



Señora

Sandra Isabel Calderón Rodríguez

Directora de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Solicitud de Patente de Invención PCT denominada
**“SÍNTESIS DEL (S)-6-HIDROXITRIPTÓFANO Y
DERIVADOS DEL MISMO”**

Asunto: Respuesta al oficio No. 9195 de 21 de mayo de 2024

Expediente No. NC2021/0007237

Juan Carlos Cuesta Quintero, mayor de edad, identificado como aparece al pie de mí firma, obrando en mi calidad de apoderado de **HEIDELBERG PHARMA RESEARCH GMBH** doy respuesta al Oficio No. 9195 de 21 de mayo de 2024, bajo los siguientes términos:

I. MODIFICACIONES AL TÍTULO

Se acepta la modificación al título tal y como ha sugerido el Examinador.



II. MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

La reivindicación 1 se ha modificado de manera que se especifican los posibles catalizadores quirales (previamente incluidos en la anterior reivindicación 4) y además se especifica la estructura del posible precursor aminoácido olefínico (previamente incluidos en la anterior reivindicación 2). El resto de las reivindicaciones se han reenumerado acorde.

III. CLARIDAD

El Examinador considera que todo el conjunto de reivindicaciones carece de **claridad**, ya que se presenta de manera imprecisa. En particular, el Examinador afirma que la reivindicación independiente no proporciona una definición clara de la síntesis de interés. Es decir, en su opinión, la reivindicación 1 no incluye las condiciones específicas de la etapa de conversión, ni las condiciones básicas de la síntesis, incluidos los reactivos mínimos requeridos. Por lo tanto, el Examinador afirma que la reivindicación 1 carece de claridad debido a esta ambigüedad.

En la reivindicación independiente 1 modificada, el "compuesto precursor de aminoácidos olefínicos" se ha limitado a dos tipos de compuestos concretos, y el "catalizador quiral" se ha restringido a seis catalizadores específicos que están suficientemente soportados en la descripción (por ejemplo, Tabla 1 de la solicitud tal como se presentó originalmente). Por tanto, al haber definido los posibles reactantes mínimos requeridos y el posible catalizador implicado en la reacción de hidrogenación enantioselectiva, se considera que la presente reivindicación 1 es clara.

También se objetan las anteriores reivindicaciones 6 y 7 ya que, en opinión del Examinador, agregan información adicional al proceso al mencionar que la síntesis del precursor del aminoácido olefínico procede de compuestos específicos. Según el Examinador, esta información no es precisa y no se corresponde con el objeto de la



reivindicación anterior. El Examinador también afirma que la información proporcionada en las reivindicaciones 6 y 7 amplía el alcance de la reivindicación 1, de la que dependen, porque incluyen características técnicas adicionales que no se han contemplado anteriormente. Lo mismo se aplica a las reivindicaciones 10 y 11 que, según el Examinador, amplía el alcance de la reivindicación 1 al introducir nuevos pasos en la ruta sintética. En general, el examinador considera que el conjunto de reivindicaciones está redactado de manera que cada reivindicación dependiente amplía su alcance al introducir nuevas características.

El solicitante discrepa respetuosamente de esta afirmación, ya que la materia de las nuevas reivindicaciones 4 y 5 (anteriores 6 y 7) se refiere a que el precursor aminoácido olefínico de la reivindicación 1 se obtiene específicamente a partir del compuesto HDP 30.2822 (reiv. 4) o del compuesto B (reiv. 5). Es decir, que se ha limitado que los precursores olefínicos definidos en la reivindicación 1 sean específicamente los obtenidos a partir de HDP 30.2822 o compuesto B. El incluir esta condición en el procedimiento de la reivindicación 1 supone que se tiene que cumplir dicha condición más específica (se pasa de algo más general a algo más específico) y, por tanto, se restringe el alcance de la reivindicación 1. El mismo razonamiento aplica a las reivindicaciones 7 y 8 (anteriores 10 y 11), ya que son formas más específicas de realizar el procedimiento de la reivindicación 1 en las que se han definido de manera específica los reactantes y las etapas, lo que supone una limitación del alcance de la reivindicación 1.

Se objeta también que la inclusión del compuesto (II) como posible precursor aminoácido olefínico no está plenamente soportada porque "las realizaciones preferidas se refieren a las síntesis de (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarboniltryptófano (HDP 30.2550) o (S)-6-hidroxitryptófano, con los precursores (I) y (III). Sin embargo, no se evidencia la acción del precursor (II)". Por lo tanto, el Examinador sugiere limitar la aplicación a una generalización razonable del tipo de precursor probado o sintetizado. Para superar esta objeción se ha procedido a eliminar el compuesto (II) de la reivindicación 1 modificada.



IV. NIVEL INVENTIVO

El Examinador considera además que la presente invención definida en el presente conjunto de reivindicaciones carece de actividad inventiva a la vista de los documentos D2 (WO 2016/134145) y D3 (WO 2011/073173).

Se supone que D2 es el estado de la técnica más cercano a la presente invención, "ya que revela métodos para la preparación de compuestos de fórmula (Ia) (p. 58, línea 11). En particular, D2 ejemplifica un proceso para preparar (S)-6-hidroxitriptófano (p. 124, Ejemplo 31)".

Según el Examinador, la diferencia entre la presente invención y el proceso divulgado en D2 es que "incluye un paso de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral".

Además, según el Examinador, no hay pruebas de que la inclusión de una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral proporcione un proceso con un efecto técnico diferente del ya proporcionado por el D2, ya que los procesos para fabricar compuestos y sus derivados que pueden incorporarse a polipéptidos para formar proteínas artificiales o no naturales, ya se había previsto en dicho documento (p. 93, líneas 22 a 25).

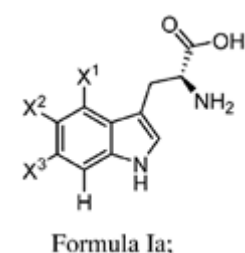
Sin embargo, supuestamente la inclusión de una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral ya se informa en D3, lo que supuestamente hace que el objeto de la reivindicación 1 (y las reivindicaciones dependientes) sea obvio. El solicitante discrepa, respetuosamente, de esta conclusión.

El Examinador reconoce que D2, a diferencia de la presente invención, no revela "un paso de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral". Esto significa básicamente que D2 no se relaciona con el método de



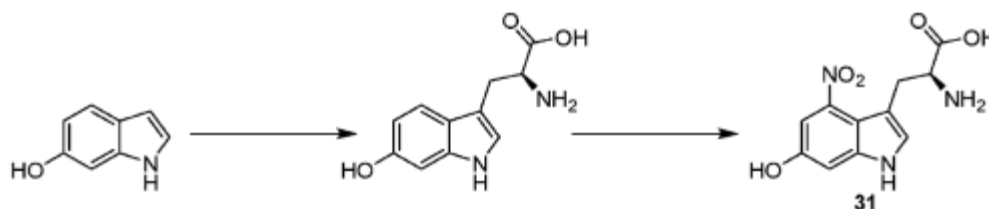
síntesis de (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) o (S)-6-hidroxitriptófano como se reivindica en la presente invención, ya que este último se basa en "un paso de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral".

El Examinador refiere a la persona experta en la materia a un método para la preparación del compuesto de fórmula (Ia) en la página 58, línea 11, que se muestra a continuación:



Esta fórmula (Ia) no revela ni se refiere a un método que comprende una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral.

El Examinador se refiere en particular al Ejemplo 31, p. 124, en D2, como se muestra a continuación



que tampoco revela ni se refiere a un método que comprende una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral.

El Examinador se refiere además a los procesos para la fabricación de compuestos y sus derivados que pueden incorporarse a polipéptidos para formar proteínas artificiales o no naturales, que supuestamente ya se habían previsto en el documento D2 (p. 93, líneas 22 a 25), recitando:



"En algunas realizaciones, un compuesto de las Fórmulas I-IX se incorpora a un polipéptido. Por ejemplo, la nitración de un compuesto de las fórmulas Ia-IXa da lugar a la formación de un compuesto de las fórmulas I-IX. Es sabido en la técnica que el L-triptófano y sus derivados (por ejemplo, los compuestos de las fórmulas I-IX) pueden incorporarse a polipéptidos para formar proteínas artificiales o no naturales"

Lo cual, de nuevo, es conocido por la persona experta, pero no tiene nada que ver con una hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral.

Por último, el Examinador argumenta que "la inclusión de una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico utilizando un catalizador quiral ya se ha informado en D3".

D3 (que también había sido citada en el WO-ISA en fase internacional como D3) revela la hidrogenación enantioselectiva de un precursor olefínico para obtener 4-metoxitriptófano. Como se señala en el WO-ISA (punto 2, segunda sección), D3 "difiere del objeto actualmente reivindicado porque no revela la preparación de (S)-6-acetiloxy-N-terc-butoxicarbonil-triptófano o (S)-6-hidroxitriptófano, y también utiliza un catalizador quiral diferente".

Esto significa que la divulgación de D3 se refiere a (i) un producto final diferente, (ii) un método de preparación diferente y (iii) un catalizador quiral diferente, en comparación con la presente invención y por lo tanto, incluso en combinación con D2, D3 no enseña ni llega al objeto de la reivindicación principal de la presente invención.

En conclusión, ni D2 solo ni D2 en combinación con D3 hacen que el objeto de estudio tal como se reivindica en la presente invención sea obvio.

V. CONCLUSIONES

Con las enmiendas realizadas a las reivindicaciones y los argumentos proporcionados anteriormente, el solicitante considera subsanadas las objeciones del examinador.



En consecuencia y luego de haber presentado los argumentos necesarios y haber realizado las modificaciones pertinentes en el capítulo reivindicatorio y descriptivo de la presente invención, queda evidenciado que la invención cumple con los requisitos de patentabilidad definidos en la Decisión 486 de 2000.

Cordialmente,

Juan Carlos Cuesta Quintero

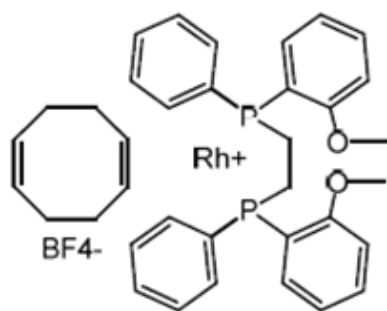
C.C. 79.339.809 de Bogotá

T.P. 43.273 del C.S. de la J.

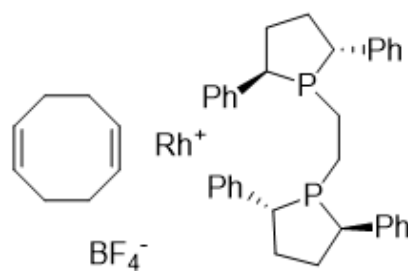
Anexos: Comprobante de pago por modificación de la solicitud.
Reivindicaciones modificadas (marcadas y limpias).
Descripción modificada (marcada y limpia).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) o del (S)-6-hidroxitriptófano, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor aminoácido olefínico, donde dicha etapa de hidrogenación enantioselectiva es catalizada por un catalizador quiral, donde dicho catalizador quiral es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)



HDP 30.2758



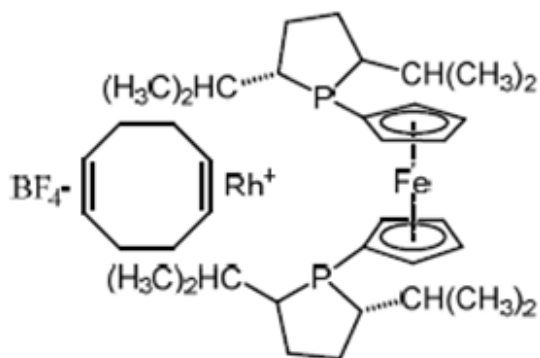
(R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)



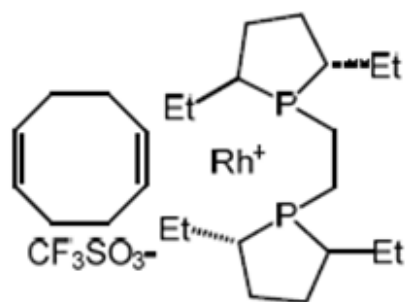
(R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)



(R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-)

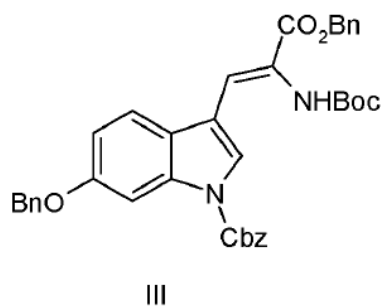
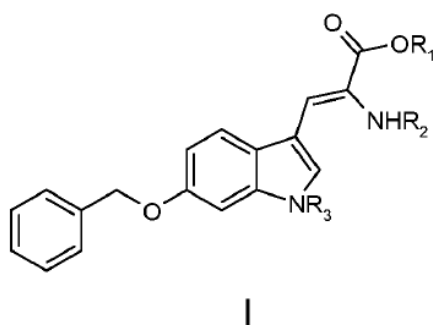


(R,R)-DuPhos-ferroceno-Et₂ (BF₄-)



(R,R)-DuPhos-alquilo (CF₃SO₃-),

y en el que dicho precursor aminoácido olefínico es un compuesto deshidroaminoácido seleccionado del grupo que consiste en los compuestos I y III:



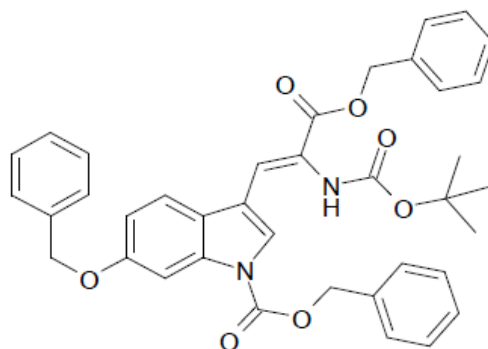
en los que

R₁ se selecciona entre: H, alquilo, alquenilo, arilalquilo opcionalmente sustituido,

R₂ se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

R₃ se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz.

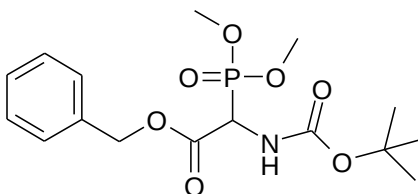
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho precursor aminoácido olefínico es el compuesto HDP 30.2824



HDP 30.2824

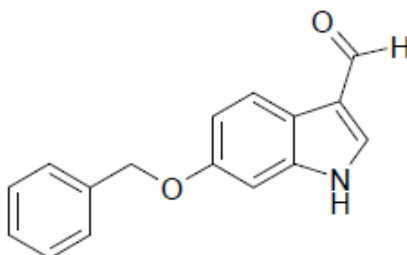
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho catalizador quiral es el compuesto HDP 30.2758 o (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la síntesis de dicho precursor aminoácido olefínico comprende el compuesto HDP 30.2822



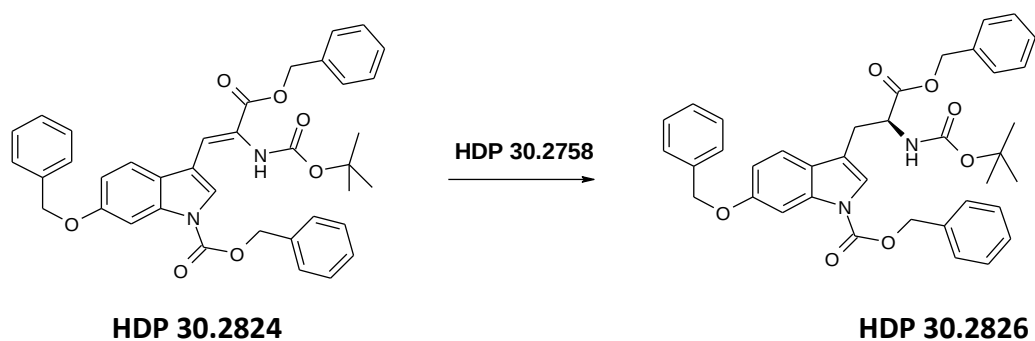
HDP 30.2822.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la síntesis de dicho precursor aminoácido olefínico comprende el compuesto B



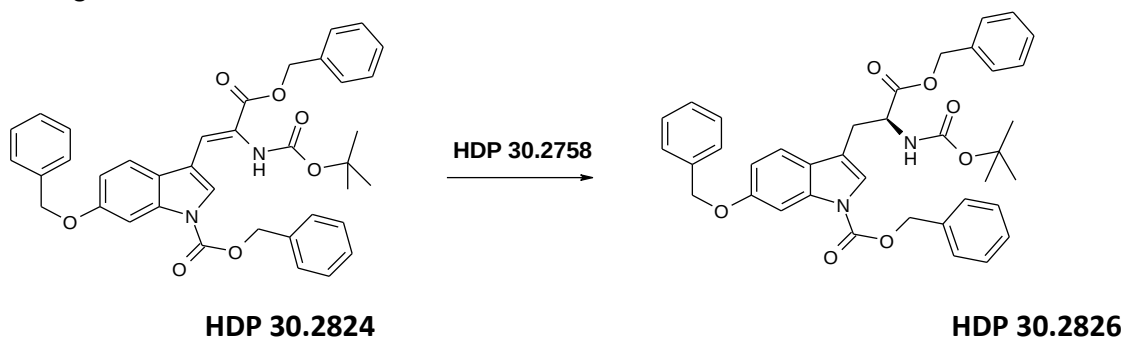
Compuesto B

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa de hidrogenación enantioselectiva



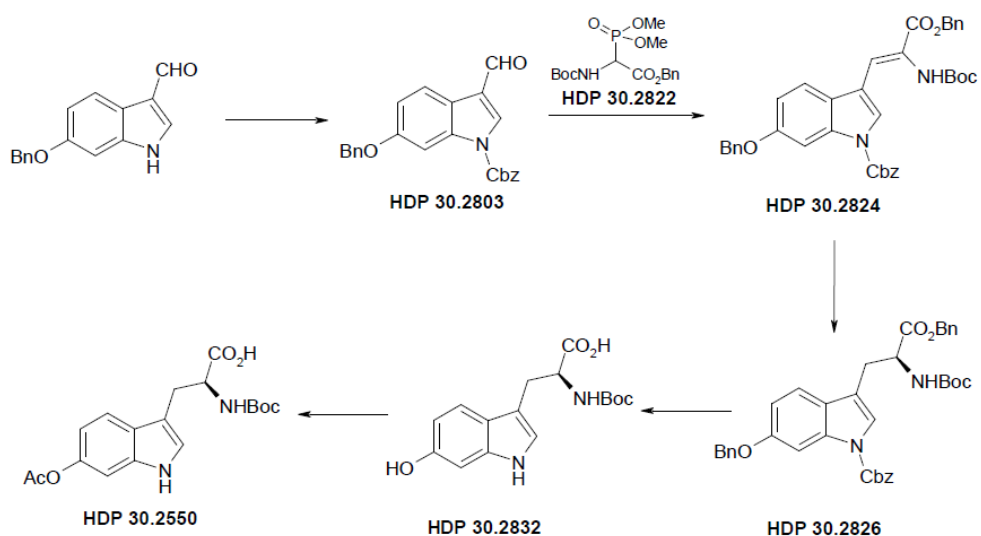
es catalizada por un catalizador quiral seleccionado del grupo que consiste en el compuesto HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-).

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa de hidrogenación enantioselectiva

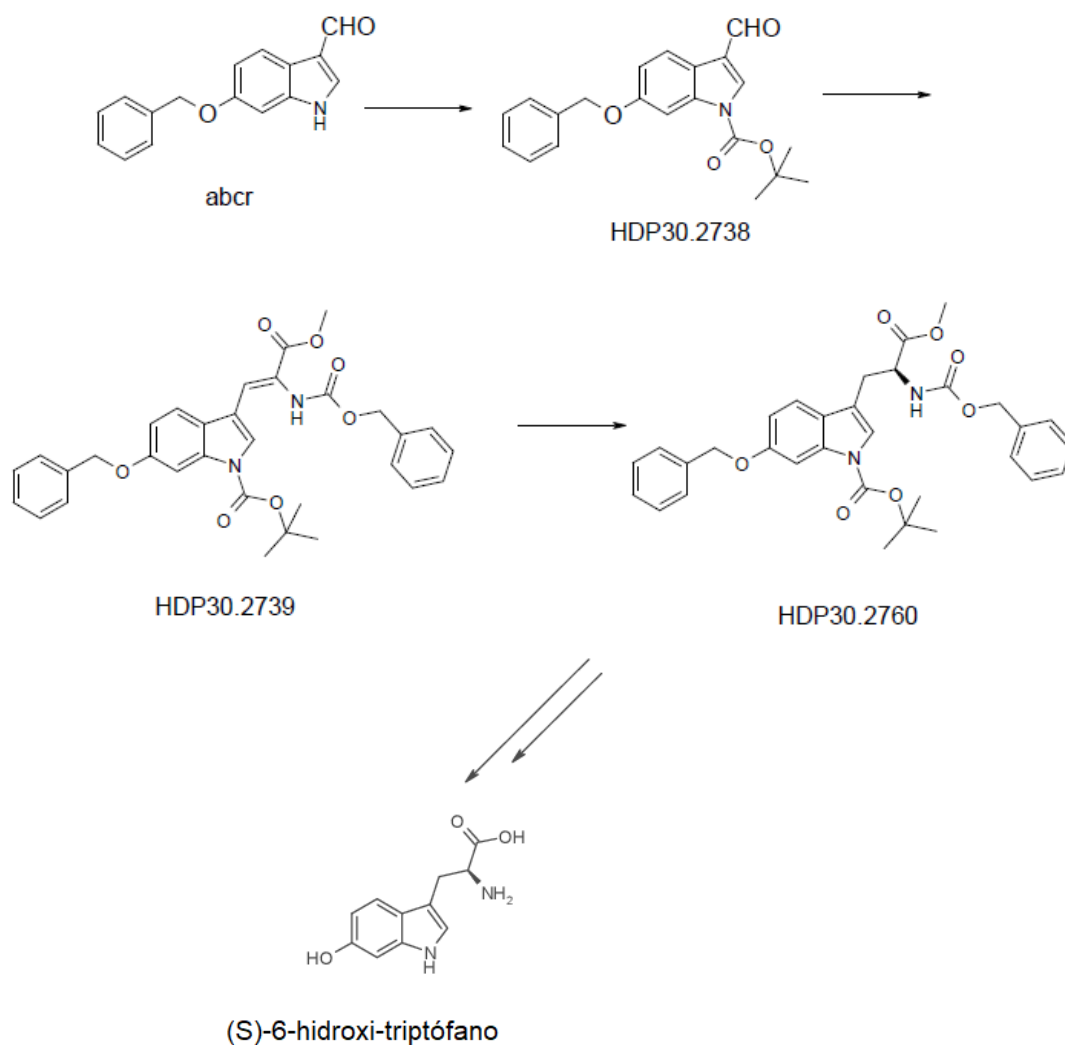


es catalizada por un catalizador quiral tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758).

