

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**CICLOPÉPTIDOS  $\beta$ -LACTÁMICOS DE TIPO RGD: SINTESIS,  
ESTUDIO CONFORMACIONAL,  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ANALISIS GÉNICO**

Departamento de Química Orgánica I de la Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

**Xabier Fernández Oyón, 2011**









**ACTA DE GRADO DE DOCTOR**  
**ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL**

DOCTORANDO DON. XABIER FERNÁNDEZ OYÓN

TITULO DE LA TESIS: CICLOPÉPTIDOS β-LACTÁMICOS DE TIPO RGD: SÍNTESIS, ESTUDIO CONFORMACIONAL, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ANÁLISIS GÉNICO

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por \_\_\_\_\_ la calificación de:  
*unanimidad ó mayoría*

Idioma/s defensa: CASTELLANO

En SAN SEBASTIAN a 21 de FEBRERO de 2011

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: \_\_\_\_\_



## **Agradecimientos:**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis Claudio Palomo Nicolau e Iñaki Ganboa Landa el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el departamento de Química Orgánica I de la Universidad del País Vasco en Donostia.

En segundo lugar agradecer al Gobierno Vasco, a la U.P.V. y a Genetadi S. L. las becas y contratos concedidos.

También quisiera dar las gracias al profesor Jesús María Aizpurua por toda la ayuda desinteresada ofrecida para solucionar cualquier tipo de duda que pudiera tener durante la redacción de la tesis.

Durante la realización de esta Tesis he tenido la gran suerte de compartir mi tiempo con muchas personas, secretaria, profesores, técnicos y compañeros del laboratorio, de una calidad humana excepcional, de los que he aprendido muchas cosas y con los que me lo he pasado muy bien. Además algunas de ellas se han convertido en personas muy importantes para mí, a todos ellos muchas gracias

También quisiera agradecer a mis amigos de Donosti, a “la casa de los líos” y a la peña de Cascante todos los buenos momentos que me han hecho pasar y el apoyo mostrado.

Por último quisiera dar las gracias a mi familia por el apoyo incondicional que me ha dado en todo momento. A mi amona por darme todo el cariño que un nieto necesita y más; a mi aita por enseñarme a pasármelo bien en cualquier parte; a mi ama por enseñarme a tirar siempre “palante”; a mi hermano Iñaki por ser mi apoyo incondicional; a mis hermanos Kepa y Mikel por su interés y apoyo constante; a mis cuñadas Esther y Pili y a los “peques” Urko y June sin ellos esto no hubiera sido posible.





*“Resistir es vencer”*

*Anibal Barca*



**Abreviaturas y acrónimos**

Arg (R)	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp (D)	Ácido Aspártico
BAIB	Bisacetoxiyodobenceno
$\beta$ -LSAD	$\beta$ -Lactam Scaffold-Assisted Design
CAN	Nitrato de Cerio(IV) y amonio
cat.	Catalizador
CPP	Ciclopentapéptido
COSY	Espectro de protón de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones (COrrrelation SpectroscopY)
DBN	1,5-diazabicyclo(4,3,0)-non-5-eno
DBU	1,8- diazabicycloundec-7-eno
DIPA	Diisopropilamina
DM	Dinámica Molecular
EEDQ	2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina
EDC·HCl	Clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N-N',N'- tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxi-1H-benzotriazol
HPLC-MS	Cromatografía fase líquida a alta presión – Espectrometría de Masas
HUVEC	Células endotélicas de vena umbilical humana (Human umbilical vein endothelial cells)
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria al 50%

J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
MEC	Matriz extraceclular
MIDAS	Metal-ion-dependent adhesion site
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
NMM	N-metilmorfolina
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement; Efecto Nuclear de Overhauser
NOESY	Espectroscopía nuclear de Overhauser de dos Dimensiones
Ns-	Nitrobenzenosulfonilo
Pbf-	2,2,4,6,7-Pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PG	Protecting Group (Grupo Protector)
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (Angioplastia percutánea transluminal coronaria)
RGD	Arginina-Glicina-Aspártico
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
TBDMS	Terc-butildimetil sililo
TEA	Trietilamina
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía de capa fina

**Publicaciones:****1. “Cyclic RGD  $\beta$ -lactam peptidomimetics induce differential gene-expression in human endothelial cells”**

