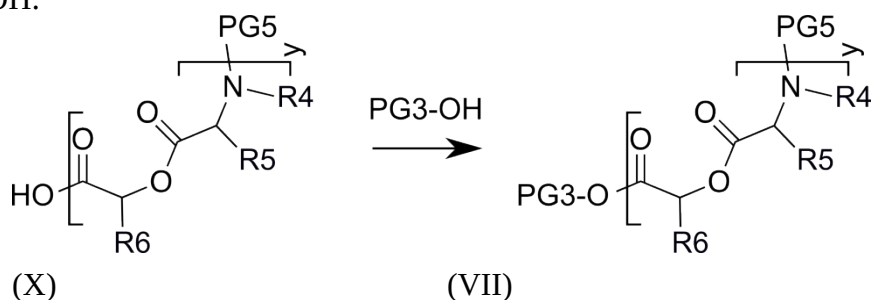
También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (VI) se obtiene de la esterificación de un precursor de acuerdo con la fórmula general (IX) con X-LG:



donde R10 a R12, y X tienen un significado como se define anteriormente y PG4 tiene un significado como se define anteriormente y LG es un grupo saliente. La protección o etiquetado del grupo ácido carboxílico en (IX) puede efectuarse usando procedimientos estándar, LG a menudo será halogenuro, especialmente cloruro. De manera alternativa LG puede ser -OH, luego a menudo aplicarán protocolos de condensación estándar.

También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (VII) se

obtiene de la esterificación de un precursor de acuerdo con la fórmula general (X) con PG3-OH:

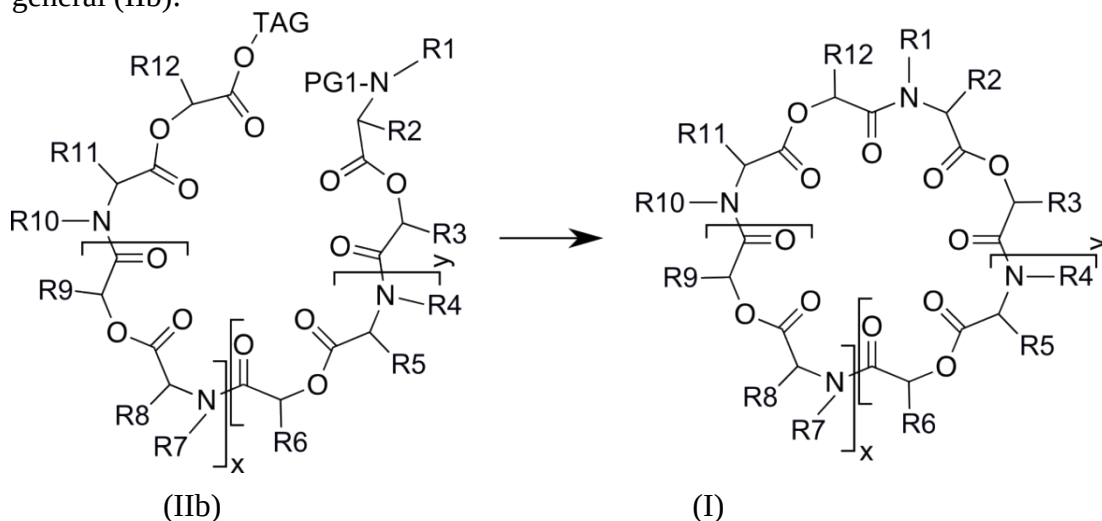


5 donde R4 a R6, e y tienen un significado como se define anteriormente, PG3 también tiene un significado como se define anteriormente y PG5 también tiene un significado como se define anteriormente.

También se prefiere que los precursores (III) y (IV) sean idénticos.

También se prefiere que R3 y R9 sean idénticos, R1 y R7 sean idénticos, R2 y
10 R8 sean idénticos, R4 y R10 sean idénticos, R5 y R11 sean idénticos y R6 y R12 sean idénticos.

De acuerdo con una modalidad alternativa de la presente invención, A es lábil a la base mientras que B es lábil al ácido. Por ende, una modalidad alternativa de la presente invención provee un método para la síntesis de depsipéptidos cíclicos de
15 acuerdo con la fórmula general (I) a partir de depsipéptidos de acuerdo con la fórmula general (IIb):



20 donde PG1 es un grupo protector amino y TAG es un grupo protector ácido carboxílico,

el método comprende las etapas de:

- desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG1 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;

- desproteger el ácido carboxílico que se protege por el grupo TAG en presencia de un ácido, obteniendo así un grupo ácido carboxílico desprotegido;
- condensación de los grupos amino y ácido carboxílico desprotegidos, obteniendo así el depsipéptido cíclico (I)

5 El grupo TAG comprende un resto Arilo-O-(CH₂)_n- donde Arilo representa un resto aromático y n es ≥ 13 , x e y son, independientemente uno del otro, 0, 1 o 2 con la condición de que $x+y \geq 1$ (preferentemente, x e y son 1) y R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 cada uno, independientemente uno del otro, representan hidrógeno, alquilo-C1-C8 de cadena recta o ramificada, en particular, metilo, etilo, 10 propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, hexilo, isohexilo, sec-hexilo, heptilo, isoheptilo, sec-heptilo, terc-heptilo, octilo, isooctilo, sec-octilo, alquilo C1-C8 halogenado de cadena recta o ramificada, en particular, sec-butilo fluorinado, hidroxialquilo-C1-C6, en particular, hidroximetilo, 1-hidroxietilo, alcanoiolo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, acetoximetilo, 1-acetoxietilo, 15 alcoxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metoximetilo, 1-metoxietilo, arilalquiloxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, benciloximetilo, 1-benciloxietilo, mercaptoalquilo-C1-C6, en particular, mercaptometilo, alquiltio-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metiltioetilo, alquilsulfinilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfinietilo, alquilsulfonilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfonietilo, 20 carboxialquilo-C1-C6, en particular, carboximetilo, carboxietilo, alcóxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metóxicarbonilmetilo, etóxicarbonietilo, arilalcóxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, bencilóxicarbonilmetilo, carbamoilalquilo-C1-C6, en particular, carbamoilmetilo, carbamoiletilo, aminoalquilo-C1-C6, en particular, aminopropilo, aminobutilo, alquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilaminopropilo, metilaminobutilo, dialquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, 25 en particular, dimetilaminopropilo, dimetilaminobutilo, guanidinoalquilo-C1-C6, en particular, guanidinopropilo, alcóxicarbonilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, terc-butoxicarbonilaminopropilo, terc-butoxicarbonilaminobutilo, 9-fluorenilmetóxicarbonil(Fmoc)aminoalquilo-C1-C6, en particular, 9-fluorenilmetóxicarbonil(Fmoc)aminopropilo, 30 9-fluorenilmetóxicarbonil(Fmoc)aminobutilo, alqueno-C2-C8, en particular, vinilo, alilo, butenilo, cicloalquilo-C3-C7, en particular, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, cicloalquilo-C3-C7-alquilo-C1-C4, en particular, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, cicloheptilmetilo, bencilo, bencilo sustituido, fenilo, fenilalquilo-C1-C4, en particular, 35 fenilmetilo que puede estar opcionalmente sustituido por radicales del grupo que

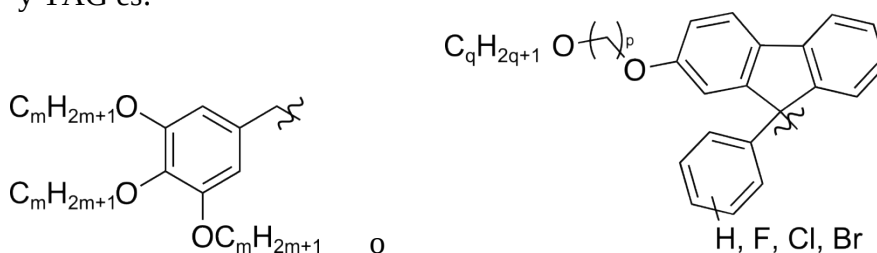
consiste en halógeno, en particular, flúor, cloro, bromo o yodo, hidroxilo, alcoxi-C1-C4, en particular, metoxi o etoxi, alquilo-C1-C4, en particular, metilo.

En el método de acuerdo con la invención se encontró sorprendentemente que los depsipéptidos cíclicos (I), en particular, emodepsida y estructuras estrechamente relacionadas, pueden sintetizarse en grandes rendimientos totales usando grupos protectores de ácido carboxílico hidrofóbico TAG. Estos grupos pueden dejar las moléculas a las que están unidos ("moléculas etiquetadas") insolubles en solventes polares como metanol. Por ende, las moléculas etiquetadas pueden precipitarse de una mezcla de reacción y el propio grupo de etiquetado, luego de la desprotección, puede también separarse usando esta técnica. Asimismo, el grupo de etiquetado hidrofóbico permite que las moléculas etiquetadas sean solubles en solventes no polares como diclorometano.

La desprotección del grupo amino al retirar el grupo de protección PG1 puede realizarse usando procedimientos estándar asistidos por base como tratamiento con una solución de piperidina en diclorometano. Del mismo modo, la desprotección del grupo ácido carboxílico al retirar el grupo TAG puede realizarse usando protocolos para retirar un grupo bencilo como tratamiento con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano.

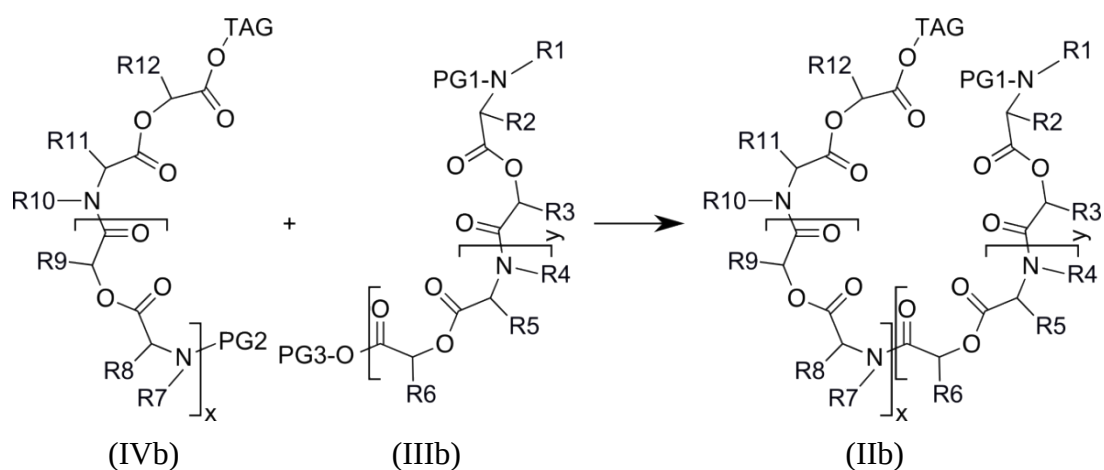
En otra modalidad del método de acuerdo con la invención PG1 es 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), t-butil carbamato (Boc), bencil carbamato (Z), acetamida, trifluoroacetamida, ftalimida, bencilo (Bn), trifenilmetilo (Tr), bencilideno o p-toluenosulfonamida (Ts)

y TAG es:



donde m es ≥ 15 a ≤ 25 , p es ≥ 8 a ≤ 18 y q es ≥ 15 a ≤ 25 . Preferentemente, m es 18, 19, 20, 21 o 22, p es 11, 12 o 13 y q es 21, 22 o 23.

En otra modalidad del método de acuerdo con la invención el depsipéptido de acuerdo con la fórmula general (IIb) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (IVb) y (IIIb):

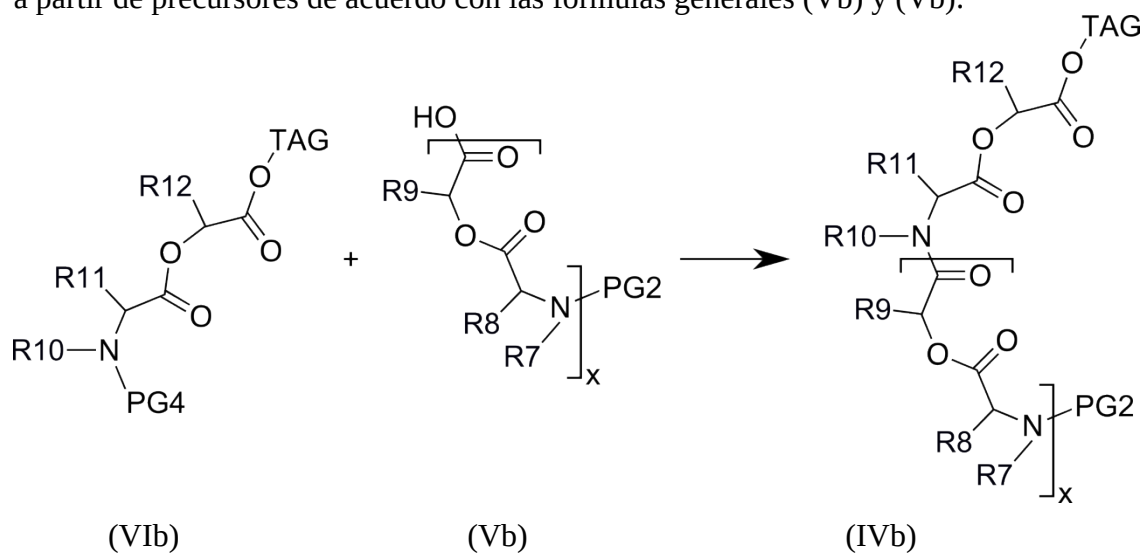


por:

- en el precursor (IVb), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG2 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;
- en el precursor (IIIb), desproteger el ácido carboxílico que se protege por el grupo PG3 en presencia de un ácido, obteniendo así un grupo ácido carboxílico desprotegido;
- condensación de los grupos amino y ácido carboxílico desprotegidos, obteniendo así el depsipéptido (IIb);

donde R1 a R12, TAG, PG1, x, e y tienen un significado como se define anteriormente (en particular, x e y pueden ser 1), PG2 es un grupo protector amino y PG3 es un grupo protector ácido carboxílico. Los métodos de desprotección y condensación pueden ser iguales que los señalados con relación a la reacción de compuestos (II) a (I) anteriormente.

Preferentemente el precursor de acuerdo con la fórmula general (IVb) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (Vb) y (Vb):



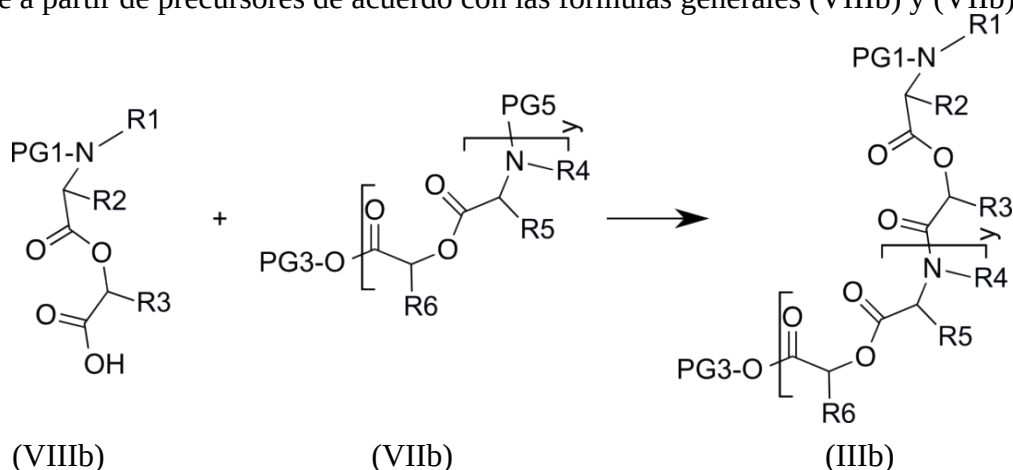
por:

- en el precursor (VIb), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG4 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;

- condensación del grupo amino desprotegido del precursor (VIb) y grupo ácido carboxílico del precursor (Vb), obteniendo así el precursor (IVb);

5 donde R7 a R12, TAG y x tienen un significado como se define anteriormente (en particular, x puede ser 1), PG2 tiene un significado como se define anteriormente y PG4 es un grupo protector amino. Los métodos de desprotección y condensación pueden ser iguales que los señalados con relación a la reacción de compuestos (IIb) a (I) anteriormente.

10 También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (IIIb) se obtiene a partir de precursores de acuerdo con las fórmulas generales (VIIIb) y (VIIb):



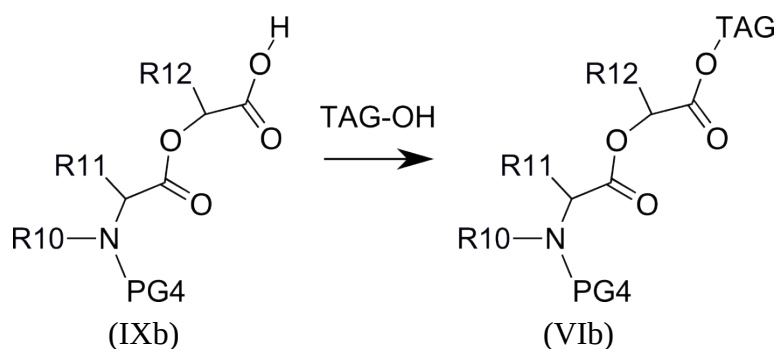
por:

15 - en el precursor (VIIb), desproteger el grupo amino que se protege por el grupo PG5 en presencia de una base, obteniendo así un grupo amino desprotegido;

- condensación del grupo amino desprotegido del precursor (VIIb) y grupo ácido carboxílico del precursor (VIIIb), obteniendo así el precursor (IIIb);

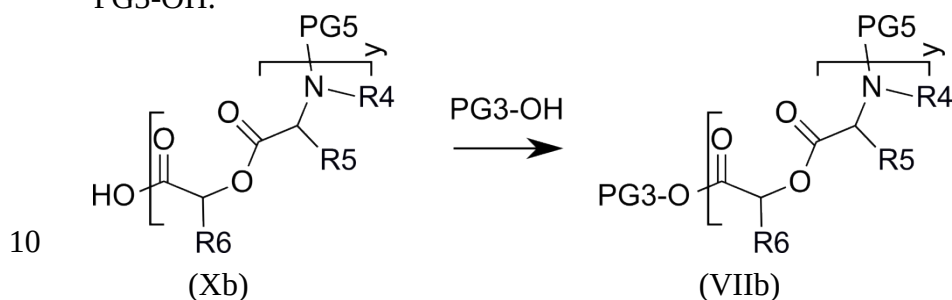
20 donde R1 a R6, PG1 e y tienen un significado como se define anteriormente (en particular, y puede ser 1), PG3 tiene un significado como se define anteriormente y PG5 es un grupo protector amino. Los métodos de desprotección y condensación pueden ser iguales que los señalados con relación a la reacción de compuestos (IIb) a (I) anteriormente.

25 También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (VIb) se obtiene de la esterificación de un precursor de acuerdo con la fórmula general (IXb) con TAG-OH:



donde R10 a R12, y TAG tienen un significado como se define anteriormente y PG4 tiene un significado como se define anteriormente. La protección o etiquetado del grupo ácido carboxílico en (IXb) puede efectuarse usando sistema de condensación estándar como DCC/DMAP.

También se prefiere que el precursor de acuerdo con la fórmula general (VIIb) se obtiene de la esterificación de un precursor de acuerdo con la fórmula general (X) con PG3-OH:



donde R4 a R6, e y tienen un significado como se define anteriormente, PG3 también tiene un significado como se define anteriormente y PG5 también tiene un significado como se define anteriormente.

También se prefiere que PG3 sea TAG como se define anteriormente.

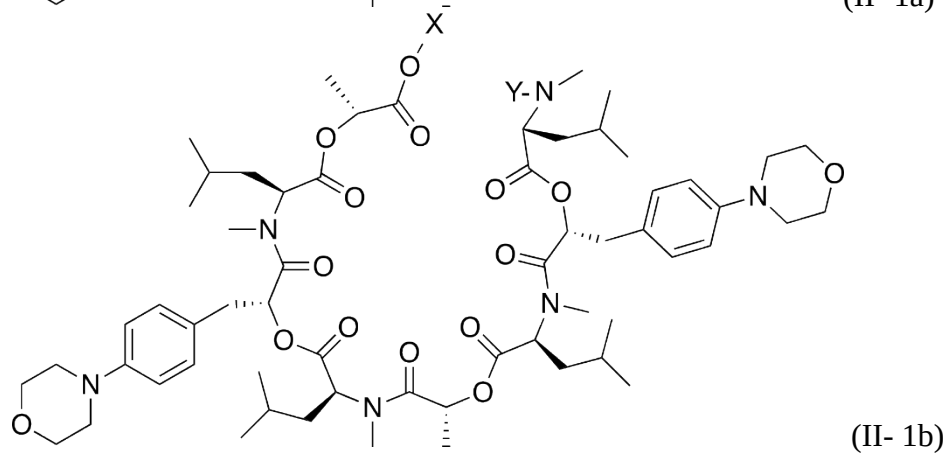
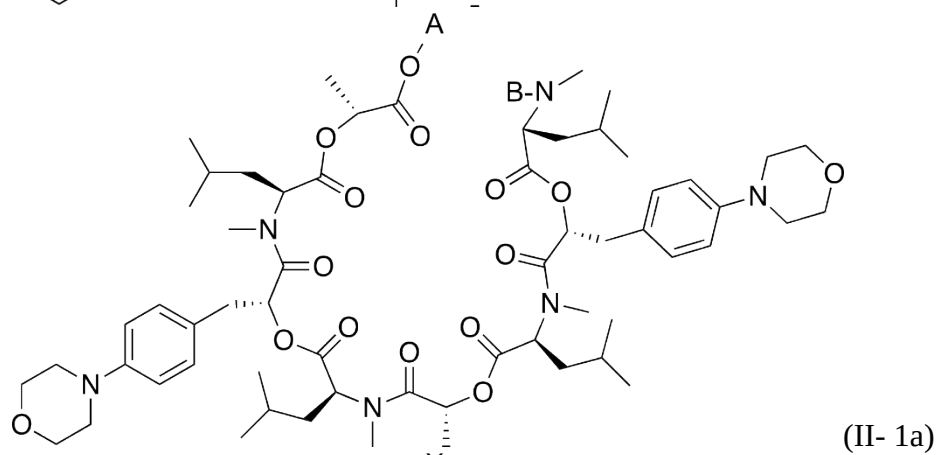
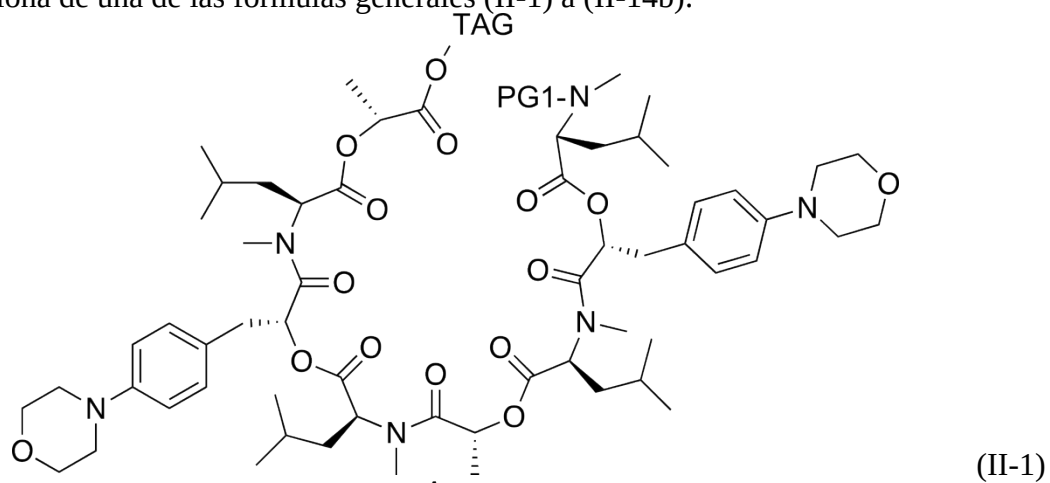
En otra modalidad del método de acuerdo con la invención al menos un paso de reacción de los pasos de reacción que resultan en una molécula con TAG es seguido por la precipitación de producto de reacción bruto en metanol, purificando así el producto de reacción bruto.

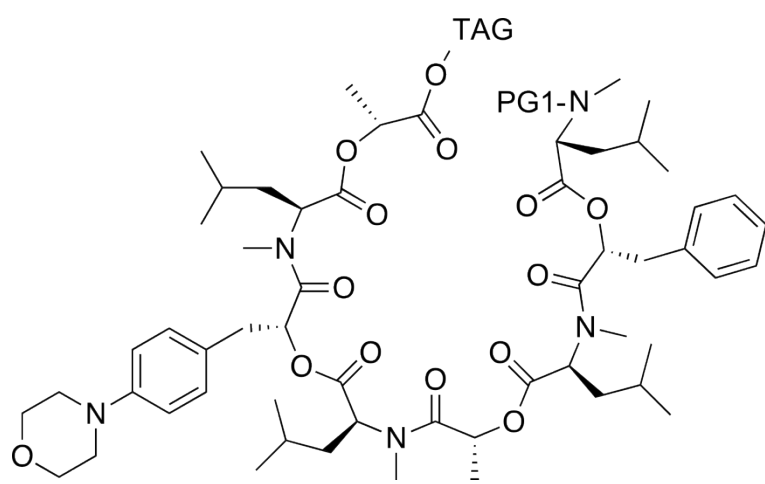
En otra modalidad del método de acuerdo con la invención al menos un paso de los pasos de reacción donde los grupos de ácido carboxílico protegidos por TAG se desprotegen es seguido por la precipitación de TAG-OH escindido en metanol y remoción del precipitado por filtración, purificando así el producto de reacción bruto.

También se prefiere que los precursores (IIIb) y (IVb) sean idénticos.

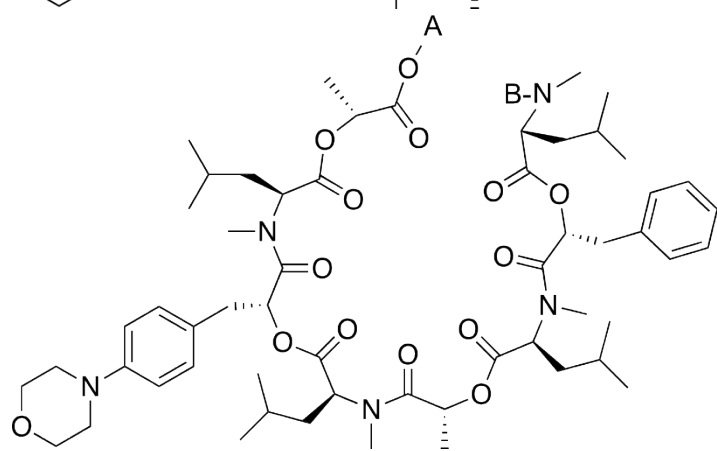
También se prefiere que R3 y R9 sean diferentes entre sí, R1 y R7 sean idénticos, R2 y R8 sean idénticos, R4 y R10 sean idénticos, R5 y R11 sean idénticos y R6 y R12 sean idénticos.

En otra modalidad del método de acuerdo con la invención el depsipéptido se selecciona de una de las fórmulas generales (II-1) a (II-14b):

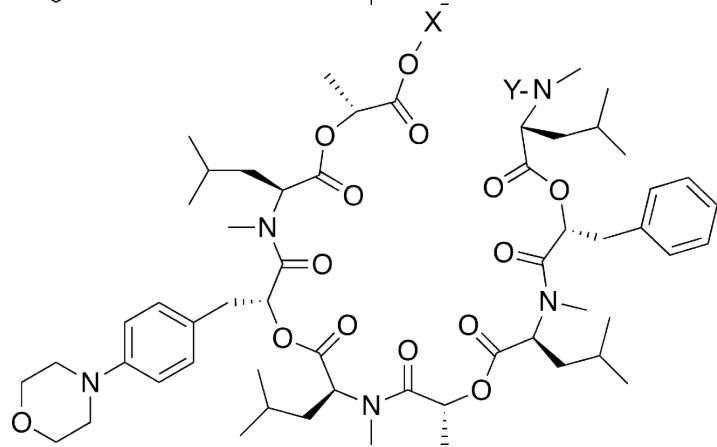




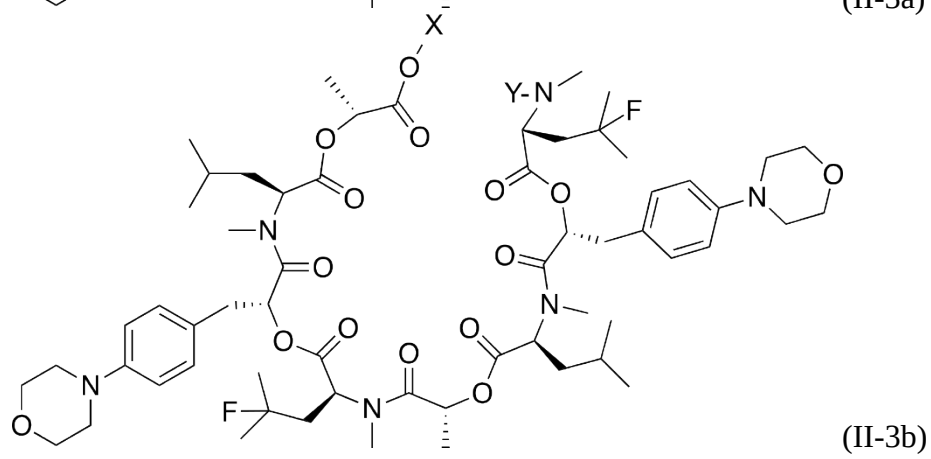
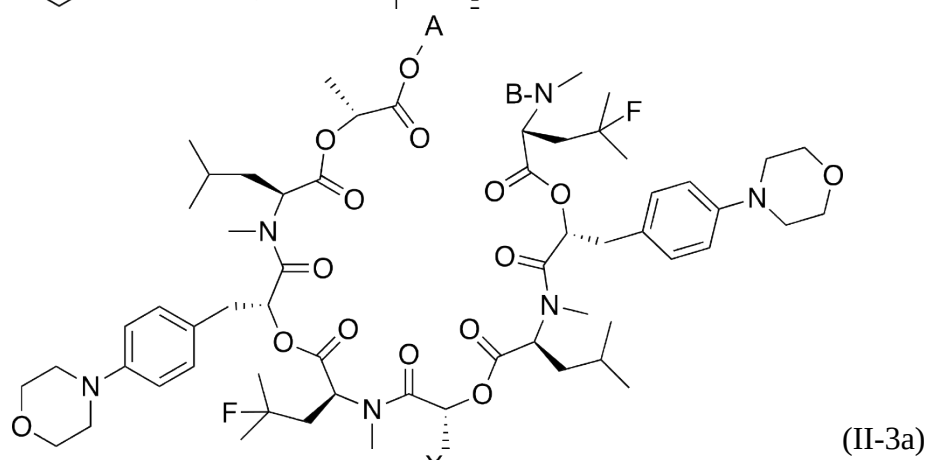
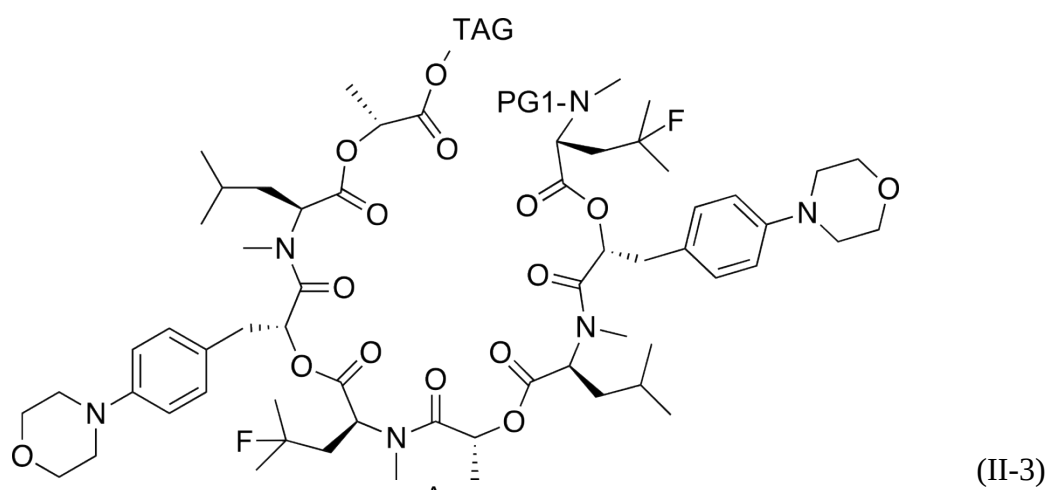
(II-2)

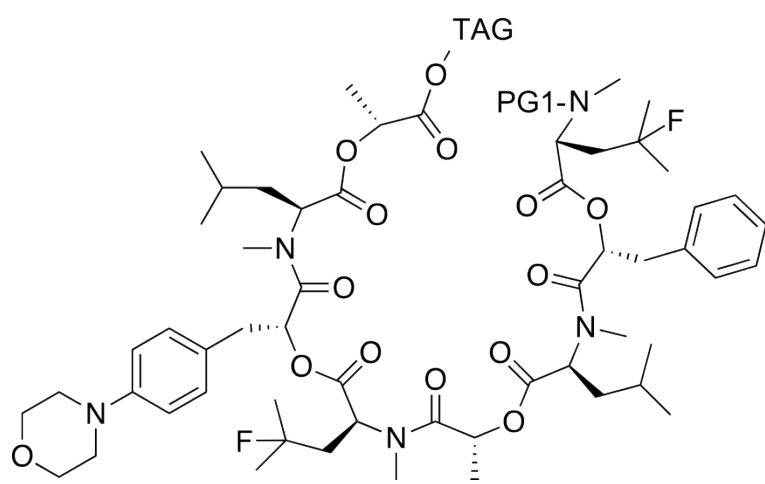


(II-2a)

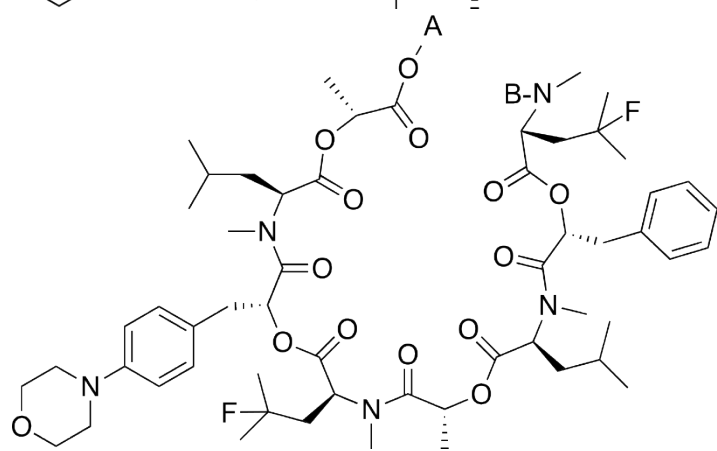


(II- 2b)

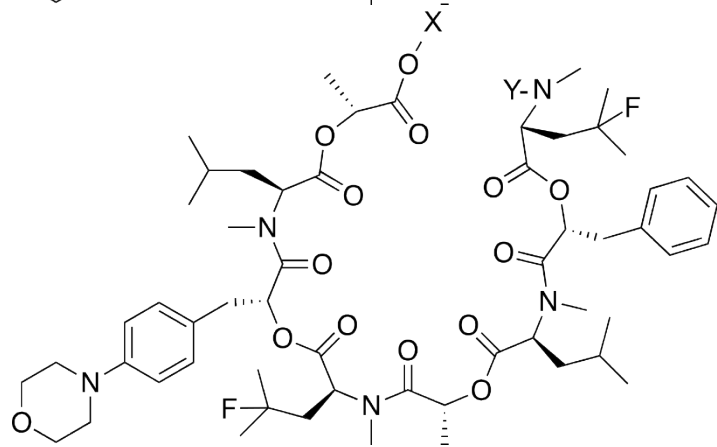




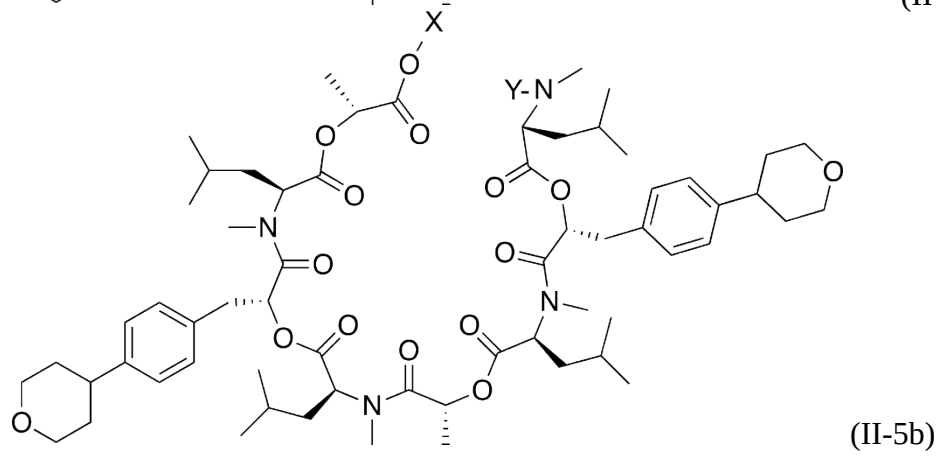
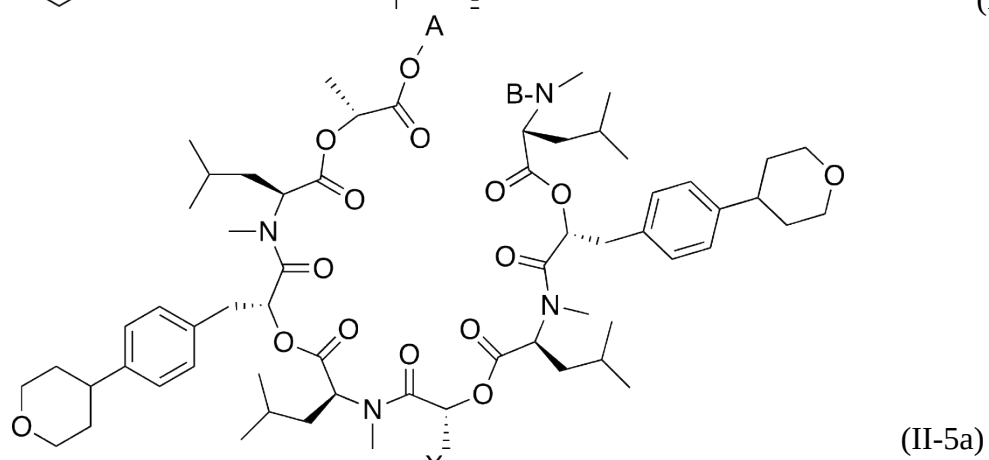
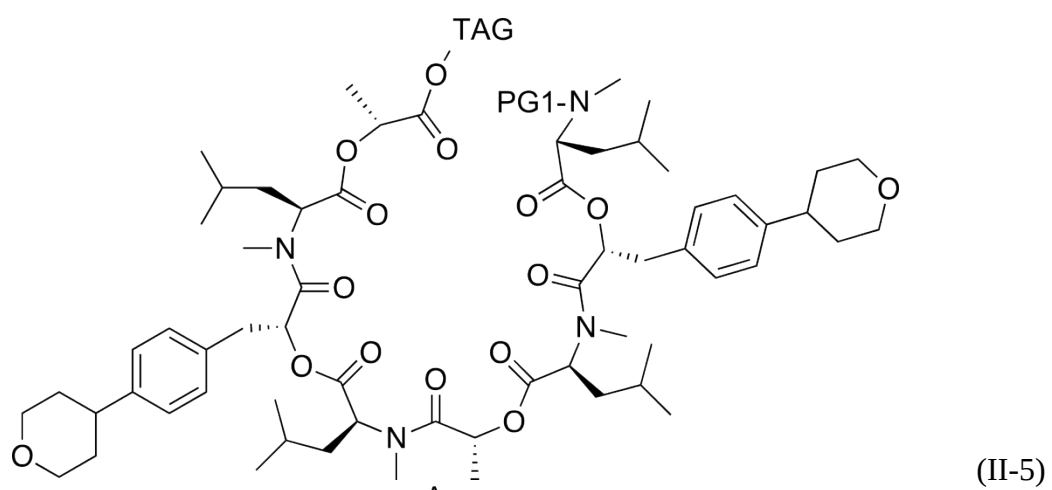
(II-4)