8. El procedimiento para la síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

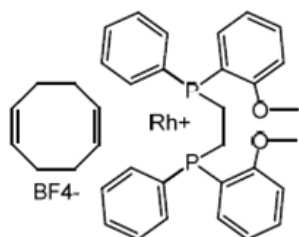


9. El procedimiento para la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

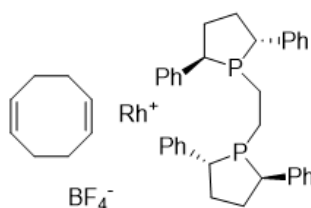


REIVINDICACIONES

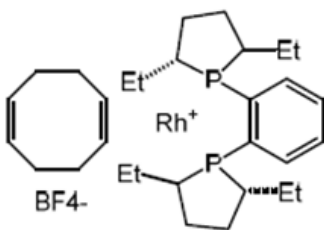
1. Procedimiento para la síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) o del (S)-6-hidroxitriptófano, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor aminoácido olefínico, donde dicha etapa de hidrogenación enantioselectiva es catalizada por un catalizador quiral, donde dicho catalizador quiral es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno-Et₂ (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)



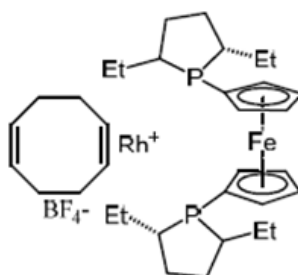
HDP 30.2758



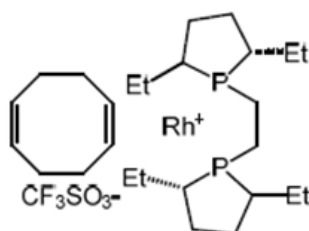
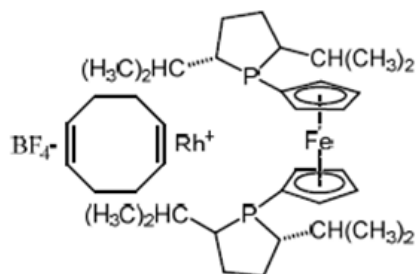
(R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)



(R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)



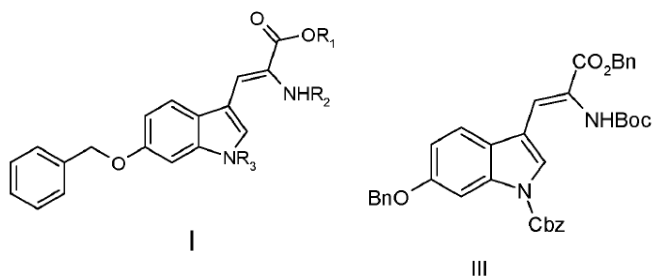
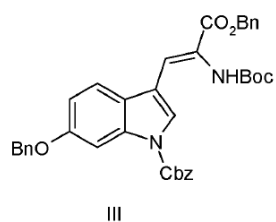
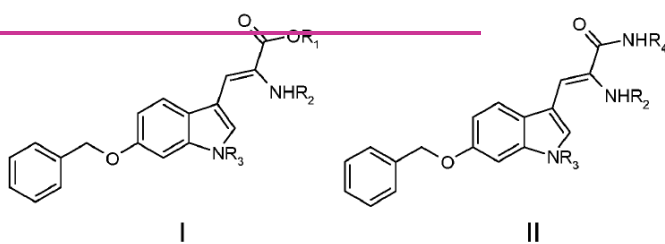
(R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-)



(R,R)-DuPhos-ferroceno-Et₂ (BF₄⁻)

(R,R)-DuPhos-alquilo (CF₃SO₃⁻)

2. — El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, y en el que dicho precursor aminoácido olefínico es un compuesto deshidroaminoácido seleccionado del grupo que consiste en los compuestos I, II y III:



R₁ se selecciona entre: H, alquilo, alquenilo, arilalquilo opcionalmente
tuido,

R₂ se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

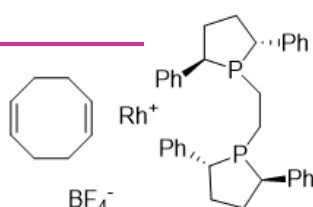
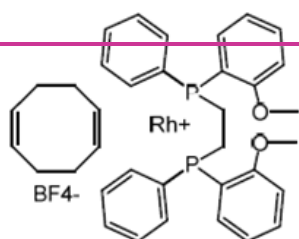
R₃ se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

~~R₄ es un residuo aminoácido.~~

CC(C)(C)OC(=O)NC(=O)C=Cc1c[nH]c2cc(OCc3ccccc3)ccc12

HDP 30.2824

4. ~~El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho catalizador quiral es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en el compuesto HDP-30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF₄), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF₄), (R,R)-DuPhos-ferroceno-Et₂ (BF₄), (R,R)-DuPhos-alkilo (CF₃SO₂) y (R,R)-fenil-DuPhos-alkilo (BF₄)~~

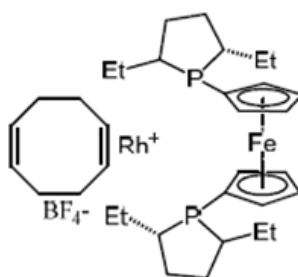
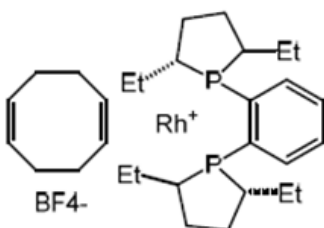


HDP 30.2758

(R,R)-fenil-DuPhos-alkilo (BF_4^-)

Con formato: Español (España)

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

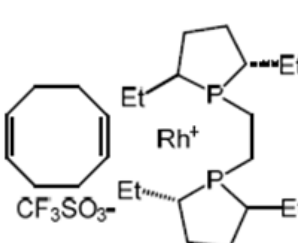
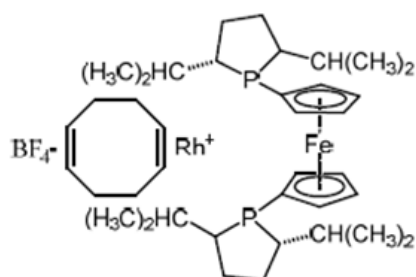


(R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)

(R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-)

Con formato: Español (España)

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm



(R,R)-DuPhos-ferroceno-Et₂ (BF_4^-)

(R,R)-DuPhos-alkilo (CF_3SO_3^-)

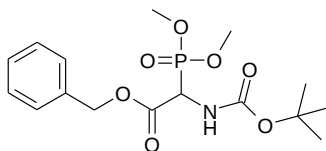
Con formato: Español (España)

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

35. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho catalizador quiral es el compuesto HDP 30.2758 o (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-).

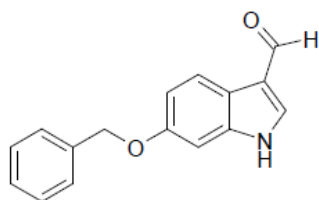
46. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-35,

en el que la síntesis de dicho precursor aminoácido olefínico comprende el compuesto HDP 30.2822



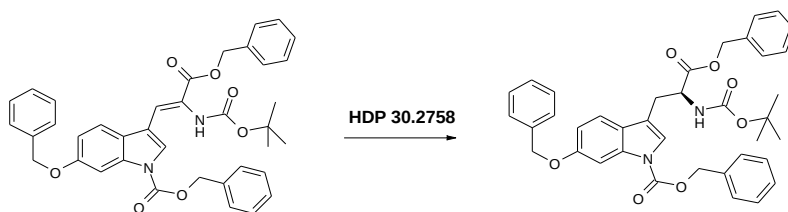
HDP 30.2822.

57. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 46, en el que la síntesis de dicho precursor aminoácido olefínico comprende el compuesto B



Compuesto B

68. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-57, en el que la etapa de hidrogenación enantioselectiva



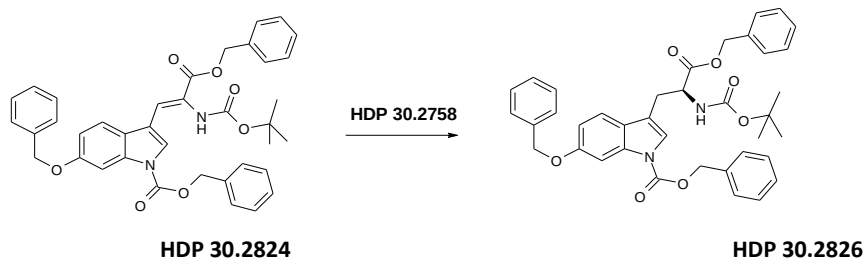
HDP 30.2824

HDP 30.2826

Con formato: Español (España)

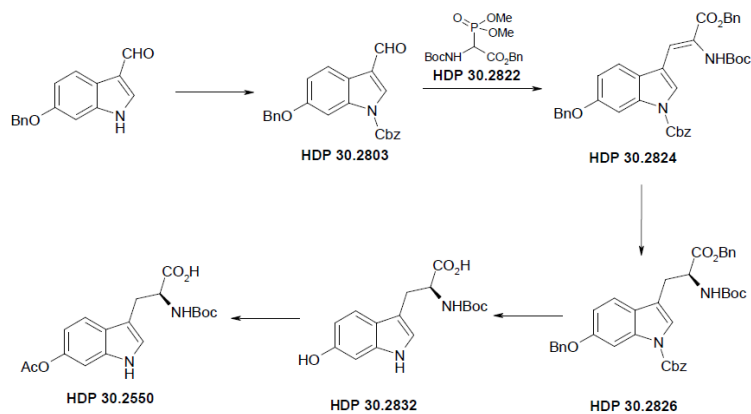
es catalizada por un catalizador quiral seleccionado del grupo que consiste en el compuesto HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-).

79. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación **68**, en el que la etapa de hidrogenación enantioselectiva



es catalizada por un catalizador quiral tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758).

819. El procedimiento para la síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-**79**, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:



911. El procedimiento para la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-**79**, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

SÍNTESIS DEL (S)-6-HIDROXITRIPTÓFANO Y (S)-6-ACETILOXI-N-TERC-BUTOXICARBONIL TRIPTÓFANO MEDIANTE HIDROGENACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE PRECURSORES AMINOÁCIDO OLEFÍNICOS EMPLEANDO CATALIZADORES QUIRALES

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos y compuestos para sintetizar derivados de amanitina. La invención se refiere en particular a procedimientos para sintetizar derivados del (S)-6-hidroxitriptófano que se pueden usar como bloques de construcción en la síntesis de derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco. Asimismo, la invención se refiere también a compuestos intermedios de dichas rutas de síntesis para su uso en la síntesis de derivados de amanitina y conjugados amatoxina-fármaco así como al uso de catalizadores particulares adecuados para mediar en dichas rutas de síntesis.

15

Antecedentes

Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos que se encuentran en las setas *Amanita phalloides* (véase la Fig. 1). Las amatoxinas específicamente inhiben la ARN polimerasa II dependiente del ADN en células de mamíferos y, por tanto, también la transcripción y la biosíntesis de proteínas en las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre la amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte (KD = 3 nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento, haciendo que la recuperación de una célula afectada sea, por tanto,

25

poco probable. Cuando la inhibición de la transcripción dura suficiente tiempo, la célula experimenta la muerte celular programada (apoptosis).

Las amatoxinas se pueden aislar de carpóforos de la seta *Amanita phalloides* recolectada o a partir de cultivos puros (Zhang P, *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 15 Nov 2005; 252(2): 223-8. Epub 15 Sep 2005). Sin embargo, las cantidades de amatoxinas que se pueden obtener son más bien bajas (en el intervalo de aproximadamente 0,3-3 mg/g de materia seca a partir de carpóforos naturales, y de aproximadamente un 10 % de ellas a partir de un cultivo puro) y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxina naturales es limitada. Como alternativa, las amatoxinas se pueden obtener mediante fermentación usando un basidiomiceto (Muraoka S, y Shinozawa T., *J Biosci Bioeng.* 2000; 89(1): 73-6) o *A. fissa* (Guo XW, *et al.*, Jun 2006; 46(3): 373-8). Los rendimientos son también bajos y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxina naturales es asimismo limitada. Por último, se han preparado amatoxinas mediante síntesis total o parcial (por ejemplo, Zanotti G, Mähringer C, y Wieland T., *Int J. Pept Protein Res.* Oct 1987; 30 (4): 450-9; Zanotti G, Wieland T, Benedetti E, Di Blasio B, Pavone V, y Pedone C., *Int J. Pept Protein Res.* Sep 1989; 34(3): 222-8). Como alternativa, el uso de rutas totalmente sintéticas para dar amatoxinas puede proporcionar el suministro de mayores cantidades de amatoxinas requeridas para usos terapéuticos y puede proporcionar la construcción de una serie de nuevas variantes de amatoxina mediante el uso de materiales de partida apropiados como bloques de construcción.

Las amanitinas de origen natural tales como la α -amanitina, la β -amanitina o la γ -amanitina comprenden una función hidroxilo (-OH) fenólica en la posición 6'

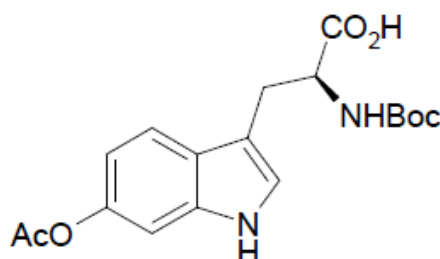
del triptófano, el cual representa el aminoácido 4 en el octapéptido cíclico de la amanitina, que permite el acoplamiento de un conector a la amatoxina (véase la Fig. 1). Las macromoléculas de unión a la diana, tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden acoplar entonces a través de dicho conector a fin de
5 generar conjugados, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco. El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para terapia tumoral ya se había explorado en 1981 acoplando un anticuerpo anti-Thy 1.2 a la α -amanitina usando un conector unido al anillo de indol del triptófano (Trp, aminoácido 4; véase la figura 1) mediante diazotación (Davis & Preston, *Science* 1981, 213, 1385-1388).

10 Con los compuestos de amanitina totalmente sintéticos investigados actualmente, la incorporación de un triptófano funcionalizado para el acoplamiento de elementos conectores solo se ha conseguido muy recientemente. Antes de ello, por tanto, los conectores se acoplaban a las amanitinas totalmente sintéticas predominantemente en las posiciones del
15 aminoácido 1 (ácido aspártico) o en el nitrógeno del indol (N1) del aminoácido 4 (triptófano). Puesto que se ha demostrado que son muy diferentes los perfiles de actividad biológica de las amanitinas acopladas en diferentes posiciones de anclaje de la estructura de amanitina, resulta de gran interés poder proporcionar triptófano sintético hidroxilado en la posición 6', es decir, correspondiente a la α -
20 amanitina, β -amanitina o γ -amanitina naturales, como bloque de construcción que se puede incorporar en el transcurso de la síntesis de la amanitina.

La introducción sintética de triptófano en la estructura de la amanitina se puede llevar a cabo mediante la reacción de Savige-Fontana (Savige & Fontana, 1980, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 15(3): 285-97). De acuerdo con esta reacción, el
25 triptófano se convierte en una mezcla de cis-2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-

hexahidropirrol[2,3-b]indol y trans-2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol protegidos con Boc y se incorpora después en la secuencia de aminoácidos del precursor lineal de la amanitina.

Para la producción totalmente sintética de la amanitina, la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano y la síntesis de los bloques de construcción respectivos son de esencial importancia. En particular, uno de estos bloques de construcción de esencial importancia es el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550).



HDP 30.2550

Hasta ahora, no se ha descrito en la técnica anterior una ruta de síntesis eficaz y satisfactoria para el (S)-6-hidroxitriptófano y sus bloques de construcción. En particular, no ha habido disponible una ruta de síntesis que proporcionara la pureza necesaria de los enantiómeros (L o S) de este derivado del aminoácido. Se podrían considerar principalmente diferentes opciones básicas de síntesis. Una primera opción podría ser la cristalización de la forma racémica con ácidos o bases quirales auxiliares. Sin embargo, solo se podría obtener un rendimiento máximo del 50 % con este procedimiento. Una segunda opción es una producción enzimática; sin embargo, el empleo de este método requiere mucho tiempo, los resultados son inciertos y la reproducibilidad es baja.

Un objeto de la presente invención, por tanto, es proporcionar un

procedimiento eficaz, sencillo y reproducible para sintetizar el (S)-6-hidroxitriptófano, derivados del mismo y bloques de construcción del mismo. Preferentemente, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento eficaz para sintetizar el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) con una pureza enantiomérica suficientemente elevada.

Como objeto adicional de la presente invención, se debe proporcionar el uso de dicho (S)-6-hidroxitriptófano y sus derivados, preferentemente el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, como bloques de construcción para la producción totalmente sintética de amatoxinas.

Estos y otros objetos se consiguen mediante los procedimientos y medios de acuerdo con las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con realizaciones específicas.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano, el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano y sus derivados y bloques de construcción para la síntesis de los mismos. La presente invención proporciona además compuestos y bloques de construcción para su uso en la síntesis de la amanitina o derivados de la amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

A continuación se comentarán con más detalle la invención y las ventajas generales de sus características.

Descripción de las figuras

25 La **Fig. 1** muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los

números en negrita (1 a 8) designan la numeración convencional de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. Las designaciones convencionales de los átomos en los aminoácidos 1, 3 y 4 se muestran también (letras griegas α a γ , letras griegas α a δ y números 1' a 7', respectivamente).

5 La **Fig. 2** ilustra la síntesis del compuesto HDP 30.2822.

La **Fig. 3** ilustra la síntesis del compuesto HDP 30.2758.

La **Fig. 4** ilustra la síntesis de los compuestos HDP 30.2550 y HDP 30.2555.

La **Fig. 5** muestra las composiciones estructurales de los catalizadores usados para la conversión del compuesto HDP 30.2824 al HDP 30.2826.

10 La **Fig. 6** muestra los resultados de la espectroscopía de RMN ^1H del compuesto HDP 30.2826 (400 MHz, CDCl_3 , δ = ppm).

La **Fig. 7** muestra los resultados de la espectroscopía de RMN ^{13}C del compuesto HDP 30.2826 (100 MHz, CDCl_3 , δ = ppm).

Descripción detallada de la invención

15 Antes de describir la invención con detalle, se ha de entender que la presente invención no se limita a los elementos particulares de los medios descritos o las etapas de proceso de los procedimientos descritos ya que tales medios y procedimientos pueden variar. Se ha de entender también que la terminología usada en la presente invención tiene como fin describir
20 realizaciones particulares solamente y no se pretende que sea limitante. Cabe señalar que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, se ha de entender que, en caso de que se den intervalos
25 de los parámetros que están delimitados por valores numéricos, se considera

que los intervalos incluyen dichos valores de limitación.

Se ha de entender igualmente que las realizaciones divulgadas en el presente documento no se pretende que sean entendidas como realizaciones individuales que no se relacionan entre sí. Las características comentadas
5 respecto a una realización se pretende que sean divulgadas también con relación a otras realizaciones mostradas en el presente documento. Si en un caso no se divulga una característica específica con una realización, pero sí con otra, el experto en la técnica entenderá que esto no significa necesariamente que dicha característica no pretenda ser divulgada con dicha otra realización. El experto en
10 la técnica entenderá que la clave de la presente solicitud es divulgar dicha característica también para la otra realización, aunque esto no se haya realizado por cuestiones de claridad y para mantener la solicitud con un volumen manejable.

Además, el contenido de los documentos de la técnica anterior a los que se
15 hace referencia en el presente documento se incorpora al mismo por referencia. Esto se refiere en particular a documentos de la técnica anterior que divulgan procedimientos convencionales o de rutina. En tal caso, la incorporación por referencia tiene como fin principal proporcionar una suficiente divulgación habilitante y evitar repeticiones tediosas.

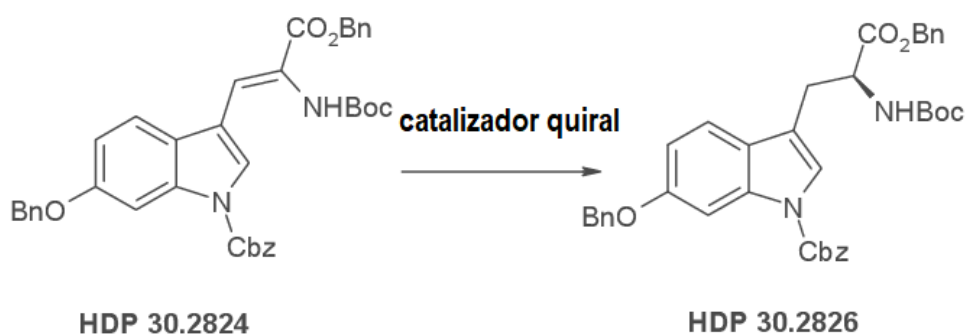
20 Una producción a gran escala que sea industrialmente factible del (S)-6-hidroxitriptófano como el comprendido en la α -, β - y γ -amanitina naturales, y/o formas químicamente protegidas del mismo, requiere un procedimiento de síntesis eficaz, sencillo y reproducible. Por primera vez, los inventores fueron capaces de proporcionar tal procedimiento de producción sencillo y eficaz,
25 mediante el empleo de una hidrogenación enantioselectiva de precursores

aminoácido olefínicos. Usando catalizadores quirales específicos, descubrieron de forma sorprendente que tal tipo de reacción podía dar una pureza enantiomérica muy elevada.

La sencilla ruta sintética divulgada proporciona un (S)-6-hidroxitriptófano que es totalmente idéntico a la correspondiente estructura natural. La capacidad para usar dicho compuesto y formas protegidas del mismo para una producción industrial a gran escala de amanitina reducirá considerablemente los costes y aumentará la eficacia, por ejemplo, de la fabricación de una α -, β - o γ -amanitina sintética al igual que de conjugados anticuerpo-fármaco basados en amatoxina para aplicaciones terapéuticas.