J.M. Aizpurua, J.I. Ganboa, C. Palomo, I. Loinaz, J. Oyarbide, X Fernandez, E. Balentová, R. M. Fratila, A. Jiménez, J. I. Miranda, A. Laso, S. Ávila, J. L. Castrillo. *ChemBioChem*, **2001**, 11, 401-405.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. La adhesión celular y la matriz extracelular .....	1
1.2. Las integrinas .....	2
1.3. Integrina $\alpha_v\beta_3$ y angiogénesis .....	7
1.3.1. Diseño de inhibidores selectivos de la integrina $\alpha_v\beta_3$ .....	10
1.3.2. Estructura secundaria: giros $\gamma$ y giros $\beta$ .....	20
1.4. Ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos. Antecedentes.....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
3.1. Ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos: Modificación de las $\beta$ -lactamas. Fines y planteamiento.....	35
3.2. Propuesta general para la síntesis de las $\beta$ -lactamas.....	43
3.3. Propuesta para la síntesis de trans $\beta$ -lactamas .....	47
3.4. Otras propuestas para la síntesis de cis y trans $\beta$ -lactamas .....	51
3.4.1. Síntesis de trans $\beta$ -lactamas.....	53
3.4.2. Preparación de cis $\beta$ -lactamas.....	67
3.4.3. Preparación de los pentapéptidos <b>26a-d</b> y ciclación de los mismos .....	73
3.4.4. Desprotección final del ciclo .....	94
3.5. Análisis conformacional de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD.....	102
3.6. Modelización de la interacción RGD/integrina $\alpha_v\beta_3$ (Docking).....	116
3.7. Síntesis del Cilengitide .....	119
3.8. Estudio de la actividad biológica de ciclopéptidos $\beta$ - lactámicos tipo RGD .....	122
3.9. Análisis génico del compuesto <b>28b</b> .....	128
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>135</b>
4.1. Materiales y métodos.....	135
4.1.1. Sistemas, disolventes y reactivos .....	135
4.1.2. Cromatografía.....	136



4.1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	136
4.1.4. Polarimetría, puntos de fusión, IR, análisis elemental y masas exactas .....	137
4.2. Síntesis de la 2-(terc-butildimetilsililoxi)etanolamina .....	137
4.3. Síntesis del (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-carbaldehído .....	138
4.4. Procedimiento general de síntesis de las $\beta$ -Lactamas <b>16a,c</b> . Reacción de Staudinger .....	139
4.4.1. (3R,4S)-3-Benciloxi-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona .....	140
4.4.2. (3S,4R)-3-Benciloxi-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona .....	141
4.5. Procedimiento general de síntesis de las $\beta$ -Lactamas <b>15a,c</b> . Reacción de Staudinger .....	142
4.5.1. (3R,4S)-3-Ftalimidoil-1-[2-(terc-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona .....	143
4.5.2. (3S,4R)-3-Ftalimidoil-1-[2-(terc-butildimetilsililoxi)etil]-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona .....	144
4.6. Procedimiento general para la desprotección del grupo bencilo en <b>17a,c</b> .....	145
4.6.1. (3R,4S)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-hidroxi-azetidín-2-ona .....	146
4.6.2. (3S,4R)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-hidroxi-azetidín-2-ona .....	147
4.7. Procedimiento general para la protección del grupo hidroxilo en las 3-hidroxi- $\beta$ -lactamas <b>19a,c</b> .....	148
4.7.1. (3R,4S)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobencenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona .....	149
4.7.2. (3S,4R)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobencenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona .....	150
4.8. Procedimiento general para la preparación de las trans-3-azido- $\beta$ -lactamas <b>21b,d</b> .....	151
4.8.1. (3S,4R)-3-Azido-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	152
4.8.2. (3R,4S)-3-Azido-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	153
4.9. Procedimiento general para la reducción del grupo azida a grupo amino en <b>22b,d</b> .....	154

---

4.9.1. (3S,4R)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	155
4.9.2. (3R,4S)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	156
4.10. Procedimiento general para la desprotección del grupo ftalimido en <b>22a,c</b> .....	157
4.10.1. (3R,4R)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	158
4.10.2. (3S,4S)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona .....	159
4.11. Descripción general del acoplamiento del Z-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH con las $\alpha$ -amino $\beta$ -lactamas <b>23a-d</b> .....	160
4.11.1. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] .....	161
4.11.2. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] .....	162
4.11.3. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] .....	163
4.11.4. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] .....	164
4.12. Procedimiento general para la desprotección del grupo TBDMS en <b>24a-d</b> .....	165
4.12.1. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-1-etoxi-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona].....	166
4.12.2. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-etoxi-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona].....	167
4.12.3. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-1-etoxi-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona].....	168
4.12.4. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-1-etoxi-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona].....	169
4.13. Procedimiento general para la transformación de las $\beta$ -lactamas <b>24a-d</b> a los ácidos carboxílicos <b>25a-d</b> .....	170