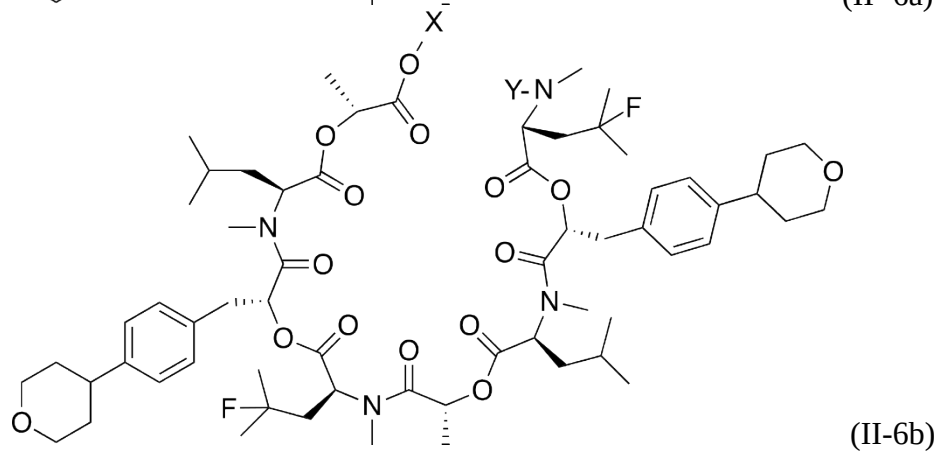
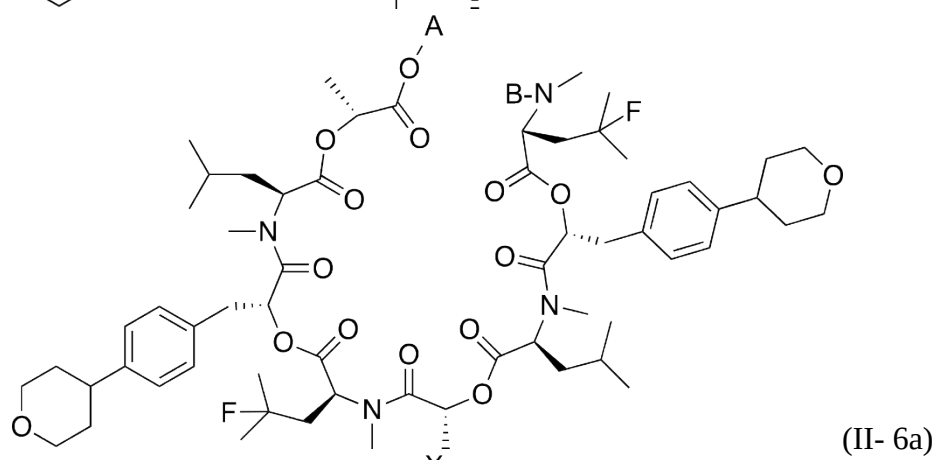
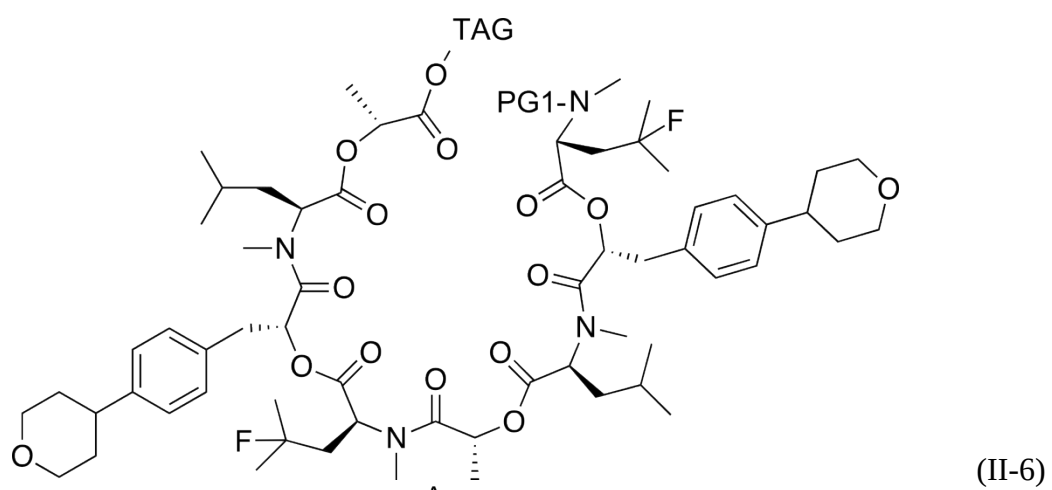


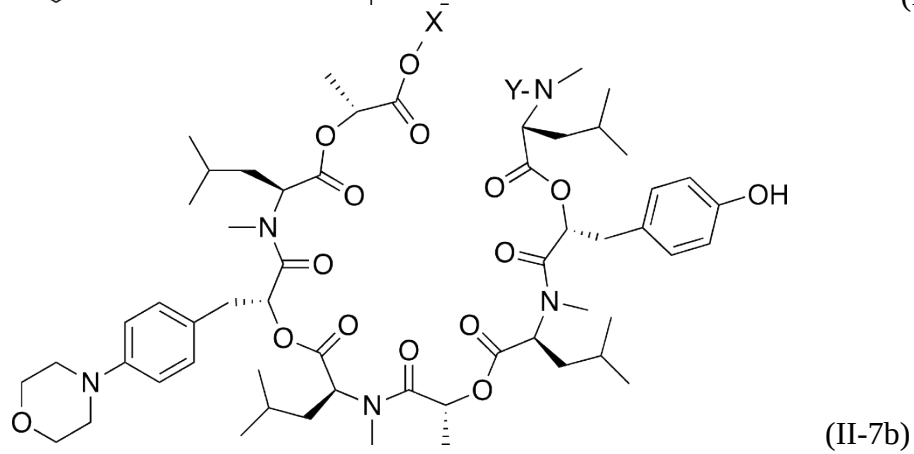
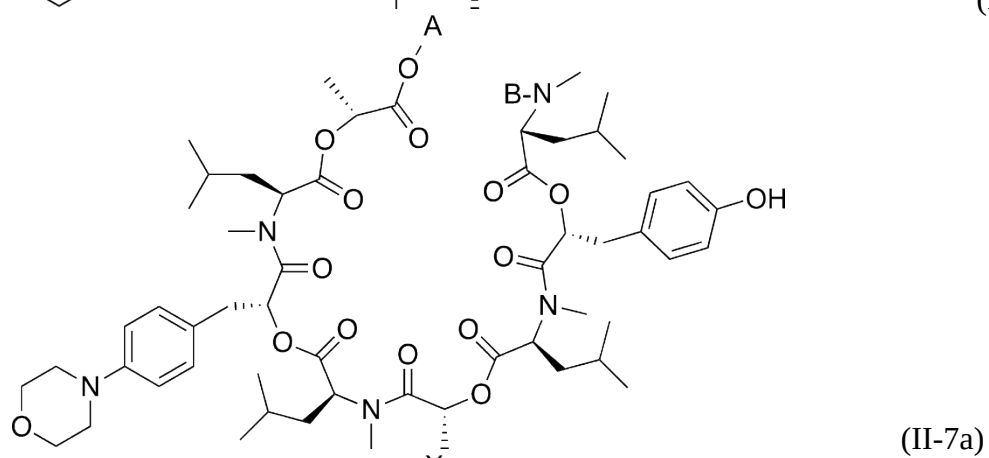
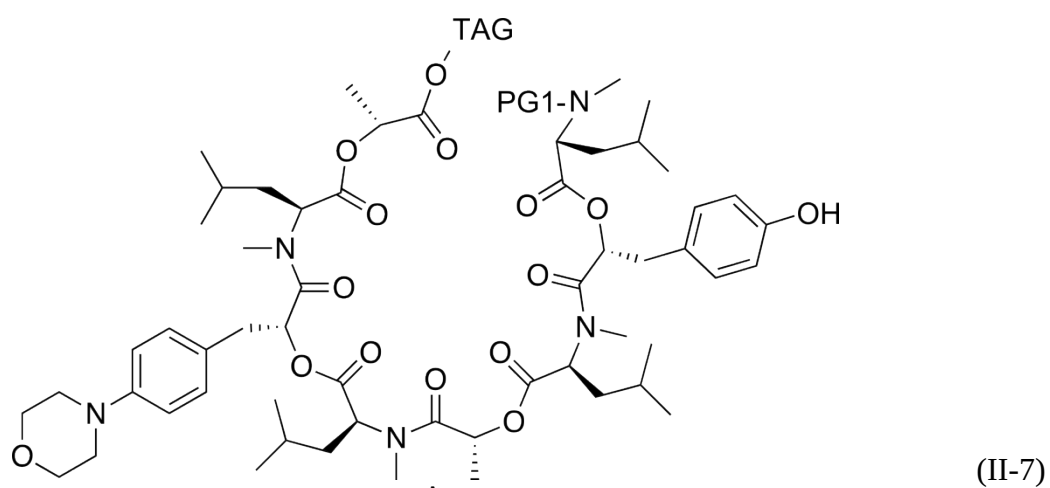
(II-4a)

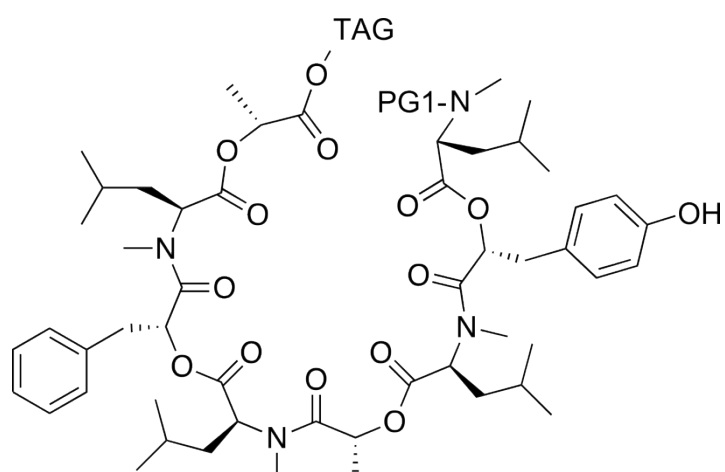


(II- 4b)

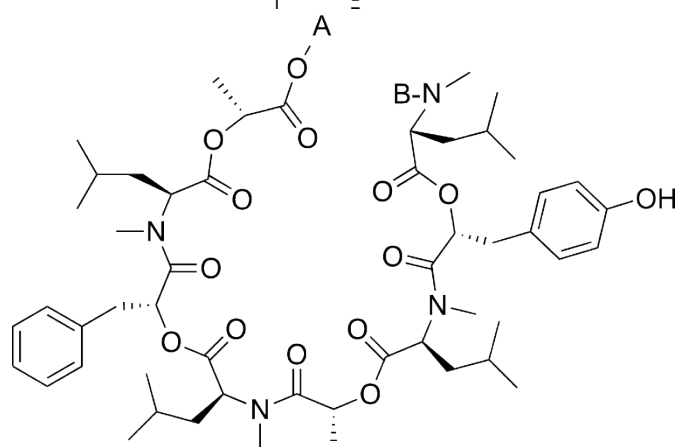




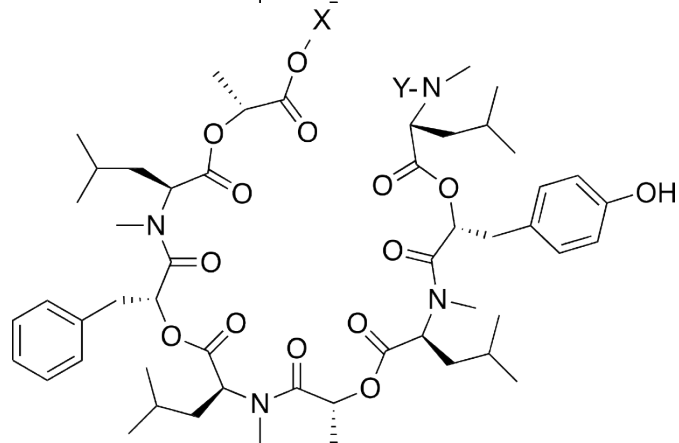




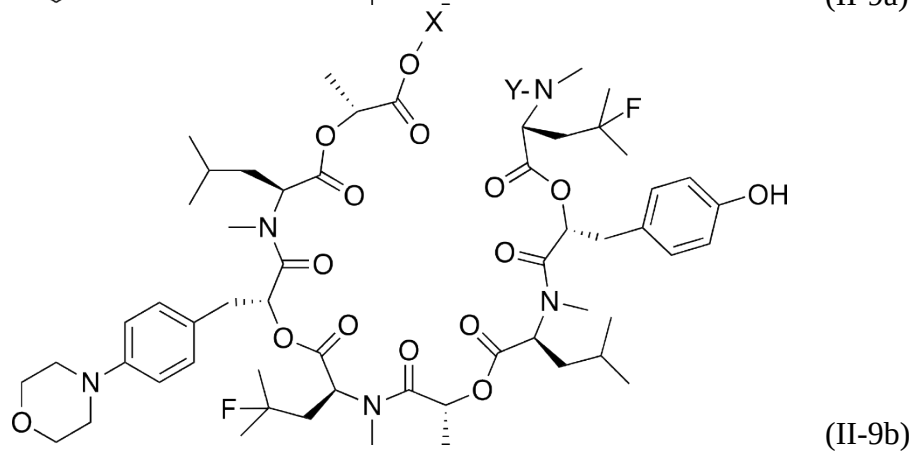
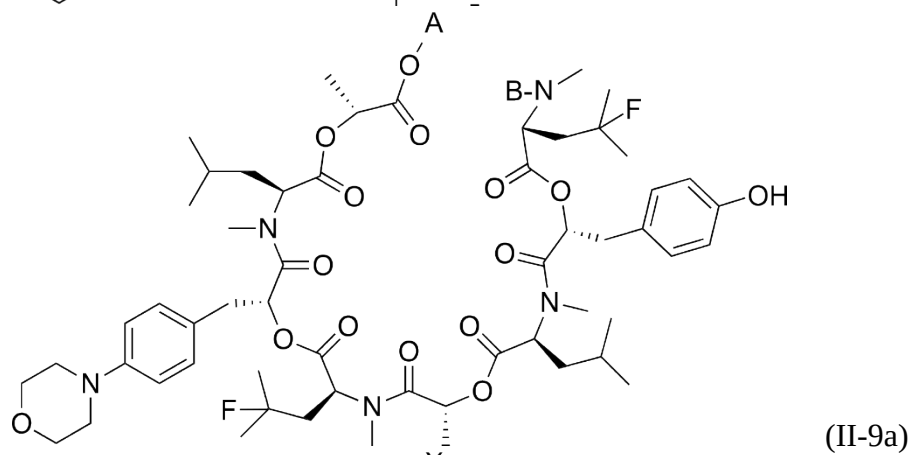
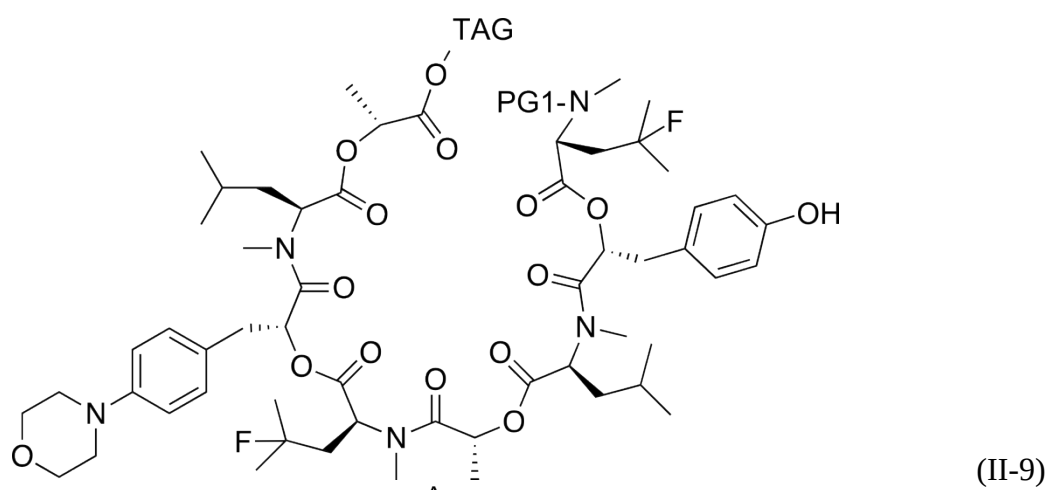
(II-8)

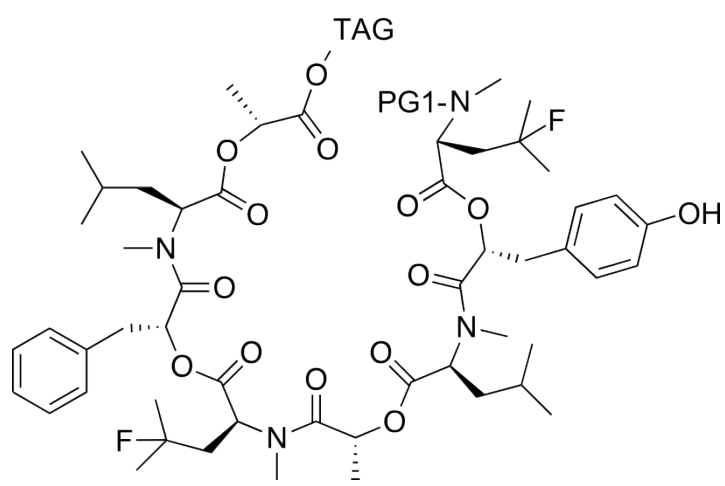


(II-8a)

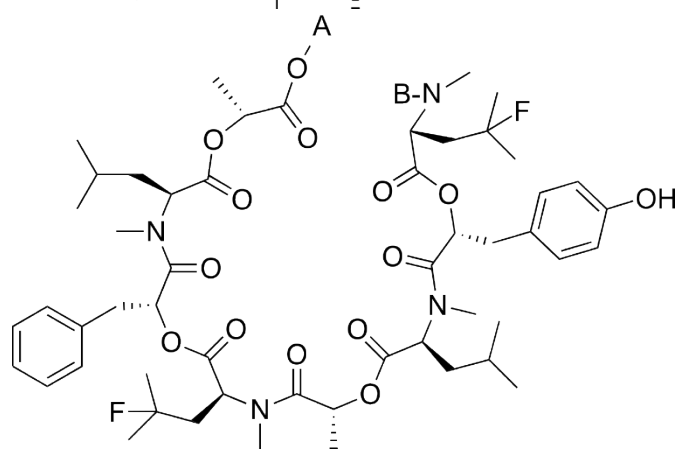


(II-8b)

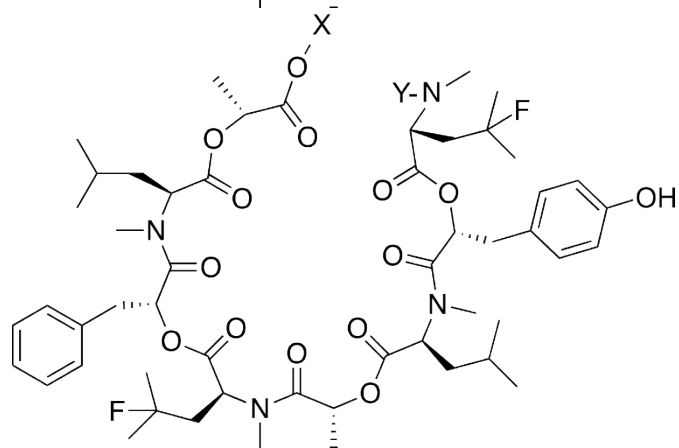




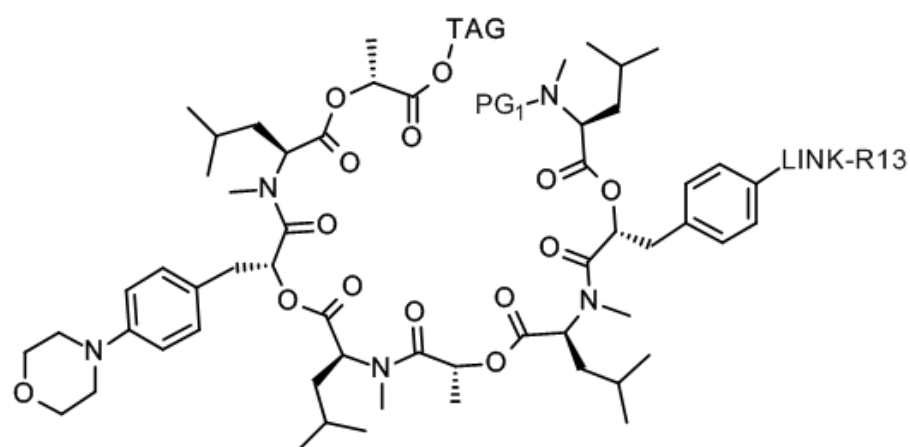
(II-10)



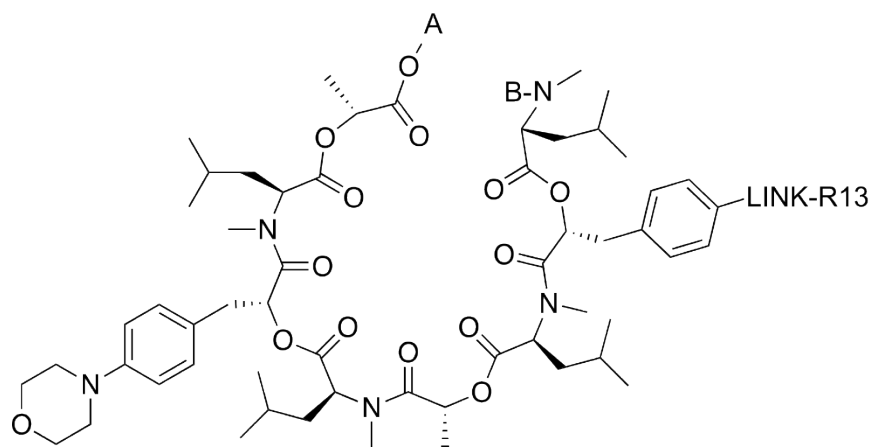
(II-10a)



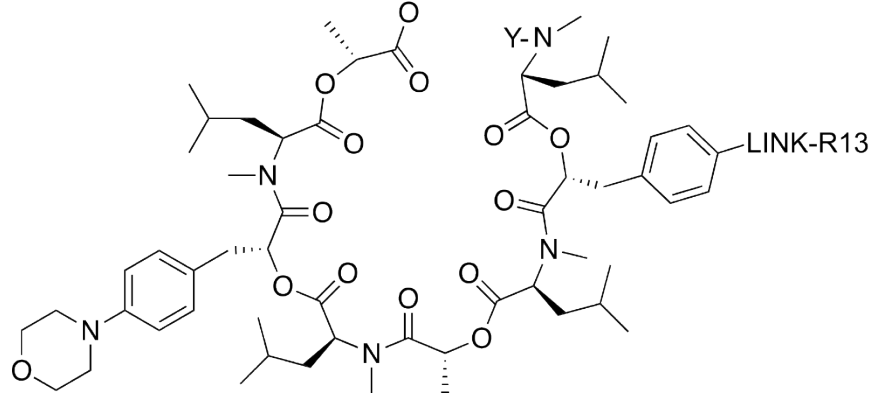
(II-10b)



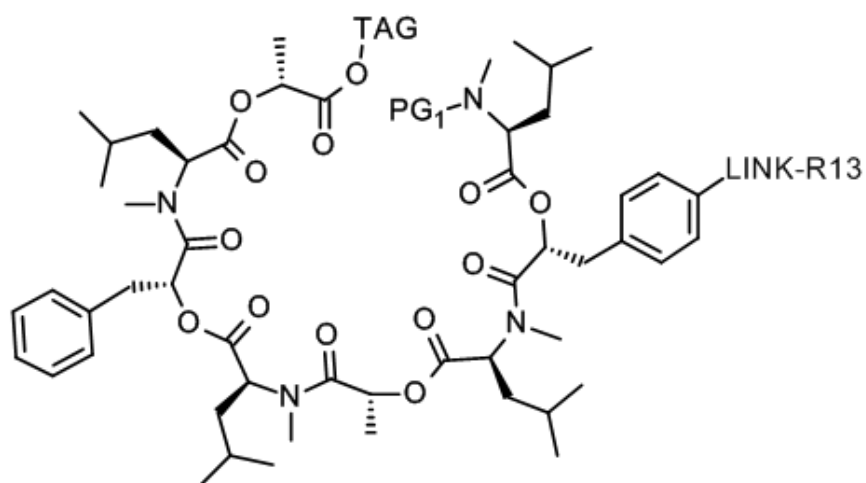
(II-11)



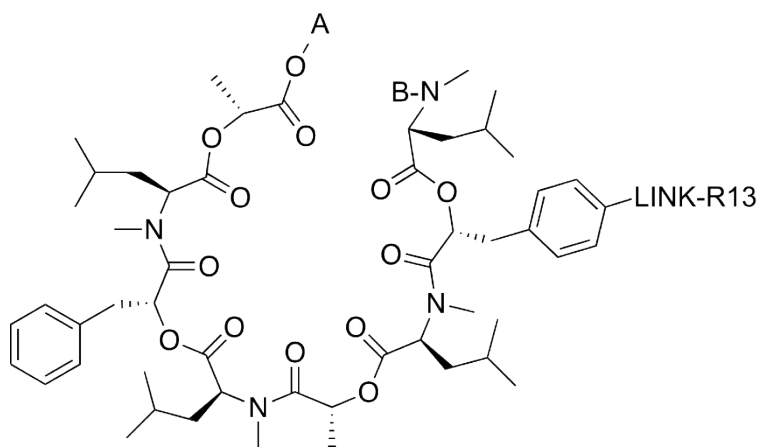
(II-11a)



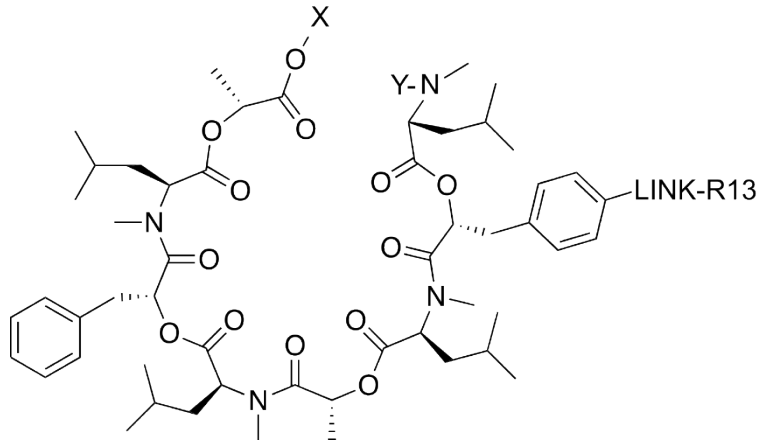
(II-11b)



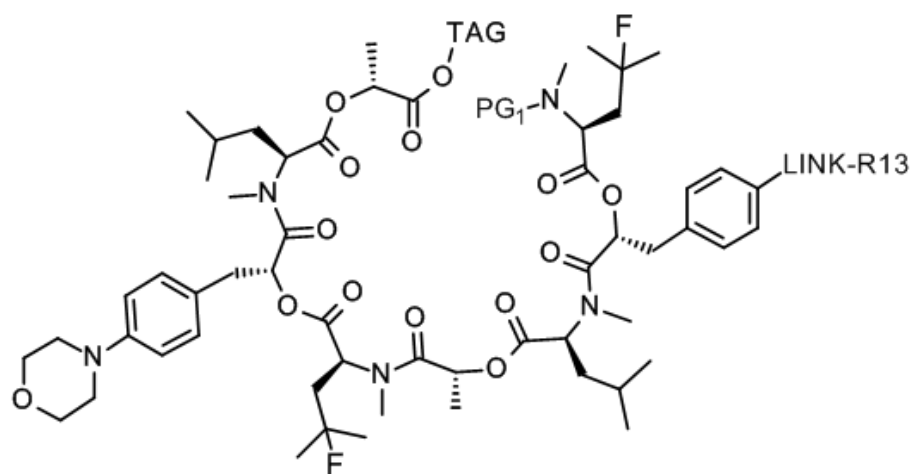
(II-12)



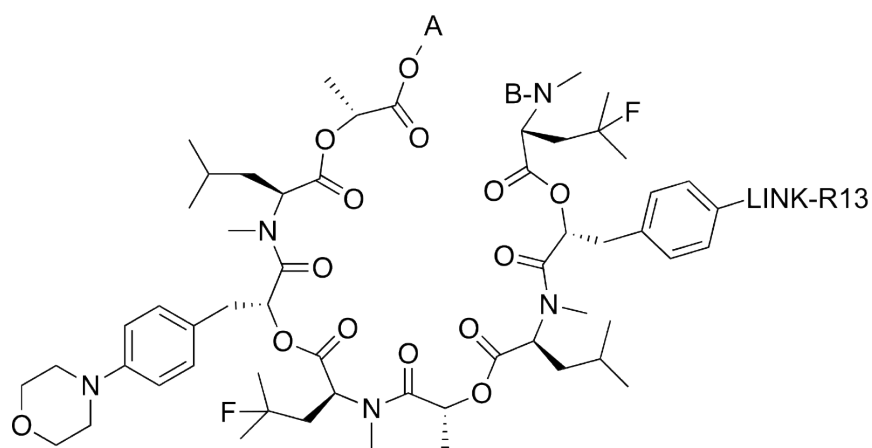
(II-12a)



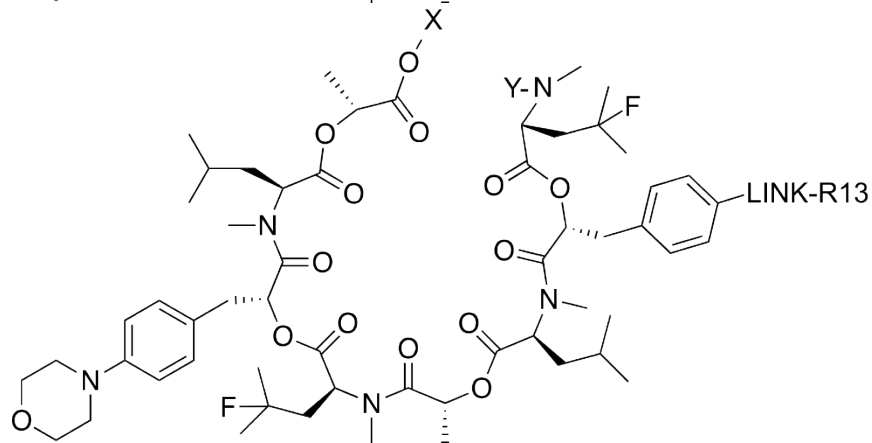
(II-12b)



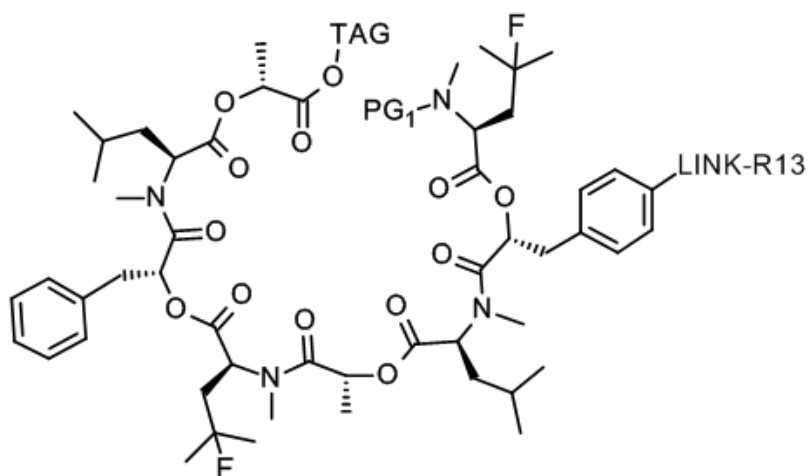
(II-13)



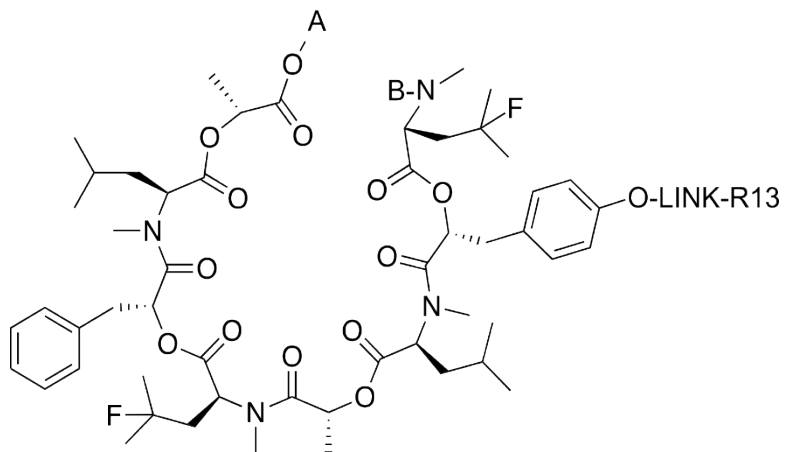
(II-13a)



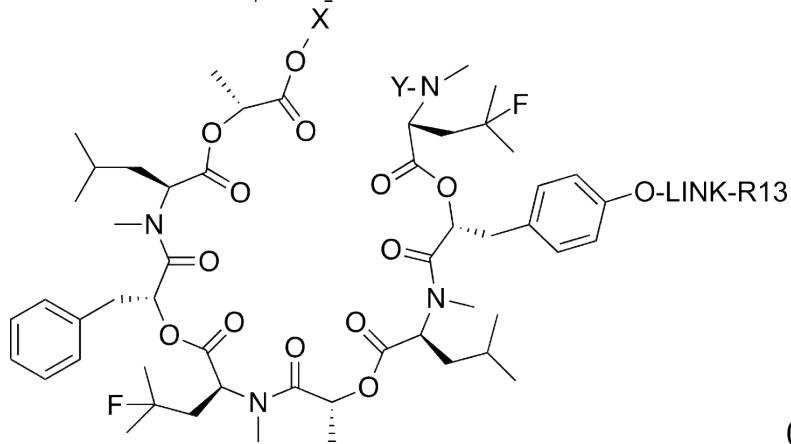
(II-13b)



(II-14)

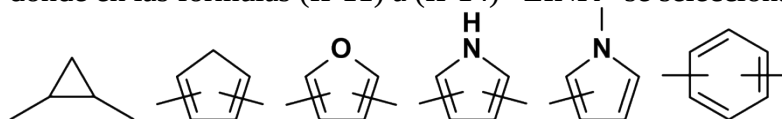


(II-14a)

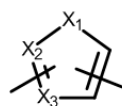


(II-14b)

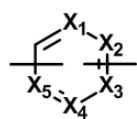
donde en las fórmulas (II-11) a (II-14) -LINK- se selecciona de:



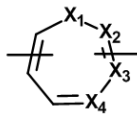
5



donde X1 puede ser C, N, S, O, X2 y X3 puede ser C o N;

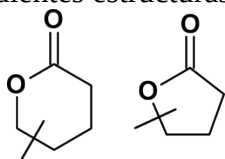


donde X1 puede ser C, N, S, O, X2, X3 y X4 puede ser C o N;



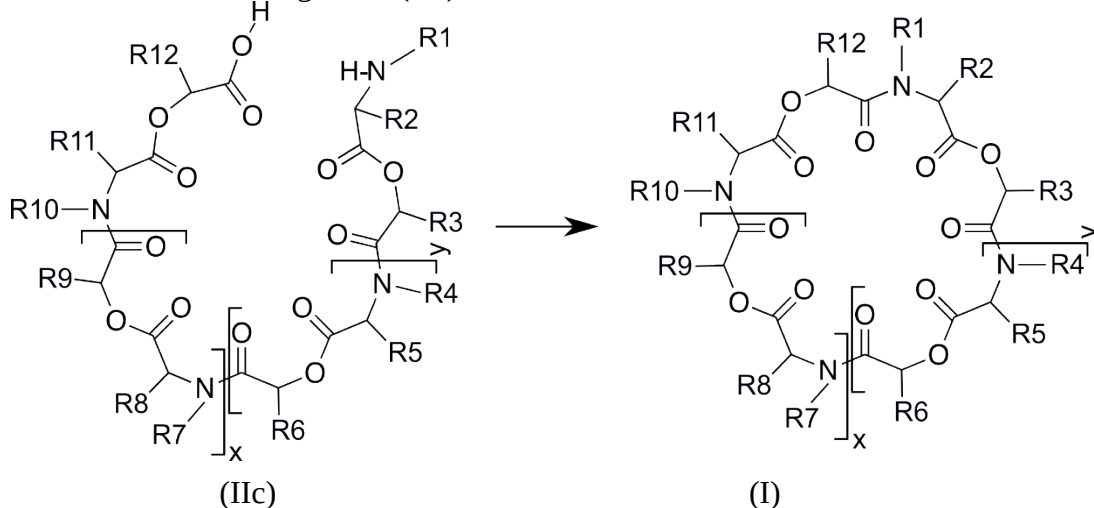
donde X1, X2, X3 y X4 pueden ser C o N;

y donde R13 se selecciona de $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, SO_2NH_2 , $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, CF_3 o una de las siguientes estructuras de lactona:



5

La presente invención asimismo provee un método para la síntesis de depsipéptidos cíclicos de acuerdo con la fórmula general (1) a partir de depsipéptidos de acuerdo con la fórmula general (IIb):



10

que comprende los pasos de

- Proveer una mezcla de compuesto (IIc) y una base en un solvente que tiene un valor $E_T(30)$ de ≥ 30 y ≤ 43

- Lento, preferentemente adición gota a gota de una solución de un agente de acoplamiento en el solvente para formar el depsipéptido cíclico (I)

15

por lo que x e y son, independientemente uno del otro, 0, 1 o 2 con la condición de que $x+y \geq 1$ (preferentemente, x e y son 1) y R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 cada uno, independientemente uno del otro, representan hidrógeno, alquilo-C1-C8 de cadena recta o ramificada, en particular, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, hexilo, isohexilo, sec-hexilo, heptilo, isoheptilo, sec-heptilo, terc-heptilo, octilo, isooctilo, sec-octilo, alquilo C1-C8 halogenado de cadena recta o ramificada, en

20

particular, sec-butilo fluorinado, hidroxil-alquilo-C1-C6, en particular, hidroximetilo, 1-hidroxietilo, alcanoiloxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, acetoximetilo, 1-acetoxietilo, alcoxi-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metoximetilo, 1-metoxietilo, aril-alquilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, benciloximetilo, 1-benciloxietilo, mercapto-alquilo-C1-C6, en particular, mercaptometilo, alquiltio-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metiltioetilo, alquilsulfinilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfiniletilo, alquilsulfonilo-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilsulfoniletilo, carboxi-alquilo-C1-C6, en particular, carboximetilo, carboxietilo, alcoxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metoxicarbonilmetilo, etoxicarboniletilo, arilalcoxicarbonil-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, benciloxicarbonilmetilo, carbamoil-alquilo-C1-C6, en particular, carbamoilmetilo, carbamoiletilo, amino-alquilo-C1-C6, en particular, aminopropilo, aminobutilo, alquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, metilaminopropilo, metilaminobutilo, dialquilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, dimetilaminopropilo, dimetilaminobutilo, guanidino-alquilo-C1-C6, en particular, guanidinopropilo, alcoxicarbonilamino-C1-C4-alquilo-C1-C6, en particular, terc-butoxicarbonilaminopropilo, terc-butoxicarbonilaminobutilo, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)amino-alquilo-C1-C6, en particular, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)aminopropilo, 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc)aminobutilo, alquenilo-C2-C8, en particular, vinilo, alilo, butenilo, cicloalquilo-C3-C7, en particular, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, cicloalquilo-C3-C7-alquilo-C1-C4, en particular, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, cicloheptilmetilo, bencilo, bencilo sustituido, fenilo, fenil-alquilo-C1-C4, en particular, fenilmetilo que puede estar opcionalmente sustituido por radicales del grupo que consiste en halógeno, en particular, flúor, cloro, bromo o yodo.