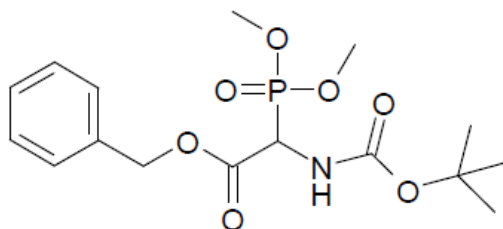
De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) o del (S)-6-hidroxitriptófano, comprendiendo dicho procedimiento al menos una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico mediante el uso de al menos un catalizador quiral.

En una realización del procedimiento reivindicado, dicho precursor olefínico usado para la hidrogenación asimétrica es un precursor aminoácido insaturado olefínico. Preferentemente es el compuesto HDP 30.2824.



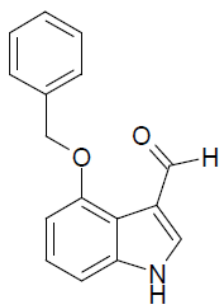
En una realización del procedimiento reivindicado, dicho precursor olefínico

se sintetiza usando el siguiente compuesto:

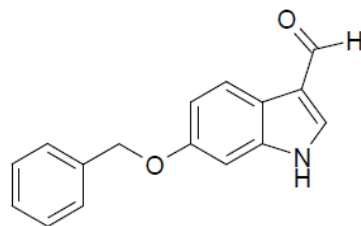


HDP 30.2822

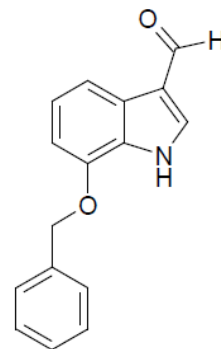
Dicho precursor olefínico se puede sintetizar adicionalmente usando cualquiera de los compuestos A, B, o C.



A



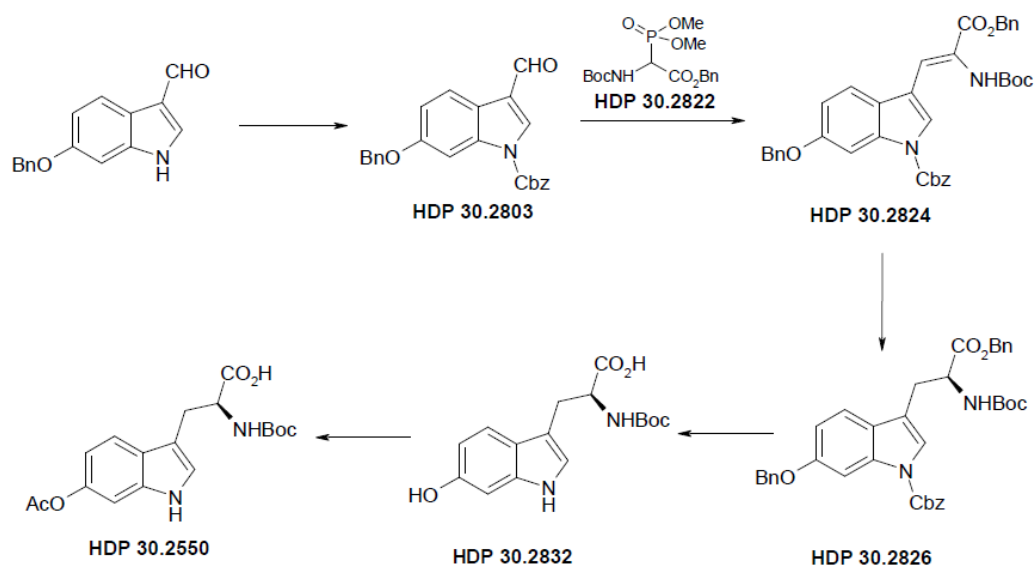
B



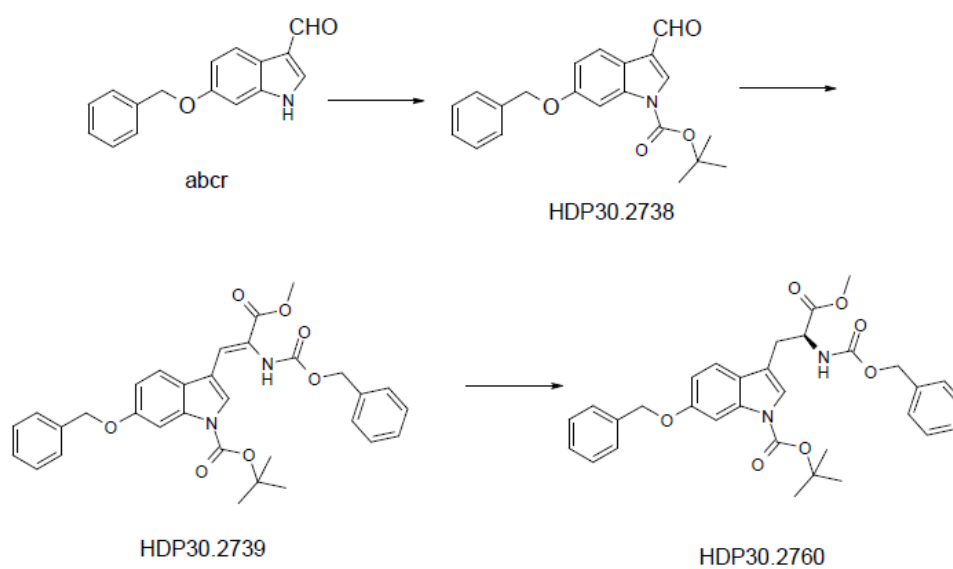
C

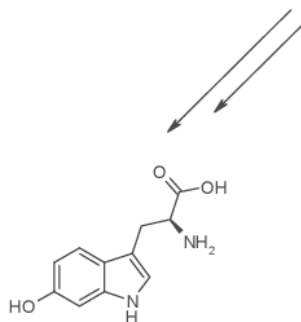
5

En una realización adicional del procedimiento reivindicado, dicho procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:



En otra realización adicional del procedimiento reivindicado, dicho procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:





(S)-6-hidroxi-triptófano

En el contexto de la presente invención, el término "amatoxina" incluye todos los péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos aislados del género *Amanita* y descritos en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., *CRC Crit Rev Biochem.* 5 (1978) 185-260), además todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura original de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos en los que el resto tioéter sulfóxido está sustituido por un sulfuro, sulfona, tioéter, o por átomos distintos al azufre, por ejemplo, un átomo de carbono como en un carboanálogo de la amanitina. Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamíferos. Las amatoxinas preferentes son aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, o un grupo tiol o que captura tiol) que puede reaccionar con moléculas conectoras o moléculas de unión a la diana, tal como se ha definido anteriormente.

En el contexto de la presente invención, el término "amanitinas" se refiere particularmente a la estructura bicíclica que está basada en un residuo de ácido aspártico o asparagina en la posición 1, un residuo de prolina, particularmente un residuo de hidroxiprolina, en la posición 2, una isoleucina, hidroxisoleucina o dihidroxisoleucina en la posición 3, un residuo de triptófano o hidroxitriptófano en la posición 4, residuos de glicina en las posiciones 5 y 7, un residuo de isoleucina en posición 6 y un residuo de cisteína en la posición 8, en particular un derivado de cisteína que se oxida a un derivado sulfóxido o sulfona (para la numeración y los ejemplos representativos de amanitinas véase la Figura 1) e incluye, además, todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura original de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos en los que, en cada caso, dicho derivado o análogo es funcionalmente activo mediante la inhibición de la ARN polimerasa II de mamíferos.

El término "resto de unión a la diana,", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que se puede unir específicamente a una molécula diana o a un epítipo diana. Los restos de unión a la diana preferentes en el contexto de la presente invención son (i) anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a anticuerpos; (ii) proteínas similares a anticuerpos; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a la diana" adecuados para su uso en la presente invención tienen

normalmente una masa molecular de 40 000 Da (40 kDa) o superior.

Un "conector" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula que aumenta la distancia entre dos componentes, por ejemplo, para aliviar la interferencia estérica entre el resto de unión a la diana y la amatoxina que, de otro modo, puede disminuir la capacidad de la amatoxina para interactuar con la ARN polimerasa II. El conector puede servir para otro fin ya que puede facilitar la liberación de la amatoxina específicamente en la célula a la que se dirige el resto de unión a la diana. Es preferente que el conector y, preferentemente el enlace entre el conector y la amatoxina por un lado y el enlace entre el conector y el anticuerpo por el otro lado, sea estable en condiciones fisiológicas fuera de la célula, por ejemplo la sangre, mientras que se puede escindir dentro de la célula, en particular dentro de la célula diana, por ejemplo una célula cancerosa o una célula inmunitaria. A fin de proporcionar esta estabilidad selectiva, el conector puede comprender funcionalidades que son preferentemente sensibles al pH o sensibles a las proteasas. Como alternativa, el enlace que une el conector al resto de unión a la diana puede proporcionar la estabilidad selectiva. Preferentemente un conector tiene una longitud de al menos 1, preferentemente una longitud de 1-30 átomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 átomos) en el que un lado del conector ha reaccionado con la amatoxina y el otro lado con un resto de unión a la diana. En el contexto de la presente invención, un conector es preferentemente un grupo alquilo C₁₋₃₀, heteroalquilo C₁₋₃₀, alquenilo C₂₋₃₀, heteroalquenilo C₂₋₃₀, alquinilo C₂₋₃₀, heteroalquinilo C₂₋₃₀, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo o heteroaralquilo, opcionalmente sustituido. El conector puede contener uno o más

elementos estructurales tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, hidrocarburo y similares. El conector puede contener también combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el conector más de una vez, por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el conector puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el conector se ha de unir en una sola etapa o bien en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y al resto de unión a la diana. Para tal fin, el conector llevará dos grupos, preferentemente en los extremos proximal y distal, los cuales

5 (i) pueden formar un enlace covalente con un grupo, preferentemente un grupo activado de una amatoxina, o el péptido de unión a la diana, o (ii) se activan o se pueden activar para formar un enlace covalente con un grupo de una amatoxina. De acuerdo con esto, si el conector está presente, es preferente que los grupos químicos estén en un extremo distal y proximal del conector, que son el resultado

10 de tal reacción de acoplamiento, por ejemplo, un éster, un éter, un uretano, un enlace péptido, etc. La presencia de un "conector" es opcional, es decir, la toxina puede estar unida directamente a un residuo del resto de unión a la diana en algunas realizaciones del conjugado resto de unión a la diana-toxina.

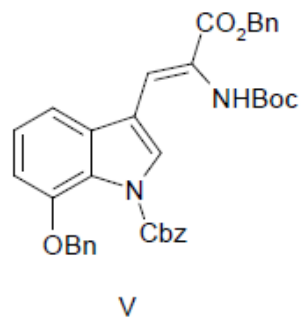
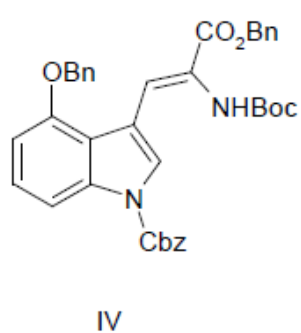
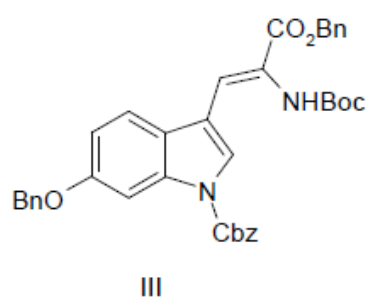
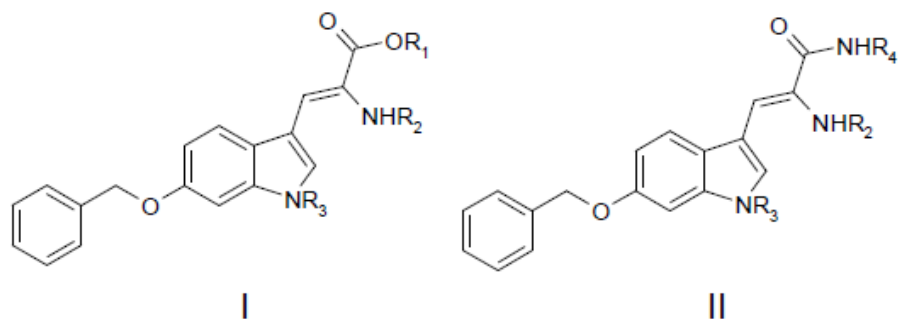
De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere al

20 (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550), al (S)-6-hidroxi-triptófano o a cualquiera de los compuestos precursores de acuerdo con la presente invención para su uso en la síntesis de amanitina o derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto

25 deshidro-aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en los

compuestos I, II, III, IV y V,



en los que

- 5 R1 se selecciona entre: H, alquilo, alqueniilo, arilalquilo opcionalmente sustituido

R2 se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

R3 se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

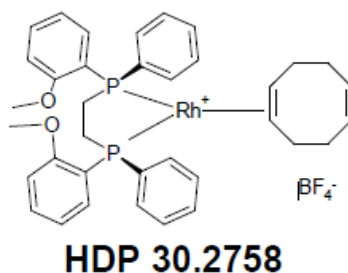
R4 es un residuo aminoácido

para su uso en la síntesis de amanitina o derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

Los compuestos III, IV y V son preferentes.

- 5 Asimismo, los inventores descubrieron de forma sorprendente que a partir de un panel mayor de compuestos catalíticos ensayados para la hidrogenación asimétrica (véase la Tabla 1, Fig. 5) el catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, proporcionaba la mayor pureza enantiomérica que era > 98 %).

10



- Se encontró que solamente el catalizador HDP 30.2758 daba una pureza muy elevada de más del 98 % de enantiómeros (S). El resto de catalizadores, a excepción del (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-) daban purezas considerablemente menores de un 50-70 % de enantiómeros (S). Además, la producción global absoluta del compuesto y las tasas de rendimiento eran mucho peores que con el HDP 30.2758.

- Los catalizadores ensayados para la hidrogenación asimétrica y los niveles de pureza del enantiómero (S) respectivos se recogen en la Tabla 1.

20

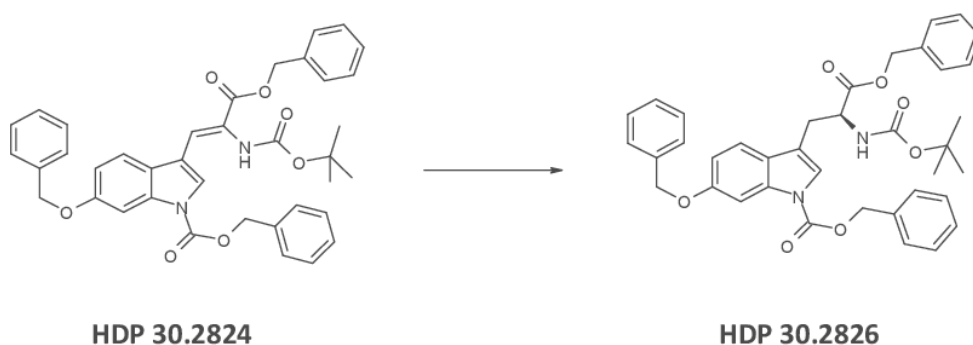
Tabla 1: Evaluación comparativa de varios catalizadores usados para la

hidrogenación enantioselectiva

Catalizador #	Identidad	Nivel de pureza
1	HDP 30.2758	> 98 % de pureza quiral
2	(R,R)-Et-DUPHOS (CF_3SO_3^-)	sin conversión
3	(R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)	90-95 % de pureza quiral
4	(R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-)	65 % de pureza quiral
5	(R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-)	55 % de pureza quiral
6	(R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-)	73 % de pureza quiral
7	(R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)	< 60 % de pureza quiral

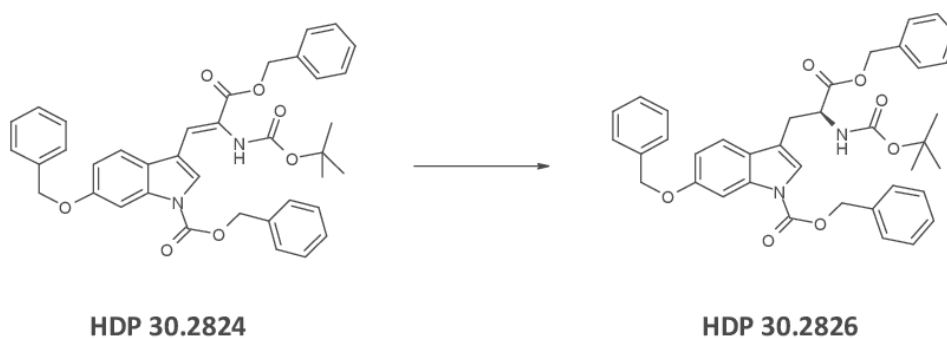
Así, de acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en el compuesto

5 HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-) como catalizador para la hidrogenación en la siguiente reacción:



10 De acuerdo con este aspecto, la presente invención preferentemente se refiere al uso de los catalizadores quirales tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758) o (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), más

preferentemente al uso del catalizador quiral tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758) como catalizador para la hidrogenación en la siguiente reacción:



- 5 La incorporación de derivados de triptófano como bloques de construcción en precursores de amanitina se ha descrito previamente en el documento PCT/EP2018/071268, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Como tal, el HDP 30.2115 se puede sintetizar mediante la incorporación de un bloque de construcción Hpi no sustituido en una molécula
- 10 precursora peptídica de amanitina para dar una amanitina sintética, el bloque de construcción 6-hidroxi sustituido HDP 30.2555 se puede usar para la síntesis de amanitinas 6-hidroxi sustituidas de acuerdo con la presente invención.

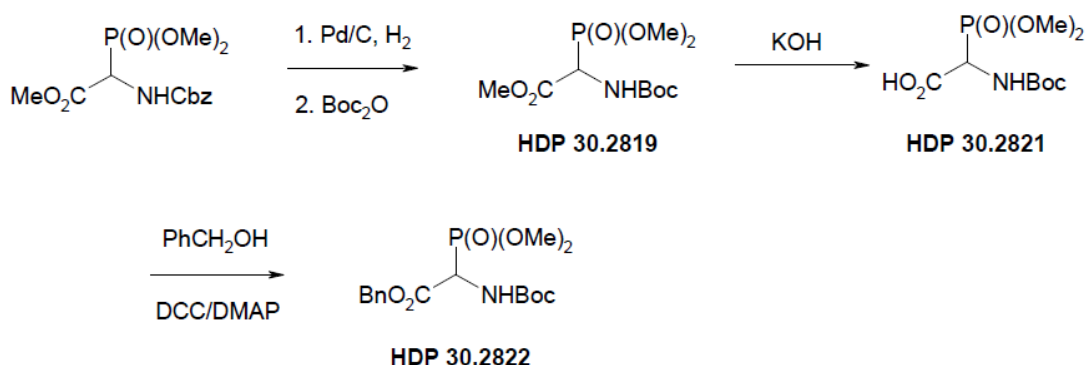
Ejemplos

- Aunque la invención se ilustra y se describe con detalle en las figuras y en
- 15 la descripción anterior, tal ilustración y descripción han de considerarse ilustrativas o a modo de ejemplo y no de forma restrictiva; la invención no se limita a las realizaciones divulgadas. Otras variaciones a las realizaciones divulgadas pueden ser comprendidas y realizadas por los expertos en la técnica al poner en práctica la invención reivindicada, a partir del estudio de las figuras,
- 20 la descripción, y las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la

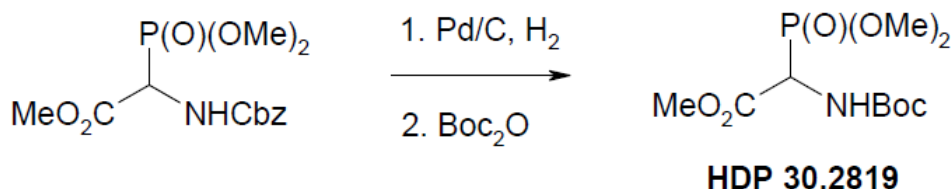
expresión "que comprende" no excluye otros elementos o etapas y los artículos indefinidos "un", "uno" o "una" no excluyen una pluralidad. El mero hecho de que determinadas mediciones se enumeren en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que no se pueda usar ventajosamente una
 5 combinación de estas mediciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no se debe interpretar que limita el alcance de las mismas.

Ejemplo 1: Síntesis del precursor fosfonio (bloque de construcción), HDP 30.2822.

La síntesis del precursor fosfonio (bloque de construcción), HDP 30.2822,
 10 se llevó a cabo tal como se ha descrito (*CHEMISTRY A European Journal*, 2018, Vol. 24, n.º 7, págs. 1544-1553):



Ejemplo 1.1: Preparación del éster trimetílico de la (R,S)-Boc-α-fosfonoglicina, HDP 30.2819



15

Se hidrogenaron 5,0 g (15,1 mmol) del éster trimetílico de la (R,S)-N-Cbz-

fosfonoglicina (n.º CAS: 88568-95-0) con 1,4 g de Pd/C al 10 % en 100 ml de metanol a 1 atm hasta que se determinó la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol 15:1). La reacción finalizó en 3 horas. El catalizador se separó mediante filtración sobre un lecho de Celite® (tierra de diatomeas) y la
 5 solución metanólica de la amina libre se concentró al vacío para dar un aceite incoloro (2,9 g). El aceite bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Se disolvieron 2,9 g del producto de hidrogenación bruto en 20 ml de diclorometano y se trataron con 3,23 ml (15,1 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo (Boc₂O). Después de 17 horas de agitación a temperatura ambiente en
 10 atmósfera de argón, la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El aceite incoloro restante cristalizó para dar un sólido blanco (4,3 g). El HDP 30.2819 bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Ejemplo 1.2: Preparación del éster trimetílico de la (R,S)-N-Boc-α-fosfonoglicina HDP 30.2821



15

Se disolvieron 4,3 g (14,3 mmol asumidos) de HDP 30.2819 bruto en 10 ml de 1,4-dioxano y se trataron rápidamente en atmósfera de argón y a temperatura ambiente con 14,5 ml de KOH 1 N. Al cabo de 85 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con 36 ml de agua y se extrajo con 35 ml de acetato de etilo. Se
 20 descartó el extracto de acetato de etilo y la solución acuosa se acidificó hasta pH 3 mediante adición gota a gota de HCl 1 N. La mezcla de reacción se extrajo con 60 ml de acetato de etilo (2x) y se secó sobre MgSO₄. El sólido blanco resultante,

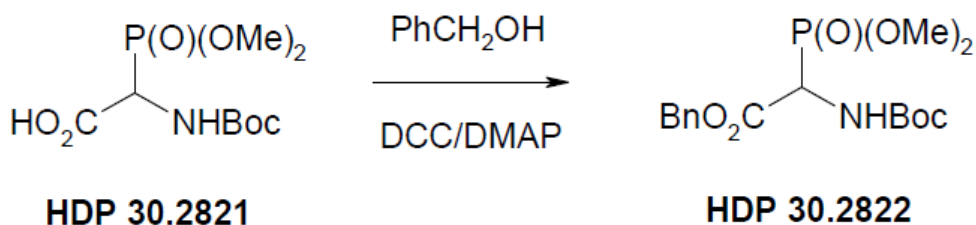
2,1 g de HDP 30.2821, se secó al vacío y se usó directamente sin purificación para la siguiente etapa de reacción.