4.13.1. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli.....	171
4.13.2. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli.....	172
4.13.3. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli.....	173
4.13.4. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli.....	174
4.14. Procedimiento general para la síntesis de Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)- $\beta$ -lactam-Gli-Arg(Pbf)-GliOBn <b>26a-d</b> .....	175
4.14.1. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn.....	176
4.14.2. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn.....	177
4.14.3. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-Obn .....	178
4.14.4. Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn.....	179
4.15. Procedimiento general para la desprotección y ciclación de los compuestos <b>26a-d</b> .....	180
4.15.1. Ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli} .....	181
4.15.2. Ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli} .....	182
4.15.3. Ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli} .....	183
4.15.4. Ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gi-Arg(Pbf)-Gli} .....	184
4.16. Procedimiento general para la desprotección del ciclo{Asp- $\beta$ -lactam-Gli-Arg-Gli} <b>27a-d</b> .....	185
4.16.1. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}.....	186
4.16.2. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}.....	187
4.16.3. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}.....	188

---

4.16.4. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}.....	189
<b>5. ESPECTROS DE <sup>1</sup>H Y <sup>13</sup>C.....</b>	<b>193</b>
<b>6. ANEXOS.....</b>	<b>227</b>
6.1. Espectros de <sup>1</sup> H y COSY de los compuestos <b>25a-d</b> .....	227
6.2. Espectros realizados en D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O (10:90) para el estudio conformacional de los compuestos <b>28a-d</b> .....	231
6.2.1. Compuesto <b>28a</b> .....	231
6.2.2. Compuesto <b>28b</b> .....	234
6.2.3. Compuesto <b>28c</b> .....	237
6.2.4. Compuesto <b>28d</b> .....	240
6.3. Clusters de energía restantes de las familias <b>28a-d</b> .....	243
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>249</b>
<b>8. PUBLICACIONES Y PATENTES .....</b>	<b>253</b>



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. **INTRODUCCIÓN**

### 1.1. **La adhesión celular y la matriz extracelular**

La matriz extracelular (MEC) es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio intercelular y que son secretados por las propias células. Tiene múltiples funciones: organiza las células para formar tejidos y coordina sus funciones, proporciona una vía para las migraciones celulares, activa las vías clásicas de transducción de señales que inducen el crecimiento y la proliferación de las células, así como la expresión génica entre otros<sup>1</sup>. Las principales macromoléculas que componen la matriz extracelular son: el colágeno, la elastina, los glucosaminoglucanos, los proteoglucanos y las glicoproteínas.

Así, los procesos fisiológicos como la embriogénesis, la diferenciación celular, la hemostasia, la cicatrización de heridas y la respuesta inmune están regulados por interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Ya en las primeras etapas del desarrollo embrionario, la adhesión entre las células y entre las células y la matriz extracelular contribuyen a la determinación del desarrollo morfológico del feto. Las interacciones de las células con las diferentes moléculas presentes en la matriz extracelular hacen posible la activación y el desarrollo de estos procesos. La adhesión celular también regula procesos fisiológicos tales como la invasión de tejidos por células tumorales y los procesos de metástasis y de angiogénesis<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> a) P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, C. M. Waterman, *Nature* **2010**, 468, 580. b) D. R. Critchley, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, 38, 235. c) M. E. Hemler, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, 10, 578. d) R. A. Black, J. M. White, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, 10, 654.

<sup>2</sup> a) M. J. Rutkowski, M. E. Sughrue, A. J. Kane, S. A. Mills, A. T. Parsa, *Molec. Cancer. Res.* **2010**, 8, 1453. b) S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, 4, 2868. c) R.O. Hynes, A. D. Lander, *Cell* **1992**, 68, 303. d) J. Travis, *Science* **1993**, 260, 906. e) P. Carmeliet, *Nature Medicine* **2000**, 6, 389. f) P. Auguste, S. Lemiére, F. Larriéu-Lahargue *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, 54, 53.



La célula está en contacto con su matriz extracelular (MEC) y con las células contiguas a través de los receptores que presenta en su membrana. Se conocen cuatro grandes familias de receptores: las integrinas, las cadherinas, las selectinas y las inmunoglobulinas.

### 1.2. Las integrinas

Las integrinas<sup>3</sup> son las proteínas más importantes en la mediación de la célula con la matriz extracelular. Las integrinas son receptores  $\alpha$ ,  $\beta$  heterodiméricos unidos por un enlace no covalente. Son glicoproteínas transmembrana formadas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ . Presentan varios dominios extracelulares extensos, una hélice transmembrana y unos dominios intracitoplasmáticos cortos (Figura 1.1).