El término “lento” especialmente significa y/o incluye que la solución de agente de acoplamiento se agrega a una tasa de ≤ 2 (mol)-% por minuto, preferentemente ≤ 1 (mol)-% por minuto más preferido $\leq 0,5$ (mol)-% por minuto.

En el método de acuerdo con la invención se encontró sorprendentemente que los depsipéptidos cíclicos (I), en particular, emodepsida y estructuras estrechamente relacionadas, pueden sintetizarse en grandes rendimientos totales. Sin limitarse a ninguna teoría, los inventores consideran que esto se debe a la escasa solubilidad del depsipéptido cíclico (I) en el solvente en contraste a la forma abierta (IIb).

El término “valor $E_T(30)$ ” se refiere a $E_T(30)$ de acuerdo con Reichardt, *Angew. Chem.* 1979,119-131, donde se enumera un método para determinar tales valores y los valores medidos para varios solventes estándar.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el valor $E_T(30)$ del solvente es ≥ 34 y ≤ 39 .

El término “solvente” en el sentido de la presente invención también incluirá una mezcla de solventes.

5 De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el solvente comprende acetato de etilo, de acuerdo con una modalidad de la presente invención, el solvente es acetato de etilo.

Los agentes de acoplamiento adecuados que son modalidades de la presente invención se brindan anteriormente. De acuerdo con una modalidad de la presente
10 invención, el agente de acoplamiento comprende T3P, de acuerdo con una modalidad de la presente invención, el agente de acoplamiento es T3P.

De acuerdo con una modalidad, la relación de agente de acoplamiento a compuesto (IIc) antes de la reacción (en mol:mol) es $\geq 1:1$ a $\leq 5:1$, preferentemente $\geq 2:1$ a $\leq 3:1$.

15 De acuerdo con una modalidad, la relación de base a compuesto (IIb) antes de la reacción (en mol:mol) es $\geq 2:1$ a $\leq 10:1$, preferentemente $\geq 4:1$ a $\leq 6:1$.

Bases adecuadas que en la medida sean modalidades de la presente invención comprenden *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), Trietilamina, Dimetilaminopiridina (DMAP), *N*-metilmorfolina, piridina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), 1,5-
20 diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN) o mezclas de estos. Más preferido es *N,N*-diisopropiletilamina.

De acuerdo con una modalidad, la temperatura durante la adición del agente de acoplamiento es ≤ 25 °C.

En una modalidad del método de acuerdo con la invención *x* es 1, *y* es 1, R1, R4, R7 y R10 son metilo, R6 y R12 son metilo, R5 y R11 son, independientemente uno del
25 otro, alquilo-C1-C4 de cadena recta o ramificada o alquilo-C1-C4 halogenado de cadena recta o ramificada y R3 y R9 son, independientemente uno del otro, bencilo o bencilo sustituido. De acuerdo con una modalidad de la invención preferida, R3 y/o R9 son bencilo sustituido con *p*-morfolino.

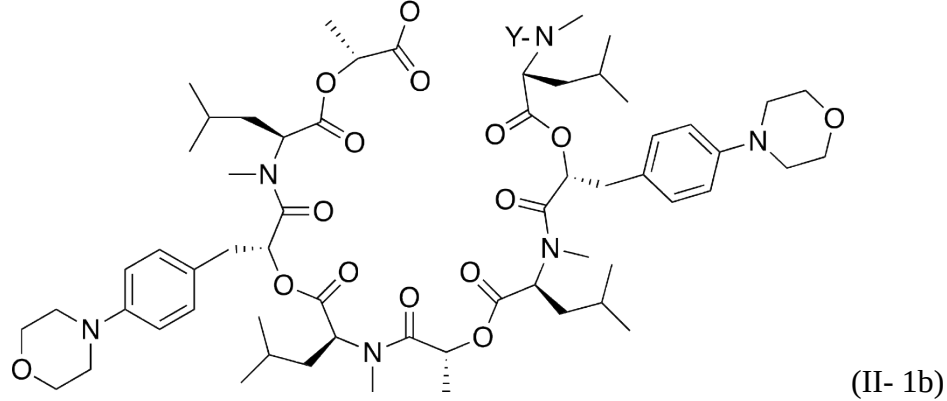
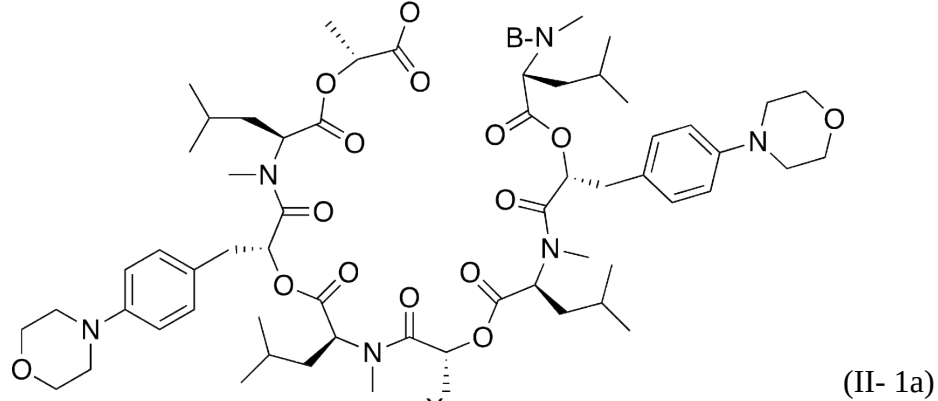
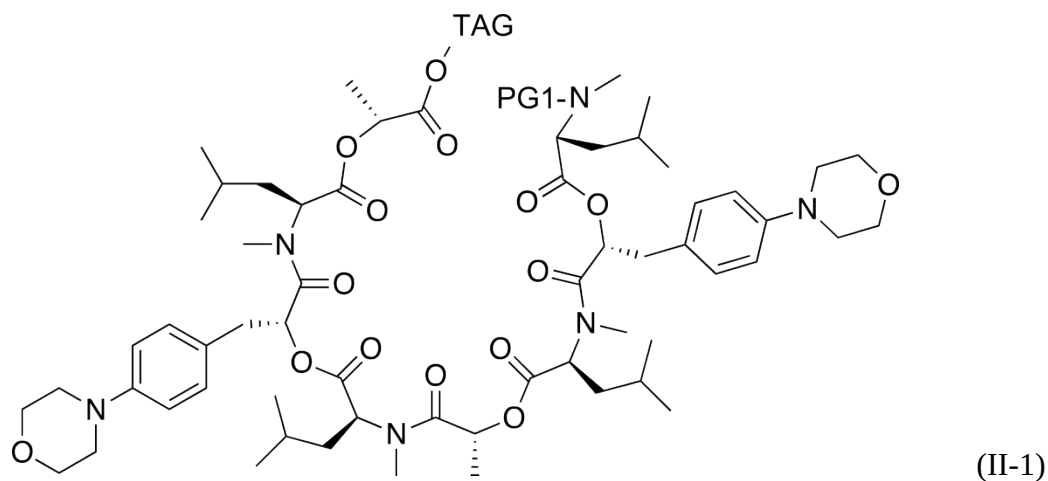
30 En una modalidad del método de acuerdo con la invención R3 y R9 son idénticos, R1 y R7 son idénticos, R2 y R8 son idénticos, R4 y R10 son idénticos, R5 y R11 son idénticos y R6 y R12 son idénticos.

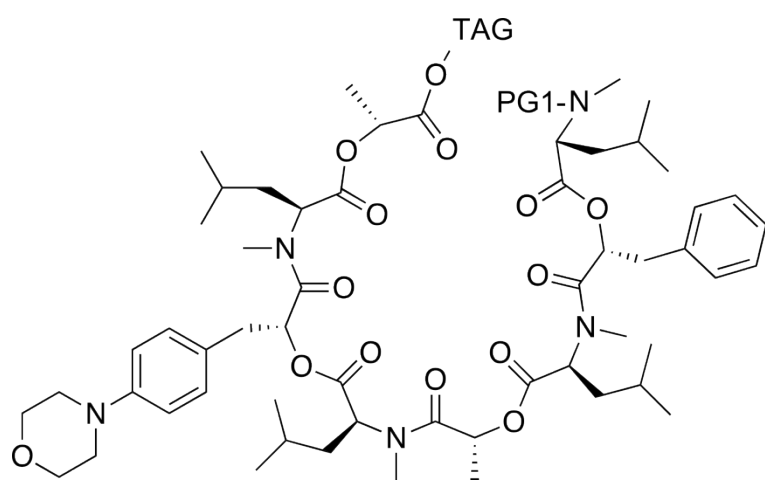
De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el compuesto IIb se sintetiza del compuesto II o IIa al desproteger los grupos protectores A y B o X e
35 Y respectivamente. El Compuesto IIb puede aislarse o usarse in situ para sintetizar el

depsipéptido (I).

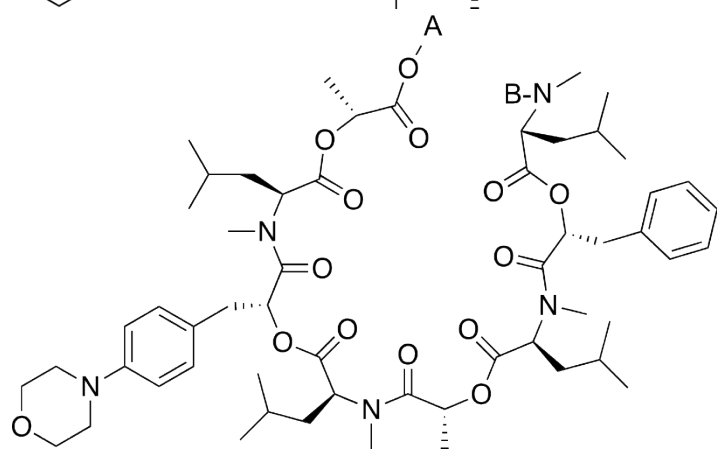
La presente invención también se refiere a un depsipéptido cíclico o lineal que se selecciona de una de las fórmulas generales (II-1) a (II-14b) o (I-1) a (I-9) como se describe más adelante o una sal farmacéuticamente o veterinariamente aceptable de estos:

5

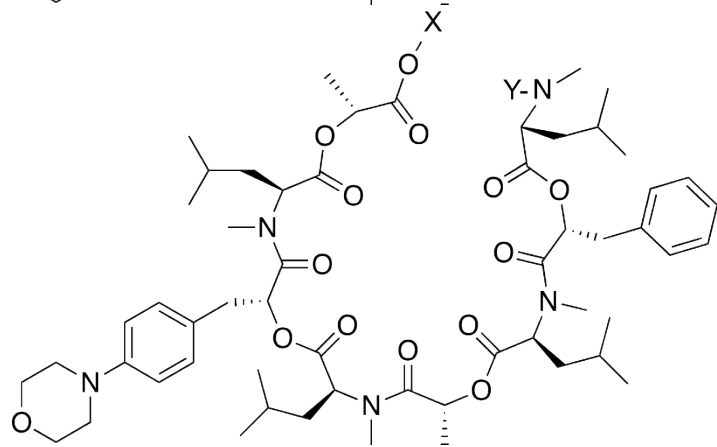




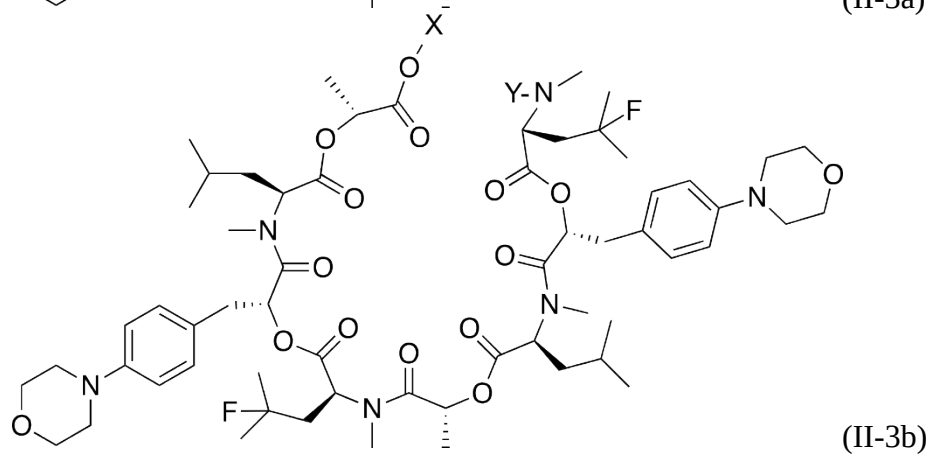
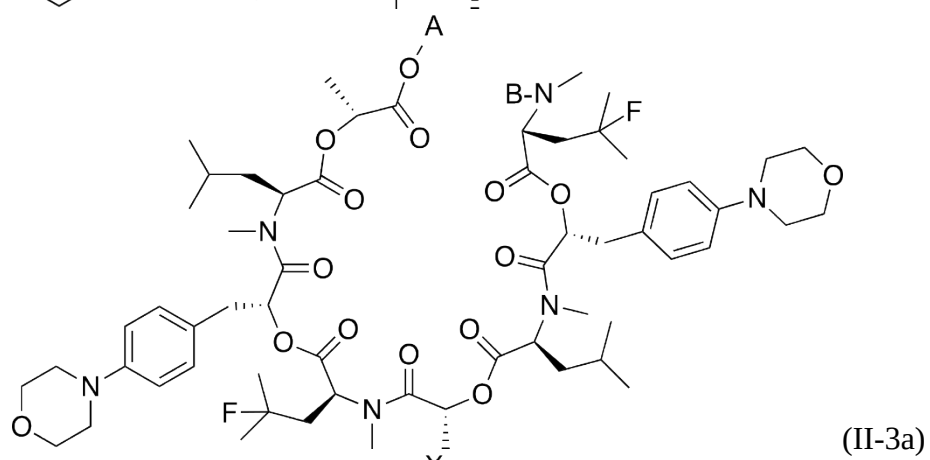
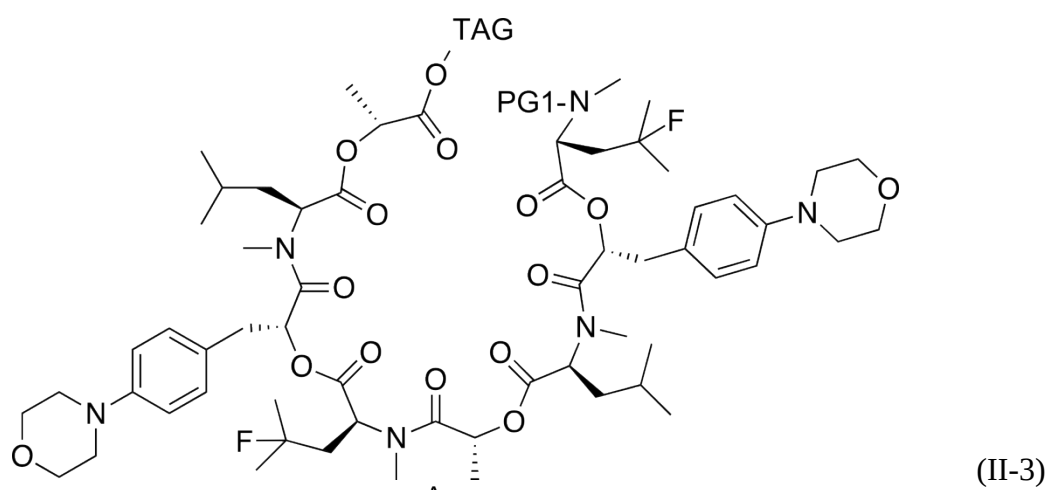
(II-2)

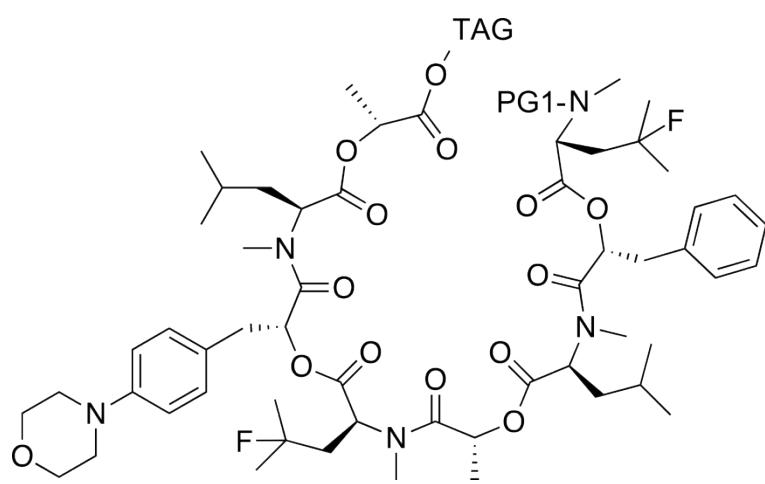


(II-2a)

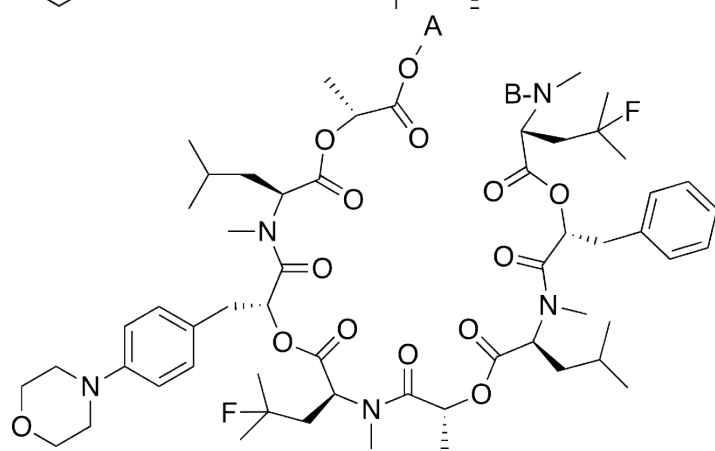


(II- 2b)

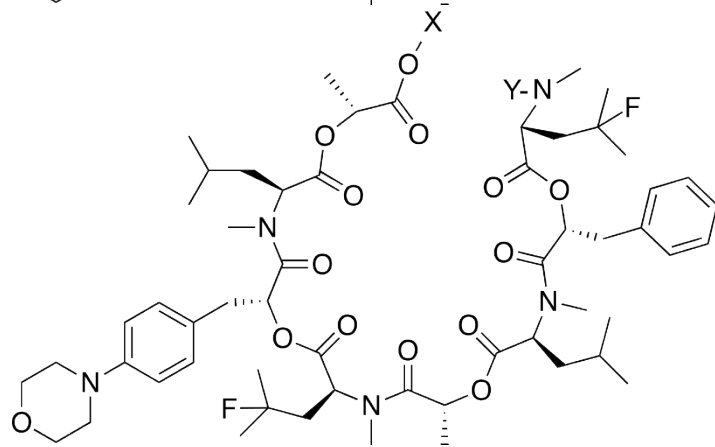




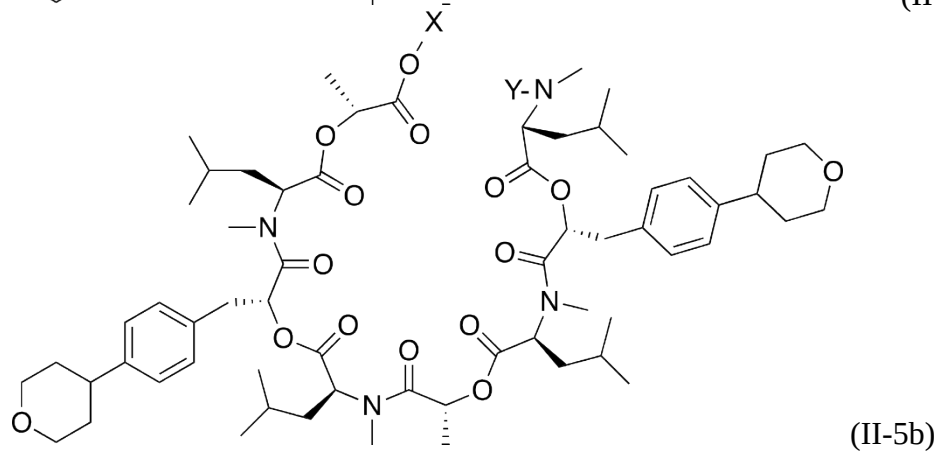
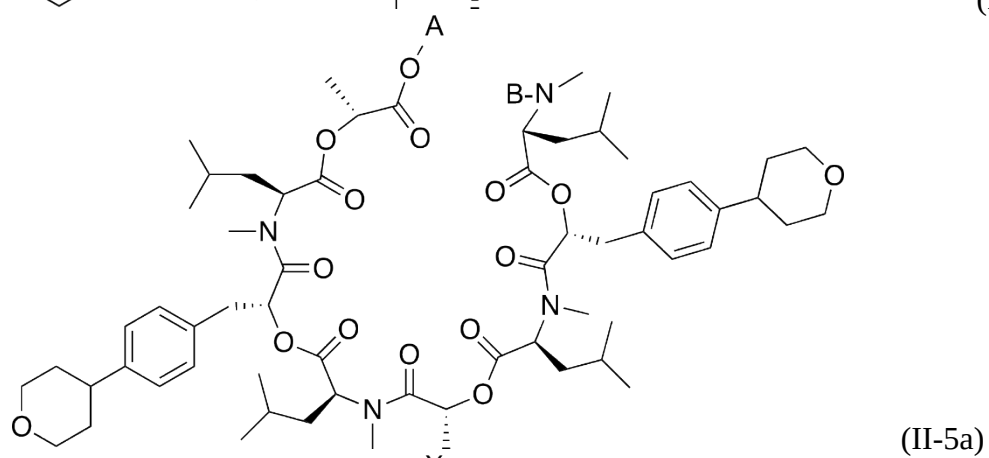
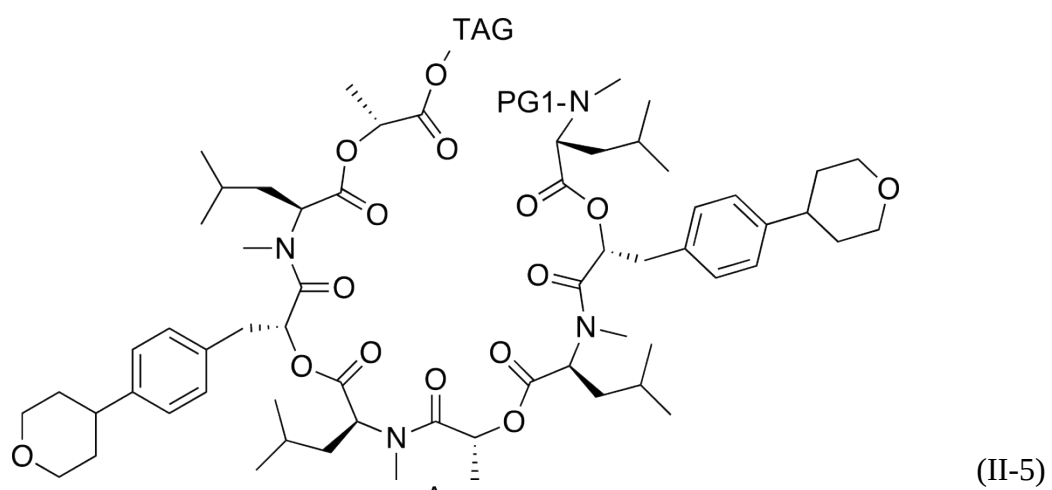
(II-4)

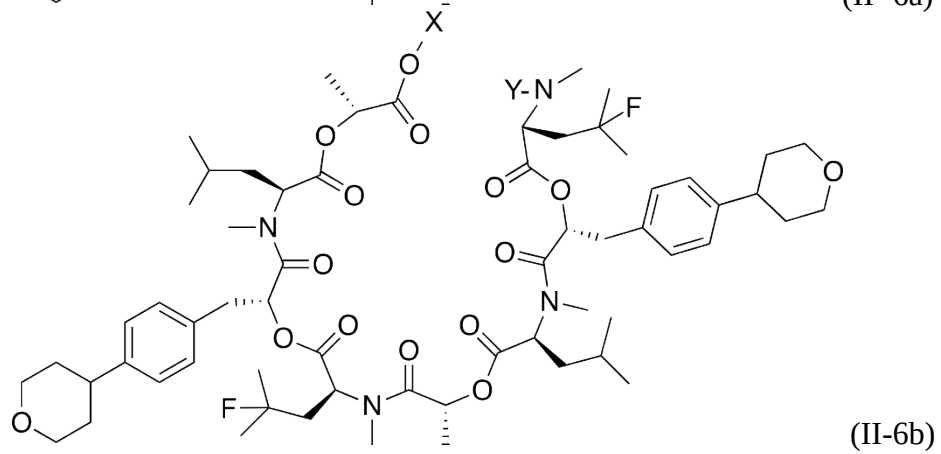
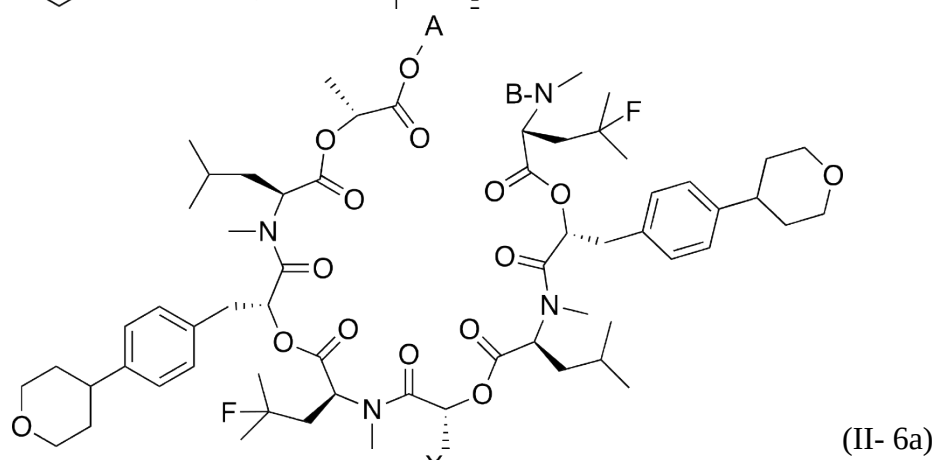
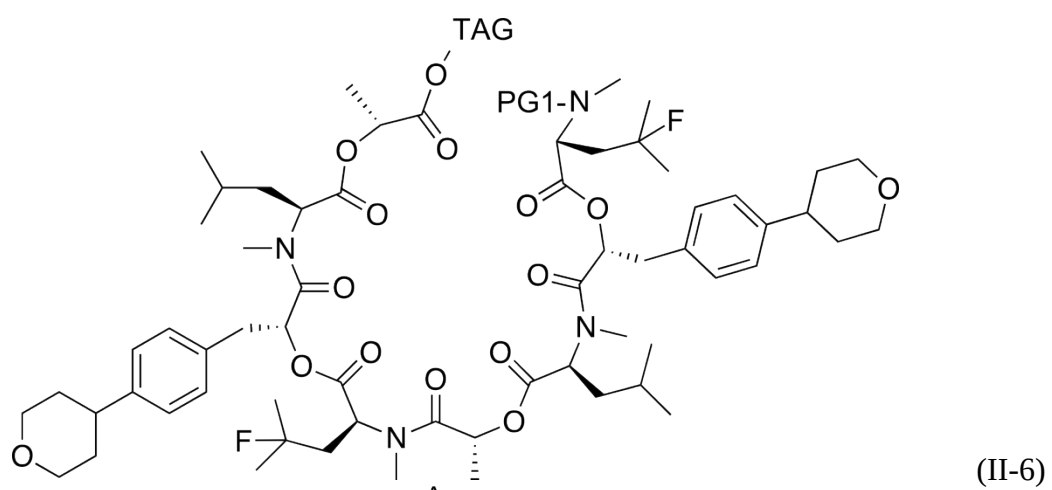


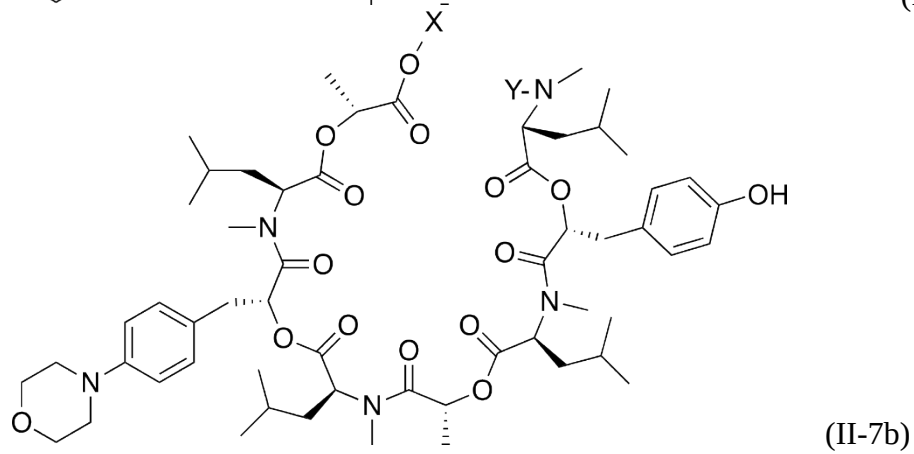
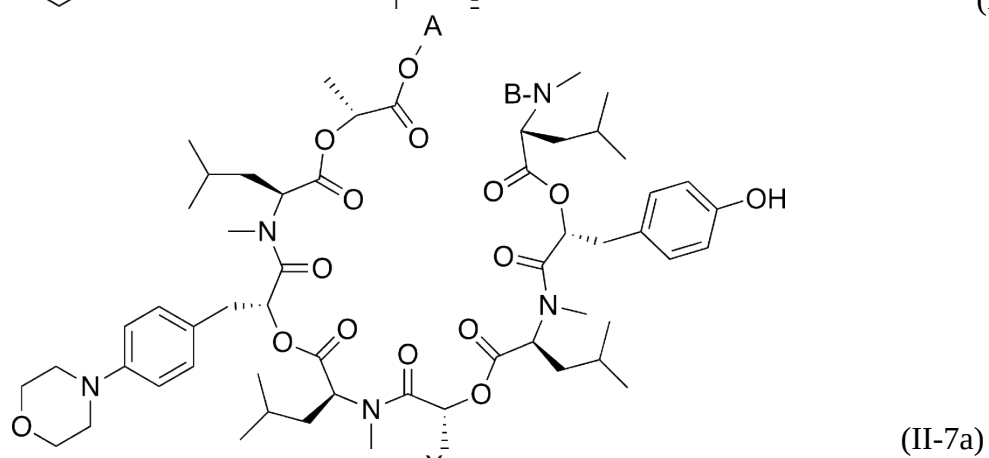
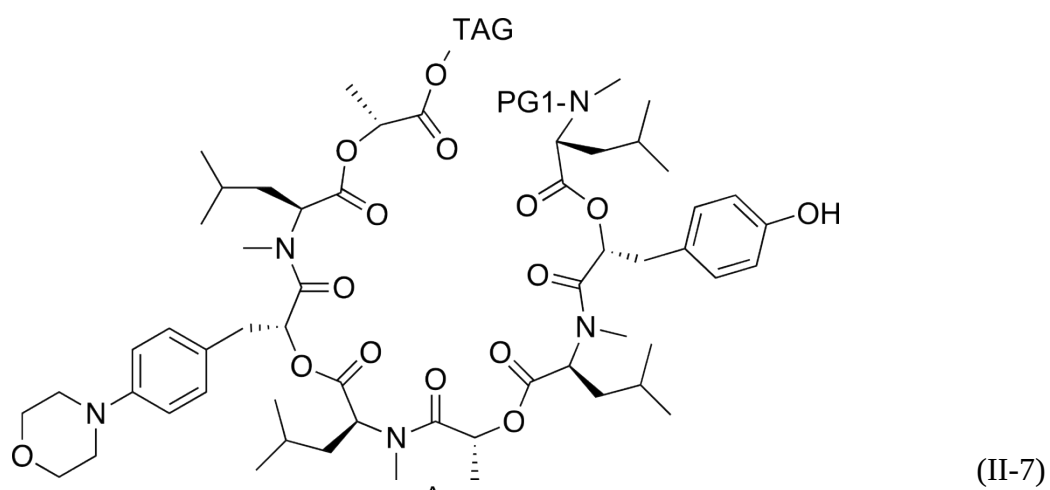
(II-4a)

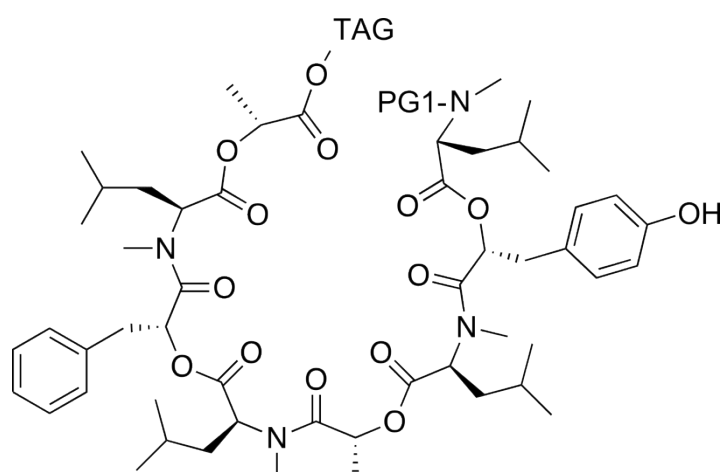


(II-4b)

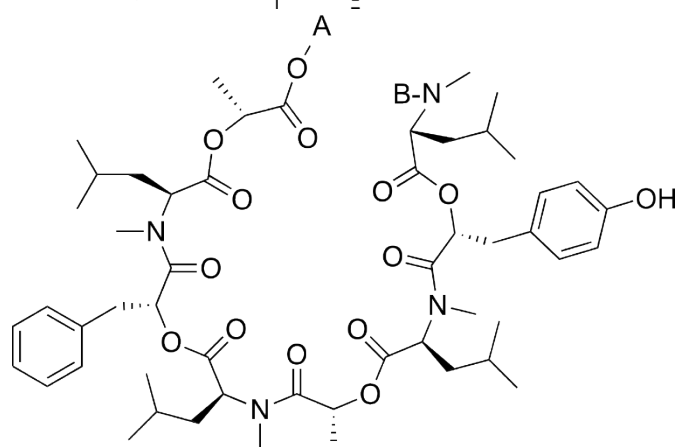




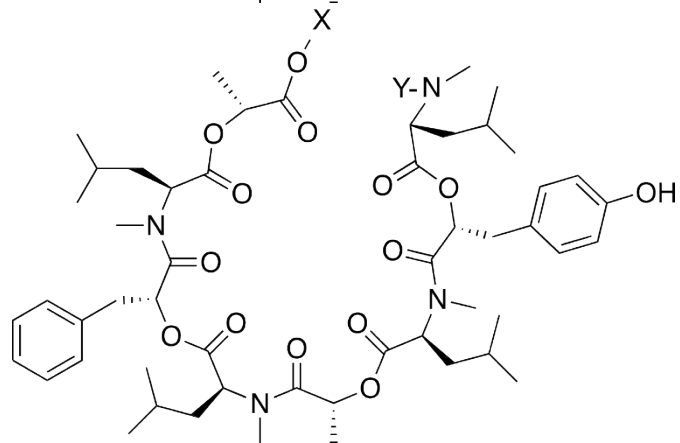




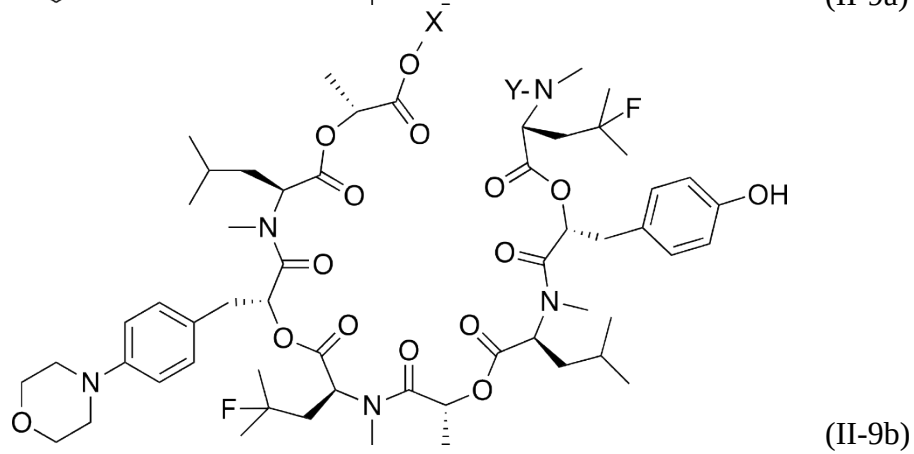
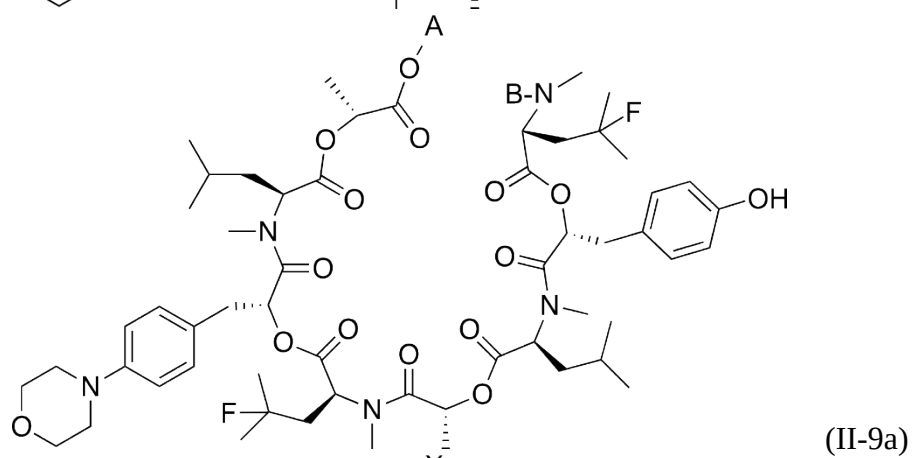
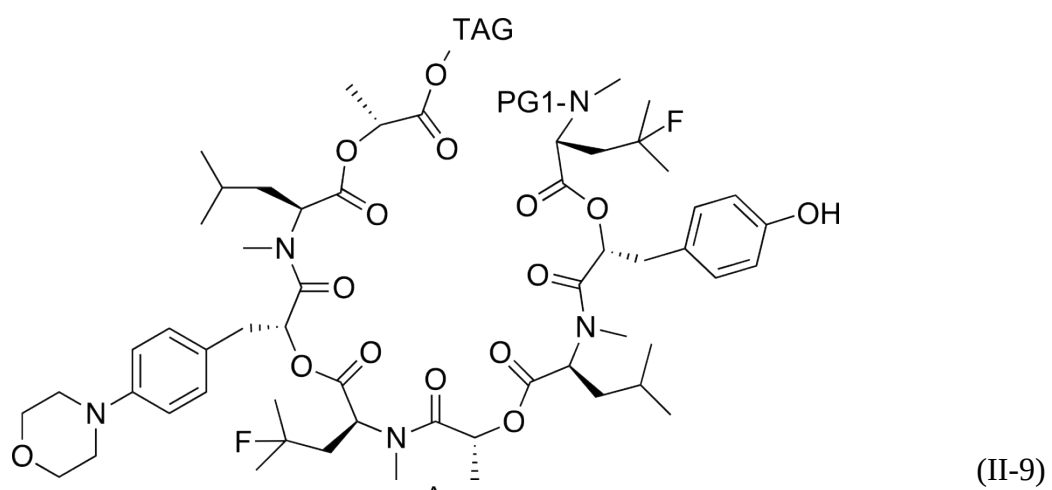
(II-8)