P.e.: 148-150 °C (Lit. JACS 111, 6244, 1989, p.f.: 154-155 °C)

MS (ESI⁻) encontrado: 282,00 [M-H]⁻; calc.: 283,08 (C₉H₁₈NO₇P)

5 MS (ESI⁻) encontrado: 238,17 [M-CO₂]⁻

Ejemplo 1.3: Preparación del éster bencílico de la (R,S)-N-Boc-α-dimetilfosfono)glicina HDP 30.2822



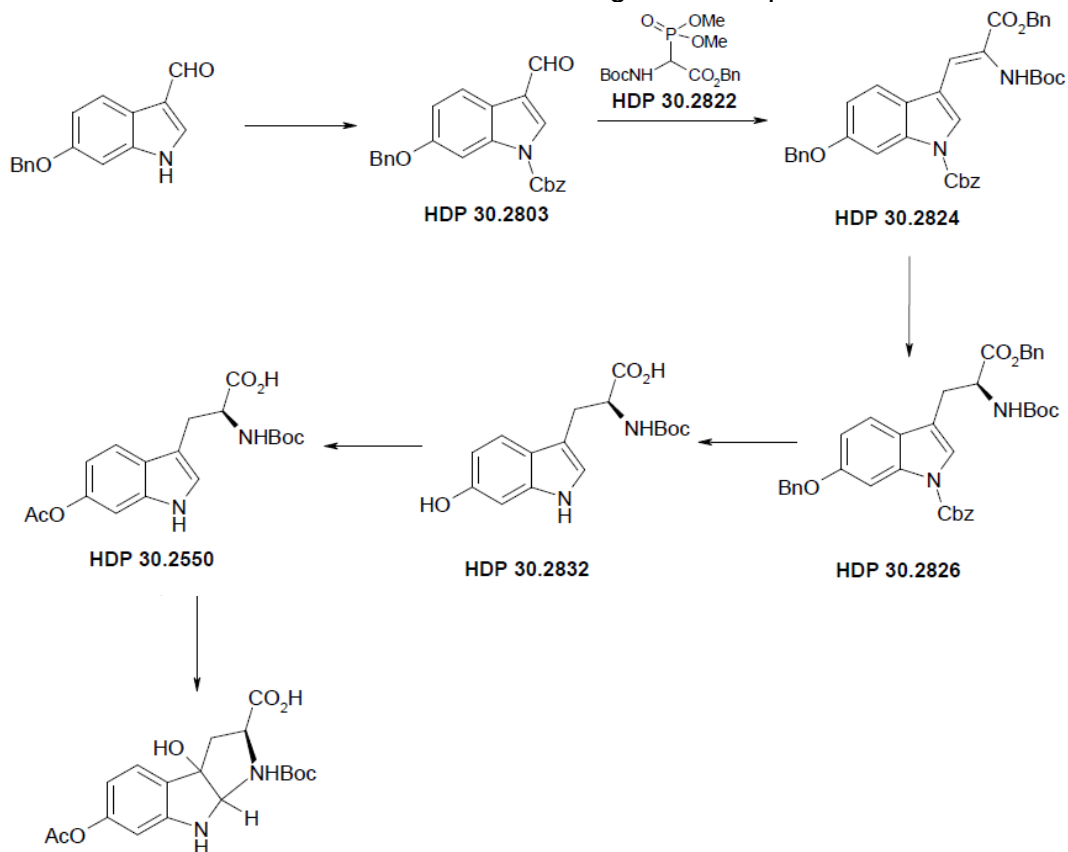
Se trataron 2,0 g (7,1 mmol) de HDP 30.2821 en 90 ml de diclorometano seco con 4,6 ml (44,1 mmol) de alcohol bencílico, 230 mg de DMAP y 2,2 g (10,6 mmol) de DCC disuelto en 7 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 24 horas. Después la urea se separó mediante filtración y la fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 5 % y se secó sobre MgSO₄. Tras la evaporación del diclorometano, el semisólido que quedó se recogió en acetato de etilo y se filtró de nuevo para retirar más urea. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (1:2) y dio tras la evaporación 1,94 g (73 %) de HDP 30.2822 en forma de un sólido blanco.

MS (ESI⁺) encontrado: 373,92 [MH]⁺; calc.: 373,13 (C₁₆H₂₄O₇P)

MS (ESI⁺) encontrado: 396,17 [M+Na]⁺

Ejemplo 2: Síntesis de (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2550, como precursor del HDP 30.2555 (Hidroxi-Hpi)

La ruta de síntesis se resume en el siguiente esquema de síntesis.



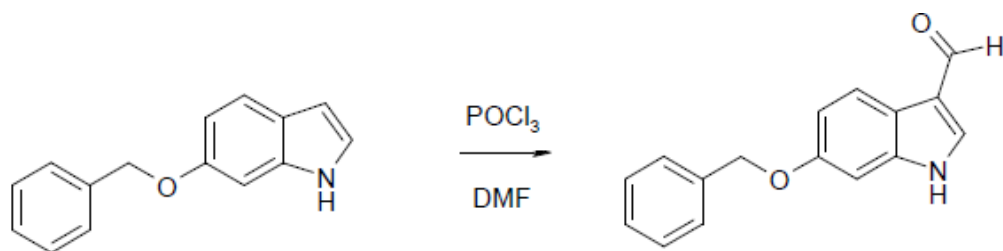
5

HDP 30.2555 (cis/trans)

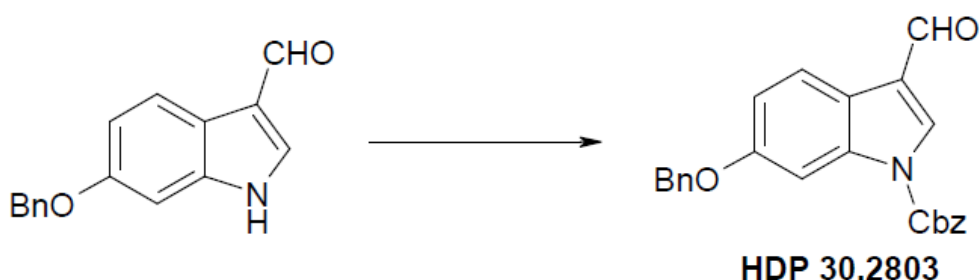
Ejemplo 2.1: Preparación de N-Cbz-6-benciloxi-indol-3-aldehído, HDP 30.2803

El material de partida 6-benciloxi-indol-3-aldehído para la síntesis está disponible en el mercado o se puede producir mediante la reacción de Vilsmeier con rendimientos elevados partiendo del 6-benciloxi-indol.

10



No es necesaria una cromatografía para su purificación.



Se añadió trietilamina (1,66 ml, 11,94 mmol, 1,50 eq) con una jeringa a una
 5 solución de 6-benciloxi-3-formil-indol (2,00 g, 7,96 mmol, 1 eq) y (DMAP) 4-
 dimetilaminopiridina (97,23 mg, 796 μ mol) en diclorometano (20 ml) a 23 °C. Se
 añadió gota a gota cloroformiato de bencilo (1,45 ml, 10,35 mmol, 1,30 eq) con
 una jeringa a la solución. Al cabo de 1 h se añadió con la jeringa otra porción de
 cloroformiato de bencilo (223 μ l, 1,59 mmol, 0,20 eq). Al cabo de 95 min, la
 10 mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (85 ml) y se lavó con una
 solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (85 ml). La capa acuosa se
 extrajo adicionalmente con diclorometano (2 $\times$ 20 ml). Las capas orgánicas
 combinadas se lavaron con cloruro de hidrógeno acuoso (1 N, 85 ml) y la capa
 acuosa resultante se extrajo con diclorometano (2 $\times$ 20 ml). Las capas orgánicas
 15 combinadas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a
 presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía
 ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de
 detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano / acetato de etilo (4:1) a n-

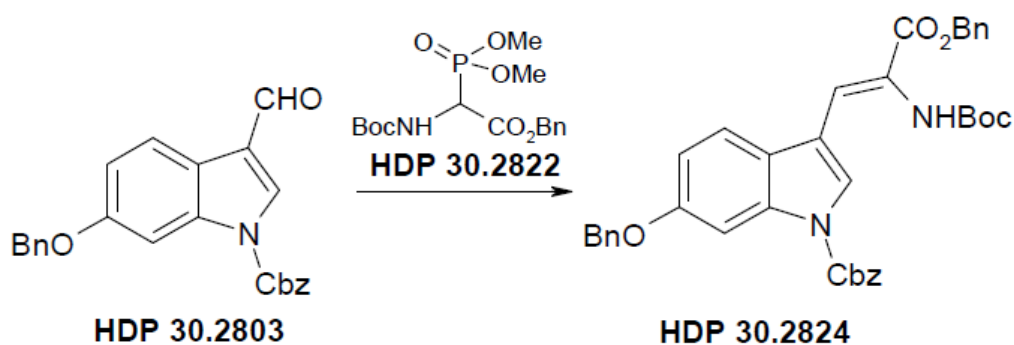
hexano / acetato de etilo (1:1) y dio tras la evaporación 2,33 g (76 %) de HDP 30.2803 en forma de un sólido blanco.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ = ppm)

δ = 5,05 (s, 2H, OCH_2); 5,47 (s, 2H, COOCH_2); 7,06 – 8,14 (m, Ar-H, 14H);

5 10,01 (s, 1H, CHO)

Ejemplo 2.2: Preparación del éster bencílico del ácido [6-benciloxi-1H-(benciloxycarbonil)-3-indol]-2-(terc-butiloxycarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2824



10 Se suspendieron 1,90 g (5,09 mmol) del éster bencílico de la (R,S)-N-Boc- α -dimetilfosfono)-glicina, HDP 30.2822, en atmósfera de argón en 8 ml de diclorometano. Se añadieron 0,705 ml (4,73 mmol) de DBU. Después de 10 min de agitación, se añadieron lentamente 1,66 g (4,31 mmol) de N-Cbz-6-benciloxi-indol-3-aldehído, HDP 30.2803, en 4,7 ml de diclorometano. La mezcla de

15 reacción se agitó durante 5 horas y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 120 ml de acetato de etilo, y la solución orgánica se lavó 2 veces con 50 ml de HCl 1N y 50 ml de salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida para dar 2,70 g de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-

20

Se añadieron 97,0 mg (0,20 mmol) de bis(ciclooctadieno-1,5)-dicloro dirodio $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ (n.º CAS: 12092-47-6. Alfa Aesar) a una suspensión de 180,0 mg (0,39 mmol) de (R,R)-DIPAMP (n.º CAS: 55739-58-7, AlfaAesar) en 2,0 ml de metanol/ agua (1,5 ml/0,5 ml). La suspensión de color naranja, agitada

durante 1 hora en atmósfera de argón, dio una solución naranja. El complejo se precipitó añadiendo lentamente (a lo largo de 30 minutos) una solución de 65,0 mg (0,6 mmol) de tetrafluoroborato de sodio en 0,5 ml de agua. Al cabo de 2,5 horas de agitación a temperatura ambiente, los cristales naranjas se separaron mediante filtración, se lavaron dos veces con pequeñas porciones de agua y se secaron a alto vacío. Se obtuvieron 240 mg (81 %) del catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, en forma de un polvo amarillo brillante. El catalizador se usó sin purificación adicional.

10 Ejemplo 2.3.2: Síntesis del éster bencílico del (S)-6-benciloxi-N-terc-butoxicarbonil-1-Cbz-L-triptófano, HDP 30.2826

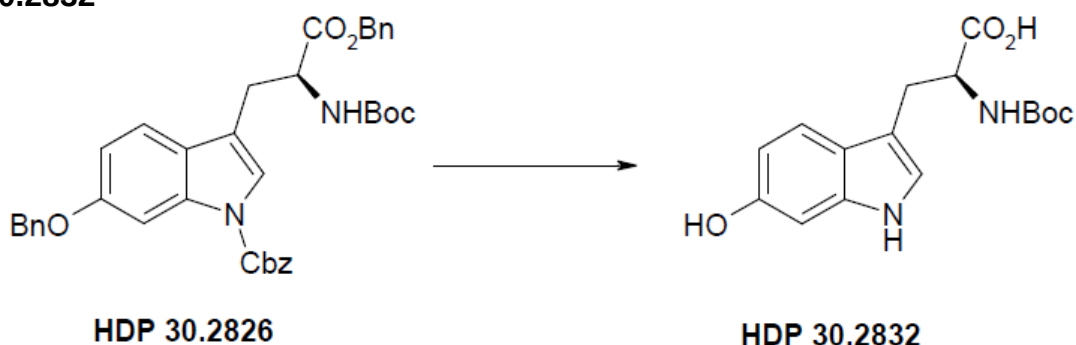
Se cargó un autoclave de acero inoxidable de 250 ml con 35,0 mg (0,08 mmol) de tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, 1000 mg (1,8 mmol) de éster bencílico del ácido [6-benciloxi-1H-(benciloxicarbonil)-3-indol]-2-(terc-butiloxicarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2824, en 40 ml de metanol seco / 15 ml de diclorometano. Después de cuatro ciclos de vacío/Ar y H₂, la reacción se presurizó a la presión inicial de 1,2 MPa (12 bar). Se dejó que la reacción procediera durante 4 días a temperatura ambiente. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 220 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con n-hexano / acetato de etilo (3:1) y dio tras la evaporación 0,79 g (79 %) de HDP 30.2826 en forma de un polvo blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 634,26 (C₃₈H₃₈N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 657,33 [M+Na]⁺;

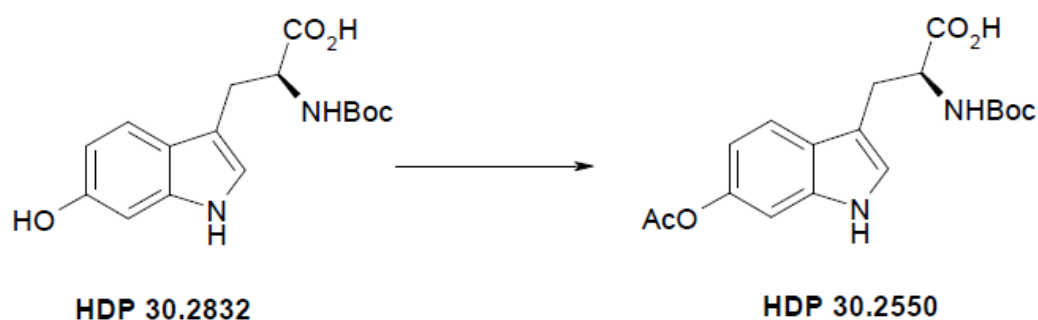
25 Ejemplo 2.4: Preparación de N-terc-butoxicarbonil-(S)-triptófano, HDP

30.2832



Se hidrogenaron 700 mg (1,10 mmol) de éster bencílico del (S)-6-benciloxi-N-terc-butoxicarbonil-1-Cbz-L-triptófano, HDP 30.2826, con 100 mg de Pd/C al
 5 10 % en una mezcla de 7 ml de acetato de etilo y 4 ml de etanol. Tras 3 horas de hidrogenación (control mediante TLC con cloroformo/metanol 19:1 + 1 % de AcOH) a temperatura ambiente y 1 atm, el catalizador se retiró mediante filtración sobre un lecho de Celite®. El disolvente se eliminó y el residuo bruto restante, 378 mg de HDP 30.2832, se usó para la siguiente etapa sin purificación.

10 **Ejemplo 2.5: Preparación de (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2550**



Se disolvieron 378 mg de HDP 30.2832 bruto (1,10 mmol asumidos) en 2,21 ml de NaOH 1. En atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se
 15 añadieron de una vez 208,5 µl (2,20 mmol) de anhídrido acético. La mezcla se

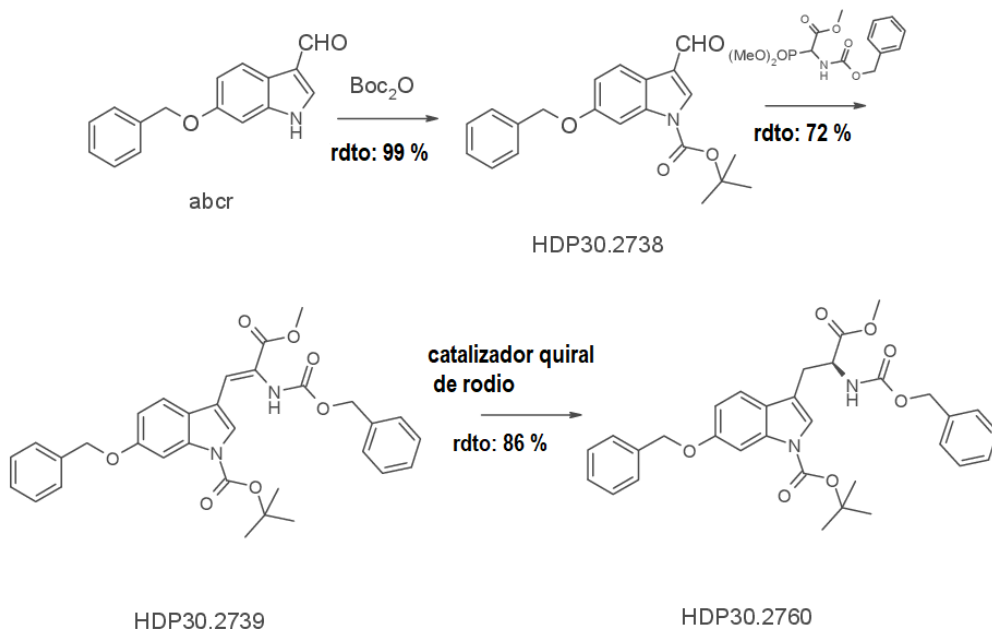
agitó durante 3,5 horas y se acidificó con ácido cítrico al 5 %. La mezcla de reacción se extrajo 3 veces con acetato de etilo, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con cloruro de sodio al 5 % y se secaron sobre MgSO_4 . Mediante filtración y evaporación a sequedad se obtuvieron 380 mg de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 120 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de diclorometano + 2 % de AcOH / diclorometano / metanol (15:1) + 2 % de AcOH y dio tras la evaporación 270 mg (68 %) de HDP 30.2550 en forma de un sólido blanco.

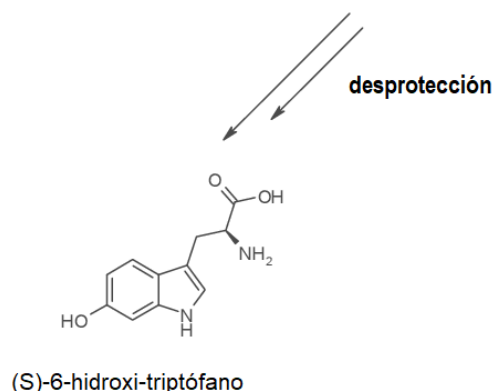
MS (ESI^-) encontrado: 361,17 $[\text{M}-\text{H}]^-$; calc.: 362,15 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$)

MS (ESI^-) encontrado: 723,08 $[2\text{M}-\text{H}]^-$

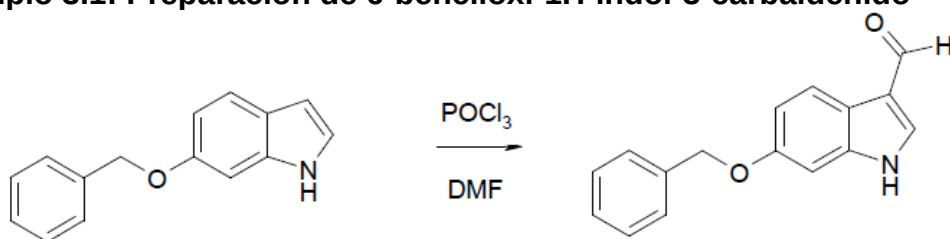
Ejemplo 3: Preparación de (S)-6-hidroxi-triptófano mediante hidrogenación asimétrica del deshidro-aminoácido

La ruta de síntesis se resume en el siguiente esquema de síntesis.





Ejemplo 3.1: Preparación de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído



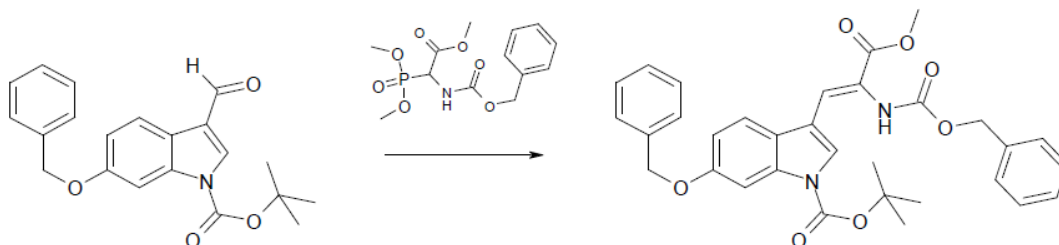
A una solución agitada de oxiclورو de fósforo (10,0 ml, 107,0 mmol) en
 5 DMF (35 ml) se añadió una solución de 6-benciloxi-indol (22,3 g, 100,0 mmol) en
 DMF (25 ml) a temperatura ambiente. Al cabo de 45 min, la mezcla de reacción
 se vertió sobre hielo-agua (200 ml). A esta mezcla se añadió NaOH sólido
 (19,0 g, 475,0 mmol) y agua (100 ml). Al cabo de 30 minutos, se añadió más
 agua (200 ml) y se sometió a reflujo toda la mezcla durante 3 minutos. El
 10 precipitado se recogió, se lavó con 5 porciones de 50 ml de agua fría y se secó
 para dar 24,8 g (98,8 %) de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído en forma de un
 polvo blanco. El compuesto era idéntico al material de referencia y
 suficientemente puro para la siguiente reacción.