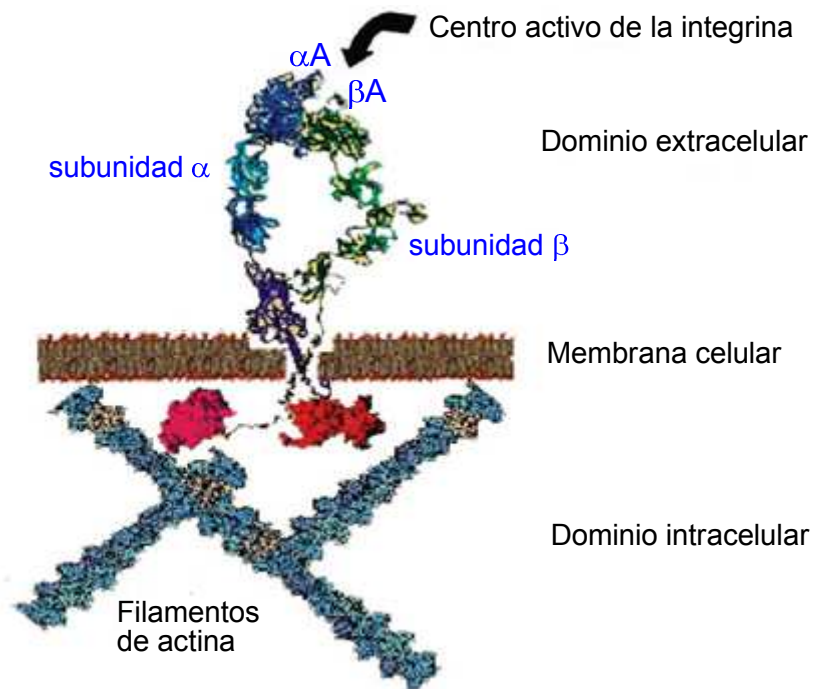


Figura 1.1. Imagen de una integrina

---

<sup>3</sup> a) S. Cabodi, M. P. Camacho-Leal, P. Di Stefano, P. Defilippi, *Nature Rev. Cancer* **2010**, 10, 858. b) E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, 12, 697. c) M.J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311. d) J. B. Ambros, M. Schwaiger, *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, 27, 631.

También es conocido, que sólo los dominios  $\alpha A$  y  $\beta A$ , correspondientes a los extremos más externos de dichas ramas, interaccionan con el ligando y por tanto, desencadenan la transducción de la señal al interior de la célula. Es más, el carbono-terminal de la subunidad  $\beta^4$  conecta la integrina con filamentos de actina del citoesqueleto a través de proteínas intracelulares como la talina<sup>5</sup>, la vinculina<sup>6</sup> y la  $\alpha$ -actinina<sup>7</sup>. Esto permite la unión de las células a la matriz extracelular y la transducción de la señal al interior de la célula.

Además de la adhesión de la célula a la MEC (matriz extracelular), las integrinas también median en procesos intracelulares como el control de la forma celular, la migración, la proliferación, la supervivencia y la apoptosis celular<sup>8</sup>.

Hoy en día se conocen 8 subunidades  $\beta$  y 18 subunidades  $\alpha$ , las cuales se combinan para formar 24 tipos de integrinas presentes en las células de los mamíferos. Éstas se pueden clasificar de acuerdo a la estructura de las ramas  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 1.2).

---

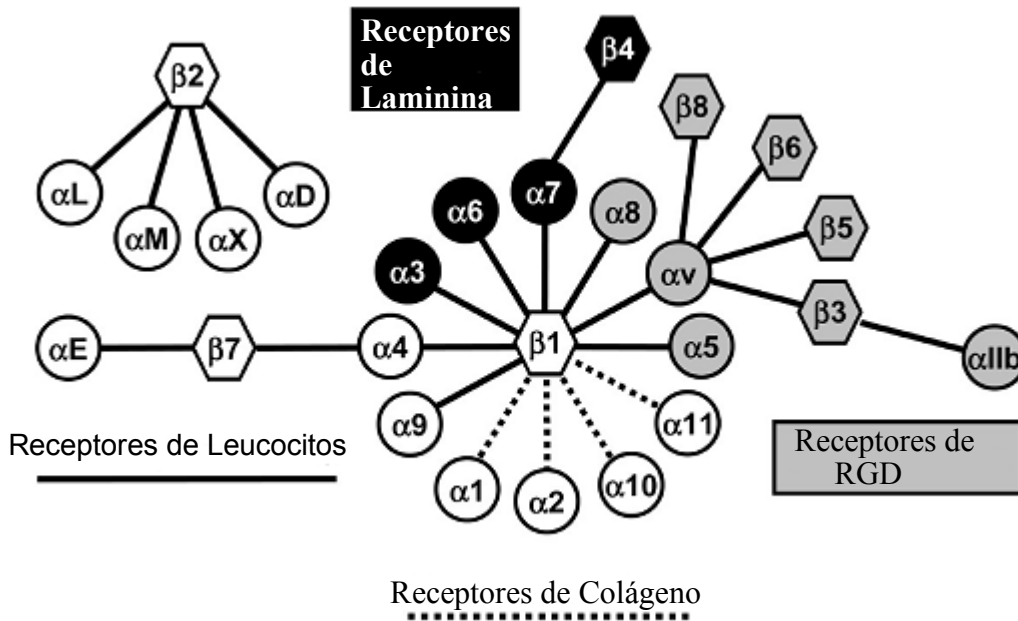
<sup>4</sup> R.O. Hynes, *Cell* **1987**, 48, 549.