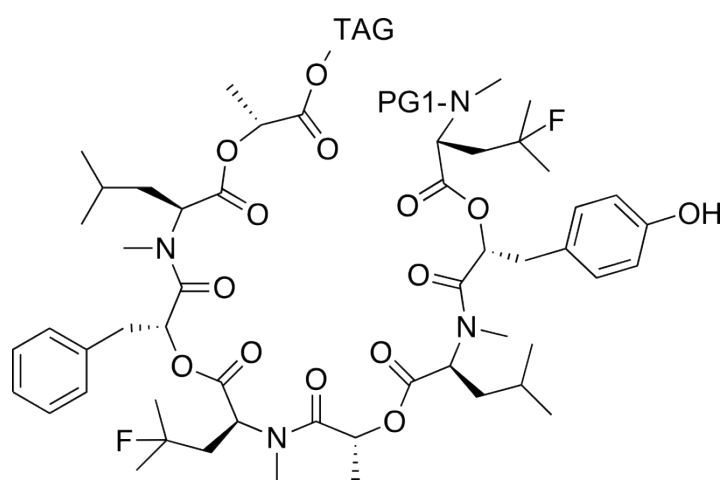


(II-8a)

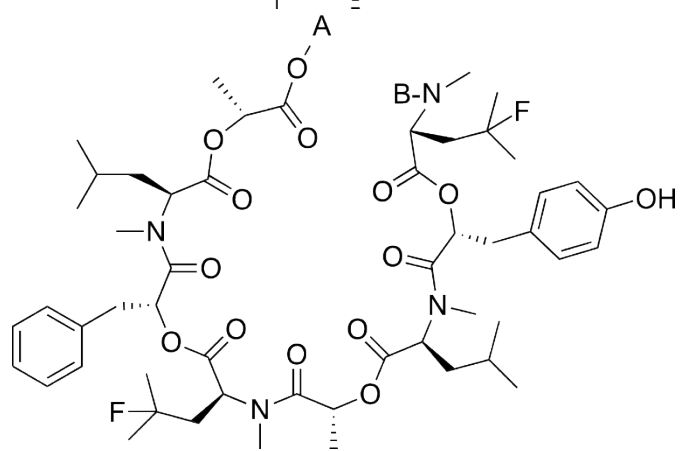


(II-8b)

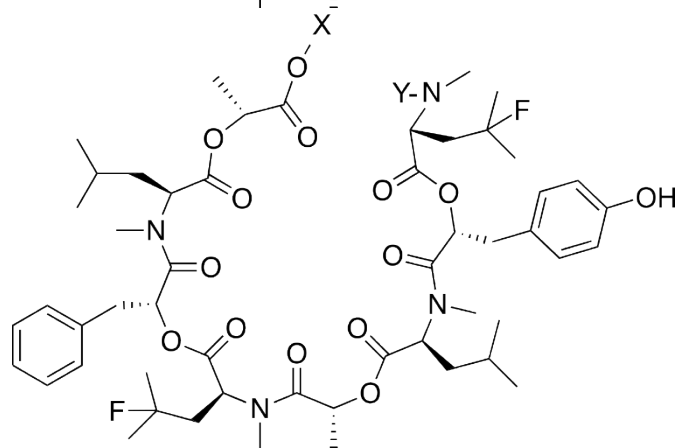




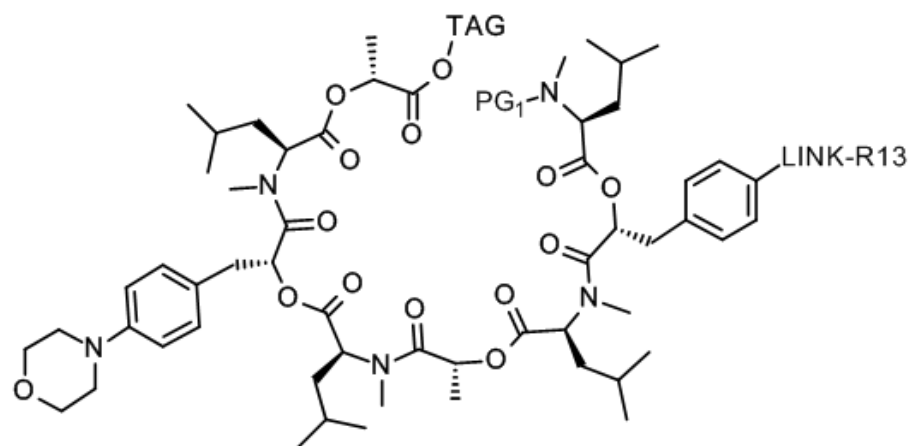
(II-10)



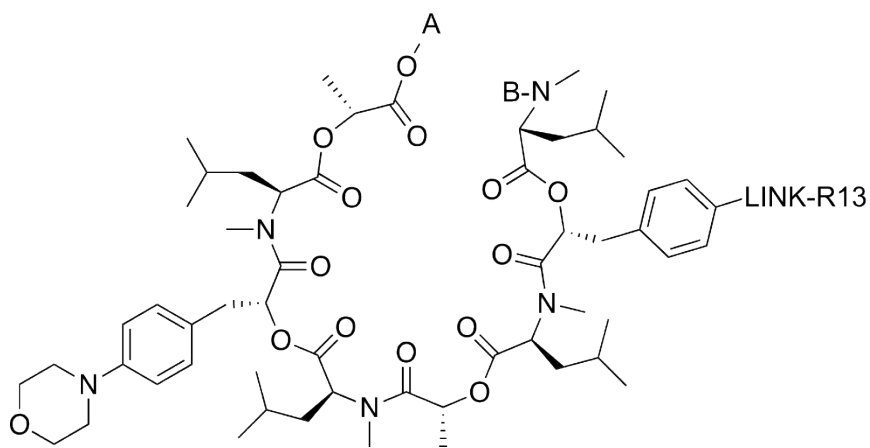
(II-10a)



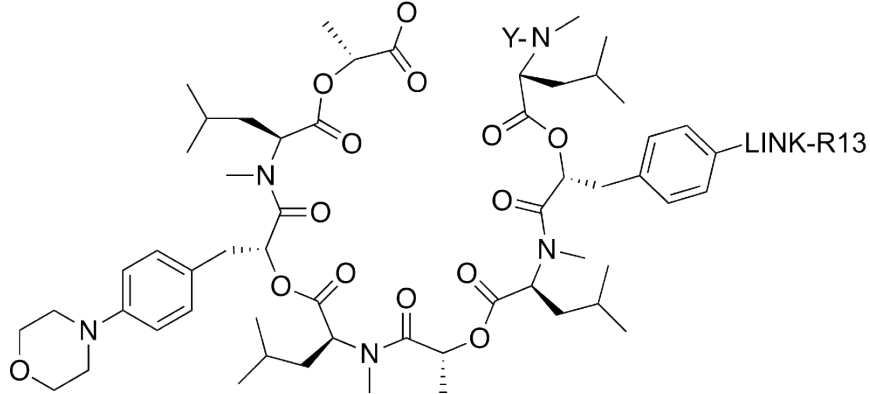
(II-10b)



(II-11)



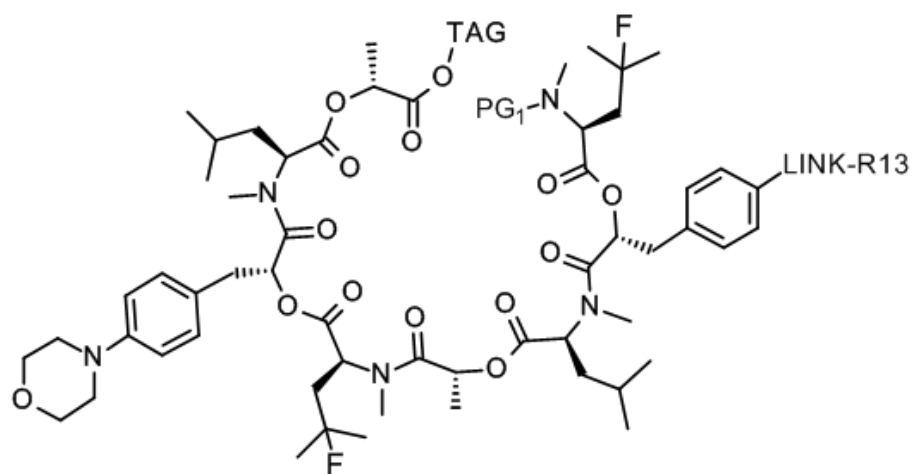
(II-11a)



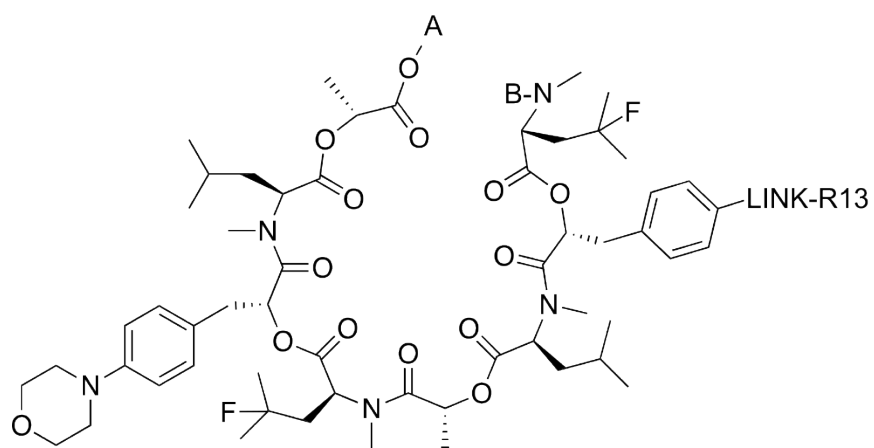
(II-11b)

The chemical structure shows a complex molecule with a central backbone. It includes a phenyl group (a benzene ring) attached to a side chain. There are several amide bonds (C=O and N-H) and ester bonds (C=O and O-C). A linker labeled "LINK-R13" is attached to a side chain. The molecule is labeled with "A" and "B-N" at specific points, indicating functional groups or attachment sites. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.

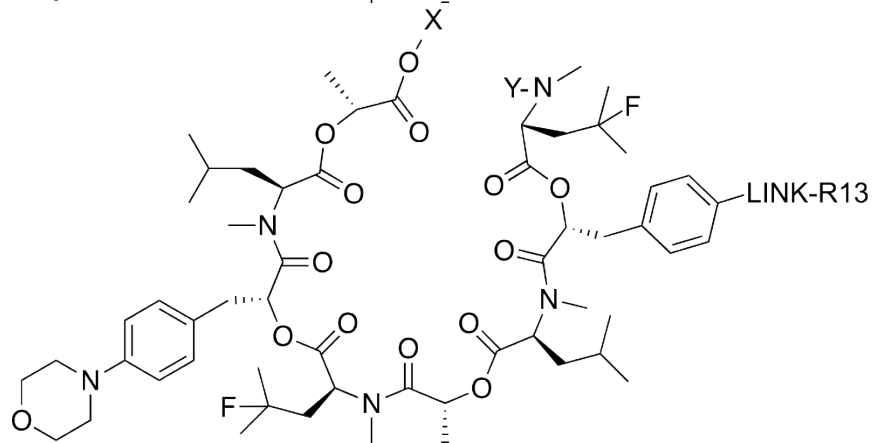
(II-12b)



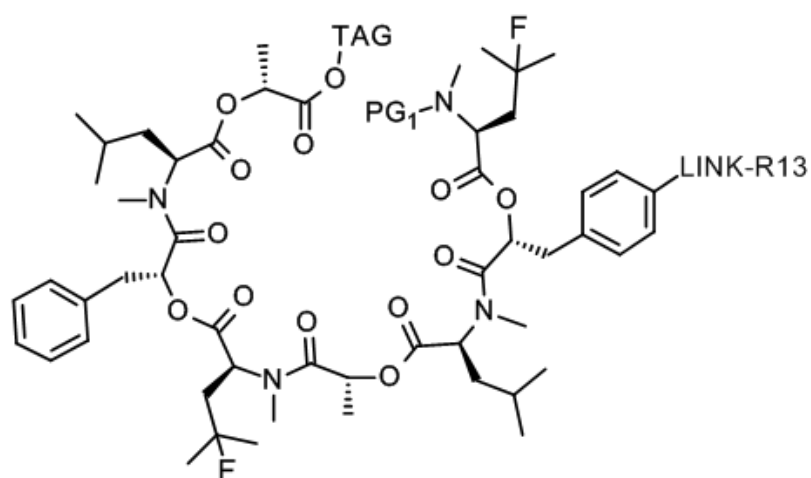
(II-13)



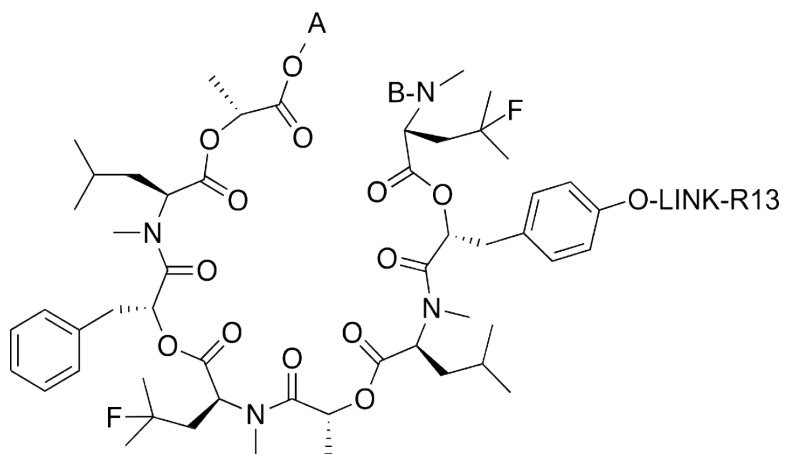
(II-13a)



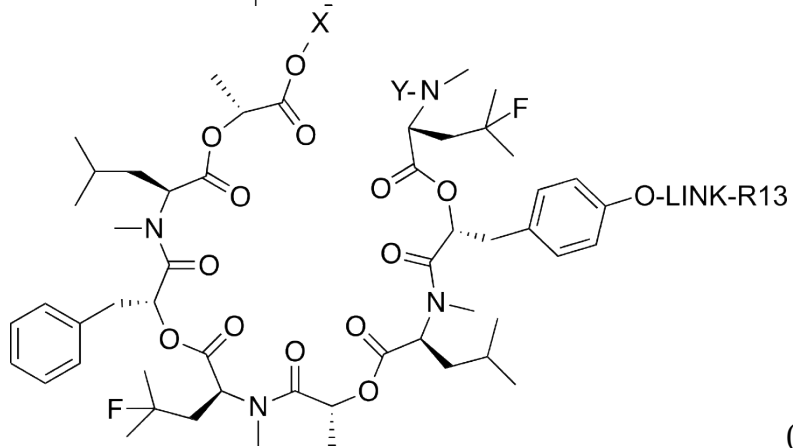
(II-13b)



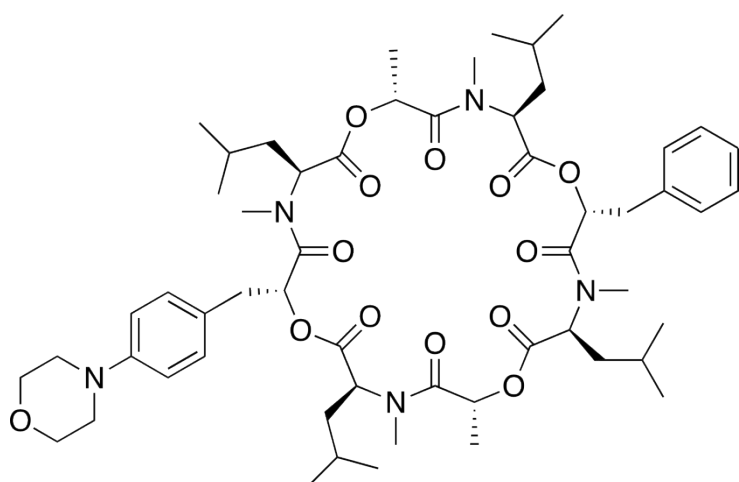
(II-14)



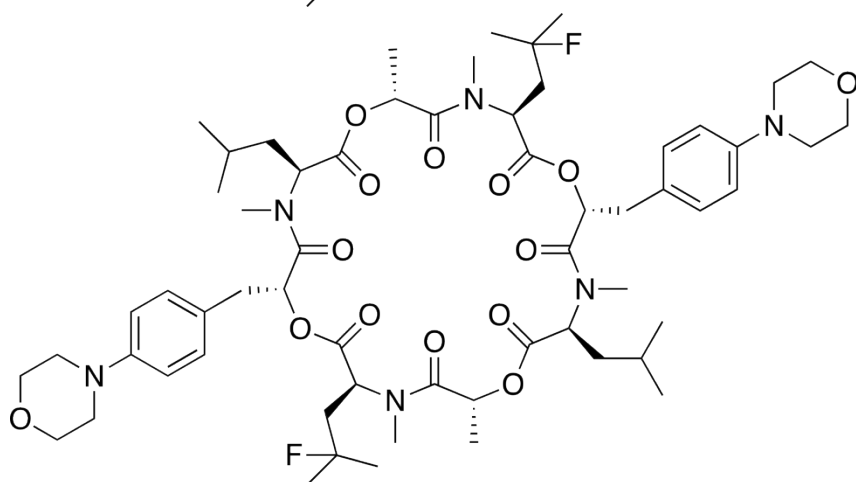
(II-14a)



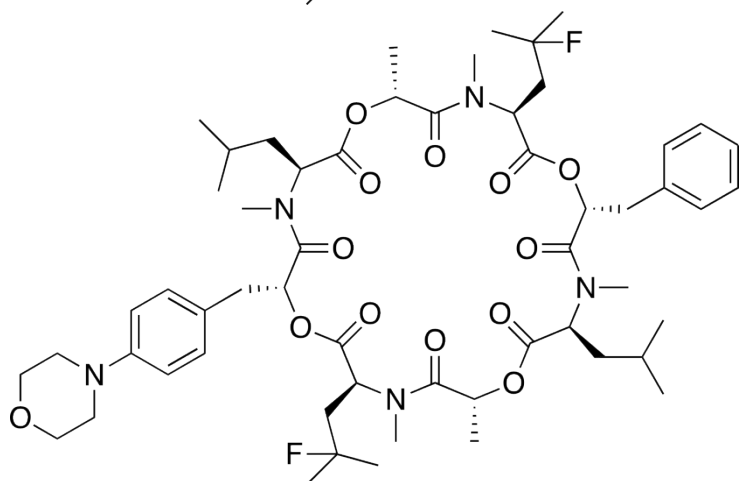
(II-14b)



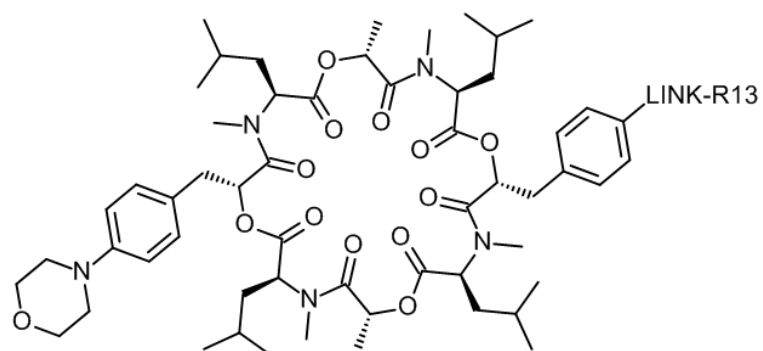
(I-1)



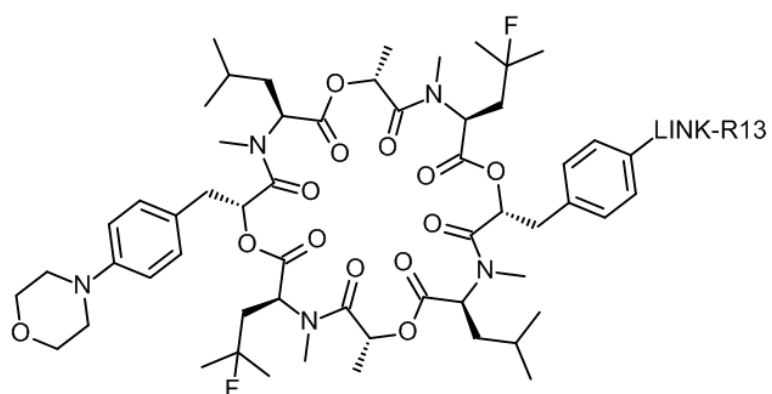
(I-2)



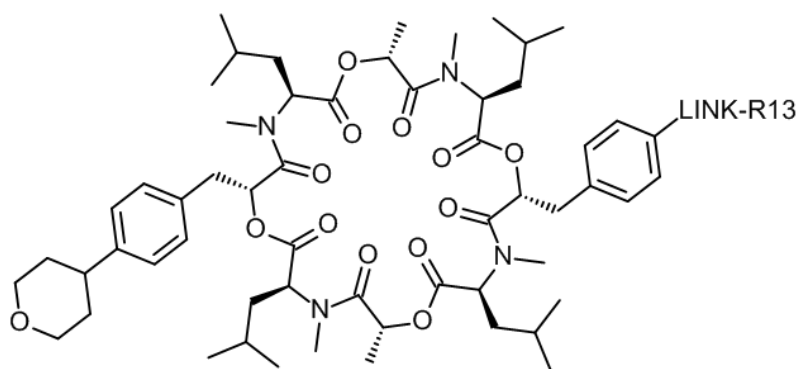
(I-3)



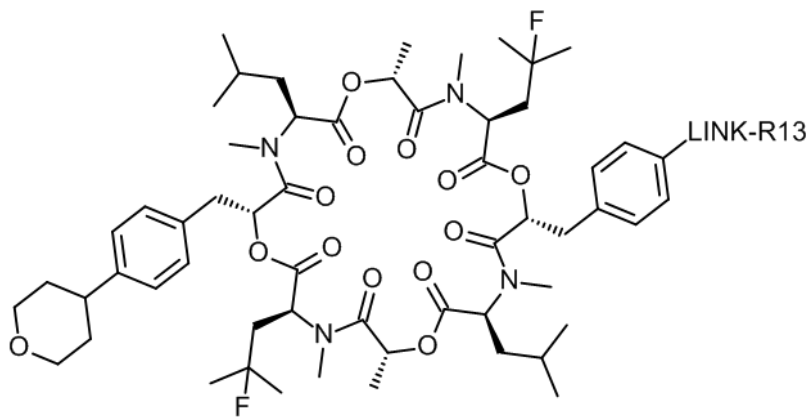
(I-4)



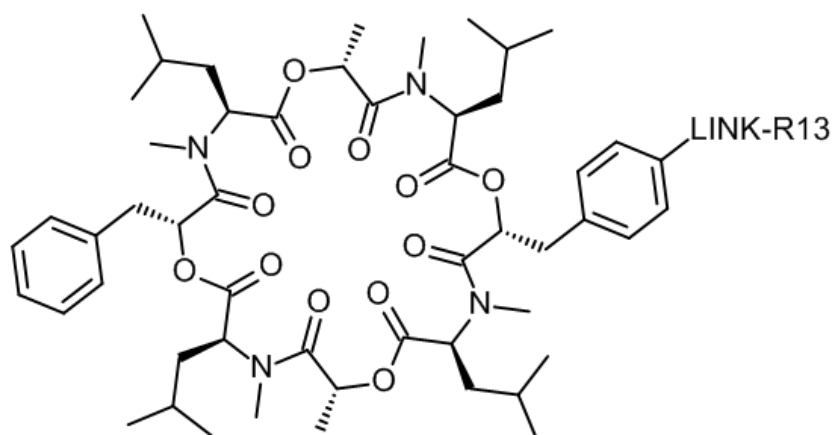
(I-5)



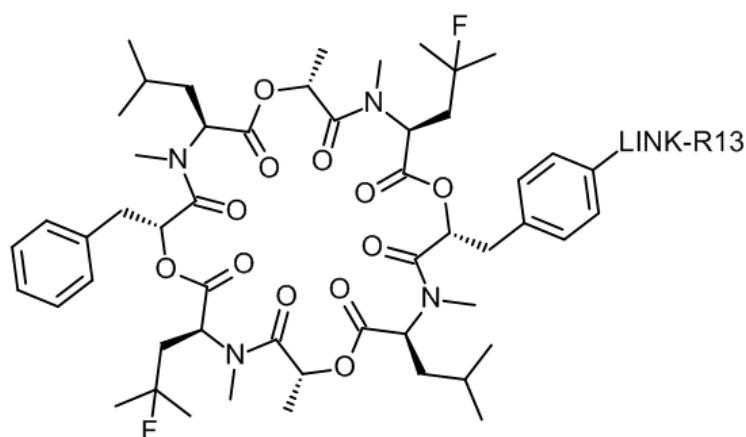
(I-6)



(I-7)



(I-8)



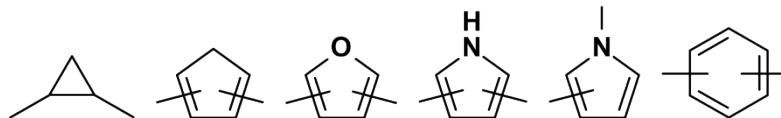
(I-9)

donde en las fórmulas (II-11) a (II-14) y (I-1) a (I-9), respectivamente:

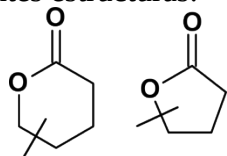
A, B, X e Y son como se define anteriormente,

5

–LINK– se selecciona de:



y R13 se selecciona de $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, SO_2NH_2 , $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, CF_3 o una de las siguientes estructuras:



10

Los términos "sal veterinariamente aceptable" y "sal farmacéuticamente aceptable" se usan en toda la memoria descriptiva para describir cualquier sal de los compuestos que son aceptables para administración para aplicaciones farmacéuticas o veterinarias, y que provee el compuesto activo tras la administración.

Las sales veterinariamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos

orgánicos o inorgánicos veterinariamente aceptables. Sales adecuadas incluyen las que comprenden metales alcalinos como litio, sodio o potasio, metales alcalinotérreos como calcio, magnesio y bario. Sales que comprende metales de transición que incluyen, de modo no taxativo, manganeso, cobre, zinc y hierro también son adecuados. Asimismo, las sales que comprenden cationes de amonio así como también cationes de amonio sustituidos, donde uno o más de los átomos de hidrógeno se remplazan por grupos alquilo o arilo están comprendidas por la invención. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos que incluyen, de modo no taxativo, ácidos hidrohaluros (HCl, HBr, HF, HI), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares son particularmente adecuados. Sales inorgánicas adecuadas también incluyen, de modo no taxativo, sales de bicarbonato, y carbonato. En algunas modalidades, ejemplos de sales veterinariamente y agrícolamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos orgánicos que incluyen, de modo no taxativo, maleato, dimaleato, fumarato, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. Por supuesto, pueden usarse otros ácidos orgánicos aceptables.

Las sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio) de los compuestos pueden también realizarse haciendo reaccionar un residuo lo suficientemente ácido en los compuestos con un hidróxido del metal alcalino o metal alcalinotérreo.

Las sales veterinariamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto lo suficientemente básico como una amina con un grupo funcional adecuadamente ácido presente en el compuesto, o haciendo reaccionar un ácido adecuado con un grupo funcional adecuadamente básico en los compuestos de la invención.

Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos sin pretender limitarse por estos.

5 1. Método general

Los elementos básicos de partida se prepararon a partir de reactivos comercialmente disponibles. A menos que se especifique de otro modo, los reactivos y solventes se obtuvieron de proveedores comerciales de alta calidad y se usaron sin purificación adicional. Metanol y tolueno seco, CH_2Cl_2 se obtuvieron de Kanto Chemical Co., Inc. Todas las reacciones se monitorearon por cromatografía de capa fina (TLC) usando placas pre-recubiertas con gel de sílice Merck 60 F254 (0,25 mm). La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo con gel de sílice Kanto Chemical (Kanto Chemical, gel de sílice 60 N, esférico neutro, 0,040–0,050 mm, Cat.-No. 37563–84). Los espectros ^1H y ^{13}C NMR se registraron en JEOL JNM-ECA-500 (500 MHz para ^1H -NMR y 125 MHz para ^{13}C -NMR). Los giros químicos se expresan en ppm posterior a los picos de solvente interno para CDCl_3 (^1H ; $\delta = 7,26$ ppm, ^{13}C ; $\delta = 77,0$ ppm), CD_3OD (^1H ; $\delta = 3,31$ ppm, ^{13}C ; $\delta = 49,0$ ppm) y los valores J se expresan en Hertz. Las siguientes abreviaturas se usaron para explicar las multiplicidades: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, dd = doblete doble, ddd = doblete doble, dt = triplete doble, dq = cuartete doble, m = multiplete, br = amplio. Todos los espectros infrarrojos se midieron en un espectrómetro Horiba FT-210. Los espectros de masas de alta y baja resolución se midieron en JEOL JMS-AX505 HA, JEOL JMS-700 MStation y JEOL JMS-T100LP. Las rotaciones ópticas se midieron usando el polarímetro JASCO P-1010. Los puntos de fusión se midieron en un aparato YANACO MP-500P o OptiMelt (Stanford Research Systems).

Método general para desprotección Fmoc

El sustrato protegido Fmoc se disolvió en 5 % piperidina/ CH_2Cl_2 (generalmente 0,05 M para sustrato) a temperatura ambiente y la solución se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió posteriormente hasta $-5\text{ }^\circ\text{C}$ y se agregó MeOH (exceso 30 quintuplo de solución de reacción). La solución heterogénea resultante se agitó durante otros 30 min a $-5\text{ }^\circ\text{C}$, y el precipitado incoloro se filtró y lavó con más MeOH para proporcionar la correspondiente amina como un polvo incoloro.

Método general para la escisión de la función TAGa

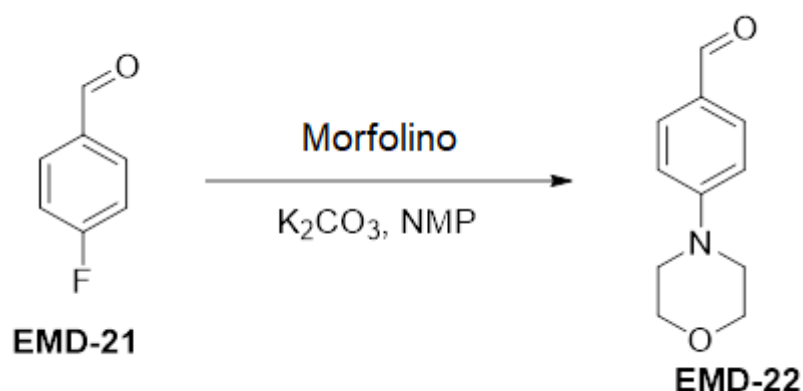
Los sustratos etiquetados con TAGa disueltos en 50 % TFA/ CH_2Cl_2 (0,05 M 35 por sustrato) a temperatura ambiente y la solución se agitó durante generalmente 1 h. La

mezcla de reacción se concentró posteriormente con tolueno (x 3) para retirar TFA. A un matraz se agregó luego CH_2Cl_2 a -5°C , luego se agregó MeOH (exceso quíntuplo de CH_2Cl_2). La solución heterogénea resultante se agitó durante otros 30 min a -5°C , y el precipitado incoloro se filtró y lavó con más MeOH. Los filtrados combinados se concentraron al vacío. Al producto resultante se agregó 4 M HCl/Dioxano (0,05 M por producto) y se concentró con tolueno (x 3) para proporcionar el correspondiente ácido carboxílico como un aceite generalmente pardo. El material bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

producto) y se concentró con tolueno (x 3) para proporcionar el correspondiente ácido carboxílico como un aceite generalmente pardo. El material bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

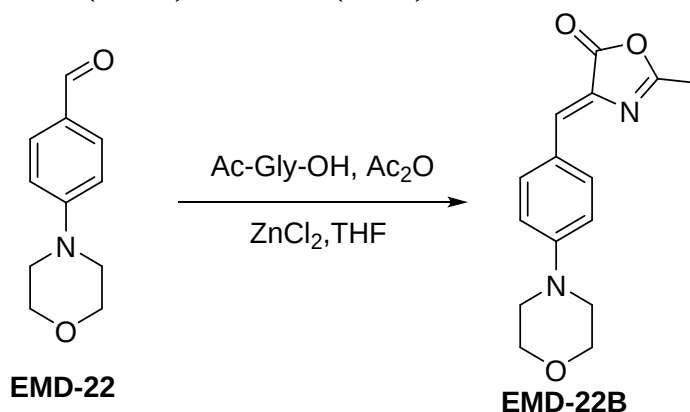
2. Síntesis de emodepsida

A continuación se describe la síntesis de emodepsida, usando el compuesto Bencil (R)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)propanoato (denominado EMD-8) que se sintetiza de p-fluoruro benzaldehído de acuerdo con el esquema de la Fig. 1. Usando este compuesto, la emodepsida se sintetizó de acuerdo con el esquema de la Fig. 2.

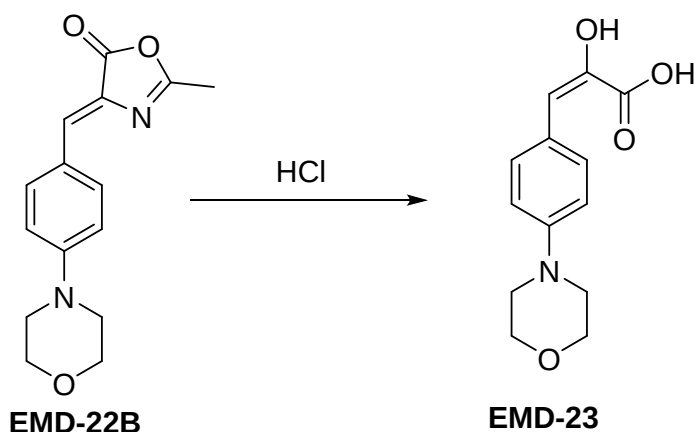


4-Morfolinobenzaldehído (EMD-22): En un reactor de 100 l, se colocó una solución de 4-fluorobenzaldehído (EMD-21, 3,6 kg, 29,0 mol, 1,0 eq) en 1-metil-2-pirrolidina (36 l, 10,0 V), morfolina (7,6 kg, 87 mol, 3,0 eq), K_2CO_3 (10,0 kg, 72,5 mol, 2,5 eq). La mezcla resultante se agitó al menos durante 6 h a $125\sim 130^\circ\text{C}$. La reacción se monitoreó por TLC hasta no haber más EMD-21. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (18 l, 5 V), H_2O (72 l, 20 V), y se separó. La fase de agua se extrajo con acetato de etilo (18 l x 2) y se combinó la fase orgánica, y se lavó con H_2O (36,0 l x 3). Los extractos orgánicos se concentraron al vacío a menos de 45°C hasta no haber más destilado. El residuo se eluyó con heptano/acetato de etilo (5:1, v/v, 7,2 l) y se

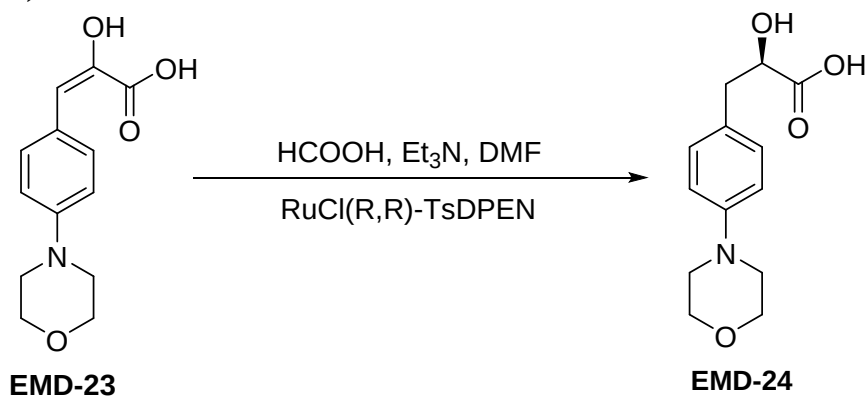
concentró al vacío a menos de 45 °C. Luego, al residuo anterior se agregó heptano/acetato de etilo (5:1, v/v, 21,6 l) a 20~25 °C. La solución se agitó a 20~25 °C durante 16 h. La mezcla se filtró, y la torta de filtrado se lavó con heptano (7,3 l). Los sólidos se secaron al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 4,67 kg (84,8 %) de 4-Morfolinobenzaldehído (EMD-22) como un sólido amarillo. MS (ES, m/z): 192 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) 9,74 (s, 1H), 7,74 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,07(d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,75-3,74 (m, 4H), 3,35-3,33 (m, 4H).



(*Z*)-2-metil-4-(4-morfolinobencilideno)oxazol-5(4H)-ona (EMD-22B): En un reactor de 100 l, se colocó una solución de *N*-acetilglicina (1,22 kg, 10,46 mol, 1,0 eq) en tetrahidrofurano (20 l, 10 V), anhídrido acético (3,2 kg, 31,38 mol, 3,0 eq), cloruro de zinc(II) (1,48 kg, 10,46 mol, 1,0 eq). La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 1 h y se agregó EMD-22 (2,0 kg, 10,46 mol, 1,0 eq). Luego, la mezcla se agitó a 70 °C durante otras 16 h y se monitoreó por LCMS. Luego de enfriarse hasta 20~25 °C, se agregó H₂O (40 l). Luego, la mezcla se agitó a 0~5 °C durante 3 h y se filtró. La torta de filtrado se lavó con H₂O (10 l), y se secó al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 2,29 kg (80,4 %) de (*Z*)-2-metil-4-(4-morfolinobencilideno)oxazol-5(4H)-ona (EMD-22B) como un sólido pardo. MS (ES, m/z): 273 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) 7,84 (s, 1H), 7,47(d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,02(d, J = 9,1 Hz, 2H), 3,74-3,71 (m, 4H), 3,32-3,27 (m, 4H).



Ácido (*E*)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)acrílico (EMD-23): En un reactor de 50 l, se colocó una solución de EMD-22B (2,2 kg, 8,08 mol, 1,0 eq) en 1,4-dioxano (8,8 l, 4,0 V), HCl (8,8 l, 4,0 V) a 20~25 °C. La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 3 h y se monitoreó por LCMS. Luego de enfriarse hasta 0~10 °C, la mezcla se agitó a 0~10 °C durante 16 h y se filtró. La torta de filtrado se secó al vacío a 40~45 °C, El producto bruto se eluyó con H₂O (4,4 l) y se agitó a 0~10 °C durante 2 h. La mezcla se filtró, y la torta de filtrado se secó al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 1,17 kg (56,0 %) de ácido (*E*)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)acrílico (EMD-23) como un sólido pizarra. MS (ES, *m/z*): 250 (M+H); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) 7,66 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,97(d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,35 (s, 1H), 4,05 (s, 1H, -OH), 3,77-3,74 (m, 4H), 3,19-3,16 (m, 4H).