15 **Ejemplo 3.2: Preparación de 6-benciloxi-1H-1-terc-butoxicarbonil-indol-
 carbaldehído, HDP 30.2738**

**HDP 30.2738**

Se suspendieron 10,0 g (39,8 mmol) de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído en 100 ml de diclorometano y se trataron con 0,56 g (4,5 mmol) de 4-dimetilaminopiridina, DMAP, y 10,5 g (47,3 mmol) de dicarbonato de di-terc-
 5 butilo Boc_2O disuelto en 10 ml de diclorometano. Tras agitar durante 2 horas, se añadieron 100 ml de KHSO_4 1 N y se evaporó el diclorometano. La capa acuosa se extrajo con varias porciones de dietil éter (2 x 200 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con 250 ml de KHSO_4 1 N, 250 ml de NaHCO_3 1 N y 250 ml de salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a
 10 presión reducida para dar 12,0 g (86 %) de un polvo rojo-parduzco. El compuesto era suficientemente puro para la siguiente etapa de reacción.

Ejemplo 3.3: Preparación del éster metílico del ácido 3-[6-benciloxi-1H-(1-terc-butoxicarbonil)-3-indol]-2-(benciloxicarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2739

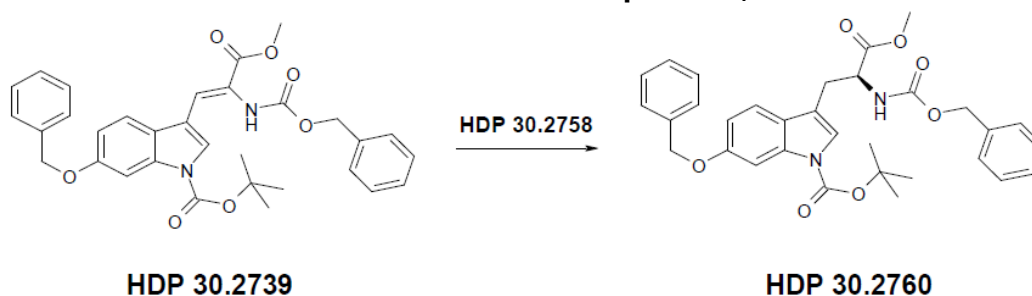
**HDP 30.2738****HDP 30.2739**

Se disolvieron 5,12 g (15,44 mmol) del éster trimetílico de la (R,S)-benciloxycarbonil- δ -fosfonoglicina (n.º CAS: 88568-95-0, Alfa Aesar) en atmósfera de argón en 18 ml de diclorometano. Se añadieron 2,14 ml (14,31 mmol) de DBU. Después de 10 min de agitación, se añadieron lentamente
 5 4,60 g (13,07 mmol) de 6-benciloxi-1H-1-terc-butiloxycarbonil-indol-3-carbaldehído, HDP 30.2738, en 14 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 300 ml de acetato de etilo, después la solución orgánica se lavó 2 veces con 120 ml de HCl 1N y 120 ml de salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se
 10 concentró a presión reducida para dar 7,43 g de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (2:1) y dio tras la evaporación 5,23 g (72 %) de HDP 30.2739 en forma de un sólido blanco.

15 MS (ESI⁺) encontrado: 557,17 [MH]⁺; calc.: 557,22 (C₃₂H₃₂N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 579,25 [M+Na]⁺

Ejemplo 3.4: Preparación del éster metílico del 6-benciloxi-N-carbobenciloxi-1-terc-butoxycarbonil-L-triptófano, HDP 30.2760



20 **Ejemplo 3.4.1: Síntesis del tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758**

El catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, se sintetizó tal como se describe en el Ejemplo 2.3.1.

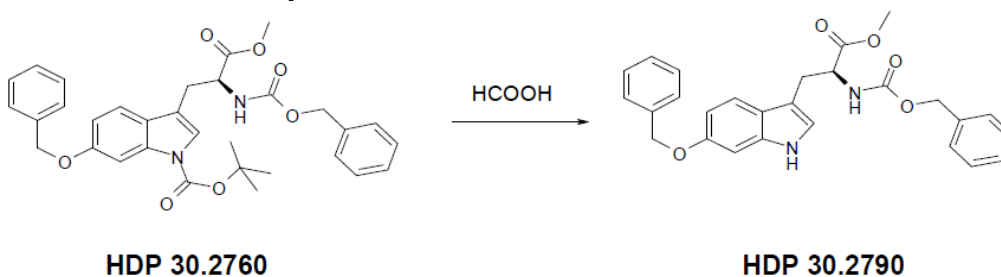
Ejemplo 3.4.2: Síntesis del éster metílico del (S)-6-benciloxi-N-carbobenciloxi-1-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2760

5 Se cargó un autoclave de acero inoxidable de 250 ml con 60,0 mg (0,08 mmol) de tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, y 1000 mg (1,8 mmol) de éster metílico del ácido [6-benciloxi-1H-(1-terc-butoxicarbonil)-3-indol]-2-(benciloxycarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2739, en 40 ml de metanol seco. Después de cuatro ciclos de vacío/Ar y H₂,
10 la reacción se presurizó a la presión inicial de 3 MPa (30 bar). Se dejó que la reacción procediera durante 4 días a temperatura ambiente. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 120 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (2:1) y dio
15 tras la evaporación 0,85 g (86 %) de HDP 30.2760 en forma de un sólido blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 558,23 (C₃₃H₃₄N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 581,17 [M+Na]⁺; 1138,83 [2M+Na]⁺

Ejemplo 3.5: Preparación del éster metílico del 6-benciloxi-N-carbobenciloxi-L-triptófano, HDP 30.2790



20

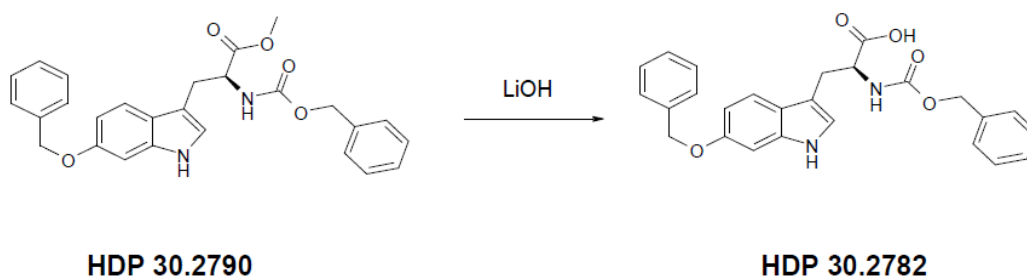
Se disolvieron 100,0 mg (0,18 mmol) del éster metílico del (S)-6-benciloxi-

N-carbobenciloxi-1-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2760, en 5,0 ml de ácido fórmico y se agitó durante 1 hora a 40 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se lavó con agua, NaHCO₃ saturado y salmuera y se secó sobre
 5 MgSO₄. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 24 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (1:1) y dio tras la evaporación 29 mg (35 %) de HDP 30.2790 en forma de un sólido blanco.

10 MS (ESI⁺) calc.: 458,52 (C₂₇H₂₆N₂O₅)

MS (ESI⁺) encontrado: 459,25 [M+H]⁺

Ejemplo 3.6: Preparación de (S)-6-benciloxi-N-carbobenciloxi-triptófano, HDP 30.2782



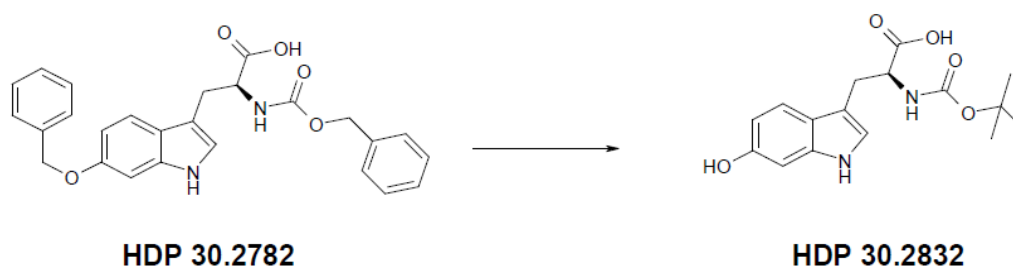
15 Se añadió una solución acuosa 2 N de LiOH (84,7 µl) a una solución de 25,9 mg (0,056 mmol) de HDP 30.2790 en 1000 µl de tetrahidrofurano/agua (10:1) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas y se repartió entre acetato de etilo y ácido cítrico al 5 %. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron, se secaron
 20 (MgSO₄) y se concentraron. El ácido carboxílico HDP 30.2782 resultante se purificó sobre gel de sílice usando diclorometano / metanol (+ 1 % de ácido

acético) como fase móvil. 13,7 mg (55 %), sólido blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 444,17,23 (C₂₆H₂₄N₂O₅)

MS (ESI⁺) encontrado: 445,25 [M+H]⁺; 467,17 [M+Na]⁺

Ejemplo 3.7: Preparación de (S)-6-hidroxi-N-(terc-butoxicarbonil)-triptófano, HDP 30.2832



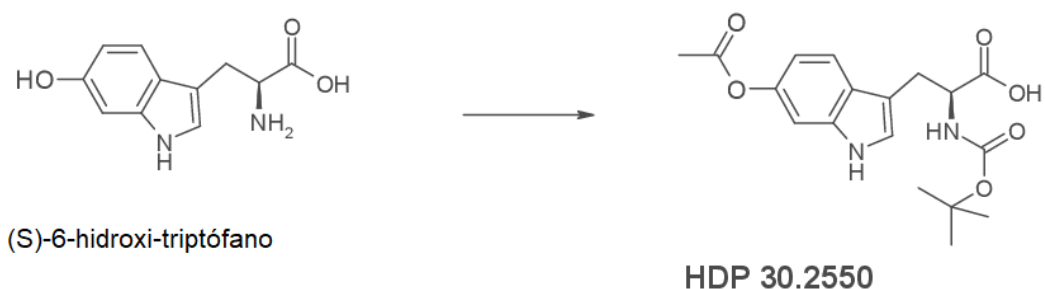
Se añadieron 10 mg (10 % en peso) de paladio sobre carbono a una solución de 50 mg (0,11 mmol) de HDP 30.2782 en 800 µl de metanol. La mezcla de reacción se purgó tres veces con hidrógeno y se agitó durante 2,5 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un lecho de Celite®, se lavó con metanol y se concentró a sequedad. El residuo sólido de (S)-6-hidroxitriptófano (22,2 mg) se disolvió en 1000 µl de 1,4-dioxano/agua (1:1) y se trató con 101 µl (0,101 mmol) de NaOH 1 N y 21,57 µl (0,10 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas y el pH se ajustó a 2 con ácido clorhídrico 1 N. La solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se evaporaron a sequedad. El HDP 30.2832 bruto resultante se purificó sobre gel de sílice usando diclorometano / metanol (+ 1 % de ácido acético) como fase móvil. 9,9 mg (31 %) de un sólido blanco. El material era idéntico a la muestra de referencia.

MS(ES⁻) calc.: MS.: 320,14 (C₁₆H₂₀N₂O₅)

MS (ESI⁻) encontrado: 319,08 [M-H]⁻

Ejemplo 4: Preparación de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrollo[2,3-b]indol, cis-HDP 30.2555, y trans-HDP 30.2555 (cis,trans-6-acetoxi-Hpi)

5 **Ejemplo 4.1: Preparación de (S)-N-(terc-butoxicarbonil)-6-acetoxi-triptófano, HDP 30.2550**



Se suspendieron 590,0 mg (2,68 mmol) del (S)-6-hidroxitriptófano de la etapa de hidrogenación del Ejemplo 3.7 en una mezcla de 30 ml de 1,4-dioxano/agua 1:1 (v/v). En atmósfera de argón se añadieron de una vez 2,68 ml (2,68 mmol) de NaOH 1 N a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se trató después con 574,6 ml (2,68 mmol) de anhídrido de Boc (Boc₂O) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución se acidificó con ácido clorhídrico 1 N a pH 2,4 y se extrajo 3 veces con 25 ml de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron sobre MgSO₄. Mediante filtración y evaporación a sequedad se obtuvieron 785,0 mg de un material bruto. El N-Boc-6-hidroxi-L-triptófano bruto se disolvió en 4,91 ml (4,91 mmol) de NaOH 1 N y se trató con 463,2 ml (500,3 mg, 4,90 mmol) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas en atmósfera de argón y se acidificó con ácido

10

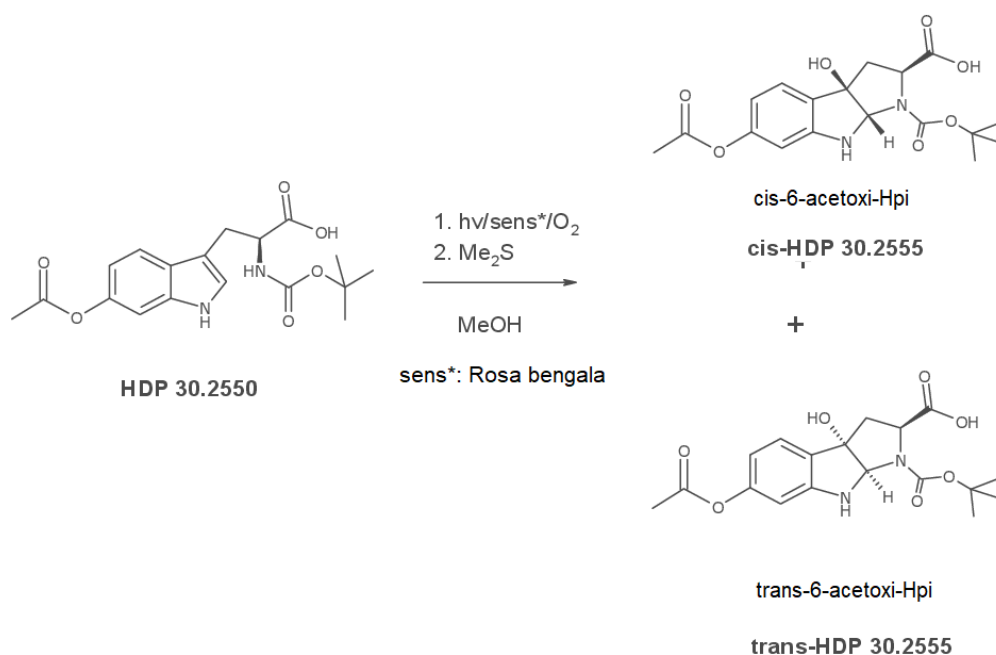
15

20

cítrico al 5 %. La fase acuosa se extrajo tres veces con 25 ml de acetato de etilo, se lavó con NaCl saturado y se secó sobre MgSO₄. Mediante filtración y evaporación se obtuvieron 635 mg de un sólido bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de CH₂Cl₂ + 1 % de ácido acético a CH₂Cl₂/MeOH (15:1) + 1 % de ácido acético y tras la coevaporación con tolueno dio 564,4 mg (56 % de rendimiento) de un polvo blanco.

MS (ESI⁻) encontrado: 361,08 [M-H]⁻; calc.: 362,15 (C₁₈H₂₂N₂O₆)

10 Ejemplo 4.2: Preparación de cis,trans-6-acetoxi-Hpi



La fotooxigenación se llevó a cabo con una lámpara de sodio de alta presión de 400 W (lámpara Sirius X400, 230 V, 400 W; 55000 lumen a una distancia de 1,3 m). Se usó rosa bengala como sensibilizador colorante. La reacción se llevó a cabo en un vaso de reacción cilíndrico de 500 ml con una camisa de

intercambio de calor hecho de vidrio de borosilicato, con fondo plano y una brida de laboratorio plana (DN) con dos conectores con rosca GL18. La distancia entre la lámpara y el vaso de reacción era de 15 cm y la temperatura de reacción estaba en el intervalo de 3-4 °C.

5 El producto final se purificó en un sistema de cromatografía ultrarrápida Teledyne ISCO con una columna con 330 g de gel de sílice Redi Sept Flash (Teledyne ISCO cat. 69-2203-330). Los disolventes CH_2Cl_2 , $-\text{CH}_3\text{OH}$, CH_3COOH eran de calidad HPLC o BP convencional. Se burbujeó oxígeno seco (99,5 % de pureza) a través de la mezcla de reacción con una velocidad de 2-4 litros por
10 minuto.

Se disolvieron 943,0 mg (2,60 mmol) de N-(terc-butoxicarbonil)-L-6-acetoxi-triptófano, HDP 30.2550, y 100 mg de rosa bengala en 500 ml de metanol y se enfriaron hasta 3°C usando un criostato Hubert con glicol/agua como medio de enfriamiento. La solución de reacción se irradió con la lámpara
15 de sodio de alta presión de 400 W. Durante la irradiación se burbujeó una corriente lenta de oxígeno a través de la solución de reacción. Al cabo de 5 horas de irradiación, se detuvo la oxigenación y el enfriamiento y el medio de reacción se trató con 10 ml de sulfuro de dimetilo. La mezcla se agitó durante 2 horas y se evaporó a sequedad usando un rotavapor con una temperatura del baño de
20 agua de 35 °C. El residuo rojo oscuro se secó adicionalmente a alto vacío para dar un sólido cristalino de 1,20 g. El producto bruto se purificó en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de CH_2Cl_2 + 5 % de ácido acético a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30:1) + 5 % de ácido acético. Se eluyeron 380 mg de cis-HDP 30.2555 y 290 mg de trans-HDP
25 30.2555 y se coevaporaron con tolueno. Después de la liofilización en terc-

butanol se obtuvieron ambos isómeros en forma de polvos blanquecinos.

cis-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrololo[2,3-b]indol (cis-HDP 30.2555)

380 mg de cis-HDP 30.2555; rendimiento: 39 %

5 RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

δ = 1,22, 1,44, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,23 (s, 3H, OCOCH_3); 2,46-2,63 (m, 2H, CH_2); 4,14-4,29 (m, 1H, 2-H); 5,35 (s, 1H, 8a-H); 6,39-6,46 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,20-7,24 (m, 1H, 4-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

10 δ = 20,93, 28,45, 31,12, 42,80, 61,12, 69,44, 82,21, 85,82, 87,93, 104,97, 112,98, 124,84, 129,42, 151,51, 154,04, 155,97, 171,34, 175,79

MS (ESI^+) encontrado: 378,92 $[\text{MH}]^+$; calc.: 378,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

MS (ESI^+) encontrado: 401,17 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc.: 401,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$)

UV/VIS(CH_3OH): λ_{max} = 296 nm, 239 nm, 215 nm

15 λ_{min} = 266 nm, 227 nm

trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrololo[2,3-b]indol (trans-HDP 30.2555)

290 mg de trans-HDP 30.2555; rendimiento: 30 %

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

20 δ = 1,22, 1,45, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,22 (s, 3H, OCOCH_3); 2,55-2,73 (m, 2H, CH_2); 4,51-4,57 (m, 1H, 2-H); 5,21-5,24 (s, 1H, 8a-H); 6,36-6,41 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,17-7,18 (m, 1H, 4-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

25 δ = 20,95, 28,50, 31,12, 42,47, 60,97, 69,44, 82,06, 84,84, 87,54, 104,74, 112,67, 125,03, 128,70, 152,31, 154,22, 156,00, 171,23, 174,67

MS (ESI⁺) encontrado: 379,00 [MH]⁺; calc.: 378,14 (C₁₈H₂₂N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 401,17 [M+Na]⁺; calc.: 401,14 (C₁₈H₂₂N₂NaO₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 779,00 [2M+Na]⁺; calc.: 779,28 (C₃₆H₄₄N₄Na₂O₁₄)

UV/VIS(CH₃OH): $\lambda_{\max}$ = 299 nm, 241 nm, 215 nm

5 $\lambda_{\min}$ = 268 nm, 228 nm

Ejemplo 4.3: Introducción de cis,trans-6-acetoxi-Hpi en un precursor de amanitina

La síntesis de amanitina usando cis,trans-6-acetoxi-Hpi se efectuó tal como se describe en el documento PCT/EP2018/071268, cuyo contenido se incorpora
10 en el presente documento por referencia, principalmente con el fin de la habilitación.

Referencias:

- Muraoka S, y Shinozawa T., *J Biosci Bioeng.* 2000; 89 (1): 73-6
- Wieland T, Faulstich H. 1978 *CRC Crit Rev Biochem.* Vol. 5 185-260.
- 15 Zanotti G, Mähringer C, y Wieland T., *Int J. Pept Protein Res.* Oct 1987; 30 (4): 450-9;
- Zanotti G, Wieland T, Benedetti E, Di Blasio 8, Pavone V, y Pedone C. *Int J. Pept Protein Res.* Sep 1989; 34(3): 222-8
- Zhang P, et al., *FEMS Microbiol Lett.* 15 Nov 2005; 252(2): 223-8. Epub 15
20 Sep 2005.

RESUMEN

SÍNTESIS DEL (S)-6-HIDROXITRIPTÓFANO Y (S)-6-ACETILOXI-N-TERC-BUTOXICARBONIL TRIPTÓFANO MEDIANTE HIDROGENACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE PRECURSORES AMINOÁCIDO OLEFÍNICOS EMPLEANDO CATALIZADORES QUIRALES

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos y compuestos para sintetizar derivados de amanitina. La invención se refiere en particular a procedimientos para sintetizar derivados del (S)-6-hidroxitriptófano que se pueden usar como bloques de construcción en la síntesis de derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco. La invención se refiere también a compuestos intermedios de dichas rutas de síntesis para su uso en la síntesis de derivados de amanitina y conjugados amatoxina-fármaco, así como al uso de catalizadores particulares adecuados para mediar en dichas rutas de síntesis.

SÍNTESIS DEL (S)-6-HIDROXITRIPTÓFANO Y (S)-6-ACETOLOXI-N-TERC-BUTOXICARBONIL TRIPTÓFANO MEDIANTE HIDROGENACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE PRECURSORES AMINOÁCIDO OLEFÍNICOS EMPLEANDO CATALIZADORES QUIRALES DERIVADOS DEL MISMO

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos y compuestos para sintetizar derivados de amanitina. La invención se refiere en particular a procedimientos para sintetizar derivados del (S)-6-hidroxitriptófano que se pueden usar como bloques de construcción en la síntesis de derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco. Asimismo, la invención se refiere también a compuestos intermedios de dichas rutas de síntesis para su uso en la síntesis de derivados de amanitina y conjugados amatoxina-fármaco así como al uso de catalizadores particulares adecuados para mediar en dichas rutas de síntesis.

15

Antecedentes

Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos que se encuentran en las setas *Amanita phalloides* (véase la Fig. 1). Las amatoxinas específicamente inhiben la ARN polimerasa II dependiente del ADN en células de mamíferos y, por tanto, también la transcripción y la biosíntesis de proteínas en las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre la amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte ($K_D = 3 \text{ nM}$). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento, haciendo que la recuperación de una célula afectada sea, por tanto,

25

poco probable. Cuando la inhibición de la transcripción dura suficiente tiempo, la célula experimenta la muerte celular programada (apoptosis).

Las amatoxinas se pueden aislar de carpóforos de la seta *Amanita phalloides* recolectada o a partir de cultivos puros (Zhang P, *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 15 Nov 2005; 252(2): 223-8. Epub 15 Sep 2005). Sin embargo, las cantidades de amatoxinas que se pueden obtener son más bien bajas (en el intervalo de aproximadamente 0,3-3 mg/g de materia seca a partir de carpóforos naturales, y de aproximadamente un 10 % de ellas a partir de un cultivo puro) y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxina naturales es limitada. Como alternativa, las amatoxinas se pueden obtener mediante fermentación usando un basidiomiceto (Muraoka S, y Shinozawa T., *J Biosci Bioeng.* 2000; 89(1): 73-6) o *A. fissa* (Guo XW, *et al.*, Jun 2006; 46(3): 373-8). Los rendimientos son también bajos y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxina naturales es asimismo limitada. Por último, se han preparado amatoxinas mediante síntesis total o parcial (por ejemplo, Zanotti G, Mähringer C, y Wieland T., *Int J. Pept Protein Res.* Oct 1987; 30 (4): 450-9; Zanotti G, Wieland T, Benedetti E, Di Blasio B, Pavone V, y Pedone C., *Int J. Pept Protein Res.* Sep 1989; 34(3): 222-8). Como alternativa, el uso de rutas totalmente sintéticas para dar amatoxinas puede proporcionar el suministro de mayores cantidades de amatoxinas requeridas para usos terapéuticos y puede proporcionar la construcción de una serie de nuevas variantes de amatoxina mediante el uso de materiales de partida apropiados como bloques de construcción.

Las amanitinas de origen natural tales como la α -amanitina, la β -amanitina o la γ -amanitina comprenden una función hidroxilo (-OH) fenólica en la posición 6'

Con formato: Italiano (Italia)

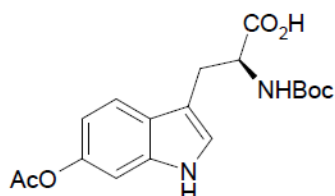
del triptófano, el cual representa el aminoácido 4 en el octapéptido cíclico de la amanitina, que permite el acoplamiento de un conector a la amatoxina (véase la Fig. 1). Las macromoléculas de unión a la diana, tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden acoplar entonces a través de dicho conector a fin de generar conjugados, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco. El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para terapia tumoral ya se había explorado en 1981 acoplando un anticuerpo anti-Thy 1.2 a la α -amanitina usando un conector unido al anillo de indol del triptófano (Trp, aminoácido 4; véase la figura 1) mediante diazotación (Davis & Preston, *Science* 1981, 213, 1385-1388).

Con los compuestos de amanitina totalmente sintéticos investigados actualmente, la incorporación de un triptófano funcionalizado para el acoplamiento de elementos conectores solo se ha conseguido muy recientemente. Antes de ello, por tanto, los conectores se acoplaban a las amanitinas totalmente sintéticas predominantemente en las posiciones del aminoácido 1 (ácido aspártico) o en el nitrógeno del indol (N1) del aminoácido 4 (triptófano). Puesto que se ha demostrado que son muy diferentes los perfiles de actividad biológica de las amanitinas acopladas en diferentes posiciones de anclaje de la estructura de amanitina, resulta de gran interés poder proporcionar triptófano sintético hidroxilado en la posición 6', es decir, correspondiente a la α -amanitina, β -amanitina o γ -amanitina naturales, como bloque de construcción que se puede incorporar en el transcurso de la síntesis de la amanitina.

La introducción sintética de triptófano en la estructura de la amanitina se puede llevar a cabo mediante la reacción de Savige-Fontana (Savige & Fontana, 1980, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 15(3): 285-97). De acuerdo con esta reacción, el triptófano se convierte en una mezcla de cis-2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-

hexahidropirrol[2,3-b]indol y trans-2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol protegidos con Boc y se incorpora después en la secuencia de aminoácidos del precursor lineal de la amanitina.

Para la producción totalmente sintética de la amanitina, la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano y la síntesis de los bloques de construcción respectivos son de esencial importancia. En particular, uno de estos bloques de construcción de esencial importancia es el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550).



HDP 30.2550

Hasta ahora, no se ha descrito en la técnica anterior una ruta de síntesis eficaz y satisfactoria para el (S)-6-hidroxitriptófano y sus bloques de construcción. En particular, no ha habido disponible una ruta de síntesis que proporcionara la pureza necesaria de los enantiómeros (L o S) de este derivado del aminoácido. Se podrían considerar principalmente diferentes opciones básicas de síntesis. Una primera opción podría ser la cristalización de la forma racémica con ácidos o bases quirales auxiliares. Sin embargo, solo se podría obtener un rendimiento máximo del 50 % con este procedimiento. Una segunda opción es una producción enzimática; sin embargo, el empleo de este método requiere mucho tiempo, los resultados son inciertos y la reproducibilidad es baja.

Un objeto de la presente invención, por tanto, es proporcionar un

procedimiento eficaz, sencillo y reproducible para sintetizar el (S)-6-hidroxitriptófano, derivados del mismo y bloques de construcción del mismo. Preferentemente, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento eficaz para sintetizar el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) con una pureza enantiomérica suficientemente elevada.

Como objeto adicional de la presente invención, se debe proporcionar el uso de dicho (S)-6-hidroxitriptófano y sus derivados, preferentemente el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, como bloques de construcción para la producción totalmente sintética de amatoxinas.

Estos y otros objetos se consiguen mediante los procedimientos y medios de acuerdo con las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con realizaciones específicas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para la síntesis del (S)-6-hidroxitriptófano, el (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano y sus derivados y bloques de construcción para la síntesis de los mismos. La presente invención proporciona además compuestos y bloques de construcción para su uso en la síntesis de la amanitina o derivados de la amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

A continuación se comentarán con más detalle la invención y las ventajas generales de sus características.

Descripción de las figuras

La **Fig. 1** muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los

números en negrita (1 a 8) designan la numeración convencional de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. Las designaciones convencionales de los átomos en los aminoácidos 1, 3 y 4 se muestran también (letras griegas α a γ , letras griegas α a δ y números 1' a 7', respectivamente).

5 La **Fig. 2** ilustra la síntesis del compuesto HDP 30.2822.

La **Fig. 3** ilustra la síntesis del compuesto HDP 30.2758.

La **Fig. 4** ilustra la síntesis de los compuestos HDP 30.2550 y HDP 30.2555.

La **Fig. 5** muestra las composiciones estructurales de los catalizadores usados para la conversión del compuesto HDP 30.2824 al HDP 30.2826.

10 La **Fig. 6** muestra los resultados de la espectroscopía de RMN ^1H del compuesto HDP 30.2826 (400 MHz, CDCl_3 , δ = ppm).

La **Fig. 7** muestra los resultados de la espectroscopía de RMN ^{13}C del compuesto HDP 30.2826 (100 MHz, CDCl_3 , δ = ppm).

Descripción detallada de la invención

15 Antes de describir la invención con detalle, se ha de entender que la presente invención no se limita a los elementos particulares de los medios descritos o las etapas de proceso de los procedimientos descritos ya que tales medios y procedimientos pueden variar. Se ha de entender también que la terminología usada en la presente invención tiene como fin describir
20 realizaciones particulares solamente y no se pretende que sea limitante. Cabe señalar que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, se ha de entender que, en caso de que se den intervalos
25 de los parámetros que están delimitados por valores numéricos, se considera

que los intervalos incluyen dichos valores de limitación.

Se ha de entender igualmente que las realizaciones divulgadas en el presente documento no se pretende que sean entendidas como realizaciones individuales que no se relacionan entre sí. Las características comentadas respecto a una realización se pretende que sean divulgadas también con relación a otras realizaciones mostradas en el presente documento. Si en un caso no se divulga una característica específica con una realización, pero sí con otra, el experto en la técnica entenderá que esto no significa necesariamente que dicha característica no pretenda ser divulgada con dicha otra realización. El experto en la técnica entenderá que la clave de la presente solicitud es divulgar dicha característica también para la otra realización, aunque esto no se haya realizado por cuestiones de claridad y para mantener la solicitud con un volumen manejable.

Además, el contenido de los documentos de la técnica anterior a los que se hace referencia en el presente documento se incorpora al mismo por referencia. Esto se refiere en particular a documentos de la técnica anterior que divulgan procedimientos convencionales o de rutina. En tal caso, la incorporación por referencia tiene como fin principal proporcionar una suficiente divulgación habilitante y evitar repeticiones tediosas.

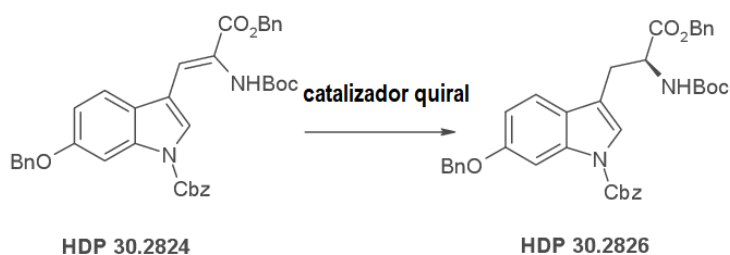
Una producción a gran escala que sea industrialmente factible del (S)-6-hidroxitriptófano como el comprendido en la α -, β - y γ -amanitina naturales, y/o formas químicamente protegidas del mismo, requiere un procedimiento de síntesis eficaz, sencillo y reproducible. Por primera vez, los inventores fueron capaces de proporcionar tal procedimiento de producción sencillo y eficaz, mediante el empleo de una hidrogenación enantioselectiva de precursores

aminoácido olefínicos. Usando catalizadores quirales específicos, descubrieron de forma sorprendente que tal tipo de reacción podía dar una pureza enantiomérica muy elevada.

La sencilla ruta sintética divulgada proporciona un (S)-6-hidroxitriptófano que es totalmente idéntico a la correspondiente estructura natural. La capacidad para usar dicho compuesto y formas protegidas del mismo para una producción industrial a gran escala de amanitina reducirá considerablemente los costes y aumentará la eficacia, por ejemplo, de la fabricación de una α -, β - o γ -amanitina sintética al igual que de conjugados anticuerpo-fármaco basados en amatoxina para aplicaciones terapéuticas.

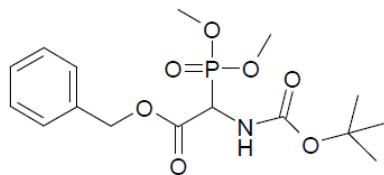
De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis del (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550) o del (S)-6-hidroxitriptófano, comprendiendo dicho procedimiento al menos una etapa de hidrogenación enantioselectiva de un compuesto precursor olefínico mediante el uso de al menos un catalizador quiral.

En una realización del procedimiento reivindicado, dicho precursor olefínico usado para la hidrogenación asimétrica es un precursor aminoácido insaturado olefínico. Preferentemente es el compuesto HDP 30.2824.



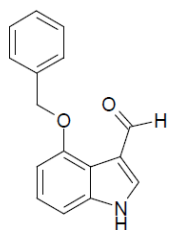
En una realización del procedimiento reivindicado, dicho precursor olefínico

se sintetiza usando el siguiente compuesto:

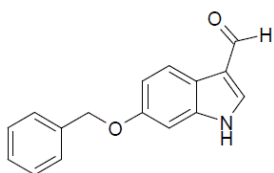


HDP 30.2822

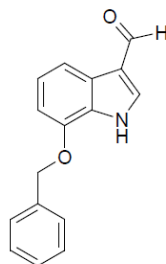
Dicho precursor olefínico se puede sintetizar adicionalmente usando cualquiera de los compuestos A, B, o C.



A



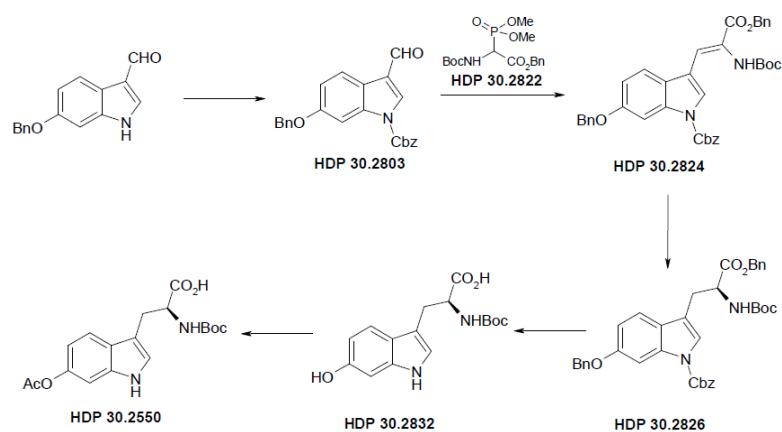
B



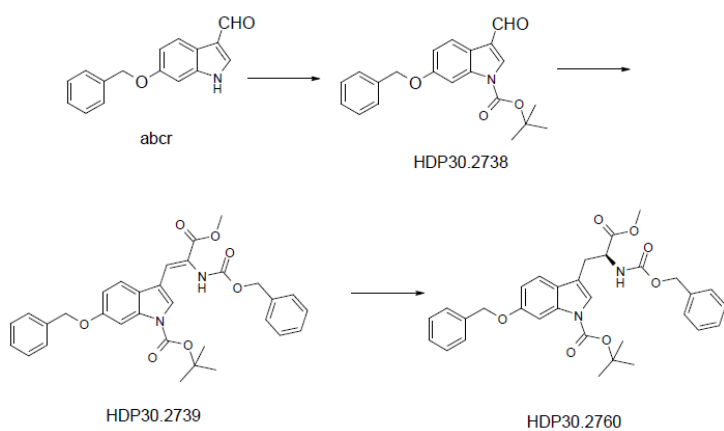
C

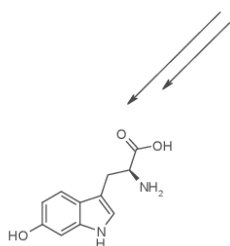
5

En una realización adicional del procedimiento reivindicado, dicho procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:



En otra realización adicional del procedimiento reivindicado, dicho procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:





(S)-6-hidroxi-triptófano

En el contexto de la presente invención, el término "amatoxina" incluye todos los péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos aislados del género Amanita y descritos en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., *CRC Crit Rev Biochem.* 5 (1978) 185-260), además todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos construidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura original de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos en los que el resto tioéter sulfóxido está sustituido por un sulfuro, sulfona, tioéter, o por átomos distintos al azufre, por ejemplo, un átomo de carbono como en un carboanálogo de la amanitina. Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamíferos. Las amatoxinas preferentes son aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, o un grupo tiol o que captura tiol) que puede reaccionar con moléculas conectoras o moléculas de unión a la diana, tal como se ha definido anteriormente.

En el contexto de la presente invención, el término "amanitinas" se refiere particularmente a la estructura bicíclica que está basada en un residuo de ácido aspártico o asparagina en la posición 1, un residuo de prolina, particularmente un residuo de hidroxiprolina, en la posición 2, una isoleucina, hidroxisoleucina o dihidroxisoleucina en la posición 3, un residuo de triptófano o hidroxitriptófano en la posición 4, residuos de glicina en las posiciones 5 y 7, un residuo de isoleucina en posición 6 y un residuo de cisteína en la posición 8, en particular un derivado de cisteína que se oxida a un derivado sulfóxido o sulfona (para la numeración y los ejemplos representativos de amanitinas véase la Figura 1) e incluye, además, todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura original de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos en los que, en cada caso, dicho derivado o análogo es funcionalmente activo mediante la inhibición de la ARN polimerasa II de mamíferos.

El término "resto de unión a la diana," tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que se puede unir específicamente a una molécula diana o a un epítipo diana. Los restos de unión a la diana preferentes en el contexto de la presente invención son (i) anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a anticuerpos; (ii) proteínas similares a anticuerpos; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a la diana" adecuados para su uso en la presente invención tienen

normalmente una masa molecular de 40 000 Da (40 kDa) o superior.

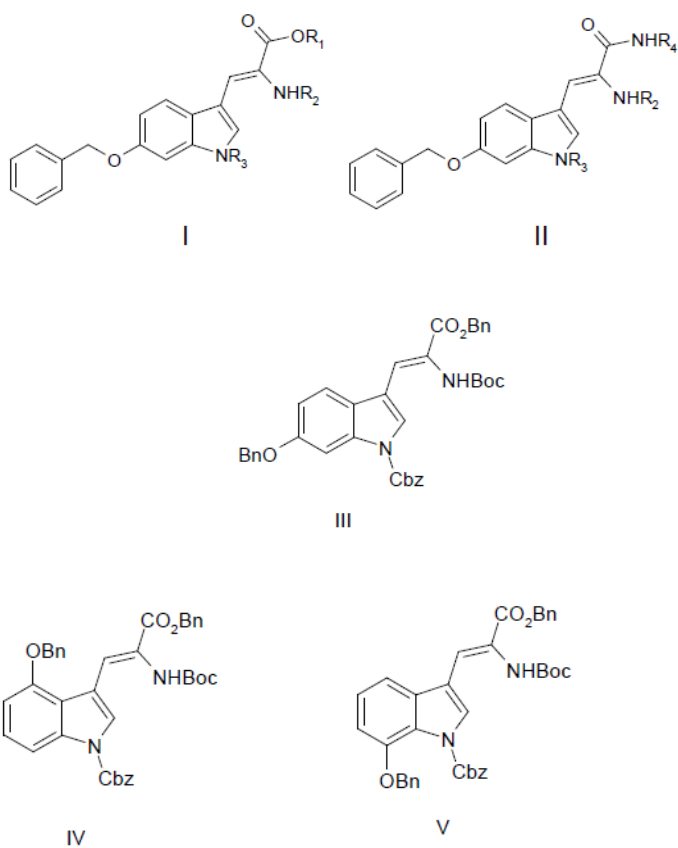
Un "conector" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula que aumenta la distancia entre dos componentes, por ejemplo, para aliviar la interferencia estérica entre el resto de unión a la diana y la amatoxina que, de otro modo, puede disminuir la capacidad de la amatoxina para interactuar con la ARN polimerasa II. El conector puede servir para otro fin ya que puede facilitar la liberación de la amatoxina específicamente en la célula a la que se dirige el resto de unión a la diana. Es preferente que el conector y, preferentemente el enlace entre el conector y la amatoxina por un lado y el enlace entre el conector y el anticuerpo por el otro lado, sea estable en condiciones fisiológicas fuera de la célula, por ejemplo la sangre, mientras que se puede escindir dentro de la célula, en particular dentro de la célula diana, por ejemplo una célula cancerosa o una célula inmunitaria. A fin de proporcionar esta estabilidad selectiva, el conector puede comprender funcionalidades que son preferentemente sensibles al pH o sensibles a las proteasas. Como alternativa, el enlace que une el conector al resto de unión a la diana puede proporcionar la estabilidad selectiva. Preferentemente un conector tiene una longitud de al menos 1, preferentemente una longitud de 1-30 átomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 átomos) en el que un lado del conector ha reaccionado con la amatoxina y el otro lado con un resto de unión a la diana. En el contexto de la presente invención, un conector es preferentemente un grupo alquilo C₁₋₃₀, heteroalquilo C₁₋₃₀, alquenilo C₂₋₃₀, heteroalquenilo C₂₋₃₀, alquinilo C₂₋₃₀, heteroalquinilo C₂₋₃₀, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo o heteroaralquilo, opcionalmente sustituido. El conector puede contener uno o más

elementos estructurales tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, hidrocarburo y similares. El conector puede contener también combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el conector más de una vez, por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el conector puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el conector se ha de unir en una sola etapa o bien en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y al resto de unión a la diana. Para tal fin, el conector llevará dos grupos, preferentemente en los extremos proximal y distal, los cuales (i) pueden formar un enlace covalente con un grupo, preferentemente un grupo activado de una amatoxina, o el péptido de unión a la diana, o (ii) se activan o se pueden activar para formar un enlace covalente con un grupo de una amatoxina. De acuerdo con esto, si el conector está presente, es preferente que los grupos químicos estén en un extremo distal y proximal del conector, que son el resultado de tal reacción de acoplamiento, por ejemplo, un éster, un éter, un uretano, un enlace péptido, etc. La presencia de un "conector" es opcional, es decir, la toxina puede estar unida directamente a un residuo del resto de unión a la diana en algunas realizaciones del conjugado resto de unión a la diana-toxina.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere al (S)-6-acetilo-N-terc-butoxicarbonil-triptófano (HDP 30.2550), al (S)-6-hidroxi-triptófano o a cualquiera de los compuestos precursores de acuerdo con la presente invención para su uso en la síntesis de amanitina o derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto deshidro-aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en los

compuestos I, II, III, IV y V,



en los que

5 R1 se selecciona entre: H, alquilo, alquenoilo, arilalquilo opcionalmente sustituido

 R2 se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

 R3 se selecciona entre: los grupos N-protectores Boc, Cbz,

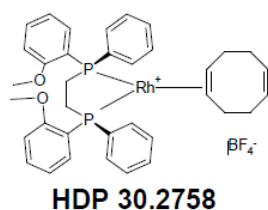
R4 es un residuo aminoácido

para su uso en la síntesis de amanitina o derivados de amanitina o conjugados amatoxina-fármaco.

Los compuestos III, IV y V son preferentes.

5 Asimismo, los inventores descubrieron de forma sorprendente que a partir de un panel mayor de compuestos catalíticos ensayados para la hidrogenación asimétrica (véase la Tabla 1, Fig. 5) el catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, proporcionaba la mayor pureza enantiomérica que era > 98 %).

10



Se encontró que solamente el catalizador HDP 30.2758 daba una pureza muy elevada de más del 98 % de enantiómeros (S). El resto de catalizadores, a excepción del (R,R)-Et-DUPHOS (BF₄⁻) daban purezas considerablemente
15 menores de un 50-70 % de enantiómeros (S). Además, la producción global absoluta del compuesto y las tasas de rendimiento eran mucho peores que con el HDP 30.2758.

Los catalizadores ensayados para la hidrogenación asimétrica y los niveles de pureza del enantiómero (S) respectivos se recogen en la Tabla 1.