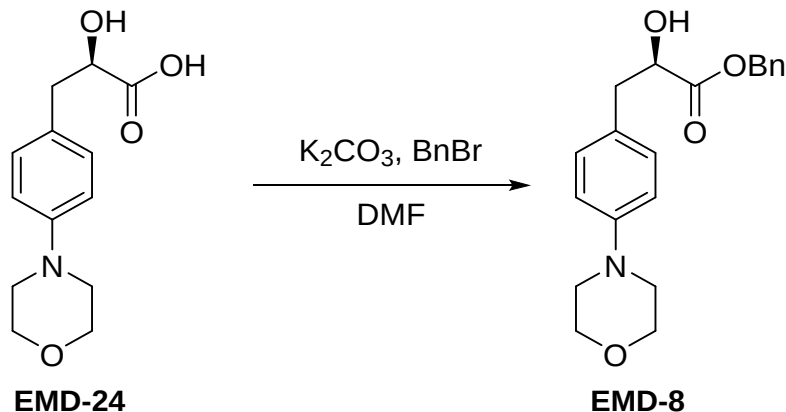


15

Ácido (*R*)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)propanoico (EMD-24): En un matraz de fondo redondo de 2 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de EMD-23 (66,0 g, 0,26 mol, 1,0 eq) en *N,N*-dimetilformamida (660 ml, 10,0 V), Et₃N (107,2 g, 1,06 mol, 4,0 eq), RuCl(R,R)-TsDPEN (1,69 g, 0,0026 mol, 0,01 eq) a 20~25 °C. A la mezcla anterior se agregó ácido fórmico

20

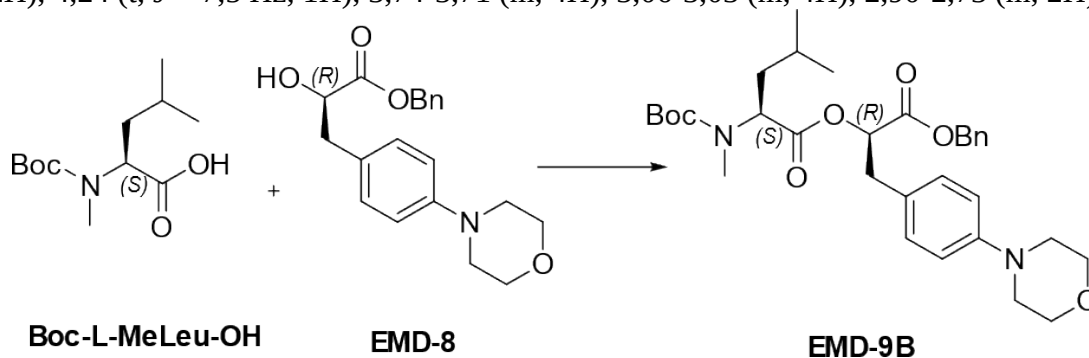
(36,59 g, 0,79 mol, 3,0 eq) gota a gota durante 2 h a 20~25 °C en atmósfera de N₂. Luego, la mezcla se agitó a 20~25 °C y se monitoreó por LCMS. La reacción se notó para M1, que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.



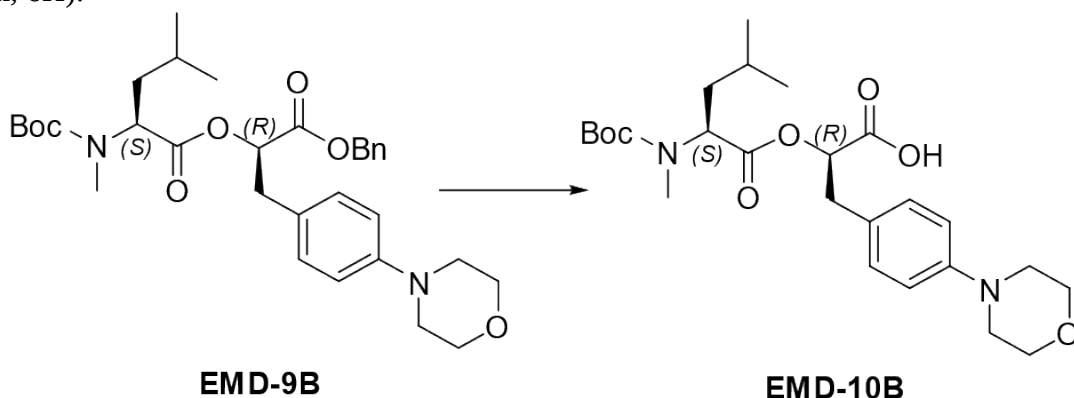
5

(R)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)propanoato de bencilo (EMD-8): A una mezcla de (M1) se agregó K₂CO₃ (109,0 g, 0,78 mol, 3,0 eq) y gota a gota bromuro de bencilo (54,0 g, 0,32 mol, 1,2 eq) a 20~25 °C durante 1 h. Luego, la mezcla se agitó a 55~60 °C durante otras 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (330 ml, 5 V), H₂O (1,2 l, 20 V), y se separó. La fase de agua se extrajo con acetato de etilo (330 ml x 2) y se combinó la fase orgánica, y se lavó con H₂O (660 ml x 3). Los extractos orgánicos se concentraron al vacío a menos de 45 °C hasta no haber más destilado. El residuo se eluyó con heptano/acetato de etilo (3:1, v/v, 132 ml) y se concentró al vacío a menos de 45 °C. Luego, al residuo anterior se agregó heptano/acetato de etilo (3:1, v/v, 264 ml) a 20~25 °C. La mezcla se filtró, y la torta de filtrado se lavó con heptano (132 ml). Los sólidos se secaron al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 52 g (58 %) de (R)-2-hidroxi-3-(4-morfolinofenil)propanoato de bencilo (EMD-8) como un sólido amarillo. MS (ES, *m/z*): 342 (M+H); ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) 7,40-7,27 (m, 5H), 7,05 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 5,17 (s, 2H), 4,24 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,74-3,71 (m, 4H), 3,06-3,03 (m, 4H), 2,90-2,73 (m, 2H).

20

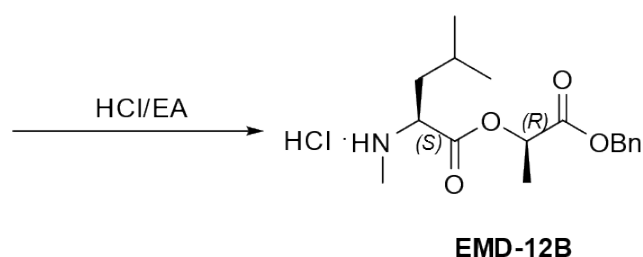
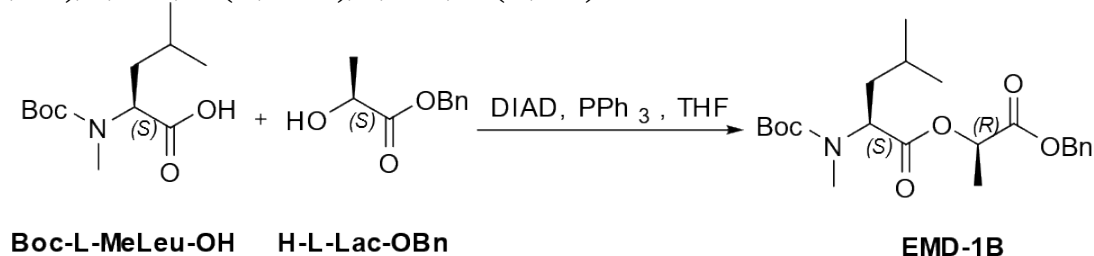


(R)-1-(benciloxi)-3-(4-morfolinofenil)-1-oxopropan-2-il-N-(terc-butoxicarbonil)-N-metil-L-leucinato (EMD-9B): En un reactor de 2 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de EMD-8 (1,96 kg, 5,75 mol, 1,0 eq) en diclorometano (14,1 l, 10, V), *N*-(terc-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-leucina (1,41 kg, 5,75 mol, 1,0 eq), DMAP (0,77 kg, 6,32 mol, 1,1 eq), EDCI (1,21 kg, 6,32 mol, 1,1 eq) a 20~25 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante al menos 3 h y se monitoreó por LCMS. La mezcla se concentró al vacío a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. El residuo se disolvió en MTBE (14,1 ml) y se filtró HCl (ac, 1 N, 14,1 l). La fase orgánica se lavó con HCl (ac, 1 N, 14,1 l), NaHCO₃ (sat, 14,1 l x 2), y se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Luego el residuo se redisolvió en heptano/MTBE (28,2 l, 8:1, v/v), y se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Al residuo anterior se agregó heptano/MTBE (15,5 l, 8:1, v/v) a 20~25 °C y cristal de siembra (0,2 %, p/p), y la agitación se mantuvo durante la noche a 20~25 °C. La mezcla se filtró; la torta de filtrado se lavó con heptano (7,0 l). Los sólidos se secaron al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 2,56 kg (78,3 %) de (R)-1-(benciloxi)-3-(4-morfolinofenil)-1-oxopropan-2-il-N-(tercbutoxicarbonil)-*N*-metil-L-leucinato (EMD-9B) como un sólido amarillo claro. MS (ES, *m/z*): 569 (M+H); ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) 7,38-7,26 (m, 5H), 7,10 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,96 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 5,25-5,22 (m, 1H), 5,12-5,10 (m, 2H), 4,07-3,99 (m, 1 H), 3,79-3,76 (m,, 4H), 3,19-2,97 (m, 6H), 2,57 (s, 3H), 1,42-1,34 (m, 11H), 1,24-1,15 (m, 1H), 0,88-0,82 (m, 6H).



Ácido (R)-2-((N-(terc-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfolinofenil)propanoico (EMD-10B): En un reactor de 50 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-9B (400 g, 0,7 mol, 1,0 eq) en EtOH (4,0 l, 10,0 V) a 20~25 °C, El reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces y se agregó Pd/C (28,0 g, 7 % p/p). Luego el reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces nuevamente, y se mantuvo hidrógeno burbujeando

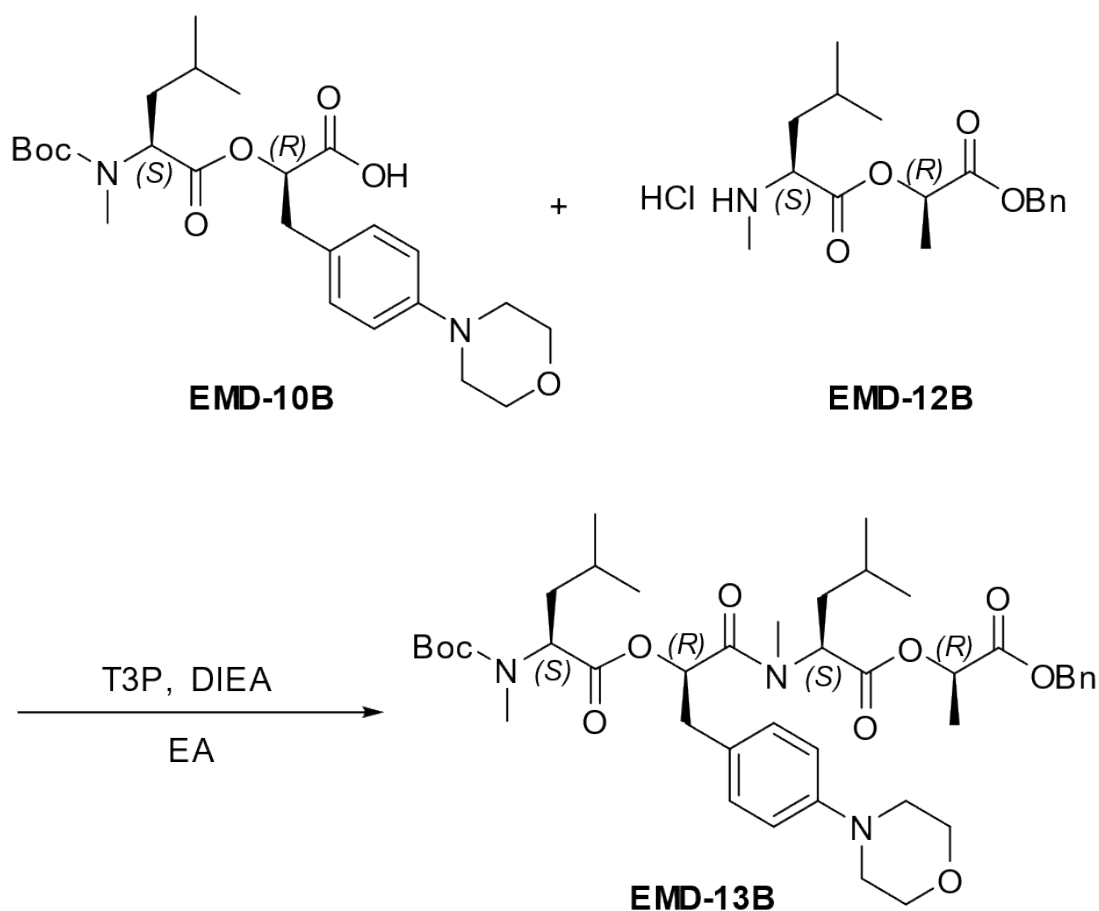
debajo de la superficie de la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante al menos 4 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC. Luego de completarse la reacción, se detuvo el burbujeo de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celite (2,0 kg) y la torta de filtrado se enjuagó con EA (0,8 l), y el filtrado se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en 317,7 g (94,4 %) de ácido (R)-2-((N-(terc-butoxicarbonil)-N-metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfo-linofenil)propanoico (EMD-10B) como un aceite amarillo oscuro; MS (ES, m/z): 479 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) 7,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 5,03-5,02 (m, 1H), 4,81-4,53 (m, 1H), 3,73 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H), 3,05 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,96-2,90 (m, 1H), 2,63 (s, 3H), 1,42-1,16 (m, 12 H), 0,89-0,84 (m, 6H).



(R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il metil-L-leucinato (EMD-12B): En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de *N*-(terc-butoxicarbonil)-*N*-metil-L-leucina (240,3 g, 0,98 mol, 1,0 eq) en THF (3,9 l, 16 v), (*S*)-2-hidroxiopropanoato de bencilo (176,5 g, 0,98 mol, 1,0 eq), trifenilfosfina (385,1 g, 1,47 mol, 1,5 eq) a 20~25 °C. Luego de enfriarse hasta menos de 10 °C, diisopropil azodiformiato (297 g, 1,47 mol, 1,5 eq) se agregó gota a gota con agitación a menos de 10 °C. Luego, se calentó hasta 20~25 °C y se agitó durante al menos 2 h. La reacción se monitoreó por HPLC hasta que el (*S*)-2-hidroxiopropanoato de bencilo fue menos de o igual a 0,5 %. La mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo (3,9 l) y se lavó con NaHCO_3 (sat, 3,9 l x 2), salmuera (3,9 l x 2). La fase orgánica se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. El residuo se intercambió con terc-butil metil éter (240 ml x 2), se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado, y se suspendió con terc-butil metil éter (960 ml) durante al menos 3 h. La

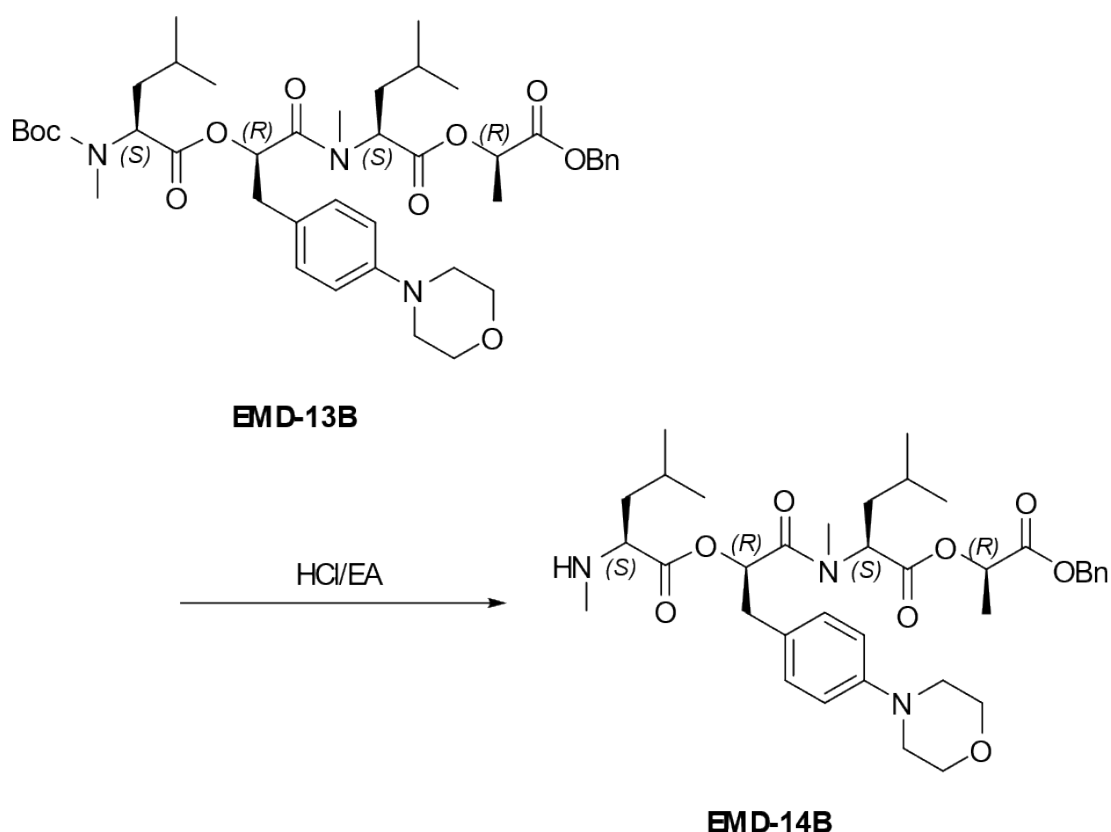
mezcla se filtró y la torta de filtrado se lavó con terc-butil metil éter (240 ml). El filtrado se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en el producto bruto de (R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-(terc-butoxicarbonil)-N-metil-L-leucinato (EMD-1B) como un aceite amarillo, que se usó para el siguiente paso sin purificación adicional.

En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-1B en HCl/EA (1,2 l, 5,0 eq) a menos de 25 °C. La mezcla se agitó durante al menos 1 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-1B fue menos de o igual a 0,5 %. La solución se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. El residuo se intercambió con terc-butil metil éter (240 ml x 2), se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado, y se redisolvió con terc-butil metil éter (1,92 l). Luego, el cristal de siembra (0,1 %, p/p) se agregó y agitó durante al menos 5 h a 20~25 °C. La mezcla se filtró y la torta de filtrado se lavó con terc-butil metil éter (0,24 l). El sólido se secó al vacío a 40±5 °C y se obtuvieron 270 g de producto bruto como un sólido blanco. El sólido se disolvió en acetato de etilo (810 ml) al calentarlo hasta 40±5 °C y se agregó terc-butil metil éter (4,05 l). Posteriormente, se enfrió hasta 20~25 °C y se agregó cristal de siembra (0,1 %, p/p). La mezcla se filtró durante al menos 5 h a 20~25 °C, se filtró, la torta de filtrado se lavó con terc-butil metil éter (0,24 l). El sólido se secó al vacío a 40±5 °C. Esto resultó en 226,7 g (67,3 %, dos pasos) de (R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il metil-L-leucinato (EMD-12B) como un sólido blanco. MS (ES, *m/z*): 308 (M+H); ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) 7,41-7,35 (m, 5 H), 5,28 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 2,51 (s, 3H), 1,77-1,71 (m, 3H), 1,50-1,48 (m, 3H), 0,90-0,87 (m, 6H).

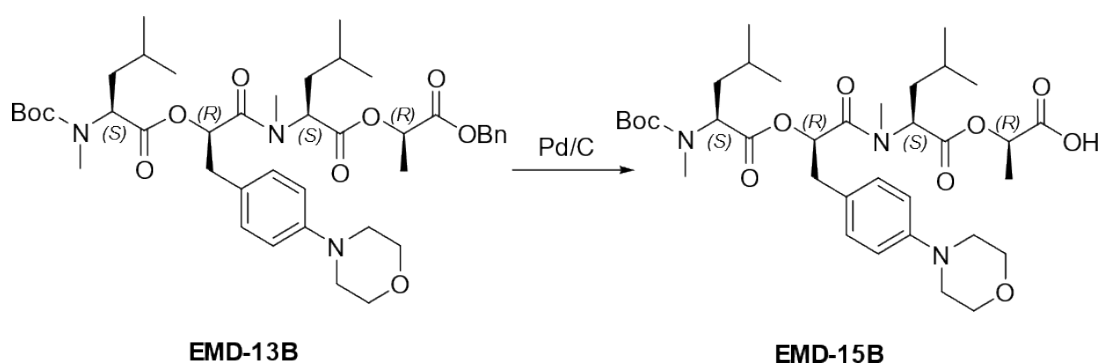


(R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-((R)-2-((N-(terc-butoxicarbonil)-N-metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfolinofenil)propanoil)-N-metil-L-leucinato (EMD-13B):

- 5 En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de EMD-10B (275,0 g, 0,57 mol, 1,0 eq) en acetato de etilo (2,2 l, 8,0 V), EMD-12B (197,7 g, 0,57 mol, 1,0 eq), *N,N*-diisopropiletilamina (372,2 g, 2,88 mol, 5,0 eq) a 20~25 °C. Luego de enfriarse hasta 10 ~20 °C, se agregó anhídrido propilfosfónico (916,4 g, 1,44 mol, 2,5 eq) gota a gota con agitación a menos de 25 °C.
- 10 Luego, la mezcla se agitó a 20~25 °C durante al menos 2,5 h y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-12B fue menos de igual a 1,0 %. La solución se diluyó con heptano (2,75 l) a 0~10 °C y se inactivó lentamente con HCl (ac, 1,0 N, 2,75 l). La fase orgánica se lavó con HCl (ac, 1,0 N, 2,75 l), NaHCO₃ (sat, 2,75 l x 2), se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en 429,8 g (97,4 %) de (R)-1-
- 15 (benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-((R)-2-((N-(terc-butoxicarbonil)-N-metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfolinofenil)propanoil)-N-metil-L-leucinato (EMD-13B) como un aceite esperm amarillo. MS (ES, *m/z*): 768 (M+H);

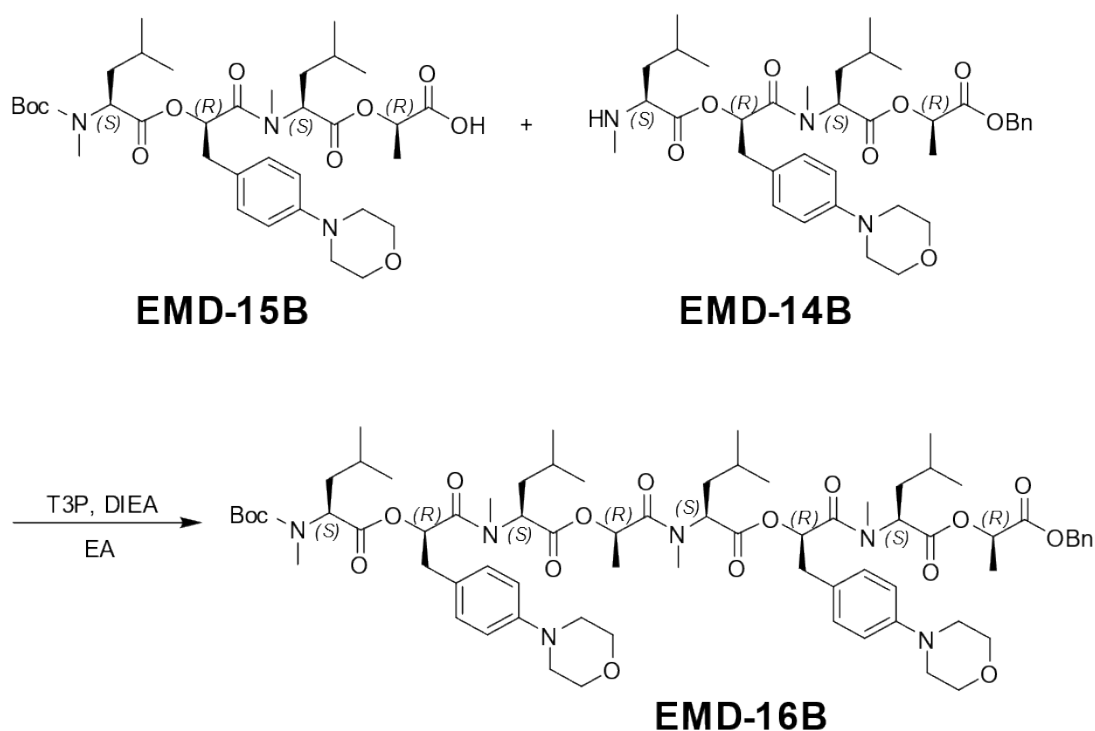


(R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il-N-metil-N-((R)-2-((metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfol-inofenil)propanoil)-L-leucinato (EMD-14B): En un reactor de 5 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-13B (245 g, 0,32 mol, 1,0 eq) en HCl/EA (735, 3,0 V) a menos de 25 °C. La mezcla se agitó durante al menos 1 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-13B fue menos de o igual a 0,5 %. La solución resultante se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado y se intercambió con acetato de etilo (245 ml x 2) a menos de 40 °C. El residuo se disolvió en acetato de etilo (735 ml) y se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (245 g) se agregó a 20 ~25 °C. La mezcla se lavó con NaHCO₃ (sat, 735 ml x 2). La solución orgánica se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en 186,9 g (89,9 %) de (R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il-N-metil-N-((R)-2-((metil-L-leucil)oxi)-3-(4-morfol-inofenil)propanoil)-L-leucinato (EMD-14B) como un aceite amarillo. MS (ES, *m/z*): 668 (M+H); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) 7,41-7,32 (m, 5 H), 7,17 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,50-5,47 (m, 1H), 5,20-5,04 (m, 4H), 4,23-3,99 (m, 1H), 3,74-3,72 (m, 4H), 3,09-2,76 (m, 10H), 2,22-1,99 (m, 3H), 1,63-1,35 (m, 5H), 1,29-1,16 (m, 4H), 0,97-0,70 (m, 12H).



Ácido (6S,9R,12S,15R)-6,12-diisobutil-2,2,5,11,15-pentametil-9-(4-morfolinobencil)-4,7,10,13-tetraoxo-3,8,14-trioxa-5,11-diazaheptadecan-16-oico

- 5 **(EMD-15B)**: En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-13B (274,2 g, 0,36 mol, 1,0 eq) en EtOH (2,8 l, 10,0 V) a 20~25 °C, El reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces y se agregó Pd/C (19,2 g, 7 % p/p). Luego el reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces nuevamente, y se mantuvo hidrógeno burbujeando debajo de la superficie de la
- 10 mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante al menos 4 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC. Luego de completarse la reacción, se detuvo el burbujeo de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celite (2,0 kg) y la torta de filtrado se enjuagó con acetato de etilo (0,56 l), y el filtrado se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en 237,4 g (98,0 %) de ácido (6S,9R,12S,15R)-6,12-diisobutil-2,2,5,11,15-
- 15 pentametil-9-(4-morfolinobencil)-4,7,10,13-tetraoxo-3,8,14-trioxa-5,11-diazaheptadecan-16-oico (EMD-15B) como un aceite amarillo; MS (ES, m/z): 678 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,85 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 5,52-5,40 (m, 1H), 5,09-5,02 (m, 1H), 4,91-4,53 (m, 2 H), 3,74-3,72 (m, 4H), 3,15-3,04 (m, 5H), 2,94-2,86 (m, 4H), 2,65-2,64 (m, 3H), 1,43-1,28 (m, 16H), 0,93-0,77 (m,
- 20 12H).



(R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-metil-N-((6S,9R,12S,15R,18S,21R)-6,12,18-triiso

5 **butil-2,2,5,11,15,17-hexametil-9,21-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16,19-hexaoxo**

-3,8,14,20-tetraoxa-5,11,17-triazadocosan-22-oil)-L-leucinato (EMD-16B):

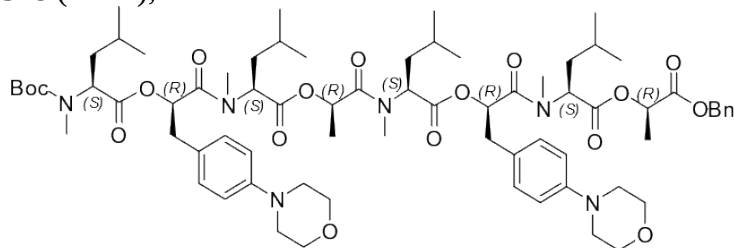
En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de EMD-15B (147,6 g, 0,22 mol, 1,0 eq) en acetato de etilo

10 (2,2 l, 8,0 V), EMD-14B (145,5 g, 0,22 mol, 1,0 eq), *N,N*-diisopropiletilamina (139,6 g, 1,08 mol, 5,0 eq) a 20~25 °C. Luego de enfriarse hasta 10 ~20 °C, se agregó anhídrido propilfosfónico (346,4 g, 0,54 mol, 2,5 eq) gota a gota con agitación a menos de 25 °C. Luego, la mezcla se agitó a 20~25 °C durante al menos 2,5 h y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-12B fue menos de igual a 0,5 %. La solución se diluyó con heptano

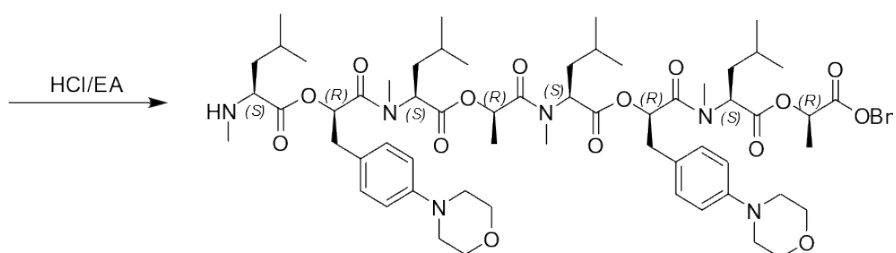
15 (2,2 l) a 0~10 °C y se inactivó lentamente con HCl (ac, 1,0 N, 2,2 l). La fase orgánica se lavó con HCl (ac, 1,0 N, 2,2 l), NaHCO₃ (sat, 2,2 l x 2), se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado, y se intercambió con heptano/MTBE (0,44 l, 1,5:1, v/v) a menos de 40 °C. El residuo se disolvió en heptano/MTBE (1,65 l, 1,5:1, v/v) y se agregó cristal de siembra (0,1 %, p/p) a 20~25 °C. La mezcla se agitó durante al menos

20 16 h a 20~25 °C y se filtró. La torta de filtrado se lavó con heptano (0,66 l), se secó al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 242,4 g (83,4 %) de (R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-metil-N-((6S,9R,12S,15R,18S,21R)-6,12,18-triiso-butyl-2,2,5,11,15,17-hexametil-

9,21-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16,19-hexaoxo-3,8,14,20-tetraoxa-5,11,17-triazadocosan-22-oil)-L-leucinato (EMD-16B) como un sólido blanco: MS (ES, m/z): 1328 (M+H);



EMD-16B



EMD-20B

5

(R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-((2R,5S,8R,11S,14R,17S)-5,11-diisobutil-6,8,12,19-

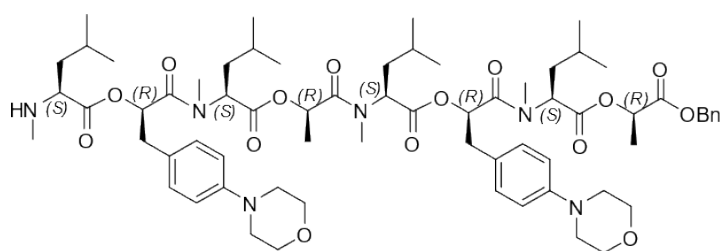
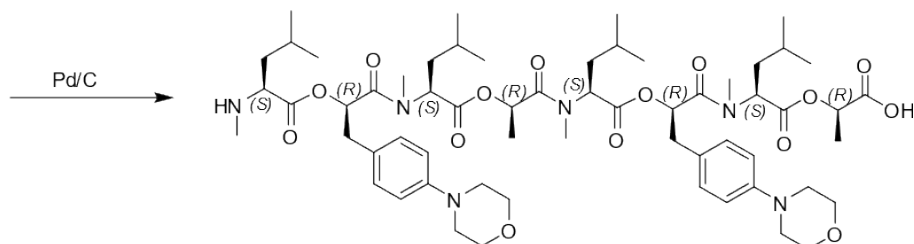
-tetrametil-17-(metilamino)-2,14-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16-

pentaoxo-3,9,15-trioxa-6,12-diazaicosanoil)-N-metil-L-leucinato (EMD-20B): En un reactor de 5 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-16B (376,4 g, 0,28 mol, 1,0 eq) en HCl/EA (1128 ml, 3,0 V) a menos de 25 °C. La mezcla se agitó durante al menos 1 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-16B fue menos de o igual a 0,5 %. La solución resultante se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado y se intercambió con acetato de etilo (376,4 ml x 2) a menos de 40 °C. El residuo se disolvió en acetato de etilo (1128 ml) y se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (376,4 g) se agregó a 20~25 °C. La mezcla se lavó con NaHCO₃ (sat, 1128 ml x 2). La solución orgánica se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. Esto resultó en 313,56 g (90,1 %) de (R)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il N-((2R,5S,8R,11S,14R,17S)-5,11-diisobutil-6,8,12,19-tetrametil-17-(metilamino)-2,14-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16-pentaoxo-3,9,15-trioxa-6,12-diazaicosanoil)-N-metil-L-leucinato (EMD-20B) como un aceite amarillo; MS (ES, m/z): 1228 (M+H);

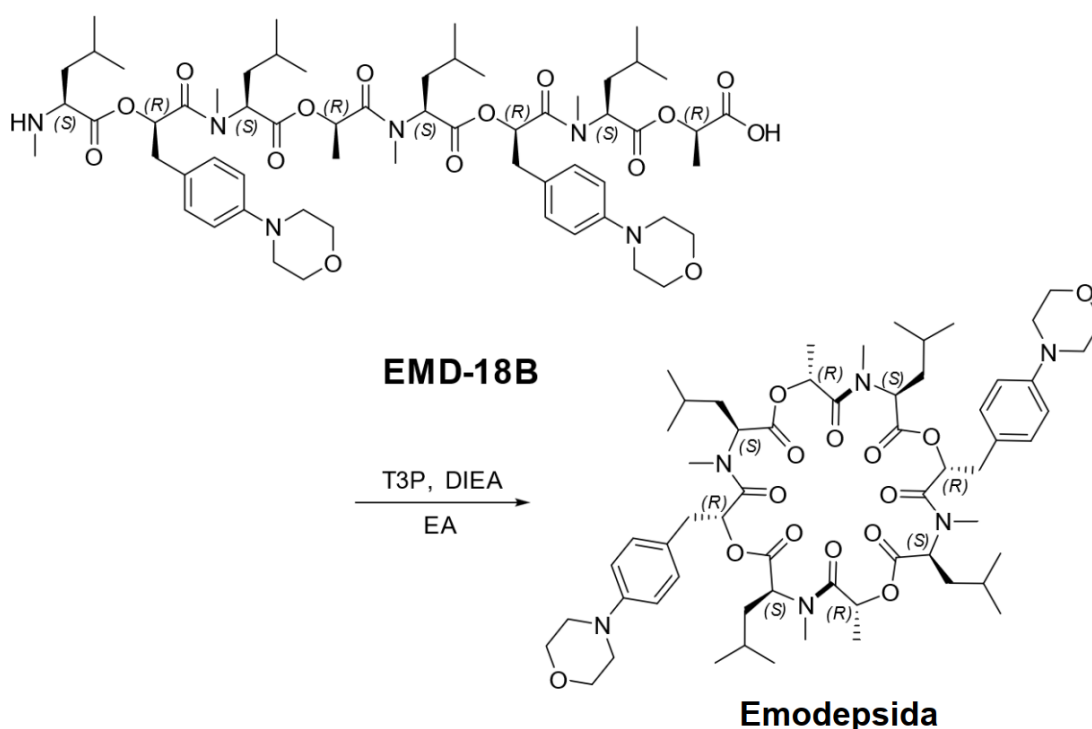
10

15

20

**EMD-20B****EMD-18B**

- Ácido (3S,6R,9S,12R,15S,18R,21S,24R)-3,9,15,21-tetraisobutil-8,12,14,20,24-pentametil-6,18-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16,19,22-heptaoxo-5,11,17,23-tetraoxa-2,8,14,20-tetraazapentacosan-25-oico (EMD-18B):** En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución de EMD-20B (313,56 g, 0,26 mol, 1,0 eq) en EtOH (3,2 l, 10,0 V) a 20~25 °C. El reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces y se agregó Pd/C (21,95 g, 7 % p/p). Luego el reactor se evacuó y enjuagó con nitrógeno tres veces nuevamente, y se mantuvo hidrógeno burbujando debajo de la superficie de la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante al menos 4 h a 20~25 °C y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-20B fue menos de o igual a 1,0 %. Luego de completarse la reacción, se detuvo el burbujeo de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celite (2,0 kg) y la torta de filtrado se enjuagó con acetato de etilo (0,64 l x 3), y el filtrado se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado. El residuo se suspendió con acetato de etilo (0,7 l) durante al menos 3 h y se filtró; la torta de filtrado se enjuagó con acetato de etilo (0,32 l x 2). El sólido se secó al vacío a 40~45 °C. Esto resultó en 234,2 g (80,6 %) de ácido (3S,6R,9S,12R,15S,18R,21S,24R)-3,9,15,21-tetraisobutil-8,12,14,20,24-pentametil-6,18-bis(4-morfolinobencil)-4,7,10,13,16,19,22-heptaoxo-5,11,17,23-tetraoxa-2,8,14,20-tetraazapentacosan-25-oico (EMD-18B) como un sólido blancuzco; MS (ES, *m/z*): 1138 (M+H); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) 7,34-7,16 (m, 8H), 5,68-5,28 (m, 3H), 5,11-5,04 (m, 3H), 4,93-4,86 (m, 1H), 4,03-3,99 (m, 1H), 3,85-3,82 (m, 8H), 3,23-3,22 (m, 8H), 3,23-2,76 (m, 13H), 2,49 (s, 2H), 2,07 (s, 2H), 1,66-1,45 (m, 8H), 1,43-1,16 (m, 10H), 0,99-0,64 (m, 24H).



(3S,6R,9S,12R,15S,18R,21S,24R)-3,9,15,21-tetraisobutil-4,6,10,16,18,22-hexametil-12,24-bis(4-morfolinobencil)-1,7,13,19-tetraoxa-4,10,16,22-

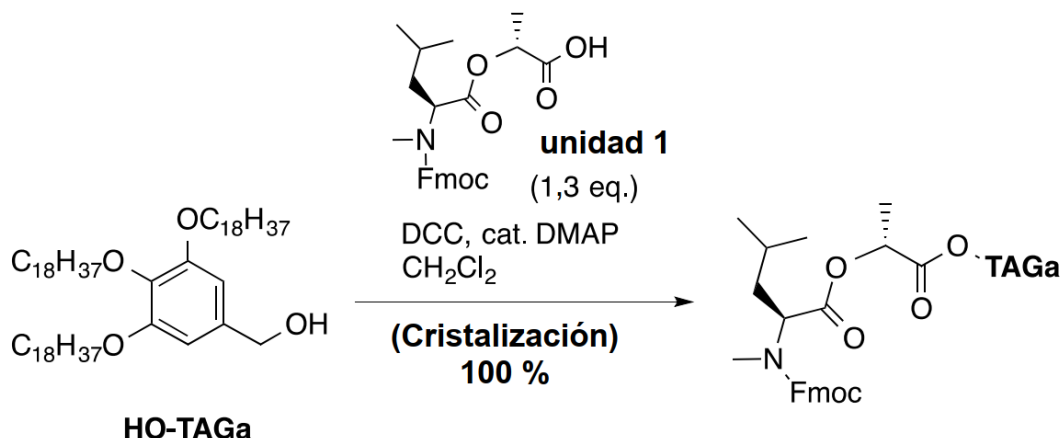
- 5 **tetraazaciclótetracosan-2,5,8,11,14,17,20,23-octaona (Emodepsida):** En un reactor de 10 l purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó en una solución de EMD-18B (234,2 g, 0,21 mol, 1,0 eq) en acetato de etilo (3,8 l, 16,0 V), *N,N*-diisopropiletilamina (131,84 g, 1,02 mol, 5,0 eq) a 20~25 °C. Luego de enfriarse hasta 10 ~20 °C, se agregó anhídrido propilfosfónico (324,5 g, 0,51 mol, 2,5 eq) gota a
- 10 gota con agitación a menos de 25 °C. Luego, la mezcla se agitó a 20~25 °C durante al menos 2,5 h y se monitoreó por HPLC hasta que EMD-18B fue menos de igual a 0,5 %. La mezcla se diluyó con heptano (2,38 l) a 0~10 °C y se inactivó lentamente con HCl (ac, 1,0 N, 2,38 l). La fase orgánica se lavó con HCl (ac, 1,0 N, 2,38 l), NaHCO₃ (sat, 2,38 l x 2), se concentró a menos de 40 °C hasta no haber más destilado, y se
- 15 intercambió con EtOH (0,48 l x 2) a menos de 40 °C. El residuo se disolvió en EtOH (0,72 l) a 45~55 °C y el cristal de siembra (0,1 %, p/p) se agregó a 20~25 °C. La mezcla se agitó durante al menos 16 h a 20~25 °C y se filtró. La torta de filtrado se enjuagó con EtOH (0,24 l). El sólido se secó al vacío a 40±5 °C. El producto bruto se recrystalizó con acetato de etilo. Esto resultó en 118,24 g (51,3 %) de
- 20 (3S,6R,9S,12R,15S,18R,21S,24R)-3,9,15,21-tetraisobutil-4,6,10,16,18,22-hexametil-12,24-bis(4-morfolinobencil)-1,7,13,19-tetraoxa-4,10,16,22-tetraazaciclótetracosan-2,5,8,11,14,17,20,23-octaona (Emodepsida) como un sólido blanco; MS (ES, *m/z*): 1120

(M+H); ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) 7,16 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), 6,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 4H), 5,68 (q, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,51-4,04 (m, 7H), 3,74-3,71 (m, 8H), 3,08-3,04 (m, 8H), 2,99-2,96 (m, 4H), 2,90-2,88 (m, 4H), 2,83-2,82 (m, 4H), 2,78 (s, 2H), 2,70 (s, 2H), 1,78-1,38 (m, 8H), 1,31-1,14 (m, 6H), 0,97-0,69 (m, 28H).