20

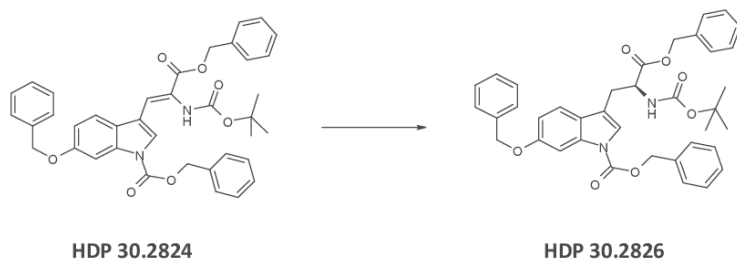
Tabla 1: Evaluación comparativa de varios catalizadores usados para la

hidrogenación enantioselectiva

Catalizador #	Identidad	Nivel de pureza
1	HDP 30.2758	> 98 % de pureza quiral
2	(R,R)-Et-DUPHOS (CF_3SO_3^-)	sin conversión
3	(R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-)	90-95 % de pureza quiral
4	(R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-)	65 % de pureza quiral
5	(R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-)	55 % de pureza quiral
6	(R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-)	73 % de pureza quiral
7	(R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-)	< 60 % de pureza quiral

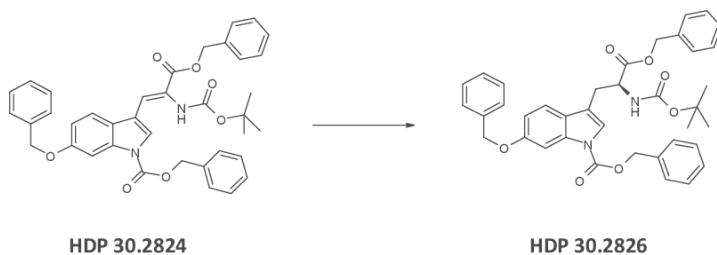
Así, de acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en el compuesto

5 HDP 30.2758, (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-ferroceno- Et_2 (BF_4^-), (R,R)-DuPhos-alquilo (CF_3SO_3^-) y (R,R)-fenil-DuPhos-alquilo (BF_4^-) como catalizador para la hidrogenación en la siguiente reacción:



- 10 De acuerdo con este aspecto, la presente invención preferentemente se refiere al uso de los catalizadores quirales tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758) o (R,R)-Et-DUPHOS (BF_4^-), más

preferentemente al uso del catalizador quiral tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio (HDP 30.2758) como catalizador para la hidrogenación en la siguiente reacción:



- 5 La incorporación de derivados de triptófano como bloques de construcción en precursores de amanitina se ha descrito previamente en el documento PCT/EP2018/071268, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Como tal, el HDP 30.2115 se puede sintetizar mediante la incorporación de un bloque de construcción Hpi no sustituido en una molécula
- 10 precursora peptídica de amanitina para dar una amanitina sintética, el bloque de construcción 6-hidroxi sustituido HDP 30.2555 se puede usar para la síntesis de amanitinas 6-hidroxi sustituidas de acuerdo con la presente invención.

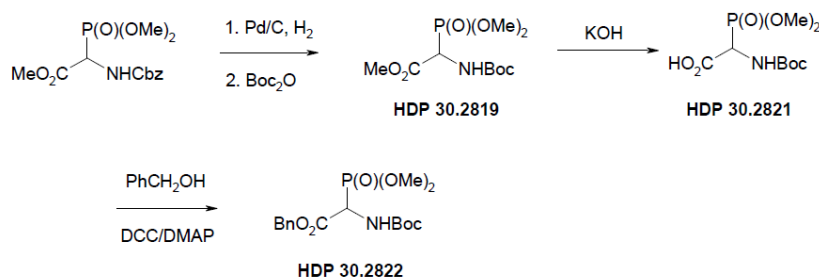
Ejemplos

- Aunque la invención se ilustra y se describe con detalle en las figuras y en
- 15 la descripción anterior, tal ilustración y descripción han de considerarse ilustrativas o a modo de ejemplo y no de forma restrictiva; la invención no se limita a las realizaciones divulgadas. Otras variaciones a las realizaciones divulgadas pueden ser comprendidas y realizadas por los expertos en la técnica al poner en práctica la invención reivindicada, a partir del estudio de las figuras,
- 20 la descripción, y las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la

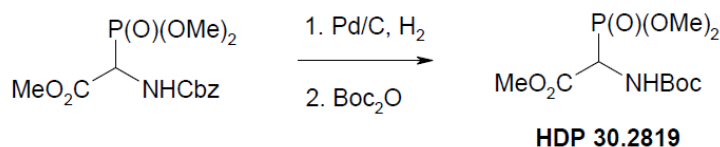
expresión "que comprende" no excluye otros elementos o etapas y los artículos indefinidos "un", "uno" o "una" no excluyen una pluralidad. El mero hecho de que determinadas mediciones se enumeren en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que no se pueda usar ventajosamente una combinación de estas mediciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no se debe interpretar que limita el alcance de las mismas.

Ejemplo 1: Síntesis del precursor fosfonio (bloque de construcción), HDP 30.2822.

La síntesis del precursor fosfonio (bloque de construcción), HDP 30.2822, se llevó a cabo tal como se ha descrito (*CHEMISTRY A European Journal*, 2018, Vol. 24, n.º 7, págs. 1544-1553):



Ejemplo 1.1: Preparación del éster trimetílico de la (R,S)-Boc-α-fosfonoglicina, HDP 30.2819

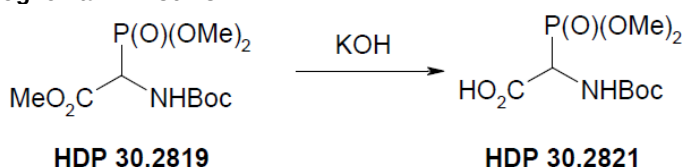


Se hidrogenaron 5,0 g (15,1 mmol) del éster trimetílico de la (R,S)-N-Cbz-

fosfonoglicina (n.º CAS: 88568-95-0) con 1,4 g de Pd/C al 10 % en 100 ml de metanol a 1 atm hasta que se determinó la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol 15:1). La reacción finalizó en 3 horas. El catalizador se separó mediante filtración sobre un lecho de Celite® (tierra de diatomeas) y la solución metanólica de la amina libre se concentró al vacío para dar un aceite incoloro (2,9 g). El aceite bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Se disolvieron 2,9 g del producto de hidrogenación bruto en 20 ml de diclorometano y se trataron con 3,23 ml (15,1 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo (Boc₂O). Después de 17 horas de agitación a temperatura ambiente en atmósfera de argón, la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El aceite incoloro restante cristalizó para dar un sólido blanco (4,3 g). El HDP 30.2819 bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Ejemplo 1.2: Preparación del éster trimetílico de la (R,S)-N-Boc-α-fosfonoglicina HDP 30.2821



Se disolvieron 4,3 g (14,3 mmol asumidos) de HDP 30.2819 bruto en 10 ml de 1,4-dioxano y se trataron rápidamente en atmósfera de argón y a temperatura ambiente con 14,5 ml de KOH 1 N. Al cabo de 85 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con 36 ml de agua y se extrajo con 35 ml de acetato de etilo. Se descartó el extracto de acetato de etilo y la solución acuosa se acidificó hasta pH 3 mediante adición gota a gota de HCl 1 N. La mezcla de reacción se extrajo con 60 ml de acetato de etilo (2x) y se secó sobre MgSO₄. El sólido blanco resultante,

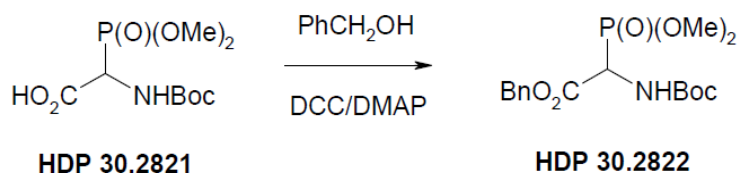
2,1 g de HDP 30.2821, se secó al vacío y se usó directamente sin purificación para la siguiente etapa de reacción.

P.e.: 148-150 °C (Lit. JACS 111, 6244, 1989, p.f.: 154-155 °C)

MS (ESI⁻) encontrado: 282,00 [M-H]⁻; calc.: 283,08 (C₉H₁₈NO₇P)

5 MS (ESI⁻) encontrado: 238,17 [M-CO₂]⁻

Ejemplo 1.3: Preparación del éster bencílico de la (R,S)-N-Boc-α-dimetilfosfona)glicina HDP 30.2822



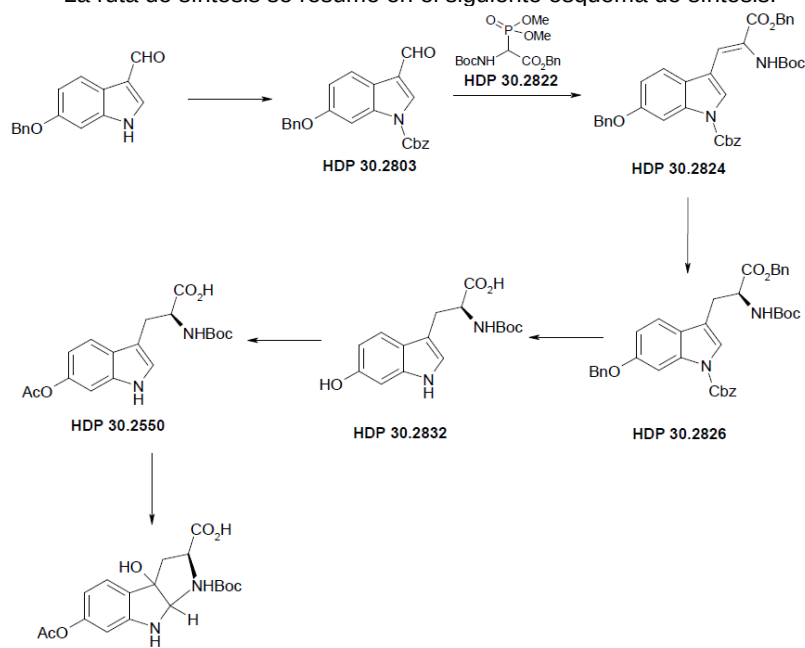
Se trataron 2,0 g (7,1 mmol) de HDP 30.2821 en 90 ml de diclorometano seco con 4,6 ml (44,1 mmol) de alcohol bencílico, 230 mg de DMAP y 2,2 g (10,6 mmol) de DCC disuelto en 7 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 24 horas. Después la urea se separó mediante filtración y la fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 5 % y se secó sobre MgSO₄. Tras la evaporación del diclorometano, el semisólido que quedó se recogió en acetato de etilo y se filtró de nuevo para retirar más urea. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (1:2) y dio tras la evaporación 1,94 g (73 %) de HDP 30.2822 en forma de un sólido blanco.

MS (ESI⁺) encontrado: 373,92 [MH]⁺; calc.: 373,13 (C₁₆H₂₄O₇P)

MS (ESI⁺) encontrado: 396,17 [M+Na]⁺

Ejemplo 2: Síntesis de (S)-6-acetiloxy-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2550, como precursor del HDP 30.2555 (Hidroxi-Hpi)

La ruta de síntesis se resume en el siguiente esquema de síntesis.



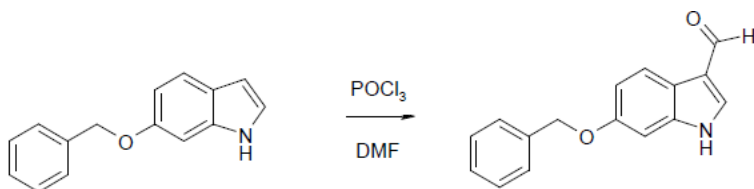
5

HDP 30.2555 (cis/trans)

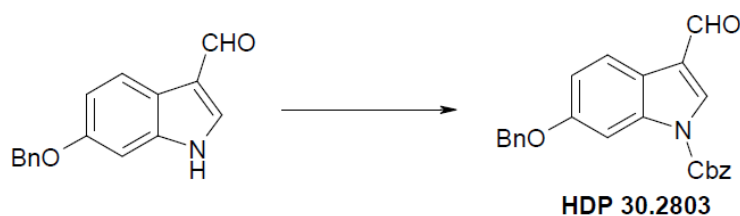
Ejemplo 2.1: Preparación de N-Cbz-6-benciloxi-indol-3-aldehído, HDP 30.2803

El material de partida 6-benciloxi-indol-3-aldehído para la síntesis está disponible en el mercado o se puede producir mediante la reacción de Vilsmeier con rendimientos elevados partiendo del 6-benciloxi-indol.

10



No es necesaria una cromatografía para su purificación.



- Se añadió trietilamina (1,66 ml, 11,94 mmol, 1,50 eq) con una jeringa a una
- 5 solución de 6-benzyloxi-3-formil-indol (2,00 g, 7,96 mmol, 1 eq) y (DMAP) 4-dimetilaminopiridina (97,23 mg, 796 μ mol) en diclorometano (20 ml) a 23 °C. Se añadió gota a gota cloroformiato de bencilo (1,45 ml, 10,35 mmol, 1,30 eq) con una jeringa a la solución. Al cabo de 1 h se añadió con la jeringa otra porción de cloroformiato de bencilo (223 μ l, 1,59 mmol, 0,20 eq). Al cabo de 95 min, la
- 10 mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (85 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (85 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (2 $\times$ 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con cloruro de hidrógeno acuoso (1 N, 85 ml) y la capa acuosa resultante se extrajo con diclorometano (2 $\times$ 20 ml). Las capas orgánicas
- 15 combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano / acetato de etilo (4:1) a n-

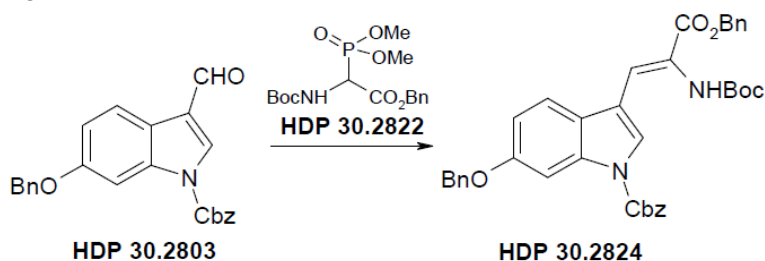
hexano / acetato de etilo (1:1) y dio tras la evaporación 2,33 g (76 %) de HDP 30.2803 en forma de un sólido blanco.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ = ppm)

δ = 5,05 (s, 2H, OCH_2); 5,47 (s, 2H, COOCH_2); 7,06 – 8,14 (m, Ar-H, 14H);

5 10,01 (s, 1H, CHO)

Ejemplo 2.2: Preparación del éster bencílico del ácido [6-benciloxi-1H-(benciloxicarbonil)-3-indol]-2-(terc-butiloxicarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2824



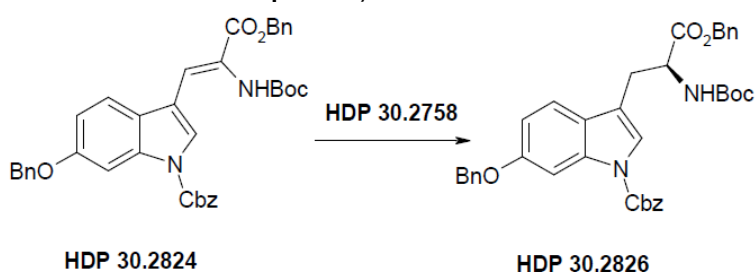
10 Se suspendieron 1,90 g (5,09 mmol) del éster bencílico de la (R,S)-N-Boc- α -dimetilfosfono)-glicina, HDP 30.2822, en atmósfera de argón en 8 ml de diclorometano. Se añadieron 0,705 ml (4,73 mmol) de DBU. Después de 10 min de agitación, se añadieron lentamente 1,66 g (4,31 mmol) de N-Cbz-6-benciloxi-indol-3-aldehído, HDP 30.2803, en 4,7 ml de diclorometano. La mezcla de
15 reacción se agitó durante 5 horas y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 120 ml de acetato de etilo, y la solución orgánica se lavó 2 veces con 50 ml de HCl 1N y 50 ml de salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida para dar 2,70 g de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g
20 de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de n-

hexano a n-hexano / acetato de etilo (1:1) y dio tras la evaporación 2,00 g (73 %) de HDP 30.2824 en forma de un sólido blanco.

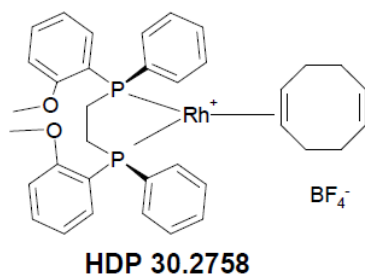
MS (ESI⁺) encontrado: 632,92 [MH]⁺; calc.: 632,25 (C₃₈H₃₆N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 655,25 [M+Na]⁺

5 **Ejemplo 2.3: Preparación del éster bencilico del (S)-6-benciloxi-N-terc-butoxicarbonil-1-Cbz-L-triptófano, HDP 30.2826**



Ejemplo 2.3.1: Síntesis del catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758



10

Se añadieron 97,0 mg (0,20 mmol) de bis(ciclooctadieno-1,5)-dicloro dirodio [Rh(COD)Cl]₂ (n.º CAS: 12092-47-6. Alfa Aesar) a una suspensión de 180,0 mg (0,39 mmol) de (R,R)-DIPAMP (n.º CAS: 55739-58-7, AlfaAesar) en 2,0 ml de metanol/ agua (1,5 ml/0,5 ml). La suspensión de color naranja, agitada

durante 1 hora en atmósfera de argón, dio una solución naranja. El complejo se precipitó añadiendo lentamente (a lo largo de 30 minutos) una solución de 65,0 mg (0,6 mmol) de tetrafluoroborato de sodio en 0,5 ml de agua. Al cabo de 2,5 horas de agitación a temperatura ambiente, los cristales naranjas se separaron mediante filtración, se lavaron dos veces con pequeñas porciones de agua y se secaron a alto vacío. Se obtuvieron 240 mg (81 %) del catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, en forma de un polvo amarillo brillante. El catalizador se usó sin purificación adicional.

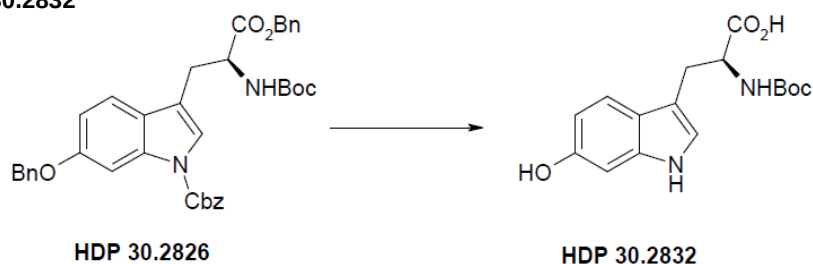
10 **Ejemplo 2.3.2: Síntesis del éster bencílico del (S)-6-benciloxi-N-terc-butoxicarbonil-1-Cbz-L-triptófano, HDP 30.2826**

Se cargó un autoclave de acero inoxidable de 250 ml con 35,0 mg (0,08 mmol) de tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, 1000 mg (1,8 mmol) de éster bencílico del ácido [6-benciloxi-1H-(benciloxicarbonil)-3-indol]-2-(terc-butiloxicarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2824, en 40 ml de metanol seco / 15 ml de diclorometano. Después de cuatro ciclos de vacío/Ar y H₂, la reacción se presurizó a la presión inicial de 1,2 MPa (12 bar). Se dejó que la reacción procediera durante 4 días a temperatura ambiente. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 220 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con n-hexano / acetato de etilo (3:1) y dio tras la evaporación 0,79 g (79 %) de HDP 30.2826 en forma de un polvo blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 634,26 (C₃₈H₃₈N₂O₇)

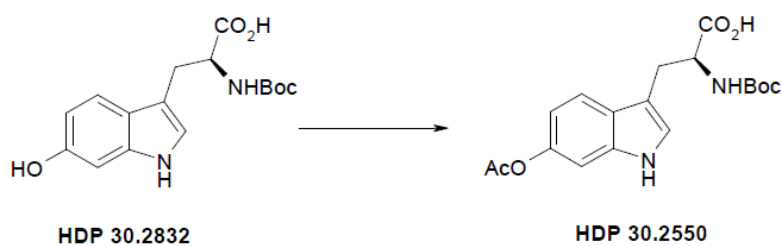
MS (ESI⁺) encontrado: 657,33 [M+Na]⁺;

25 **Ejemplo 2.4: Preparación de N-terc-butoxicarbonil-(S)-triptófano, HDP**

30.2832

Se hidrogenaron 700 mg (1,10 mmol) de éster bencílico del (S)-6-benciloxi-N-terc-butoxicarbonil-1-Cbz-L-triptófano, HDP 30.2826, con 100 mg de Pd/C al 10 % en una mezcla de 7 ml de acetato de etilo y 4 ml de etanol. Tras 3 horas de hidrogenación (control mediante TLC con cloroformo/metanol 19:1 + 1 % de AcOH) a temperatura ambiente y 1 atm, el catalizador se retiró mediante filtración sobre un lecho de Celite®. El disolvente se eliminó y el residuo bruto restante, 378 mg de HDP 30.2832, se usó para la siguiente etapa sin purificación.

Ejemplo 2.5: Preparación de (S)-6-acetiloxi-N-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2550



Se disolvieron 378 mg de HDP 30.2832 bruto (1,10 mmol asumidos) en 2,21 ml de NaOH 1. En atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se añadieron de una vez 208,5 µl (2,20 mmol) de anhídrido acético. La mezcla se

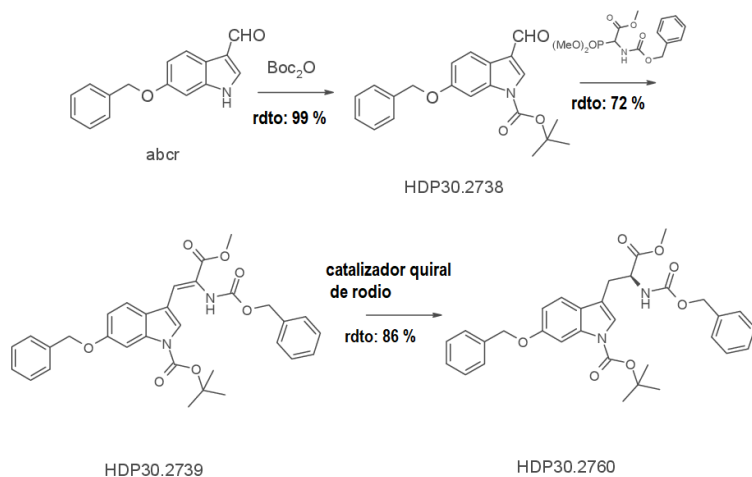
agitó durante 3,5 horas y se acidificó con ácido cítrico al 5 %. La mezcla de reacción se extrajo 3 veces con acetato de etilo, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con cloruro de sodio al 5 % y se secaron sobre MgSO_4 . Mediante filtración y evaporación a sequedad se obtuvieron 380 mg de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 120 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de diclorometano + 2 % de AcOH / diclorometano / metanol (15:1) + 2 % de AcOH y dio tras la evaporación 270 mg (68 %) de HDP 30.2550 en forma de un sólido blanco.

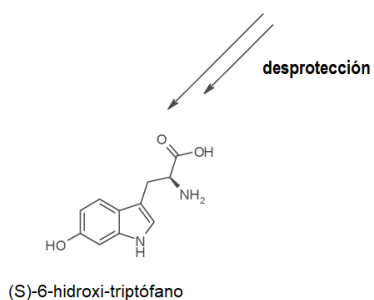
MS (ESI^+) encontrado: 361,17 $[\text{M}-\text{H}]^-$; calc.: 362,15 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$)

MS (ESI^+) encontrado: 723,08 $[2\text{M}-\text{H}]^-$

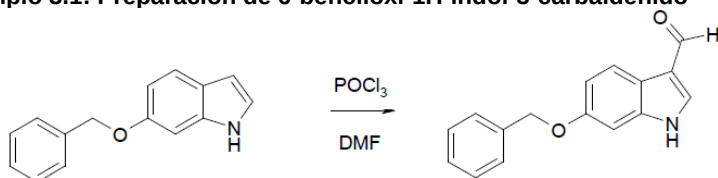
Ejemplo 3: Preparación de (S)-6-hidroxi-triptófano mediante hidrogenación asimétrica del deshidro-aminoácido

La ruta de síntesis se resume en el siguiente esquema de síntesis.





Ejemplo 3.1: Preparación de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído



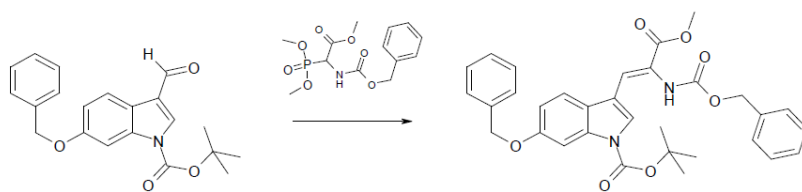
A una solución agitada de oxiclورو de fósforo (10,0 ml, 107,0 mmol) en DMF (35 ml) se añadió una solución de 6-benciloxi-indol (22,3 g, 100,0 mmol) en DMF (25 ml) a temperatura ambiente. Al cabo de 45 min, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo-agua (200 ml). A esta mezcla se añadió NaOH sólido (19,0 g, 475,0 mmol) y agua (100 ml). Al cabo de 30 minutos, se añadió más agua (200 ml) y se sometió a reflujo toda la mezcla durante 3 minutos. El precipitado se recogió, se lavó con 5 porciones de 50 ml de agua fría y se secó para dar 24,8 g (98,8 %) de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído en forma de un polvo blanco. El compuesto era idéntico al material de referencia y suficientemente puro para la siguiente reacción.

Ejemplo 3.2: Preparación de 6-benciloxi-1H-1-terc-butoxicarbonil-indol-3-carbaldehído, HDP 30.2738

**HDP 30.2738**

Se suspendieron 10,0 g (39,8 mmol) de 6-benciloxi-1H-indol-3-carbaldehído en 100 ml de diclorometano y se trataron con 0,56 g (4,5 mmol) de 4-dimetilaminopiridina, DMAP, y 10,5 g (47,3 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo Boc₂O disuelto en 10 ml de diclorometano. Tras agitar durante 2 horas, se añadieron 100 ml de KHSO₄ 1 N y se evaporó el diclorometano. La capa acuosa se extrajo con varias porciones de dietil éter (2 x 200 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con 250 ml de KHSO₄ 1 N, 250 ml de NaHCO₃ 1 N y 250 ml de salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida para dar 12,0 g (86 %) de un polvo rojo-parduzco. El compuesto era suficientemente puro para la siguiente etapa de reacción.

Ejemplo 3.3: Preparación del éster metílico del ácido 3-[6-benciloxi-1H-(1-terc-butoxicarbonil)-3-indol]-2-(benciloxicarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2739

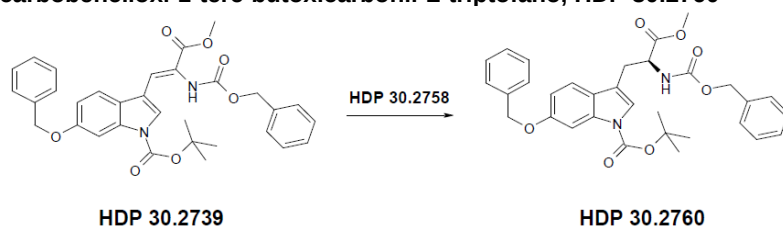
**HDP 30.2738****HDP 30.2739**

Se disolvieron 5,12 g (15,44 mmol) del éster trimetílico de la (R,S)-benciloxicarbonil- δ -fosfonoglicina (n.º CAS: 88568-95-0, Alfa Aesar) en atmósfera de argón en 18 ml de diclorometano. Se añadieron 2,14 ml (14,31 mmol) de DBU. Después de 10 min de agitación, se añadieron lentamente 4,60 g (13,07 mmol) de 6-benciloxi-1H-1-terc-butiloxicarbonil-indol-3-carbaldehído, HDP 30.2738, en 14 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en 300 ml de acetato de etilo, después la solución orgánica se lavó 2 veces con 120 ml de HCl 1N y 120 ml de salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida para dar 7,43 g de un material bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (2:1) y dio tras la evaporación 5,23 g (72 %) de HDP 30.2739 en forma de un sólido blanco.

MS (ESI⁺) encontrado: 557,17 [MH]⁺; calc.: 557,22 ($\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$)

MS (ESI⁺) encontrado: 579,25 [M+Na]⁺

Ejemplo 3.4: Preparación del éster metílico del 6-benciloxi-N-carbobenciloxi-1-terc-butoxicarbonil-L-triptófano, HDP 30.2760



Ejemplo 3.4.1: Síntesis del tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758

El catalizador tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, se sintetizó tal como se describe en el Ejemplo 2.3.1.

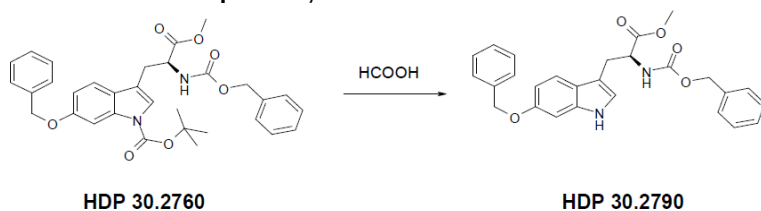
Ejemplo 3.4.2: Síntesis del éster metílico del (S)-6-benciloxi-N-carbobenciloxi-1-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2760

Se cargó un autoclave de acero inoxidable de 250 ml con 60,0 mg (0,08 mmol) de tetrafluoroborato de ciclooctadieno-1,5 [(R,R)-DIPAMP] rodio, HDP 30.2758, y 1000 mg (1,8 mmol) de éster metílico del ácido [6-benciloxi-1H-(1-terc-butoxicarbonil)-3-indol]-2-(benciloxycarbonilamino)-acrílico, HDP 30.2739, en 40 ml de metanol seco. Después de cuatro ciclos de vacío/Ar y H₂, la reacción se presurizó a la presión inicial de 3 MPa (30 bar). Se dejó que la reacción procediera durante 4 días a temperatura ambiente. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 120 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (2:1) y dio tras la evaporación 0,85 g (86 %) de HDP 30.2760 en forma de un sólido blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 558,23 (C₃₃H₃₄N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 581,17 [M+Na]⁺; 1138,83 [2M+Na]⁺

Ejemplo 3.5: Preparación del éster metílico del 6-benciloxi-N-carbobenciloxi-L-triptófano, HDP 30.2790



Se disolvieron 100,0 mg (0,18 mmol) del éster metílico del (S)-6-benciloxi-

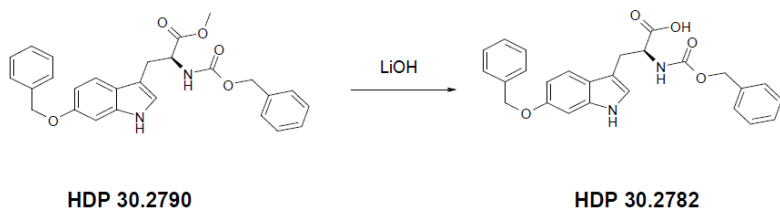
N-carbobenciloxy-1-terc-butoxicarbonil-triptófano, HDP 30.2760, en 5,0 ml de ácido fórmico y se agitó durante 1 hora a 40 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se lavó con agua, NaHCO₃ saturado y salmuera y se secó sobre

5 MgSO₄. Tras la evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 24 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de n-hexano a n-hexano / acetato de etilo (1:1) y dio tras la evaporación 29 mg (35 %) de HDP 30.2790 en forma de un sólido blanco.

10 MS (ESI⁺) calc.: 458,52 (C₂₇H₂₆N₂O₅)

MS (ESI⁺) encontrado: 459,25 [M+H]⁺

Ejemplo 3.6: Preparación de (S)-6-benciloxi-N-carbobenciloxy-triptófano, HDP 30.2782



15 Se añadió una solución acuosa 2 N de LiOH (84,7 µl) a una solución de 25,9 mg (0,056 mmol) de HDP 30.2790 en 1000 µl de tetrahidrofurano/agua (10:1) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas y se repartió entre acetato de etilo y ácido cítrico al 5 %. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron, se secaron

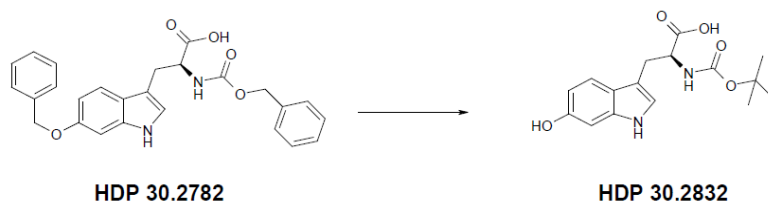
20 (MgSO₄) y se concentraron. El ácido carboxílico HDP 30.2782 resultante se purificó sobre gel de sílice usando diclorometano / metanol (+ 1 % de ácido

acético) como fase móvil. 13,7 mg (55 %), sólido blanco.

MS (ESI⁺) calc.: 444,17,23 (C₂₆H₂₄N₂O₅)

MS (ESI⁺) encontrado: 445,25 [M+H]⁺; 467,17 [M+Na]⁺

Ejemplo 3.7: Preparación de (S)-6-hidroxi-N-(terc-butoxicarbonil)-triptófano, HDP 30.2832



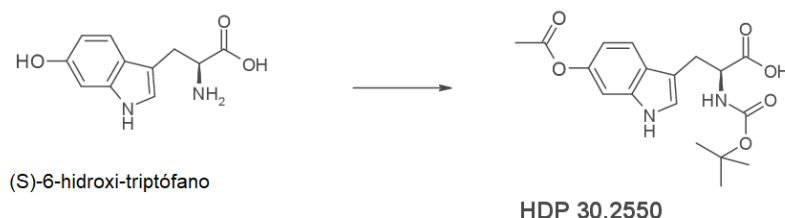
Se añadieron 10 mg (10 % en peso) de paladio sobre carbono a una solución de 50 mg (0,11 mmol) de HDP 30.2782 en 800 µl de metanol. La mezcla de reacción se purgó tres veces con hidrógeno y se agitó durante 2,5 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de un lecho de Celite®, se lavó con metanol y se concentró a sequedad. El residuo sólido de (S)-6-hidroxitriptófano (22,2 mg) se disolvió en 1000 µl de 1,4-dioxano/agua (1:1) y se trató con 101 µl (0,101 mmol) de NaOH 1 N y 21,57 µl (0,10 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas y el pH se ajustó a 2 con ácido clorhídrico 1 N. La solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se evaporaron a sequedad. El HDP 30.2832 bruto resultante se purificó sobre gel de sílice usando diclorometano / metanol (+ 1 % de ácido acético) como fase móvil. 9,9 mg (31 %) de un sólido blanco. El material era idéntico a la muestra de referencia.

MS(ES⁻) calc.: MS.: 320,14 (C₁₆H₂₀N₂O₅)

MS (ESI⁺) encontrado: 319,08 [M-H]⁺

Ejemplo 4: Preparación de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrollo[2,3-b]indol, cis-HDP 30.2555, y trans-HDP 30.2555 (cis,trans-6-acetoxi-Hpi)

5 Ejemplo 4.1: Preparación de (S)-N-(terc-butoxicarbonil)-6-acetoxi-triptófano, HDP 30.2550

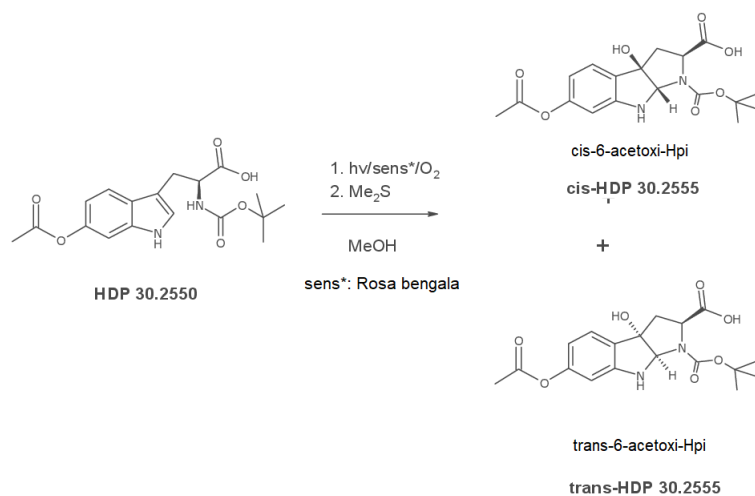


Se suspendieron 590,0 mg (2,68 mmol) del (S)-6-hidroxitriptófano de la etapa de hidrogenación del Ejemplo 3.7 en una mezcla de 30 ml de 1,4-dioxano/agua 1:1 (v/v). En atmósfera de argón se añadieron de una vez 2,68 ml (2,68 mmol) de NaOH 1 N a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se trató después con 574,6 ml (2,68 mmol) de anhídrido de Boc (Boc₂O) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución se acidificó con ácido clorhídrico 1 N a pH 2,4 y se extrajo 3 veces con 25 ml de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron sobre MgSO₄. Mediante filtración y evaporación a sequedad se obtuvieron 785,0 mg de un material bruto. El N-Boc-6-hidroxi-L-triptófano bruto se disolvió en 4,91 ml (4,91 mmol) de NaOH 1 N y se trató con 463,2 ml (500,3 mg, 4,90 mmol) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas en atmósfera de argón y se acidificó con ácido

cítrico al 5 %. La fase acuosa se extrajo tres veces con 25 ml de acetato de etilo, se lavó con NaCl saturado y se secó sobre MgSO_4 . Mediante filtración y evaporación se obtuvieron 635 mg de un sólido bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 nm) con un gradiente de CH_2Cl_2 + 1 % de ácido acético a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (15:1) + 1 % de ácido acético y tras la coevaporación con tolueno dio 564,4 mg (56 % de rendimiento) de un polvo blanco.

MS (ESI⁻) encontrado: 361,08 [M-H]⁻; calc.: 362,15 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$)

10 Ejemplo 4.2: Preparación de cis,trans-6-acetoxi-Hpi



La fotooxigenación se llevó a cabo con una lámpara de sodio de alta presión de 400 W (lámpara Sirius X400, 230 V, 400 W; 55000 lumen a una distancia de 1,3 m). Se usó rosa bengala como sensibilizador colorante. La reacción se llevó a cabo en un vaso de reacción cilíndrico de 500 ml con una camisa de

intercambio de calor hecho de vidrio de borosilicato, con fondo plano y una brida de laboratorio plana (DN) con dos conectores con rosca GL18. La distancia entre la lámpara y el vaso de reacción era de 15 cm y la temperatura de reacción estaba en el intervalo de 3-4 °C.

5 El producto final se purificó en un sistema de cromatografía ultrarrápida Teledyne ISCO con una columna con 330 g de gel de sílice Redi Sept Flash (Teledyne ISCO cat. 69-2203-330). Los disolventes CH_2Cl_2 , $\text{-CH}_3\text{OH}$, CH_3COOH eran de calidad HPLC o BP convencional. Se burbujeó oxígeno seco (99,5 % de pureza) a través de la mezcla de reacción con una velocidad de 2-4 litros por
10 minuto.

Se disolvieron 943,0 mg (2,60 mmol) de N-(terc-butoxicarbonil)-L-6-acetoxi-triptófano, HDP 30.2550, y 100 mg de rosa bengala en 500 ml de metanol y se enfriaron hasta 3°C usando un criostato Hubert con glicol/agua como medio de enfriamiento. La solución de reacción se irradió con la lámpara
15 de sodio de alta presión de 400 W. Durante la irradiación se burbujeó una corriente lenta de oxígeno a través de la solución de reacción. Al cabo de 5 horas de irradiación, se detuvo la oxigenación y el enfriamiento y el medio de reacción se trató con 10 ml de sulfuro de dimetilo. La mezcla se agitó durante 2 horas y se evaporó a sequedad usando un rotavapor con una temperatura del baño de
20 agua de 35 °C. El residuo rojo oscuro se secó adicionalmente a alto vacío para dar un sólido cristalino de 1,20 g. El producto bruto se purificó en una columna con 330 g de gel de sílice (longitud de onda de detección: 254 mm) con un gradiente de CH_2Cl_2 + 5 % de ácido acético a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30:1) + 5 % de ácido acético. Se eluyeron 380 mg de cis-HDP 30.2555 y 290 mg de trans-HDP
25 30.2555 y se coevaporaron con tolueno. Después de la liofilización en terc-

butanol se obtuvieron ambos isómeros en forma de polvos blanquecinos.

cis-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol (cis-HDP 30.2555)

380 mg de cis-HDP 30.2555; rendimiento: 39 %

5 RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

δ = 1,22, 1,44, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,23 (s, 3H, OCOCH_3); 2,46-2,63 (m, 2H, CH_2); 4,14-4,29 (m, 1H, 2-H); 5,35 (s, 1H, 8a-H); 6,39-6,46 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,20-7,24 (m, 1H, 4-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

10 δ = 20,93, 28,45, 31,12, 42,80, 61,12, 69,44, 82,21, 85,82, 87,93, 104,97, 112,98, 124,84, 129,42, 151,51, 154,04, 155,97, 171,34, 175,79

MS (ESI $^+$) encontrado: 378,92 [MH] $^+$; calc.: 378,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

MS (ESI $^+$) encontrado: 401,17 [M+Na] $^+$; calc.: 401,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$)

UV/VIS(CH_3OH): λ_{max} = 296 nm, 239 nm, 215 nm

15 λ_{min} = 266 nm, 227 nm

trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol (trans-HDP 30.2555)

290 mg de trans-HDP 30.2555; rendimiento: 30 %

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

20 δ = 1,22, 1,45, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,22 (s, 3H, OCOCH_3); 2,55-2,73 (m, 2H, CH_2); 4,51-4,57 (m, 1H, 2-H); 5,21-5,24 (s, 1H, 8a-H); 6,36-6,41 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,17-7,18 (m, 1H, 4-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

25 δ = 20,95, 28,50, 31,12, 42,47, 60,97, 69,44, 82,06, 84,84, 87,54, 104,74, 112,67, 125,03, 128,70, 152,31, 154,22, 156,00, 171,23, 174,67

MS (ESI⁺) encontrado: 379,00 [MH]⁺; calc.: 378,14 (C₁₈H₂₂N₂O₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 401,17 [M+Na]⁺; calc.: 401,14 (C₁₈H₂₂N₂NaO₇)

MS (ESI⁺) encontrado: 779,00 [2M+Na]⁺; calc.: 779,28 (C₃₆H₄₄N₄Na₂O₁₄)

UV/VIS(CH₃OH): $\lambda_{\max}$ = 299 nm, 241 nm, 215 nm

5 $\lambda_{\min}$ = 268 nm, 228 nm

Ejemplo 4.3: Introducción de cis,trans-6-acetoxi-Hpi en un precursor de amanitina

La síntesis de amanitina usando cis,trans-6-acetoxi-Hpi se efectuó tal como se describe en el documento PCT/EP2018/071268, cuyo contenido se incorpora
10 en el presente documento por referencia, principalmente con el fin de la habilitación.

Referencias:

- Muraoka S, y Shinozawa T., *J Biosci Bioeng.* 2000; 89 (1): 73-6
- Wieland T, Faulstich H. 1978 *CRC Crit Rev Biochem.* Vol. 5 185-260.
- 15 Zanolli G, Mähringer C, y Wieland T., *Int J. Pept Protein Res.* Oct 1987; 30 (4): 450-9;
- Zanolli G, Wieland T, Benedetti E, Di Blasio 8, Pavone V, y Pedone C. *Int J. Pept Protein Res.* Sep 1989; 34(3): 222-8
- Zhang P, et al., *FEMS Microbiol Lett.* 15 Nov 2005; 252(2): 223-8. Epub 15
20 Sep 2005.

RESUMEN

5 SÍNTESIS DEL (S)-6-HIDROXITRIPTÓFANO Y (S)-6-ACETOLOXI-N-TERC-
BUTOXICARBONIL TRIPTÓFANO MEDIANTE HIDROGENACIÓN
ENANTIOSELECTIVA DE PRECURSORES AMINOÁCIDO OLEFÍNICOS
EMPLEANDO CATALIZADORES QUIRALES DERIVADOS DEL MISMO

10 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos y compuestos
para sintetizar derivados de amanitina. La invención se refiere en particular a
procedimientos para sintetizar derivados del (S)-6-hidroxitriptófano que se
pueden usar como bloques de construcción en la síntesis de derivados de
amanitina o conjugados amatoxina-fármaco. La invención se refiere también a
compuestos intermedios de dichas rutas de síntesis para su uso en la síntesis
15 de derivados de amanitina y conjugados amatoxina-fármaco, así como al uso de
catalizadores particulares adecuados para mediar en dichas rutas de síntesis.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2024/0013052
Recibo: 24-77127
Fecha: 26/09/2024

JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO
CC: 79.339.809
Pago PSE No: 1021426
CUS: 938075504

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente PCT NC2021/0007237

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 214,000	\$ 214,000
TOTAL					\$ 214,000