5 3. Preparación de PF1022A (Método 1; ver esquemas de reacción en la FIG. 3 y
espectros NMR en la FIG. 4)

3-1. Procedimiento sintético

***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-D-Lac-O-TAGa**



10

A una solución agitada de **HO-TAGa** (1,69 g, 1,85 mmol) en CH₂Cl₂ (37 ml) se agregó 0,2 M solución de tolueno de **unidad 1** (12,0 ml, 2,40 mmol), 4 dimetilaminopiridina (12 mg, 93,0 μmol), y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,30 g, 2,78 mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de N₂. Luego de agitarse durante 2 h, la mezcla de reacción se enfrió luego hasta -5 °C y se agregó MeOH (185 ml). La solución heterogénea resultante se agitó durante otros 15 min a -5 °C, y el precipitado incoloro se filtró y lavó con más MeOH (500 ml) para proporcionar ***N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa*** (2,46 g, 100 %) como un polvo incoloro.

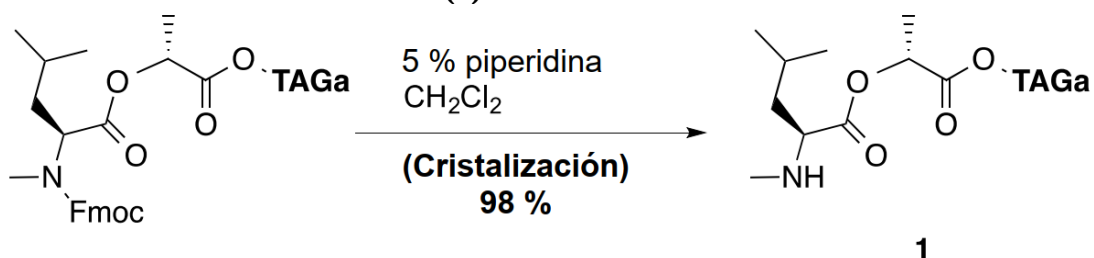
mp: 44 - 45 °C

20 $[\alpha]_D^{24}$: -10,2 (c 1,0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,78-7,74 (complejo m, 2H), 7,60-7,56 (complejo m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 6,50 (s, 4/3H), 6,48 (s, 2/3H), 5,12–5,00 (complejo -m, 4H), 4,67 (dd, *J* = 6,3, 9,7 Hz, 3/10H), 4,58 (dd, *J* = 6,3 Hz, 10,9 Hz, 4/10H), 4,50 (dd, *J* = 6,9 Hz, 10,3 Hz, 6/10H), 4,38–4,34 (complejo m, 9/10H), 4,30 (m, 5/10H), 4,23 (t, *J* = 6,3 Hz, 3/10H), 3,93 (m, 6H), 2,86 (s, 2H), 2,83 (s 1H), 1,76 (m, 6H), 1,64-1,42 (complejo m, 9H), 1,31–1,14 (complejo m, 87H), 0,96–0,87 (complejo m, 14H), 0,78 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1334.0748 (M^+ , calculado para $C_{86}H_{143}NO_9$:

1334.0763)

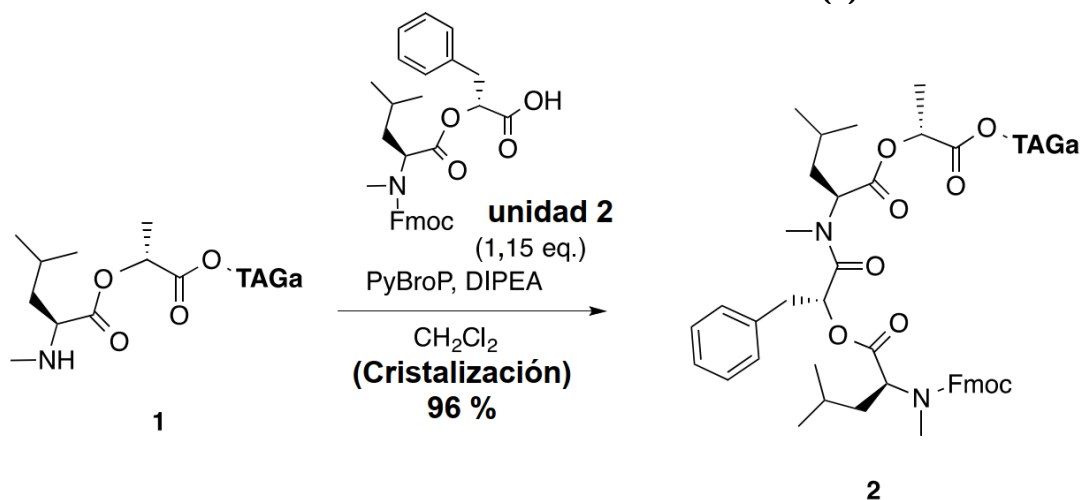
N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa (1)

5 Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** (1,00 g, 0,749 mmol) se convirtió en **1** (816 mg, 98 %) como un polvo incoloro.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6,50 (s, 2H), 5,16 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,08 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,93 (m, 6H), 3,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 2,37 (s, 3H), 1,75 (m, 6H), 1,53-1,42 (complejo m, 10H), 1,32-1,25 (complejo m, 86H), 0,93-0,86 (complejo m, 15H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170,6, 153,3, 138,4, 130,2, 106,4, 73,5, 69,2, 68,9, 67,6, 61,4, 42,2, 34,5, 32,0, 30,4, 29,8 (x2), 29,5 (x2), 26,2, 25,0, 22,8, 22,6, 22,5, 17,1, 14,2.

15 HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 1113.0151 [(M+H)⁺, calculado para C₇₁H₁₃₄NO₇ : 1113.0160]

N-Fmoc-N-MeLeu-D-PhLac-N-MeLeu-D-LacO-TAGa (2)

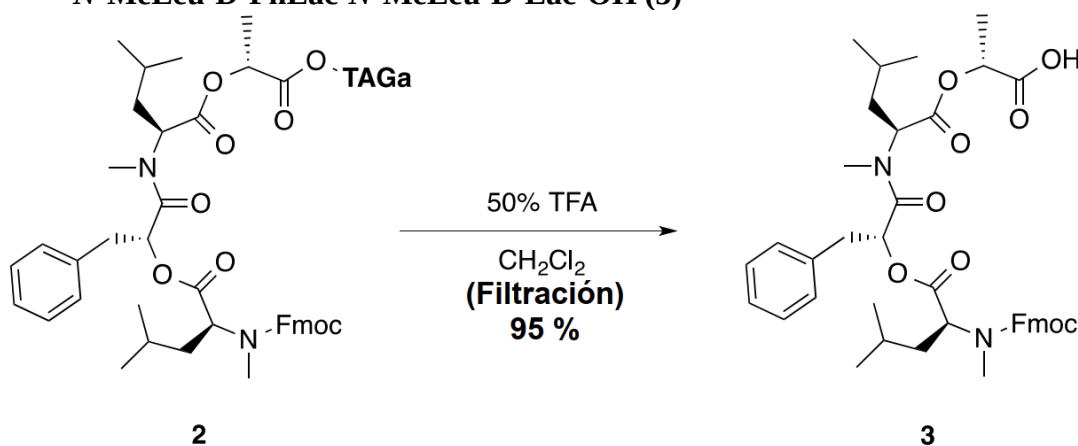
20 A una solución agitada de **1** (800 mg, 0,719 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) se agregó la **unidad 2** (426 mg, 0,827 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,429 ml, 2,52 mmol), y PyBroP (496 mg, 1,222 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 88 h,

la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de **N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar **2** (1,11 g, 96 %) como un polvo incoloro.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,76-7,72 (complejo m, 2H), 7,62-7,40 (complejo m, 2H), 7,39-7,17 (complejo m, 9H), 6,47 (m, 2H), 5,47-5,27 (complejo m, 2H), 5,15-4,97 (complejo m, 4H), 4,69-4,13 (complejo m, 3H), 3,92 (complejo m, 6H), 3,07 (m, 2H), 2,85 (complejo, 6H), 1,80-1,25 (complejo m, 105H), 1,02-0,72 (complejo m, 21H).

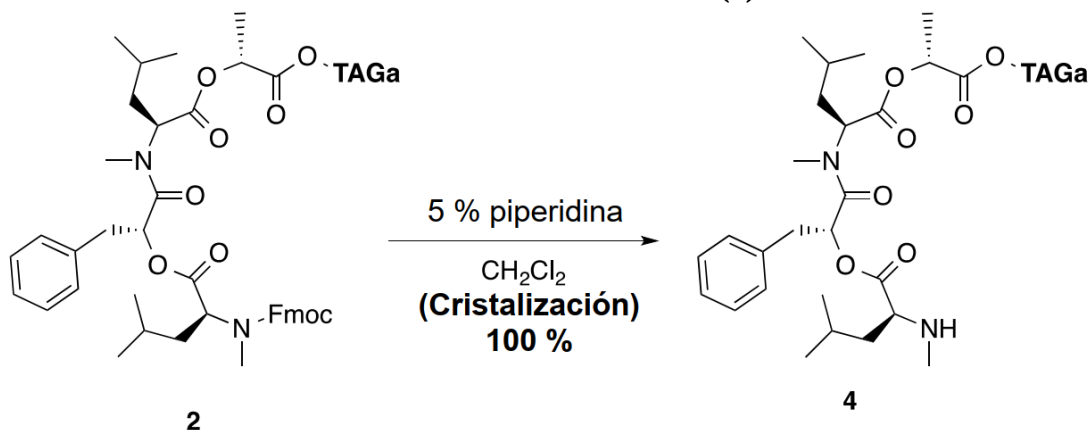
HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 1632.2163 [(M+Na)⁺, calculado para C₁₀₂H₁₆₄N₂O₁₂Na: 1632.2182]

N-MeLeu-D-PhLac-N-MeLeu-D-Lac-OH (3)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, **2** (614 mg, 0,381 mmol) se convirtió en **3** (261 mg, 95 %) como un aceite amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

N-MeLeu-D-PhLac-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa (4)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de

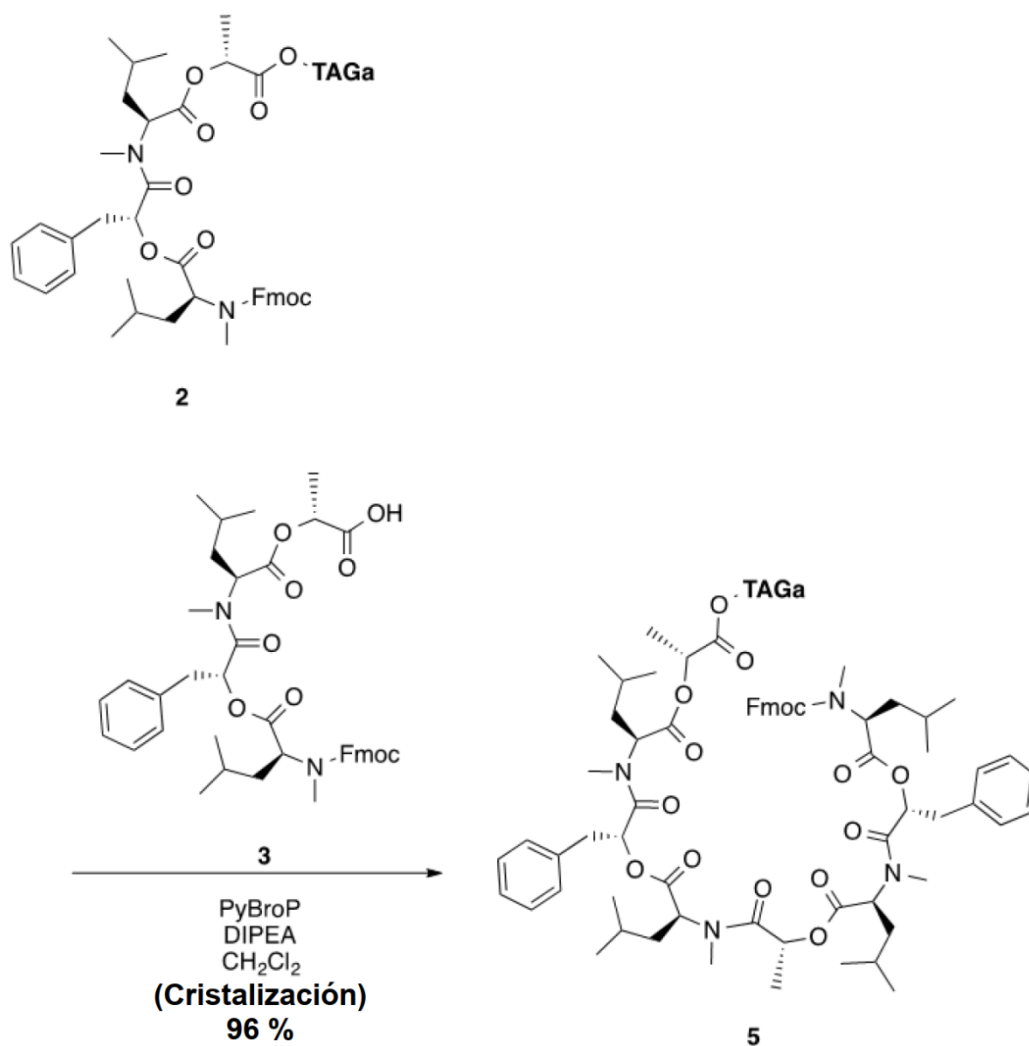
desprotección de Fmoc, **2** (472 mg, 0,293 mmol) se convirtió en **4** (404 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,27 (m, 5H), 6,49 (s, 2H), 5,50 (dd, *J* = 5,7, 8,6 Hz, 1H), 5,32 (dd, *J* = 4,6, 10,9 Hz, 1H), 5,09–5,00 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H),
 5 3,28 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,09 (m, 2H), 2,92 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 1,82–1,25 (complejo m, 105H), 0,89–0,77 (complejo m, 21H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175,6, 175,1, 175,0, 174,8, 170,9, 170,5 (x2),
 170,4, 169,8, 169,7, 166,7, 165,1, 153,3, 138,5, 138,3, 135,8 (x2), 130,2, 129,5, 129,3,
 128,7, 128,6, 128,5 (x2), 127,2, 107,0, 106,9, 105,4, 78,1, 73,5, 71,9, 71,6, 69,4, 69,2,
 10 68,9, 67,7, 67,5, 66,9, 65,6, 61,3, 61,2, 59,7, 57,7, 54,7, 42,3, 42,2, 42,1, 40,0, 38,8,
 37,5, 36,9, 34,4, 34,3, 32,8, 32,0, 31,3, 30,4, 29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 26,2, 25,0, 24,8,
 24,7, 24,6, 23,4, 22,9, 22,8, 22,5 (x2), 22,4 (x2), 21,9, 21,4, 20,5, 17,0, 16,9, 16,8, 14,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 1388.1664 [(M+H)⁺, calculado para C₈₇H₁₅₅N₂O₁₀ : 1388.1682]

15 ***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-O-TAGa (5)**

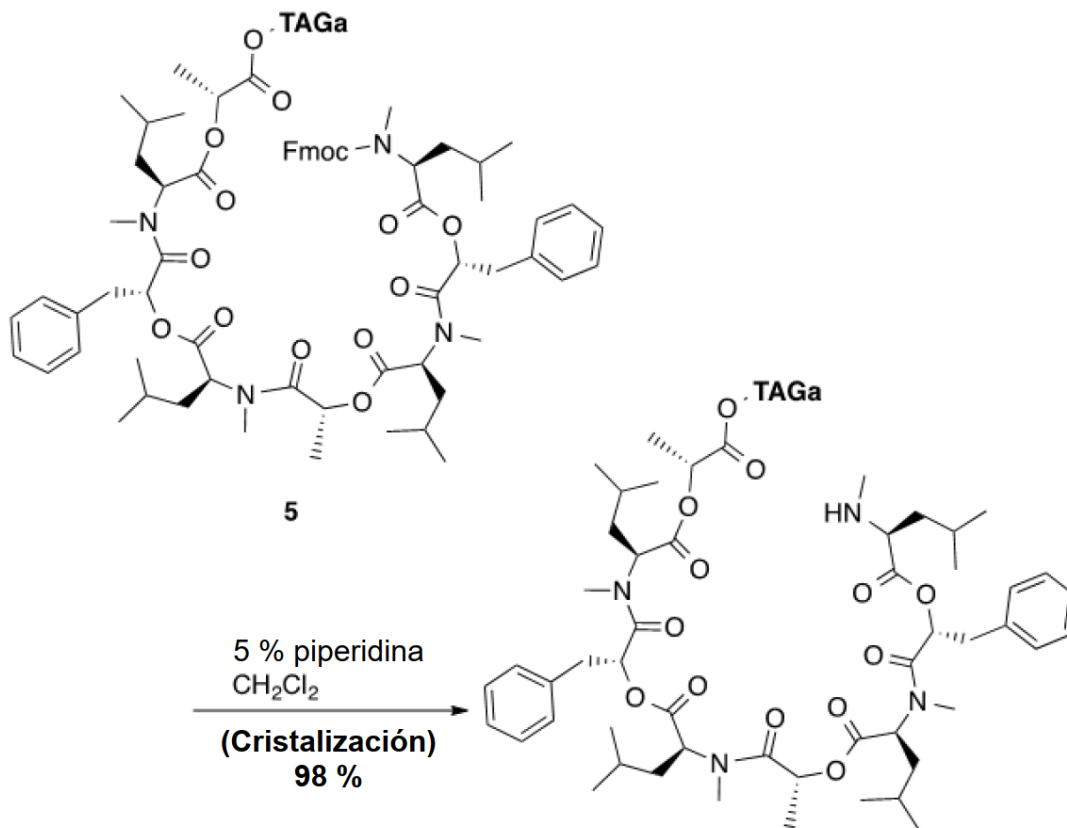


A una solución agitada de **2** (330 mg, 0,238 mmol) en CH₂Cl₂ (4,8 ml) se agregó **3** (221 mg, 0,309 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,150 ml, 0,881 mmol), y PyBroP (197 mg, 0,428 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 42 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-Fmoc-*N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-O-TAGa para proporcionar **5** (477 mg, 96 %) como un polvo incoloro.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,74 (m, 2H), 7,53 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,32–7,15 (complejo m, 12H), 6,48 (m, 2H), 5,51–4,96 (complejo m, 10H), 4,70–4,12 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H), 3,23 (dd, *J* = 6,9, 13,7 Hz, 1H), 3,08–2,70 (complejo m, 15H), 1,80–1,25 (complejo m, 114H), 0,95–0,78 (complejo m, 33H).

HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 2106.4949 [(M+Na)⁺, calculado para C₁₂₈H₂₀₂N₄O₁₈ Na₁: 2106.4912]

***N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-**

O-TAGa

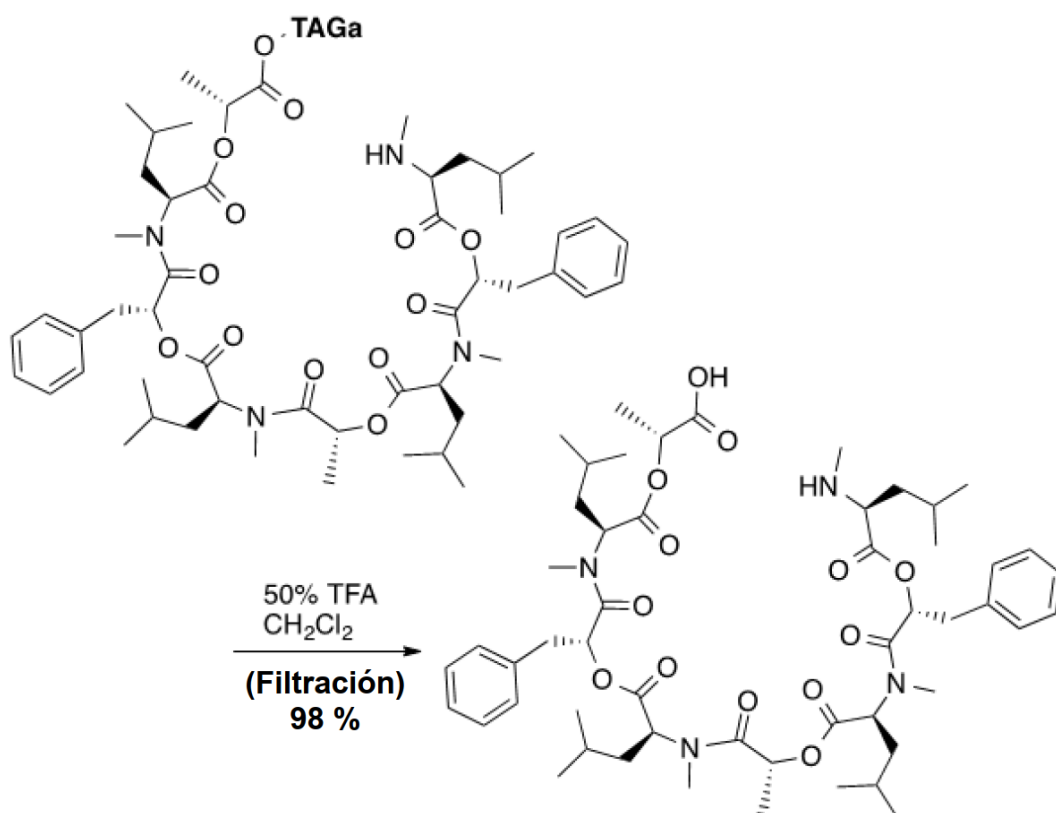
Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de
desprotección de Fmoc, **5** (450 mg, 0,206 mmol) se convirtió en la correspondiente
amina (398 mg, 98 %) como un polvo incoloro.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,25 (m, 10H), 6,48 (s, 2H), 5,57–4,99
(complejo m, 9H), 3,93 (m, 6H), 3,26–2,78 (complejo m, 14H), 2,24 (s, 3H), 1,80–1,25
(complejo m, 114H), 0,90–0,78 (complejo m, 33H),

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175,6, 175,2 (x2), 171,5, 171,1, 170,8 (x2),
170,6, 170,5 (x2), 170,3, 153,3, 138,5 (x2), 138,3, 136,1, 135,9, 135,5, 130,2, 130,1,
130,0, 129,8, 129,7, 129,6, 129,4 (x2), 128,8, 128,7, 128,6, 128,5, 127,4 (x2), 127,2,
127,1, 126,9, 126,8, 107,0 (x2), 106,9, 73,5, 72,5, 72,2, 71,7, 71,6, 69,8, 69,4, 69,2,
68,1, 68,0, 67,8, 67,5 (x2), 66,9, 61,4, 57,4, 55,2, 54,8, 54,6 (x2), 38,8, 37,7, 37,6, 37,4
(x2), 37,1 (x2), 37,0, 36,9, 34,7, 34,6, 32,2, 32,0, 31,9, 31,7, 31,6, 31,4, 31,3, 31,2, 30,4,
29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 26,2, 24,9, 24,8 (x2), 24,7, 24,6, 24,5, 23,5, 23,4, 23,3, 23,1
(x2), 23,0, 22,8, 22,7, 22,5, 22,4, 22,3, 22,0, 21,5, 21,4, 21,3 (x2), 20,5, 16,9, 16,8, 16,6,
14,2.

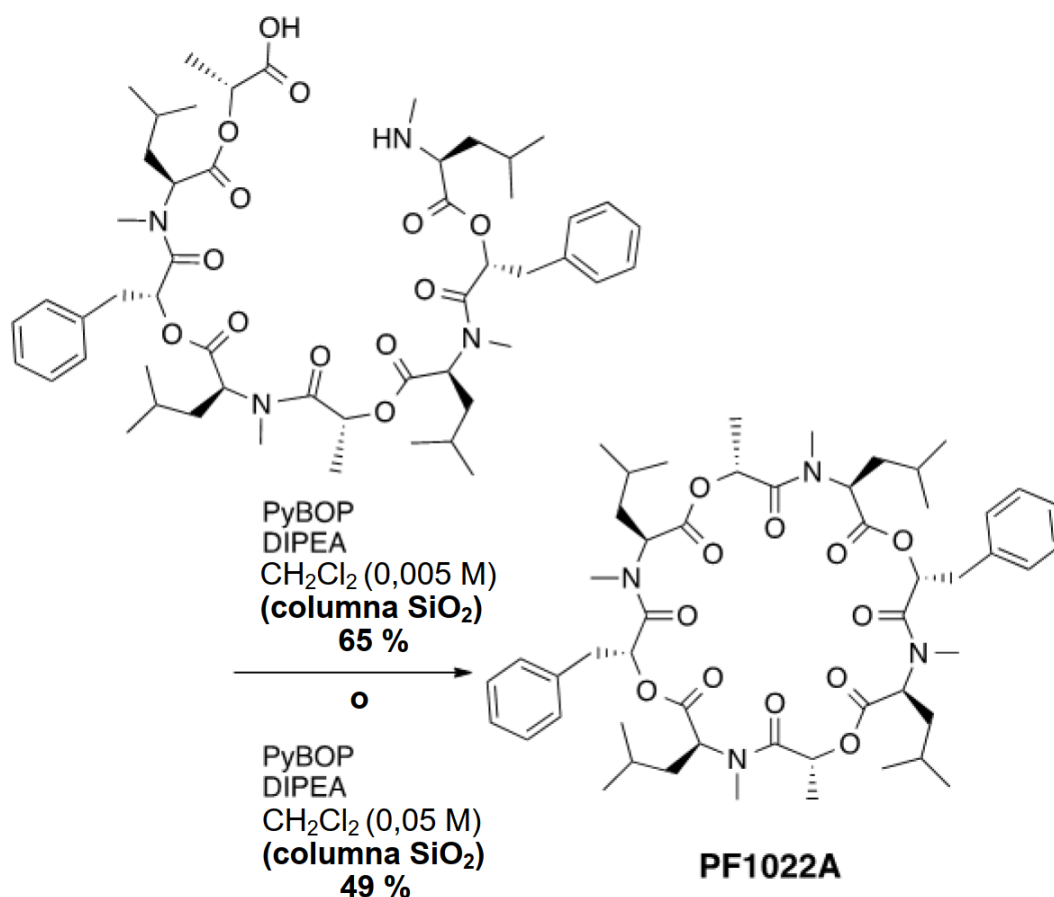
HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 1862.4425 [(M+H)⁺, calculado para
C₁₁₃H₁₉₃N₄O₁₆: 1862.4412]

***N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-OH**



5 Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, ***N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-PhLac-*N*-MeLeu-D-LacO-TAGa** (380 mg, 0,204 mmol) se convirtió en el correspondiente ácido carboxílico (198 mg, 98 %) como un aceite amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

10 **PF1022A**



Reacción para concentración 0,005 M de sustrato

Un producto bruto de reacción previa (90 mg, 0,0895 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (18 ml, 0,005 M). A la mezcla de reacción se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (76 μ l, 4,48 mmol) y PyBOP (93 mg, 0,179 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 48 h, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado (18 ml) a 0 °C y esta mezcla se extrajo con CHCl₃ (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 % NaHSO₄ acuoso (60 ml), y salmuera (60 ml), se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (CHCl₃: MeOH = 400 : 1 a 40: 1) para proveer **PF1022A** (55 mg, 65 %) como un sólido incoloro.

Reacción para concentración 0,05 M de sustrato

De acuerdo con el procedimiento de ciclación mencionado anteriormente, un producto bruto de reacción previa (90 mg, 0,0895 mmol) se cicló en CH₂Cl₂ (1,8 ml, 0,05 M) con *N,N*-diisopropiletilamina (76 μ l, 4,48 mmol) y PyBOP (93 mg, 0,179 mmol) a temperatura ambiente durante 48 h para proveer **PF1022A** (40 mg, 49 %) como un sólido incoloro.

mp: 100-103 °C

$[\alpha]^{22}_D$: -99,4 °C (c 0,06, MeOH)

IR (KBr) $\tilde{\nu}$: 1743, 1666, 1466, 1412, 1265, 1188, 1126, 1080, 1026, 748, 701

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7,29 (m, 10H), 5,82 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,72 (m, 2H, rotámero), 5,54 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H), 5,44 (dd, $J = 4,6, 11,7$ Hz, 1H), 5,40 (dd, $J = 4,6, 11,7$ Hz, 1H, rotámero), 5,23 (dd, $J = 4,6, 11,7$ Hz, 1H), 5,18 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, rotámero), 4,77 (dd, $J = 3,4, 11,2$ Hz, 1H), 3,14 (m, 4H), 3,00 (s, 5/2H, rotámero), 2,91 (m, 7H, rotámero), 2,82 (s, 5/2H, rotámero), 1,84 (m, 1H), 1,77–1,47 (complejo m, 11H), 1,39 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,05 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 0,98 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 0,80 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 0,95–0,82 (complejo m, 18H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 174,4, 173,5, 173,1, 173,1, 172,3, 172,0, 171,0, 170,7, 136,4, 136,2, 130,8, 130,7, 130,7, 129,8, 129,7, 129,7, 128,4, 128,3, 72,5, 72,3, 69,9, 68,5, 58,6, 55,7, 55,5, 55,4, 39,0, 38,9, 38,6, 38,6, 37,8, 37,3, 32,0, 31,3, 31,1, 30,0, 26,2, 26,1, 25,5, 25,2, 23,9, 23,7, 23,7, 23,6, 21,7, 21,6, 21,4, 21,1, 17,5, 17,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 971.5353 $[(M+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{52}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Na}_1$: 971.5357]

*Literatura (*J. Antibiot.*, **1992**, 45, 692-697)

mp: 104-106 °C

$[\alpha]^{22}_D$: -102 °C (c 0,1, MeOH)

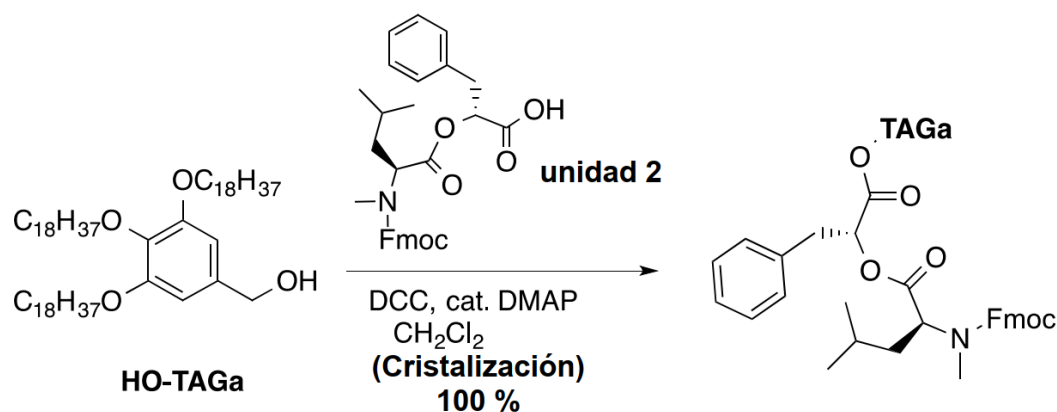
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,30 - 7,20 (PhH, 10H), 5,80 y 5,75 ($\text{C}_\alpha\text{H-PhLac}$, 1Hx2), 5,54 y 5,16 ($\text{C}_\alpha\text{H-Lac}$, 1Hx2), 5,43, 5,42, 5,22 y 4,78 ($\text{C}_\alpha\text{H-Leu}$, 1Hx4), 3,22-3,15 ($\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-PhLac}$, 2Hx2), 3,00, 2,90, 2,88 y 2,80 (N-Me-Leu, 3Hx4), 1,87-1,50 ($\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Leu}$, 2Hx4), 1,40 ($\text{C}_\gamma\text{H-Leu}$, 1Hx4), 1,38 ($\text{C}_\beta\text{H}_3\text{-Lac}$, 3H), 1,02-0,75 ($\text{C}_\delta\text{H}_3\text{-Leu}$, 6Hx4), 0,88 ($\text{C}_\beta\text{H}_3\text{-Lac}$, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 174,4, 173,4, 172,4, 172,4, 172,1, 172,1, 171,0, 170,8, 136,5, 136,2, 130,7, 130,7, 130,7, 130,7, 129,7, 129,7, 129,7, 129,7, 128,3, 128,2, 72,5, 72,3, 69,9, 68,4, 58,6, 55,7, 55,5, 55,4, 39,0, 38,9, 38,6, 38,6, 37,9, 37,4, 32,0, 31,3, 31,1, 29,9, 26,2, 26,1, 25,6, 25,2, 23,6, 23,6, 23,5, 23,5, 21,7, 21,6, 21,4, 21,0, 17,5, 17,2.

4. Preparación de PF1022A (Método 2; ver esquemas de reacción en la FIG. 5)

4-1. Procedimiento sintético

N-Fmoc-N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa



A una solución agitada de **HO-TAGa** (170 mg, 0,186 mmol) en CH_2Cl_2 (3,7 ml) se agregó 0,1 M solución de tolueno de **unidad 2** (2,42 ml, 0,242 mmol), 4-dimetilaminopiridina (1,1 mg, 9,30 μmol), y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (58 mg, 0,279 mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de N_2 . Luego de agitarse durante 1 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de **N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar **N-Fmoc-N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa** (266 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

mp: 44 – 45 °C

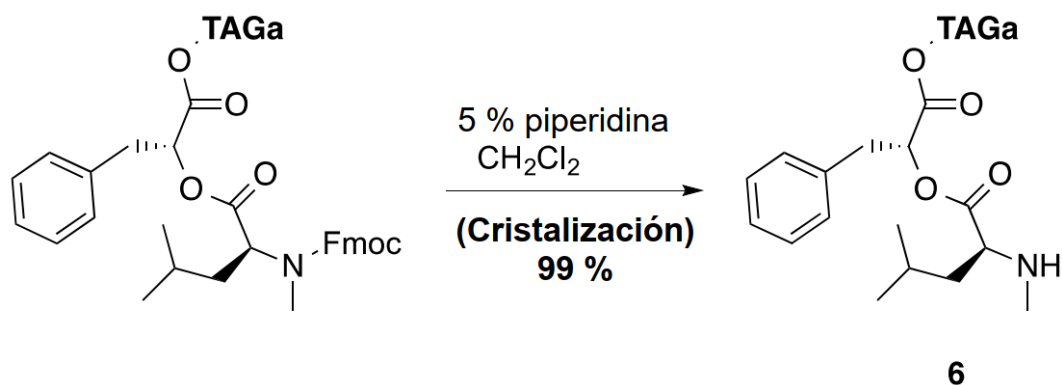
$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$: -6,1 (*c* 1,74, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,76 (complejo m, 2H), 7,54 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,30 (m, 1H), 7,26–7,14 (complejo m, 4H), 7,08 (m, 2H) 6,44 (m, 2H), 5,20 (m, 1H), 5,04–4,94 (complejo m, 3H), 4,61–4,15 (complejo m, 3H), 3,92 (m, 6H), 3,10 (m, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,76 (m, 6H), 1,60–1,25 (complejo m, 93H), 0,90–0,71 (complejo m, 15H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 177,2, 175,2, 169,5, 153,3, 138,4, 135,9, 130,0, 129,6, 129,3, 128,6, 128,4, 127,1, 107,5, 107,2, 73,5, 73,1, 69,2, 67,8, 61,6, 42,5, 37,4, 34,5, 32,0, 30,4, 29,8 (x2), 29,6, 29,5, 26,2, 24,8, 22,8, 22,6, 22,5, 14,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1410.1063 $[(\text{M}+\text{H})^+]$, calculado para $\text{C}_{92}\text{H}_{147}\text{NO}_9$: 1410.1076]

N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa (6)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, *N-Fmoc-N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa* (457 mg, 0,324 mmol) se convirtió en **6** (378 mg, 99 %) como un polvo incoloro.

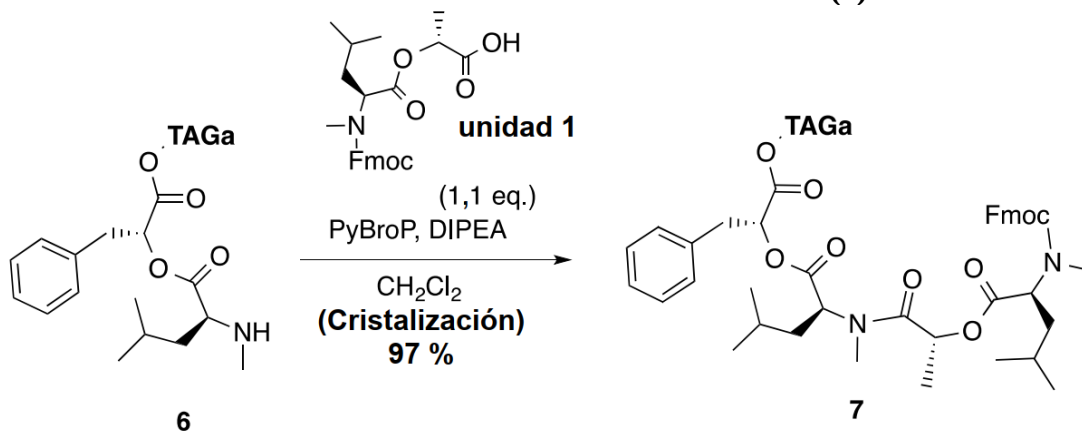
mp: 48 – 49 °C

$[\alpha]_D^{26}$: +4,2 (*c*1,10, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,22 (m, 5H), 6,48 (s, 2H), 5,28 (dd, *J* = 4,0, 10,3 Hz, 1H), 5,08 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,93 (m, 6H), 3,24 (dd, *J* = 4,0 Hz, 14,3 Hz, 1H), 3,17 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,07 (dd, *J* = 9,7, 14,3 Hz, 1H), 2,18 (s, 3H), 1,76 (m, 6H), 1,48–1,25 (complejo m, 93H), 0,90-0,76 (complejo m, 15H).

HRMS (FAB, matriz NBA) *m/z* : 1189.0458 [(*M*+*H*)⁺, calculado para C₇₇H₁₃₈NO₇: 1189.0473]

***N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLacO-TAGa* (7)**



15

A una solución agitada de **6** (358 mg, 0,301 mmol) en CH₂Cl₂ (0,6 ml) se agregó 0,1 M de solución de tolueno de la **unidad 1** (3,31 ml, 0,331 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,15 ml, 0,903 mmol), y PyBroP (211 mg, 0,452 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 13 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-*

20

TAGa para proporcionar **7** (468 mg, 97 %) como un polvo incoloro.

mp: 47 – 48 °C

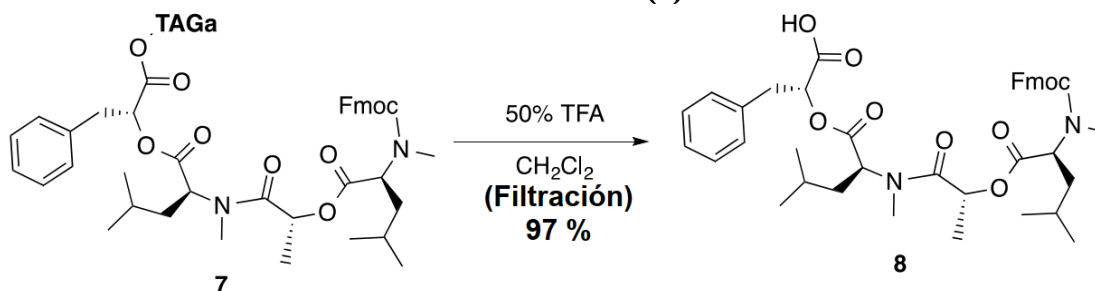
$[\alpha]_D^{26}$: -13,9 (c 1,10, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,75 (m, 2H), 7,59 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,30–7,09 (complejo m, 7H), 6,44 (m, 2H), 5,36–4,96 (complejo m, 6H), 4,71–4,24 (complejo m, 3H), 3,93 (t, J = 6,5 Hz, 6H), 3,14 (m, 2H), 2,90–2,81 (complejo s, 6H), 1,80–1,25 (complejo m, 105H), 0,96–0,76 (complejo m, 21H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 171,6, 171,2, 171,1, 170,9, 169,3, 157,0, 153,3, 144,3, 143,9, 141,4 (x2), 138,4, 135,9, 130,0, 129,9, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 129,3, 128,7, 128,5, 128,4, 127,7, 127,6, 127,0, 125,3, 125,1, 125,0, 124,9, 120,0, 107,5, 107,2, 74,1, 74,0, 73,9, 73,8, 73,5, 71,3, 69,2, 67,9, 67,7, 57,4, 57,2, 56,7, 56,6 (x2), 54,5 (x2), 47,4 (x2), 47,3, 37,6, 37,3, 37,2, 37,1, 37,0, 32,0, 31,1, 30,7, 30,6 (x2), 30,5, 30,4, 30,3, 30,2, 29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 26,2, 24,9, 24,8, 24,7, 24,6, 24,4, 23,4, 23,2, 22,9, 22,8, 22,1, 21,4, 21,2, 16,8, 14,2.

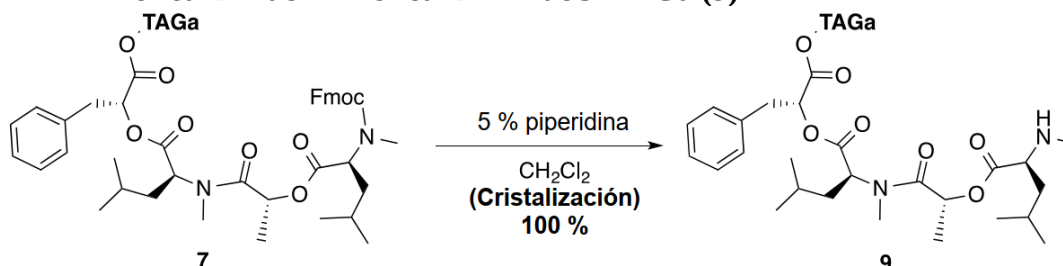
HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1609.2274 (M^+ , calculado para C₁₀₂H₁₆₈N₂O₁₂: 1609.2284)

N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLacOH (8)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, **7** (244 mg, 0,152 mmol) se convirtió en **8** (106 mg, 97 %) como un aceite amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLacO-TAGa (9)



25

Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de

desprotección de Fmoc, **7** (204 mg, 0,127 mmol) se convirtió en **9** (176 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

mp: 47 – 48 °C

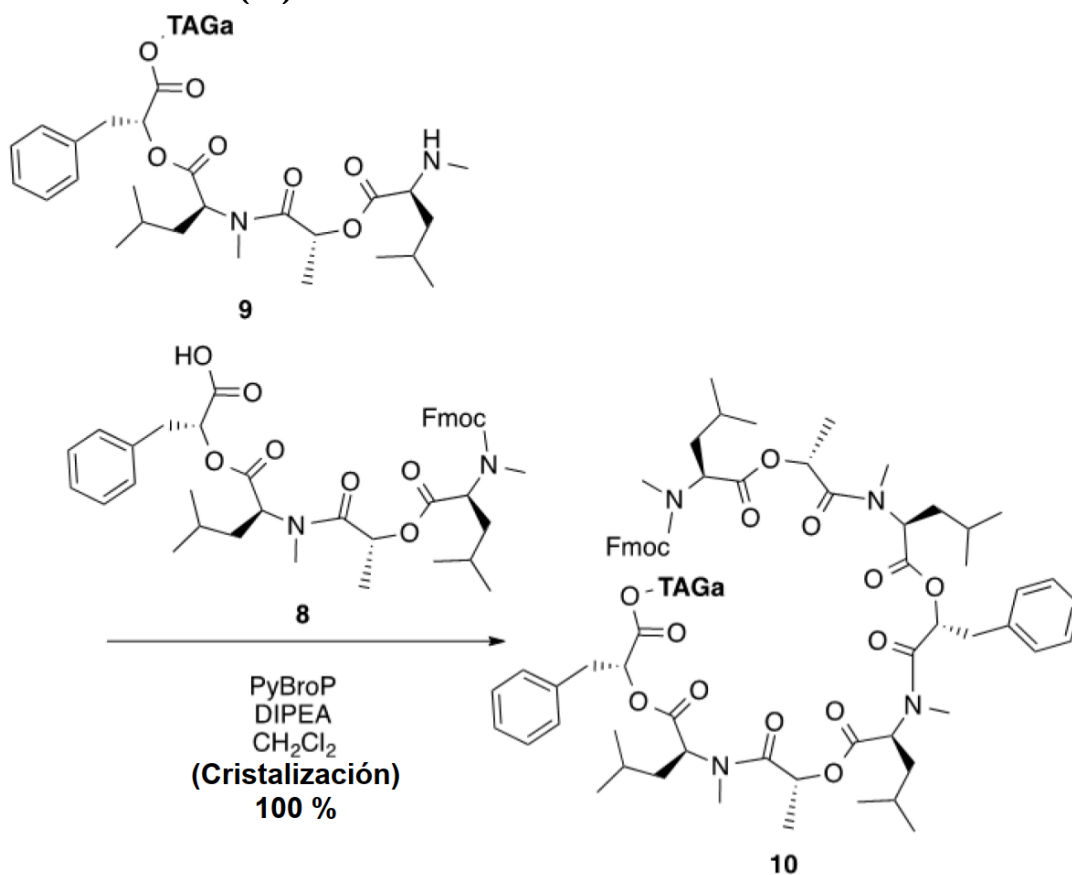
$[\alpha]_D^{26}$: -2,1 (c 11, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,19 (m, 5H), 6,45 (s, 2H), 5,45 (q, J = 6,9 Hz, 1H), 5,31 (ddd, J = 4,6, 11,2, 19,6 Hz, 1H), 5,22 (dd, J = 5,2, 6,9 Hz, 1H), 5,03 (m, 2H), 3,94 (m, 6H), 3,33–2,95 (complejo m, 3H), 2,80 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,82–1,25 (complejo m, 105H), 0,96–0,75 (complejo m, 21H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175,0, 171,1, 171,0, 169,2, 153,3, 130,0, 129,8, 129,7, 129,3, 128,7, 128,6, 128,5, 127,4, 127,1, 126,9, 107,5, 107,2, 73,8, 73,5, 71,3, 69,2, 67,9, 67,7, 67,4, 67,3, 61,2, 57,5, 54,6, 42,3, 42,2, 37,3, 37,2, 37,0, 34,6, 32,0, 31,1, 30,4, 29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 26,2, 25,0, 24,8, 23,4, 23,0, 22,8, 22,7, 22,4, 22,1, 21,3, 16,9, 16,8, 14,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1388.1676 [(M+H)⁺, calculado para C₈₇H₁₅₅N₂O₁₀: 1388.1682]

N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLac-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa (10)



A una solución agitada de **9** (155 mg, 96,2 μmol) en CH_2Cl_2 (1,9 ml) se agregó **8** (103 mg, 0,144 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (73 μl , 0,434 mmol), y PyBroP (112 mg, 0,241 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 66 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-Fmoc-**5 N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar **10** (201 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

mp: 47 – 48 °C

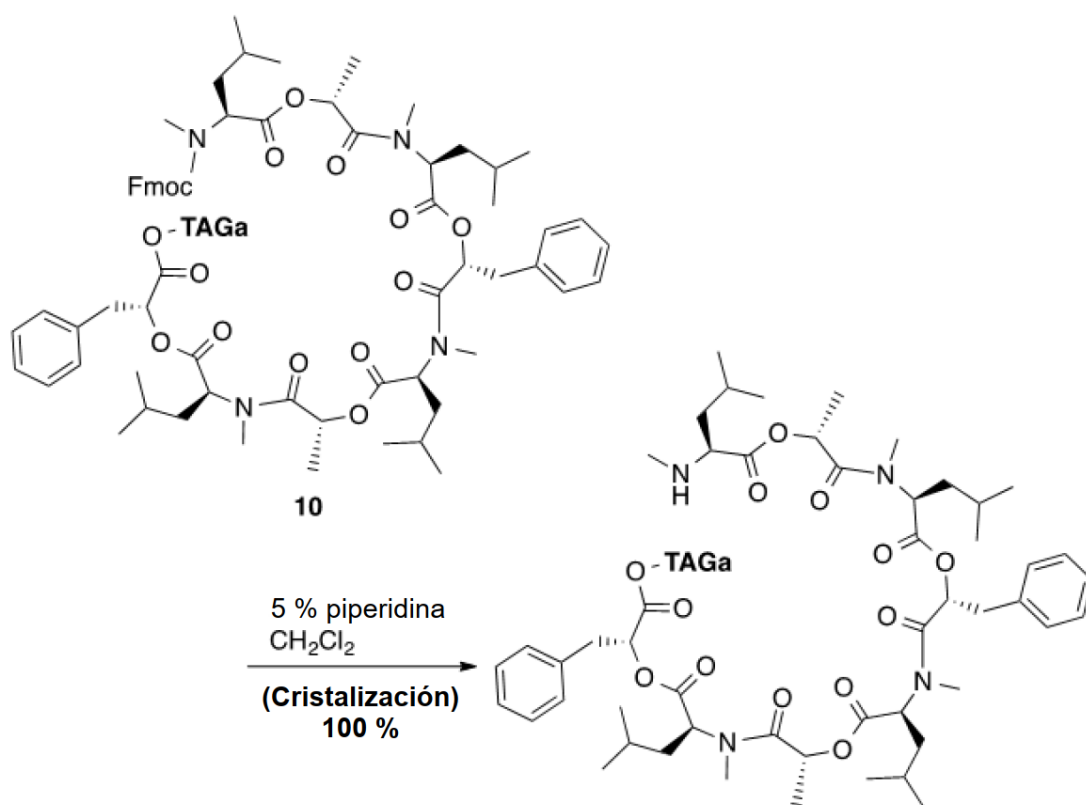
$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$: -27,2 (c 1,1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,75 (m, 2H), 7,59 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,30–7,12 (complejo m, 12H), 6,44 (m, 2H), 5,43–4,96 (complejo m, 10H), 4,69–4,22 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H), 3,24–2,69 (complejo m, 16H), 1,80–1,25 (complejo m, 114H), 0,95–0,75 (complejo m, 33H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 174,1, 171,5, 171,4, 171,3, 171,2, 171,1 (x2), 170,9, 170,8, 170,7, 170,6, 170,5, 170,4, 170,0, 169,2, 157,0, 156,5, 153,3, 144,3, 144,2, 144,0 (x2), 141,4 (x2), 138,6, 138,4, 136,1, 136,0, 135,9 (x2), 135,7, 135,6, 135,3, 130,0, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 129,3, 128,8, 128,7, 128,6, 128,4, 127,7, 127,4, 127,1 (x2), 127,0, 125,3, 125,2, 125,1, 125,0, 120,0, 107,5, 107,2, 107,1, 73,9, 73,5, 72,5, 71,3, 69,2, 68,0, 67,7, 57,5, 56,6 (x2), 55,1, 55,0, 54,9, 54,7, 54,4, 47,4, 47,3, 40,9, 40,6, 38,7, 37,6, 37,3, 37,2, 37,1, 32,0, 31,9, 31,7, 31,5, 31,3, 31,2, 31,0, 30,7, 30,6, 30,4, 30,3, 29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 25,0, 24,9, 24,8, 24,7, 24,5, 24,4 (x2), 23,4, 23,3, 23,1, 23,0, 22,9, 22,8, 22,3, 22,1, 22,0, 21,3, 21,2, 16,8, 16,6, 16,5, 14,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 2106.4910 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{128}\text{H}_{202}\text{N}_4\text{O}_{18}\text{Na}$: 2106.4912]

25 N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLac-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-PhLac-O-TAGa



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **10** (181 mg, 86,8 μmol) se convirtió en la correspondiente amina (163 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

mp: 47 – 48 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$: -18,7 (*c* 1,3, CHCl_3)

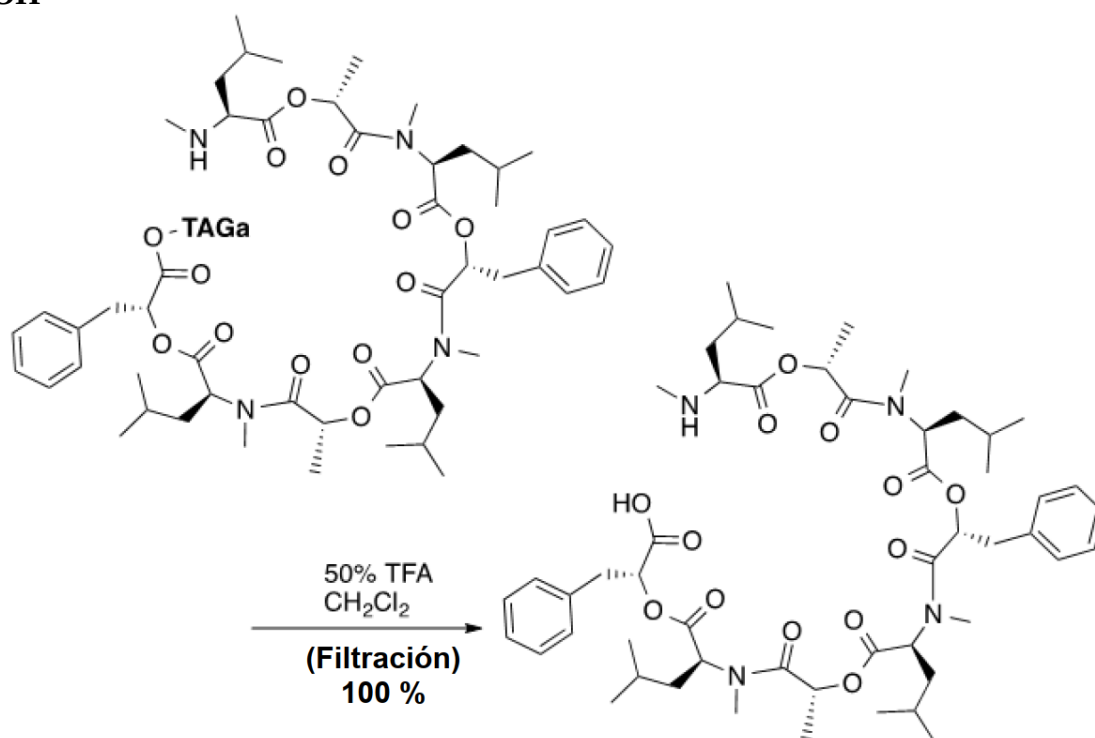
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,20 (m, 10H), 6,44 (s, 2H), 5,50–4,95 (complejo m, 9H), 3,93 (m, 6H), 3,31–2,72 (complejo m, 14H), 2,36 (m, 3H), 1,80–1,25 (complejo m, 114H), 0,99–0,81 (complejo m, 33H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 171,4, 171,2, 171,0, 170,9, 170,6, 170,4, 153,3, 138,3, 136,1, 136,0, 135,9, 135,8, 130,0, 129,8 (x2), 129,7, 129,6 (x3), 129,5, 129,4, 129,2, 129,2 (x2), 128,8, 128,7, 128,6, 128,4, 127,4, 127,3, 127,2 (x2), 127,1, 127,0, 107,5, 107,2, 107,1, 73,9, 73,5, 72,3, 72,2, 71,3, 69,2, 68,0 (x2), 67,7, 67,4, 61,3, 55,2, 55,0, 54,8, 54,5, 54,4, 42,4, 40,6, 38,7, 37,7, 37,2, 37,1, 34,7 (x2), 32,0, 31,7, 31,5, 31,0, 30,4, 29,8 (x2), 29,6, 29,5 (x2), 26,2, 25,0, 24,9 (x2), 24,7, 23,5, 23,4 (x2), 23,3, 23,2, 23,0, 22,8, 22,4, 22,1, 21,9, 21,3 (x2), 16,9, 16,8 (x3), 16,7, 16,6, 16,5, 14,2.

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1862.4462 $[(\text{M}+\text{H})^+]$, calculado para $\text{C}_{113}\text{H}_{193}\text{N}_4\text{O}_{16}$: 1862.4412]

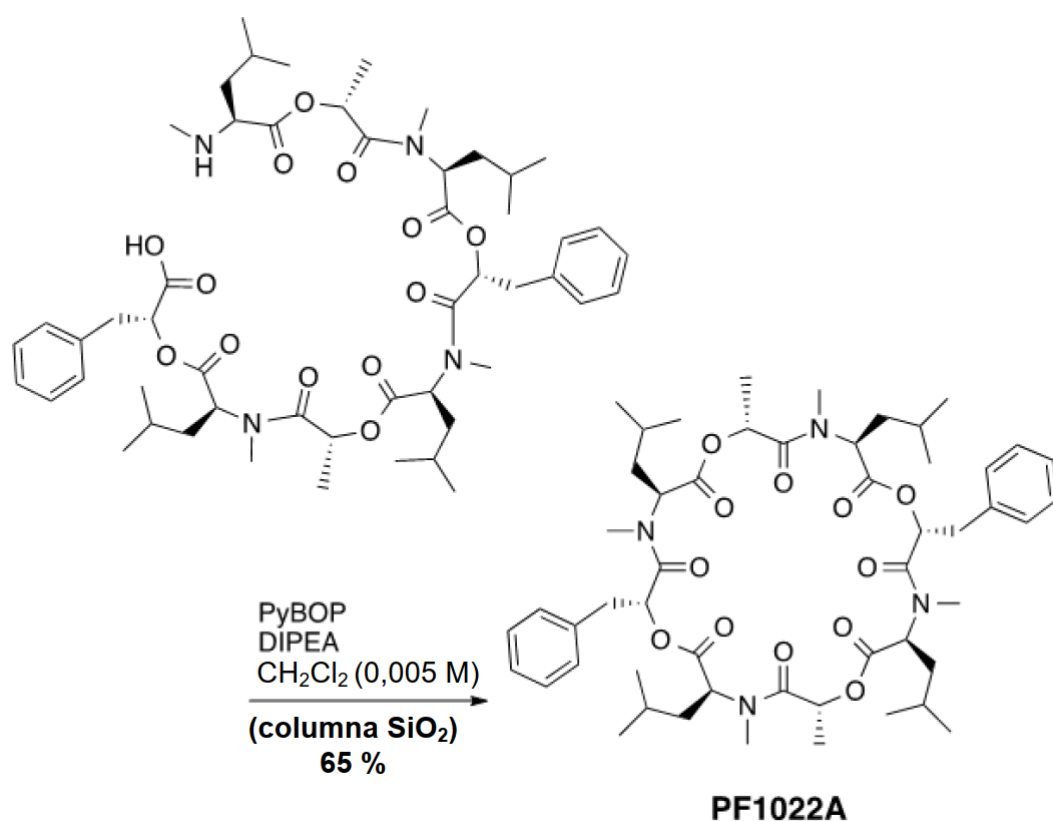
***N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-**

OH



5 Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, *N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-PhLac-**O-TAGa** (143 mg, 0,768 mmol) se convirtió en el correspondiente ácido carboxílico (78 mg, 100 %) como un aceite amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

PF1022A



Un producto bruto de reacción previa (78 mg, 0,0777 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (16 ml, 0,005 M). A la mezcla de reacción se agregó *N,N*-diisopropiletilamina

5 (66 μ l, 0,389 mmol) y PyBOP (81 mg, 0,155 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 48 h, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado (16 ml) a 0 °C y esta mezcla se extrajo con CHCl₃ (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 % NaHSO₄ acuoso (60 ml), y salmuera (60 ml), se

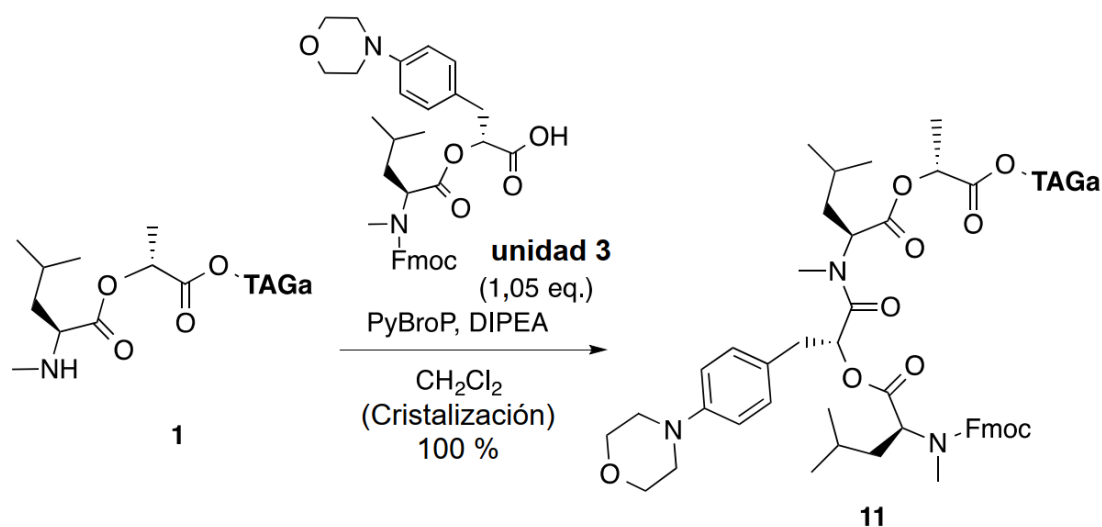
10 se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (CHCl₃: MeOH = 400 : 1 a 40: 1) para proveer PF1022A (48 mg, 65 %) como un sólido incoloro.

Todos los datos físicos para PF1022A sintético coincidieron con los datos de PF1022A auténtico.

5. Preparación de Emodepsida (Método 1; ver esquemas de reacción en la FIG. 6, espectros NMR en la FIG. 7 y espectros LC-UV en la FIG. 8)

5-1. Procedimiento sintético

***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-O-TAGa (11)**

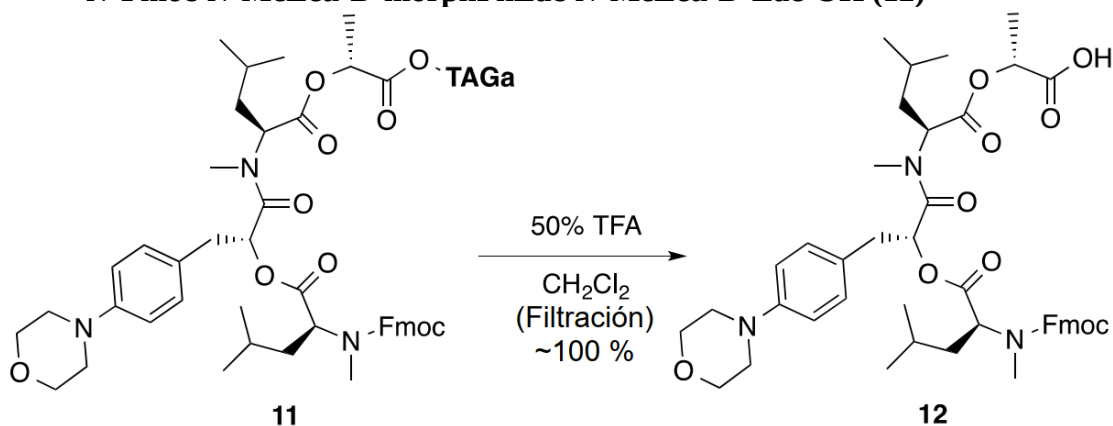


A una solución agitada de **1** (259 mg, 0,233 mmol) en CH_2Cl_2 (4,7 ml) se agregó 0,2 M de solución de tolueno de la **unidad 3** (0,122 ml, 0,244 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,12 ml, 0,698 mmol), y PyBroP (163 mg, 0,349 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse a 40 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-Lac-O-TAGa para proporcionar **11** (395 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

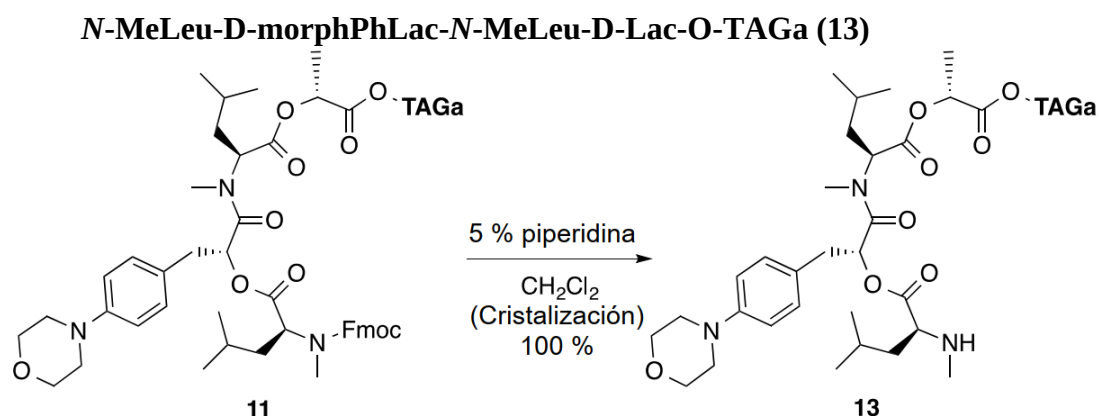
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,74 (m, 2H), 7,57 (m, 2H), 7,42–7,27 (complejo m, 4H), 7,05 (m, 2H), 6,70 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,48 (s, 2H), 5,40 (dd, $J = 6,9, 8,4$ Hz, 3/10H, rotámero), 5,35–5,27 (complejo m, 17/10H), 5,10–4,97 (complejo m, 4H), 4,72–4,12 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H), 3,75 (m, 4H), 3,00–2,79 (complejo m, 12H), 1,80–1,60 (complejo m, 9H), 1,49–1,42 (complejo m, 9H), 1,27 (complejo m, 87H), 0,93–0,80 (complejo m, 21H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1717.2701 $[(M+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{106}\text{H}_{171}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{Na}$: 1717.2710]

N-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-OH (**12**)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, **11** (210 mg, 0,124 mmol) se convirtió en **12** (100 mg, ~0,124 mmol) como un aceite pardo. Este producto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

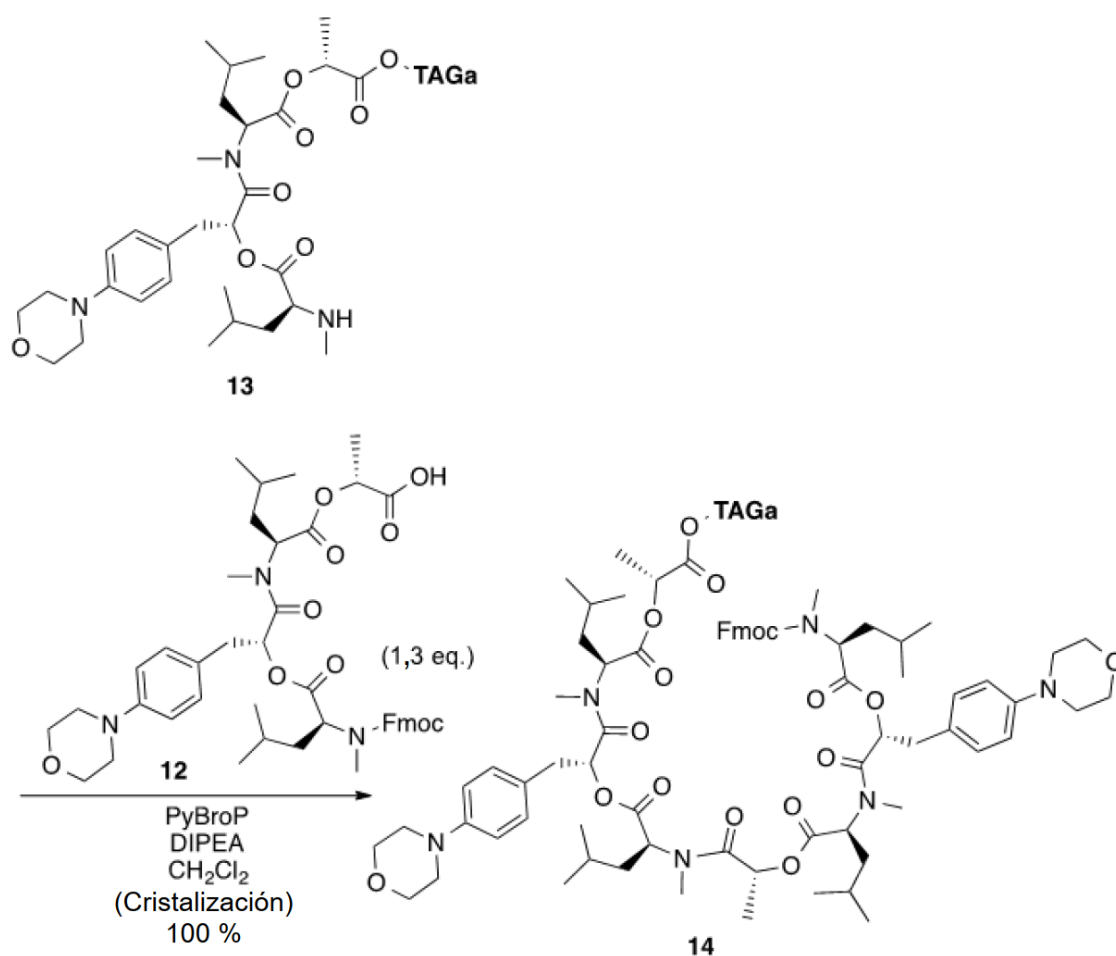


Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **11** (158 mg, 0,0934 mmol) se convirtió en **13** (138 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,15 (m, 2H), 6,83 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,49 (s, 2H), 5,47 (dd, J = 6,9, 8,0 Hz, 1H), 5,32 (dd, J = 4,9, 11,2 Hz, 1H), 5,09–5,00 (complejo m, 3H), 3,94 (m, 6H), 3,85 (m, 4H), 3,27 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,13–2,79 (complejo m, 9H), 2,29 (s, 3H), 1,81–1,25 (complejo m, 105H), 1,01–0,78 (complejo m, 21H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1473.2214 $[(\text{M}+\text{H})^+]$, calculado para $\text{C}_{91}\text{H}_{162}\text{N}_3\text{O}_{11}$: 1473.2209]

N-Fmoc-N-MeLeu-D-morphPhLac-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa (14)

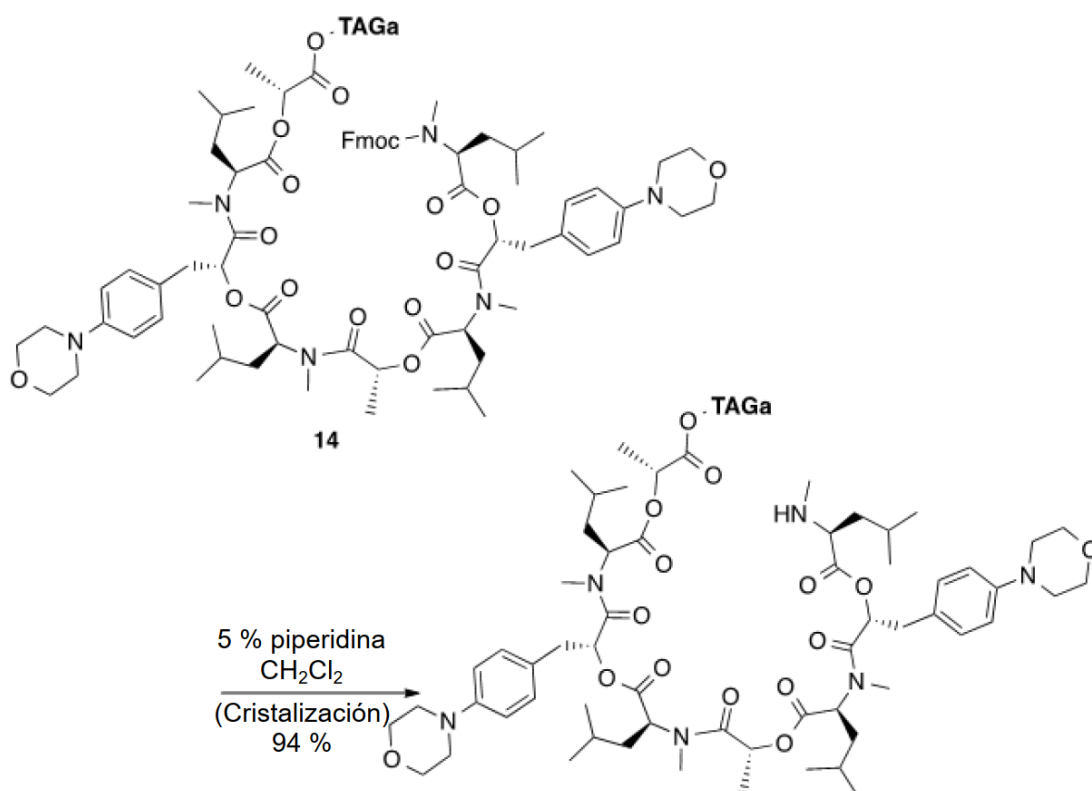


A una solución agitada de **13** (138 mg, 0,934 mmol) en CH_2Cl_2 (1,9 ml) se agregó **12** (100 mg, ~ 0,124 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (48 μl , 0,280 mmol), y PyBroP (65 mg, 0,140 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 18 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-**Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar **14** (211 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,75 (m, 2H), 7,58 (m, 2H), 7,42–7,28 (complejo m, 4H), 7,09 (m, 4H), 6,77 (m, 4H), 6,48 (s, 2H), 5,45–5,15 (complejo m, 6H), 5,06–4,97 (complejo m, 4H), 4,73–4,12 (complejo m, 3H), 3,95–3,73 (complejo m, 14H), 3,15–2,73 (complejo m, 24H), 1,80–1,25 (complejo m, 114H), 0,96–0,77 (complejo m, 33H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 2276.5962 $[(M+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{136}\text{H}_{216}\text{N}_6\text{O}_{20}\text{Na}$: 2276.5967]

***N*-MeLeu-D-morphPhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-morphPhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-O-TAGa**

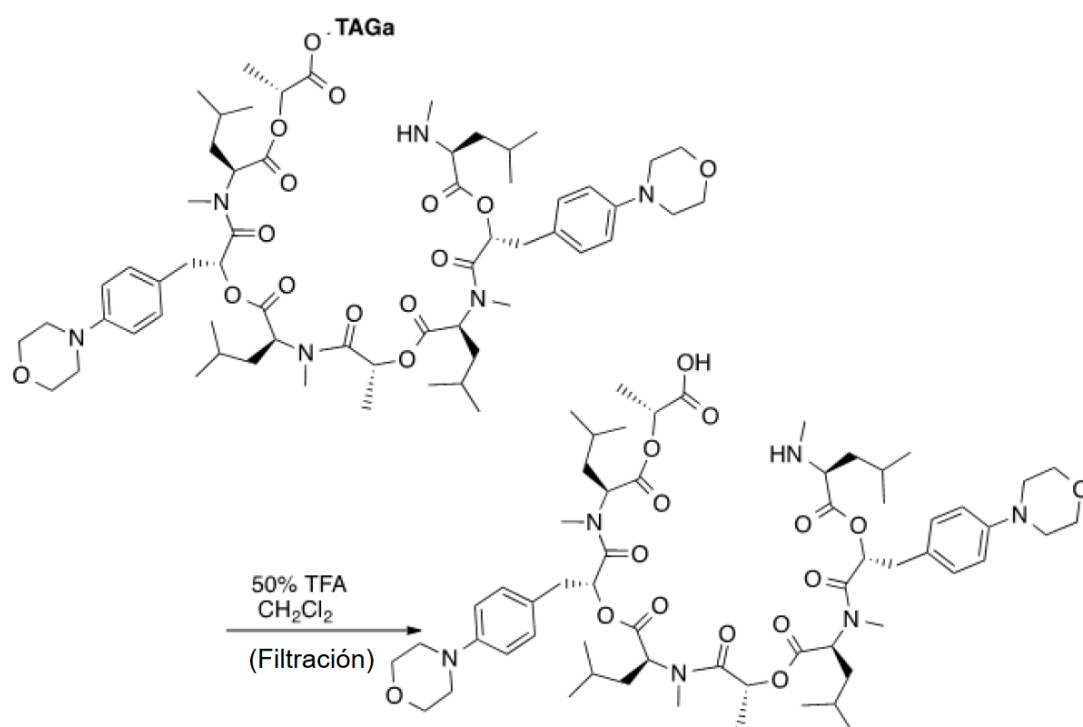


Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **14** (211 mg, 0,0934 mmol) se convirtió en la correspondiente amina (178 mg, 94 %) como un polvo incoloro.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,15 (m, 4H), 6,82 (m, 4H), 6,49 (s, 2H), 5,14 (t, $J = 7,45$ Hz, 1H), 5,44–5,09 (complejo m, 5H), 5,07–5,00 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H), 3,85 (m, 8H), 3,32 (m, 1H), 3,17–2,74 (complejo m, 21H), 2,33 (s, 3H), 1,81–1,64 (complejo m, 12H), 1,55–1,25 (complejo m, 102H), 1,03–0,77 (complejo m, 33H).

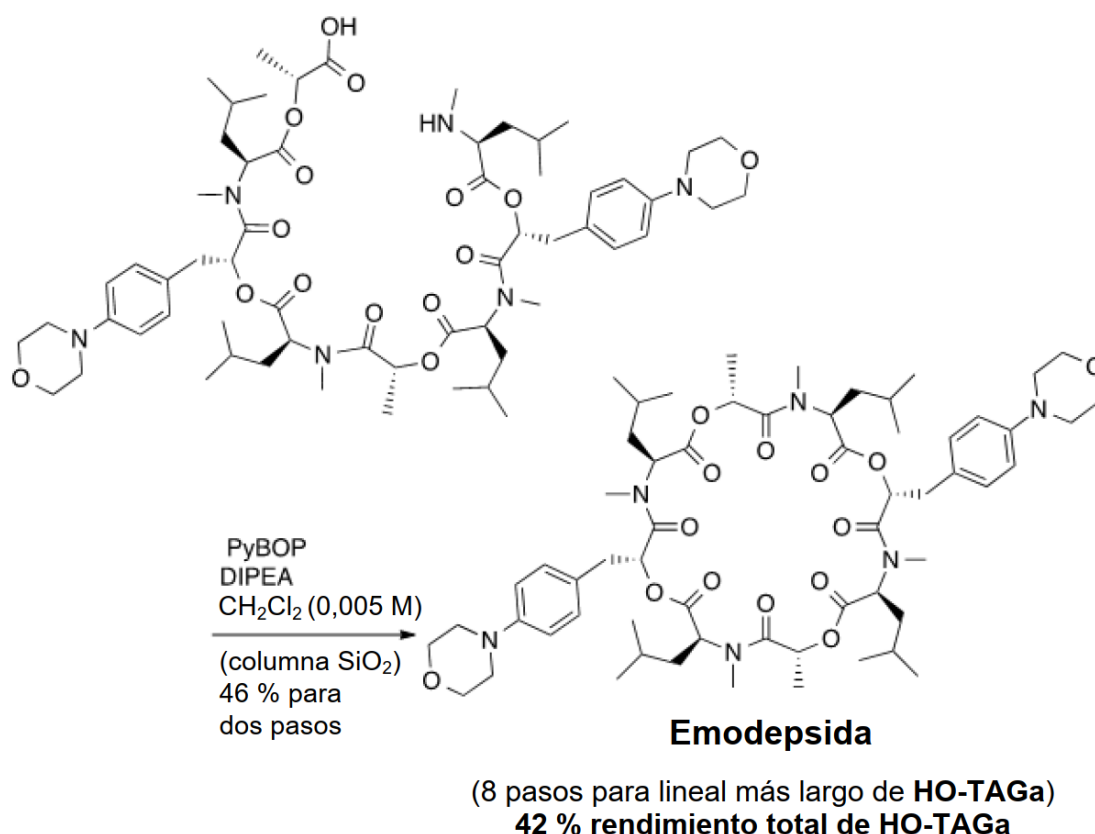
HR-MS (FAB, matriz NBA +NaI) m/z : 2032.5488 $[(M+H)^+]$, calculado para $\text{C}_{121}\text{H}_{207}\text{N}_6\text{O}_{18}$: 2032.5467]

***N*-MeLeu-D-morphPhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-morphPhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-OH**



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, ***N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*N*-MeLeu-*D*-LacO-TAGa** (178 mg, 0,0876 mmol) se convirtió en el correspondiente ácido carboxílico (~ 0,0876 mmol) como un aceite bruto, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Emodepsida (condición altamente diluida usando PyBOP)



A un producto bruto de ácido carboxílico (~0,0876 mmol) en CH₂Cl₂ (18 ml, 0,005 M) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0,10 ml, 0,613 mmol) y PyBOP (91 mg, 0,175 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 19 h, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado (18 ml) a 0 °C y esta mezcla se extrajo con CHCl₃ (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 % NaHSO₄ acuoso (60 ml), y salmuera (60 ml), se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (CHCl₃: MeOH = 400 : 1 a 100: 1) para proveer **Emodepsida** (45 mg, 46 % para 2 pasos) como un sólido amarillo claro.

mp: 98–103 °C

$[\alpha]_D^{24}$: -40,3 (*c* 0,67, CHCl₃)

IR (puro) $\tilde{\nu}_{\text{máx}}$: 2954, 2862, 1743, 1659, 1520, 1458, 1412, 1265, 1234, 1188, 1119, 1072, 1026, 926, 810.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,14-7,11 (complejo m, 4H), 6,83-6,79 (complejo m), 5,64-5,54 (complejo m), 5,52-5,43, 5,43-5,39, 5,33, 5,18, 5,06 y 4,46 (5 m, 6H), 3,85 (aparentemente t, 8H), 3,15-3,04 (complejo m, 8H), 3,04-2,92 (complejo m, 4H), 3,00, 2,82, 2,79, 2,72 y 2,71 (5 s, 12H), 1,82-1,24 (complejo m, 18H), 1,03-0,79 (complejo m, 30H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 171,6, 171,2, 171,0, 170,9, 170,3, 170,2, 170,1, 169,8, 169,7, 150,2, 130,4, 130,2, 115,7, 115,6, 71,2, 70,8, 68,5, 66,8, 66,7, 57,1, 54,0, 53,9, 49,3, 49,2, 38,0, 37,5, 37,1, 36,9, 36,8, 36,7, 36,6, 36,1, 31,1, 30,6, 30,4, 29,7, 29,6, 29,3, 25,0, 24,8, 24,6, 24,5, 24,5, 24,1, 23,6, 23,5, 23,4, 23,3, 23,3, 23,1, 22,6, 21,6, 21,5, 21,1, 21,1, 21,0, 20,8, 17,1, 15,7.

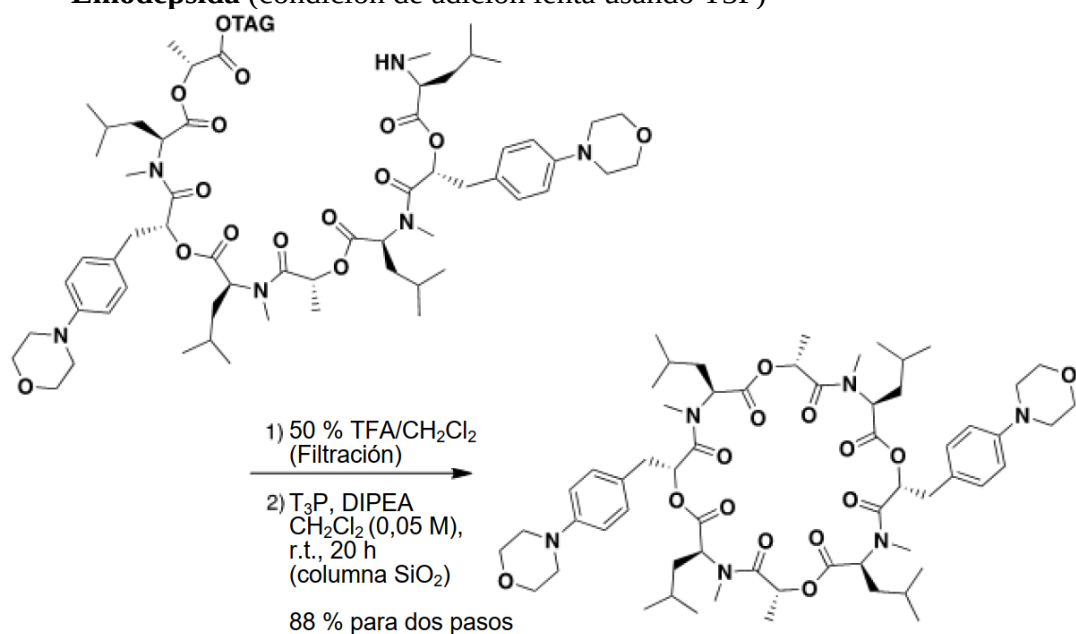
HRMS (ESI) m/z : 1141.6404 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{14}$ Na: 1141.6413]

*Literatura (*Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 1546-1553)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,17-7,09 (m, 4 H, Ar-H), 6,86-6,77 (m, 4 H, Ar-H), 5,67-5,54 (m, 2 H, $\text{C}\alpha\text{H}$ -Lac), 5,53-5,38, 5,34, 5,19, 5,08 y 4,47 (5 m, 6 H, $\text{C}\alpha\text{H}$ -Leu, $\text{C}\alpha\text{H}$ -morphPhLac), 3,88-3,81 (pseudo-t, 8 H, OCH_2 morfolina), 3,15-3,08 (m, 8 H, N- CH_2 -morfolina), 3,07-2,85 (m, 4 H, $\text{C}\beta\text{H}_2$ -morphPhLac), 3,00, 2,83, 2,80, 2,74 y 2,73 (5 s, 12 H, NCH_3), 1,83-1,20 (m, 18 H, $\text{C}\beta\text{H}_2$ -Leu, $\text{C}\gamma\text{H}$ -Leu, CH_3 -Lac), 1,05-0,77 (m, 30 H, $\text{C}\delta\text{H}_3$ -Leu, $\text{C}\beta\text{H}_3$ -Lac).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171,7, 171,2, 171,0, 170,6, 170,4, 170,2, 169,8, 141,7, 130,6, 130,4, 116,9, 116,1, 71,3, 70,8, 68,6, 66,9, 66,6, 66,5, 57,1, 54,0, 49,9, 38,1, 37,5, 37,2, 36,7, 36,2, 31,2, 30,5, 29,4, 24,9, 24,7, 24,2, 23,6, 23,5, 23,5, 23,4, 21,2, 21,1, 20,9, 17,1, 15,8.

Emodepsida (condición de adición lenta usando T3P)



Emodepsida

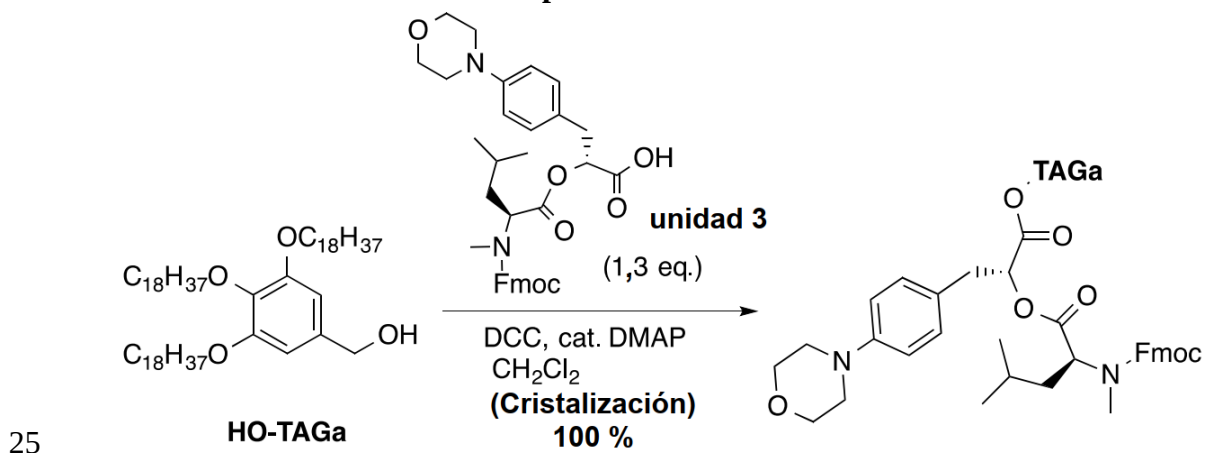
(8 pasos para lineal más largo de **HO-TAGa**)
85 % rendimiento total de HO-TAGa

Escisión de TAGa: A una solución en agitación del compuesto lineal en TAG (179,0 mg, 0,088 mmol) en DCM (1,8 ml) se agregó TFA (1,8 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 6 h a temperatura ambiente, la solución se concentró al vacío. La mezcla resultante se disolvió en tolueno (10 ml) y se concentró a presión reducida 3 veces para retirar el exceso de TFA. El residuo bruto se disolvió en CH₂Cl₂ (1,0 ml), luego se recrystalizó para los materiales de TAGa escindidos por la adición de MeOH (8,0 ml) a temperatura ambiente. Los precipitados se filtraron a través de una almohadilla de Celite® y se lavaron con MeOH (20 ml). Los filtrados combinados se concentraron al vacío. Al producto resultante se agregó 4 M HCl/Dioxano (0,05 M por producto), seguido por dilución con tolueno (10 ml) y se concentró para proporcionar el producto libre de sal de TFA. Para retirar el exceso de HCl de un producto bruto, el producto se disolvió nuevamente en tolueno (10 ml) y se concentró a presión reducida 2 veces.

Ciclación: A una solución agitada de T3P® (50 % en EtOAc, 110 µl, 0,187 mmol) en DIPEA (110 µl, 0,187 mmol) se agregó gota a gota un compuesto lineal bruto (0,088 mmol) en DCM (1,8 ml, 0,05 M incluyendo lavado) durante 2,5 h a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 20 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ ac. sat. (3,0 ml), se extrajo con CHCl₃ (2,0 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron en sulfato de sodio, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 100/1) para proveer Emodepsida (86,4 mg, 88 %) como un amorfo. Los datos analíticos se identificaron por la muestra auténtica.

6. Preparación de Emodepsida (Método 2; ver esquema de reacción en la FIG. 9)

N-Fmoc-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa



A una solución agitada de **HO-TAGa** (381 mg, 0,417 mmol) en CH₂Cl₂ (8,4 ml)

se agregó 0,2 M solución de tolueno de **unidad 3** (2,71 ml, 0,542 mmol), 4-dimetilaminopiridina (2,5 mg, 20,8 μ mol), y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (129 mg, 0,626 mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de N_2 . Luego de agitarse durante 1 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-**Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar *N*-**Fmoc-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa** (628 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

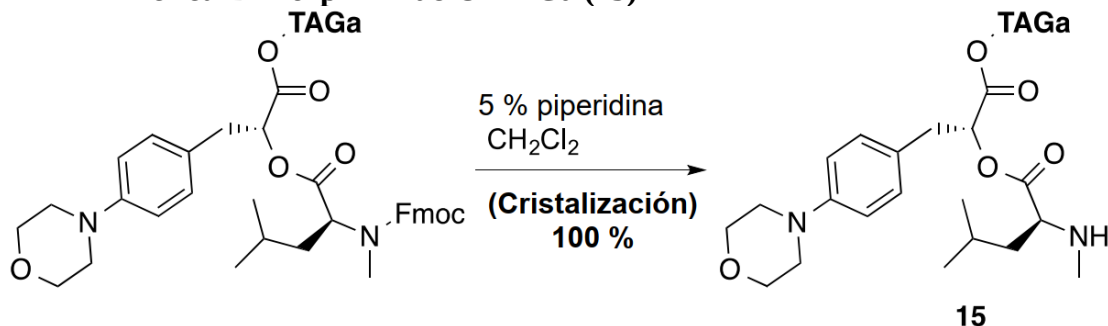
mp : 46-47 °C

$[\alpha]_D^{27} = -3,1$ (c 1,0, $CHCl_3$)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,78 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,57 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,27 (m, 2H), 6,98 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,67 (m, 2H), 6,49 (2 s, rotámero 4:3, 2H), 5,17 (2 dd, rotámero, $J = 4,0$ Hz, 8,0 Hz, 1H), 5,08–4,98 (complejo m, 3H), 4,67–4,13 (complejo m, 3H), 3,93 (m, 6H), 3,73 (m, 4H), 3,08 (dd, $J = 4,0$ Hz, 14,6 Hz, 1H), 3,07–2,95 (complejo m, 5H), 2,80 (rotámero 4:3, 3H), 1,76 (m, 6H), 1,64–1,53 (complejo m, 3H), 1,45 (m, 6H), 1,28 (complejo m, 84H), 0,93–0,86 (complejo m, 14H), 0,76 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1495.1583 (M^+ , calculado para $C_{96}H_{154}N_2O_{10}$: 1495.1604)

***N*-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa (15)**



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, *N*-**Fmoc-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa** (628 mg, 0,417 mmol) se convirtió en **15** (530 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

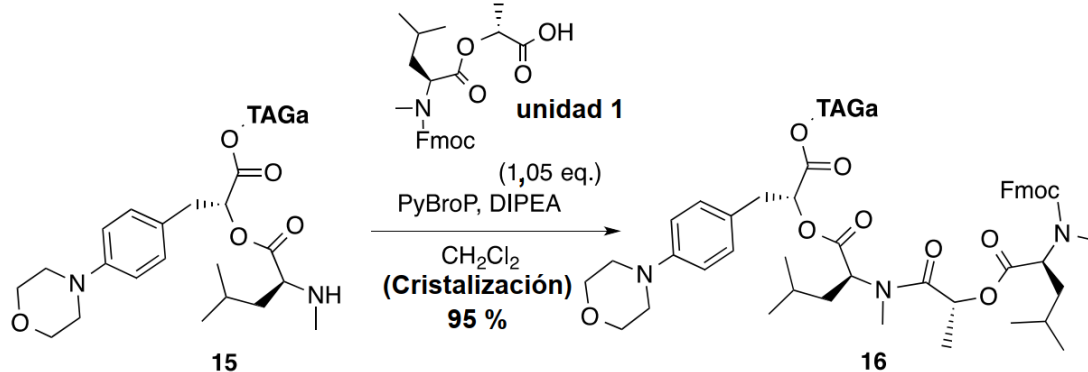
mp : 49-50 °C

$[\alpha]_D^{27} = +5,7$ (c 1,0, $CHCl_3$)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,08 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,80 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,51 (s, 2H), 5,24 (dd, $J = 4,0, 9,7$ Hz, 1H), 5,07 (q, $J = 12,0$ Hz, 2H), 3,94 (m, 6H), 3,85 (m, 4H), 3,18 (m, 2H), 3,10 (m, 4H), 3,00 (d, $J = 10,3, 14,3$ Hz, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,76 (m, 6H), 1,47 (m, 6H), 1,34–1,25 (complejo m, 87H), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 9H), 0,80 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 0,79 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1274.0986 $[(M+H)^+]$, calculado para $C_{81}H_{145}N_2O_8$: 1274. 1001]

***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*O*-TAGa (16)**



5

A una solución agitada de **15** (530 mg, 0,417 mmol) en CH_2Cl_2 (8,4 ml) se agregó 0,2 M de solución de tolueno de la **unidad 1** (0,22 ml, 0,44 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,212 ml, 1,25 mmol), y PyBroP (291 mg, 0,62 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 16 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de ***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*O*-TAGa** para proporcionar **16** (670 mg, 95 %) como un polvo incoloro.

10

mp : 48-49 °C

$[\alpha]_D^{27} = -12,4$ (c 1,0, $CHCl_3$)

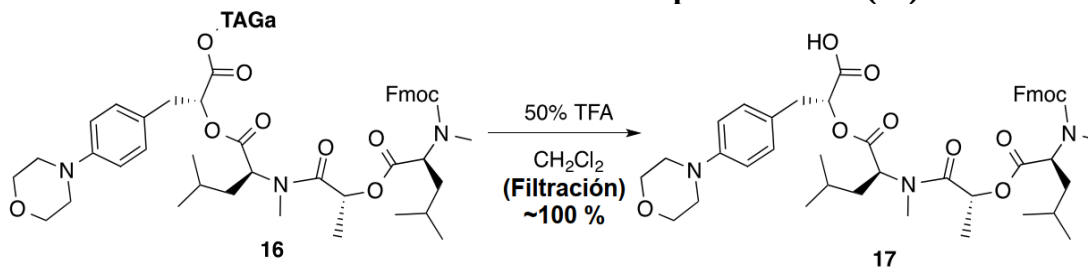
1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,76 (m, 2H), 7,61 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,30 (m, 2H), 7,02 (m, 2H), 6,74 (m, 2H), 6,49 (2 s, rotámero, 2H), 5,38–5,22 (complejo m, 2H), 5,15–4,98 (complejo m, 4H), 4,47 (complejo m, 3H), 3,94 (m, 6H), 3,81 (m, 4H), 3,12–2,78 (complejo m, 12H), 1,82–1,56 (complejo m, 9H), 1,53–1,40 (complejo m, 8H), 1,34–1,26 (complejo m, 88H), 0,98–0,75 (complejo m, 21H).

15

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 1694.2828 (M^+ , calculado para $C_{106}H_{171}N_3O_{13}$: 1694.2812)

20

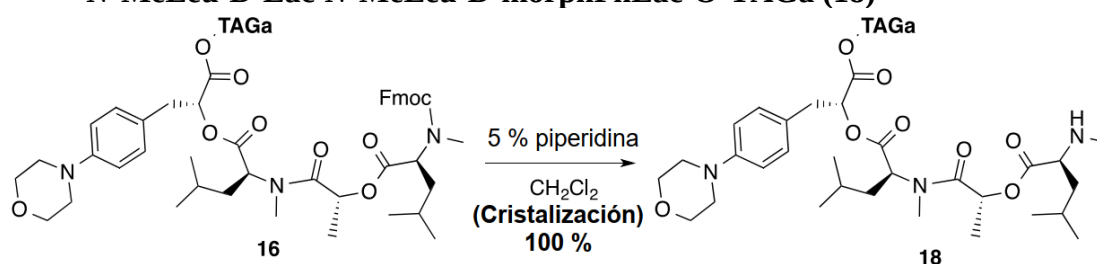
***N*-Fmoc-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-OH (17)**



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de

TAGa, **16** (376 mg, 0,222 mmol) se convirtió en **17**. En el caso de este sustrato, la reacción requirió más tiempo que el de la condición general de la escisión de TAGa (aprox. 1 h). La reacción de **16** en 50 % TFA/CH₂Cl₂ a temperatura ambiente fue necesario agitarla durante 8 h para consumir todo el material de partida, y proporcionó el producto **17** (178 mg, 0,222 mmol) como un aceite bruto, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa (18)



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **16** (290 mg, 0,171 mmol) se convirtió en **18** (251 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

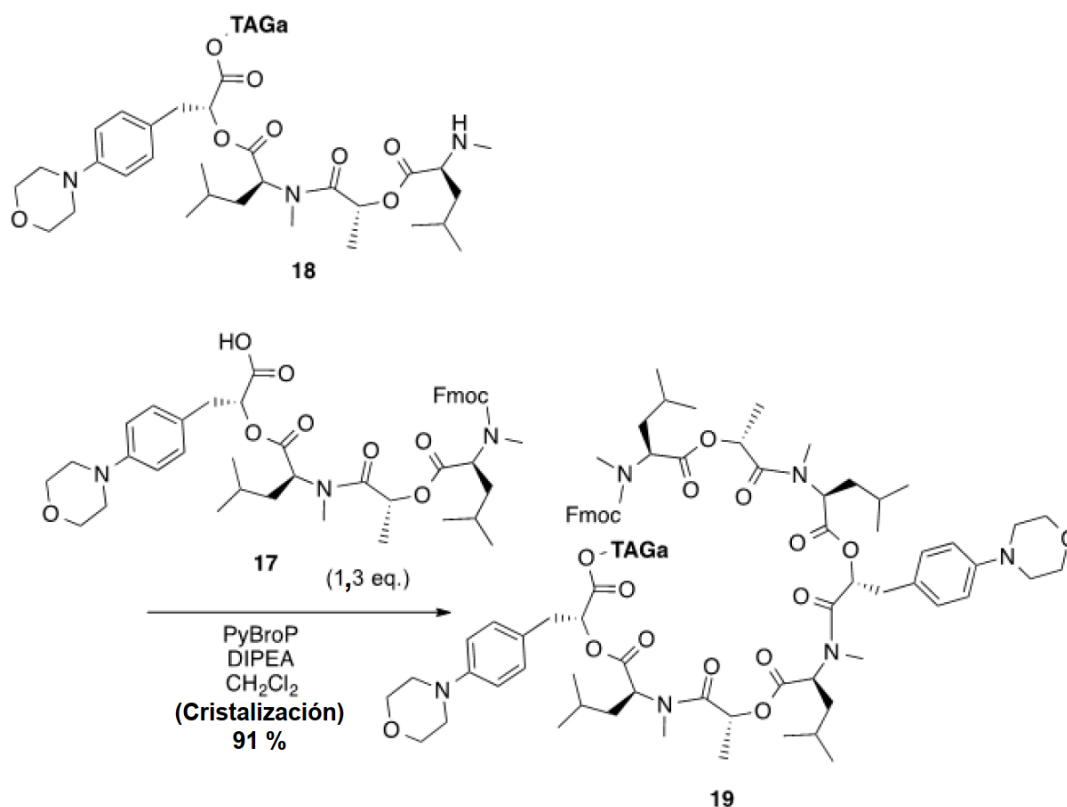
mp : 43-45 °C

$[\alpha]_D^{25} = -2,8$ (c 1,0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,07 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,49 (s, 2H), 5,46 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,33 (dd, *J* = 5,2, 10,9 Hz, 1H), 5,17 (dd, *J* = 5,2, 7,5 Hz, 1H), 5,06 (m, 2H), 3,95 (m, 6H), 3,84 (m, 4H), 3,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,11–3,06 (complejo m, 6H), 2,82 (2 s, rotámero 4:1, 3H), 2,40 (s, rotámero, 3H), 1,82–1,59 (complejo m, 10H), 1,52–1,43 (complejo m, 8H), 1,34–1,25 (complejo m, 87H), 0,97–0,86 (complejo m, 21H).

HRMS (FAB, matriz NBA +NaI) *m/z*: 1473.2222 [(M+H)⁺, calculado para C₉₁H₁₆₂N₃O₁₁ : 1473.2209]

N-Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa (19)



A una solución agitada de **18** (251 mg, 0,171 mmol) en CH_2Cl_2 (3,4 ml) se agregó **17** (178 mg, 0,222 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (87 μl , 0,513 mmol), y PyBroP (120 mg, 0,257 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 46 h, la mezcla de reacción se cristalizó por el procedimiento descrito en la síntesis de *N*-**Fmoc-N-MeLeu-D-Lac-O-TAGa** para proporcionar **19** (350 mg, 91 %) como un polvo incoloro.

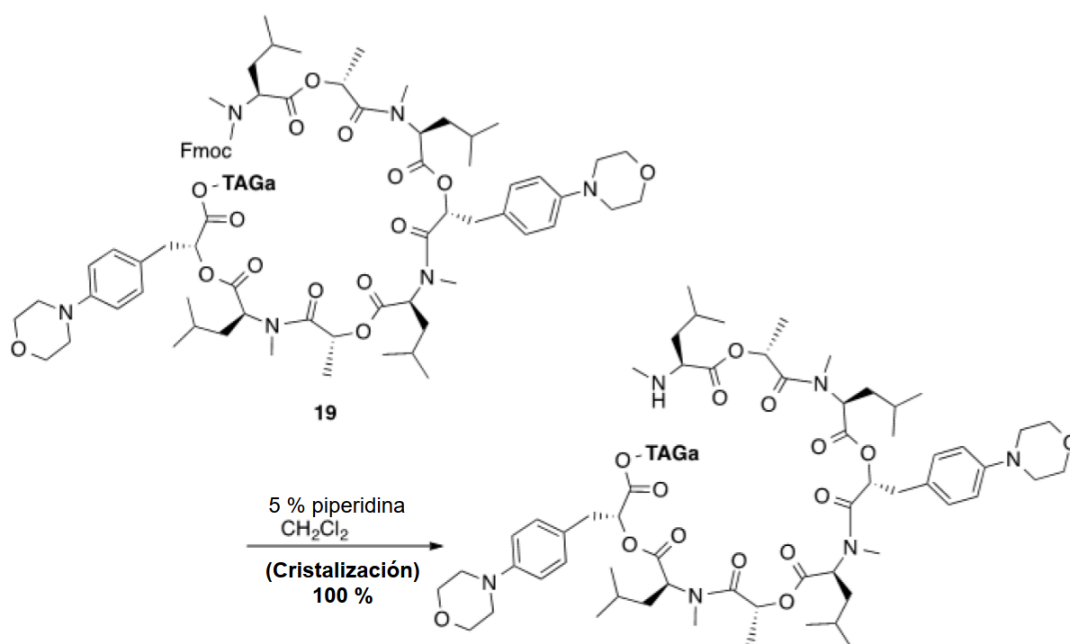
mp : 50-52 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -25,5$ (*c* 1,0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,75 (m, 2H), 7,62 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,30 (m, 2H), 7,06 (m, 4H), 6,77 (m, 4H), 6,49 (2 s, rotámero, 2H), 5,42–4,98 (complejo m, 10H), 4,73–4,20 (complejo m, 3H), 3,94 (m, 6H), 3,84 (m, 8H), 3,17–2,66 (complejo m, 24H), 1,80–1,64 (complejo m, 14H), 1,46-1,25 (complejo m, 100H), 1,00–0,77 (complejo m, 33H).

HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 2276.5940 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, calculado para $\text{C}_{136}\text{H}_{216}\text{N}_6\text{O}_{20}\text{Na}$: 2276.5967]

***N*-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-N-MeLeu-D-Lac-N-MeLeu-D-morphPhLac-O-TAGa**



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de desprotección de Fmoc, **19** (114 mg, 0,0505 mmol) se convirtió en la correspondiente amina (103 mg, 100 %) como un polvo incoloro.

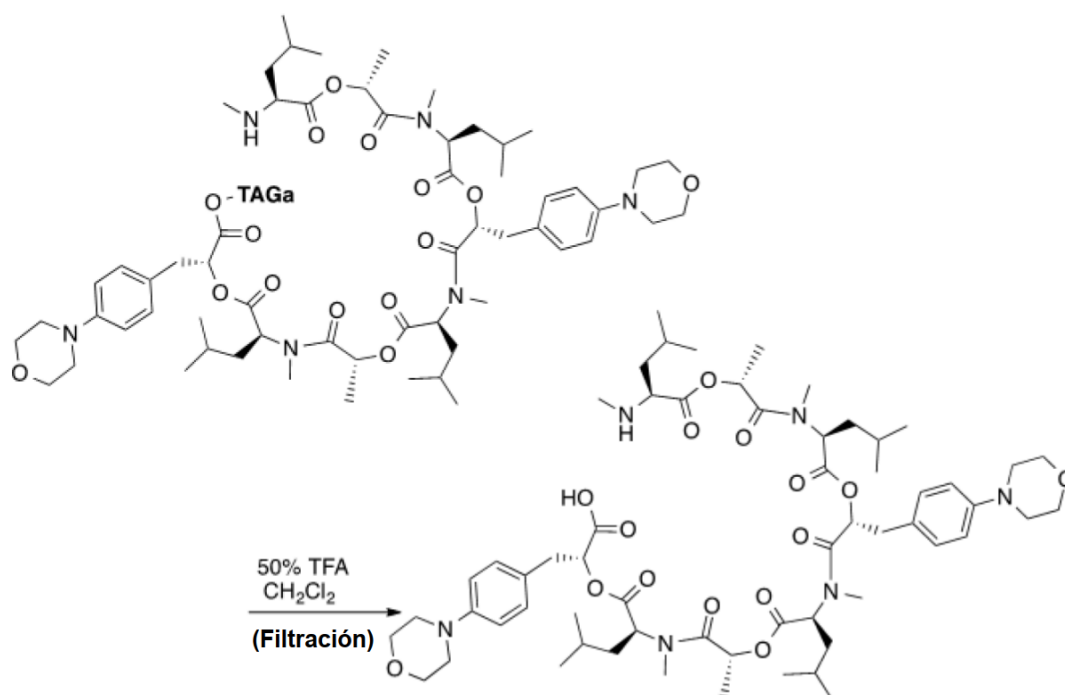
mp : 45-47 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -19,6$ (c 1,0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,76 (m, 4H), 6,79 (m, 4H), 6,48 (s, 2H), 5,50-4,96 (complejo m, 9H), 3,94 (m, 6H), 3,83 (m, 8H), 3,30 (m, 1H), 3,16-2,74 (complejo m, 21H), 2,38 (m, 3H), 1,80-1,55 (complejo m, 9H), 1,47-1,24 (complejo m, 105H), 1,00-0,81 (complejo m, 33H).

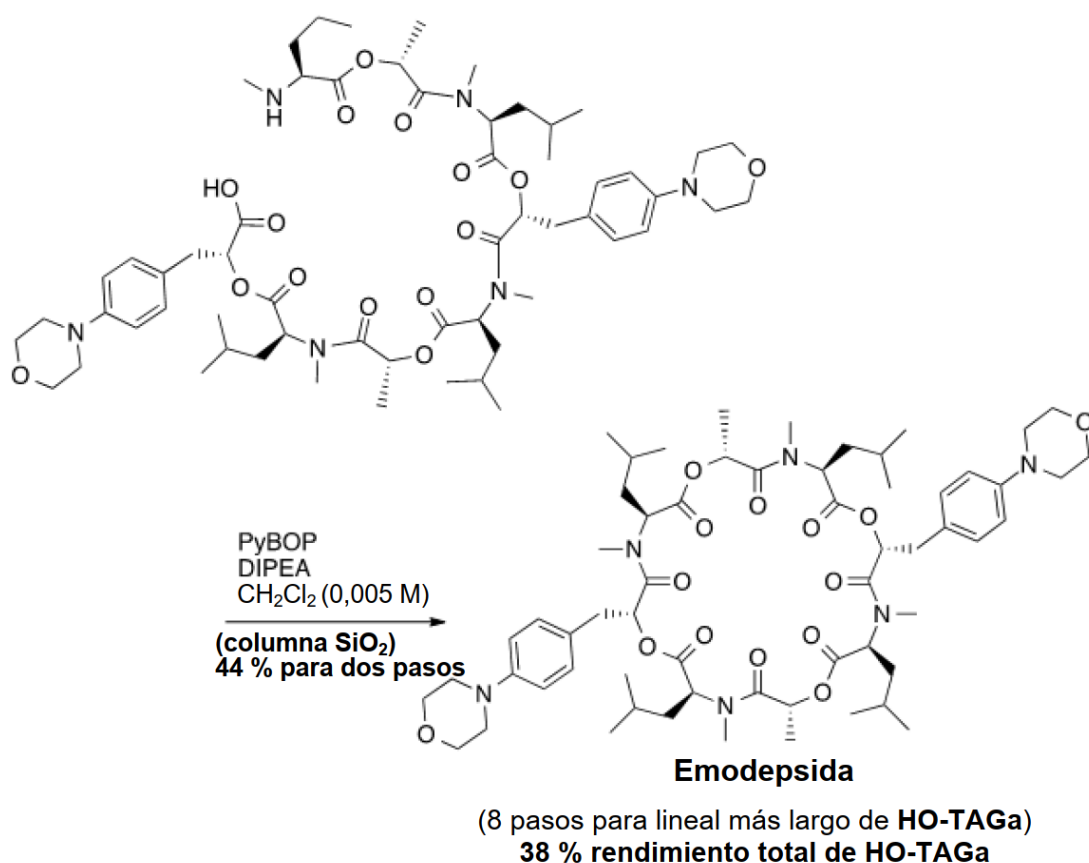
HRMS (FAB, matriz NBA) m/z : 2032.5468 [(M+H)⁺, calculado para C₁₂₁H₂₀₇N₆O₁₈: 2032.5467]

***N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-morphPhLac-*N*-MeLeu-D-Lac-*N*-MeLeu-D-morphPhLac-OH**



Luego del procedimiento descrito para el procedimiento general de la escisión de TAGa, ***N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-morphPhLac-*N*-MeLeu-*D*-Lac-*N*-MeLeu-*D*-morph- PhLac-O-TAGa** (102 mg, 0,0502 mmol) se convirtió en el correspondiente ácido carboxílico. En el caso de este sustrato, la reacción requirió más tiempo que el de la condición general de la escisión de TAGa (aprox. 1 h). La reacción en 50 % TFA/CH₂Cl₂ a temperatura ambiente fue necesario agitarla durante 5 h para consumir todo el material de partida, y proporcionó el producto deseado (~0,0502 mmol) como un aceite bruto, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Emodepsida

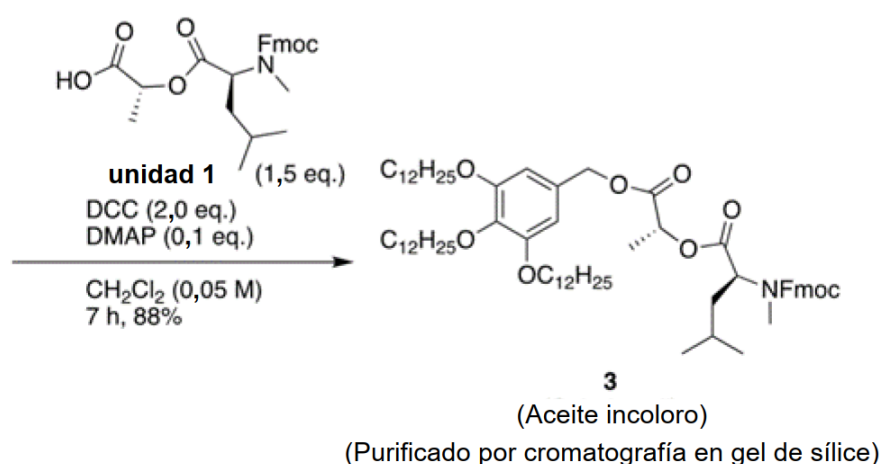
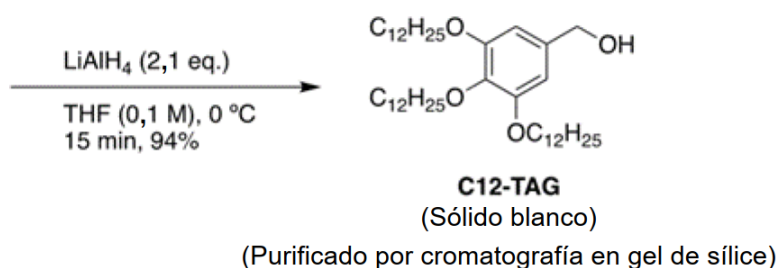
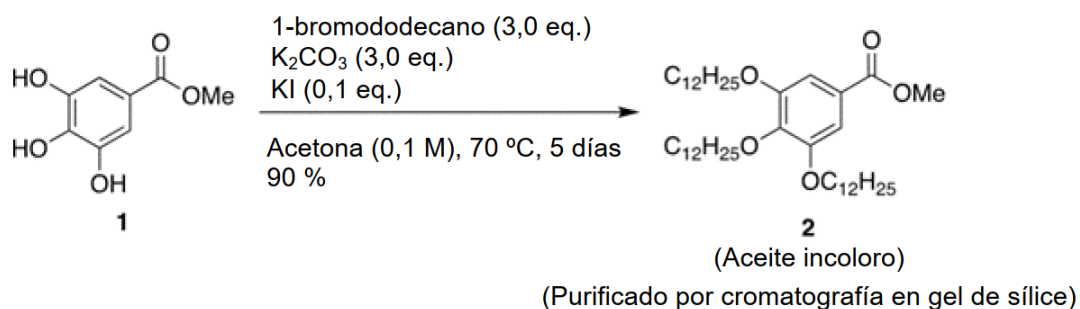


A un producto bruto de ácido carboxílico (~0,0502 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml, 0,005 M) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (60 µl, 0,351 mmol) y PyBOP (52 mg, 0,175 mmol) a temperatura ambiente. Luego de agitarse durante 44 h, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado (10 ml) a 0 °C y esta mezcla se extrajo con CHCl₃ (20 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 % NaHSO₄ acuoso (60 ml), y salmuera (60 ml), se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (CHCl₃: MeOH = 400 : 1 a 100: 1) para proveer **Emodepsida** (25 mg, 44 % para 2 pasos) como un sólido pardo claro.

Todos los datos físicos para Emodepsida sintética coincidieron con los datos del compuesto auténtico.

Ejemplo comparativo 1

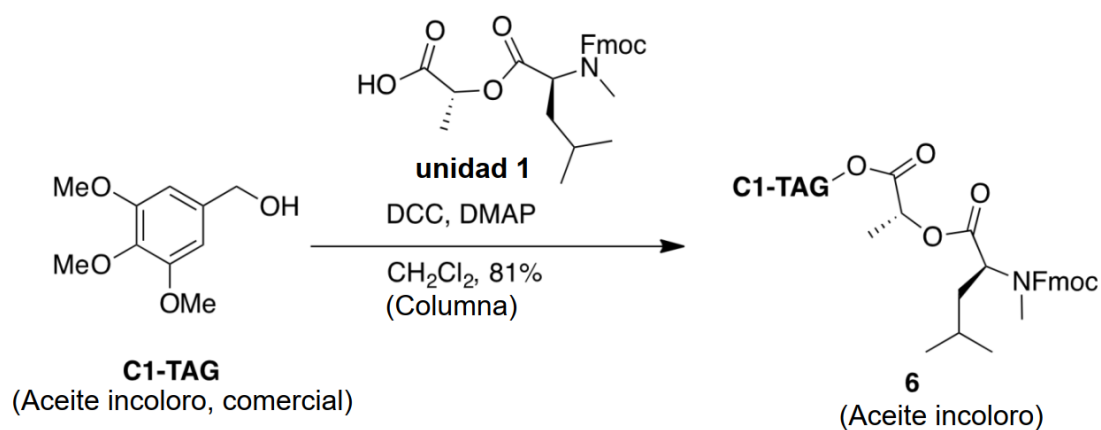
Una etiqueta análoga a TAGa, pero con C₁₂ en vez de cadenas alquilo C₁₈ (C12-TAG), se preparó y acopló con *N*-Fmoc-*N*-MeLeu-D-Lac-OH (unidad 1) de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



La purificación por cromatografía de gel de sílice fue necesaria luego de cada paso de reacción. Los compuestos 2, C12-TAG y 3 no cristalizaron en metanol. Esto es contrario a, por ejemplo, el procedimiento sintético para *N*-Fmoc-*N*-MeLeu-D-Lac-O-TAGa (sección 2.1 anterior). C12-TAG en este ejemplo comparativo no fue adecuado para la síntesis asistida por etiquetas pretendida y la funcionalización adicional del compuesto 3 no se investigó adicionalmente.

Ejemplo comparativo 2

C1-TAG comercialmente disponible se acopló con *N*-Fmoc-*N*-MeLeu-D-Lac-OH (unidad 1) de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



La purificación por cromatografía en columna fue necesaria luego del paso de reacción. Los compuestos C1-TAG y **6** no cristalizaron en metanol. C1-TAG en este ejemplo comparativo no fue adecuado para la síntesis asistida por etiquetas pretendida y la funcionalización adicional del compuesto **6** no se investigó adicionalmente.