<sup>5</sup> a) M. Thomas, M. Felcht, K. Kruse, S. Kretschmer, C. Deppermann, A. Biesdorf, K. Rohr, A. V. Benest, U. Fiedler, H. G. Augustin, *J. Biol. Chem.* **2010**, 31, 23842. b) D.J. Rees, S.E. Ades, J. Singer, R.O. Hynes, *Nature* **1990**, 347, 685.

<sup>6</sup> a) D. M. Beauvais, A. C. Rapraeger, *J. Cell Sci.* **2010**, 21, 3796. b) A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, 373, 197. b) R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, 373, 261.

<sup>7</sup> a) B. Addario, L. Backman, *Cell. Mol. Biol. Lett* **2010**, 15, 665. b) C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell. Biol.* **1990**, 111, 721.

<sup>8</sup> a) A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, 10, 220. b) R. O. Hynes, *Cell* **2002**, 110, 673. c) L. Belvisi, A. Bernardi, M. Colombo, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, G. Giannini, M. Marcellini, T. Riccioni, M. Castorina, P. LoGiudice, C. Pisano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 169.



**Figura 1.2. Esquema de las diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en las diversas integrinas y sus ligandos naturales**

Las integrinas permanecen en estado quiescente sobre la membrana celular, esperando la señal bioquímica que las active. Las sobreexpresiones de las integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$  ó  $\alpha_5\beta_1$  están asociadas al desencadenamiento de importantes mecanismos biológicos relacionados con procesos tumorales. Así, por ejemplo, la primera está implicada en la agregación plaquetaria<sup>9</sup>, la segunda (junto con la  $\alpha_5\beta_5$ ) regula la angiogénesis<sup>10</sup> o la migración celular en músculo blando vascular<sup>11</sup> y las dos últimas están implicadas en la adhesión de osteoclastos en la matriz ósea<sup>12</sup>.

<sup>9</sup> a) R. K. Andrews, E. E. Gardiner, Y. Shen, M. C. Berndt, *IUBMB Life* **2004**, *56*, 13. b) J. Wityak, T. M Sielecki, *Exp. Opin. Ther. Patents* **1996**, *6*, 1175.

<sup>10</sup> a) J. J. Marugán, C. Manthey, B. Anaclerio, L. Lafrance, T. Lu, T. Markotan, K. A. Leonard, C. Crysler, S. Eisennagel, M. Dasgupta, B. Tomczuk, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926. b) M. Cardo-Vila, W. Arap, R. Pasqualini, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1151. c) F. A. L. M. Eskens, H. Dumez, R. Hoekstra, A. Perschl, C. Brindley, S. Bottcher, W. Wynendaele, J. Drevs, J. Verweij, A. T. van Oosterom, *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 917. d) S. Strömblad, D. A. Cheresh, *Cell Survival Chem. Biol.* **1996**, *3*, 881. e) X. Chen, C. Plasencia, Y. Hou, N. Neamati, *J Med. Chem.* **2005**, *48*, 1098. (corrigendum, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5874.). f) B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227. g) G. C. Tucker, *Curr. Oncol. Rep.* **2006**, *2*, 96.

<sup>11</sup> a) H. Matsuno, J. M. Stassen, J. Vermylen, H. Deckmyn, *Circulation* **1994**, *90*, 2203. b) E. T. Choi, L. Engel, A. D. Callow, S. Sun, J. Trachtenberg, S. Santoro, U. S. Ryan, *J. Vasc. Surgery*

Por ello, no es de extrañar que diferentes ligandos capaces de interferir selectivamente estos procesos de adhesión sean considerados como principios activos en el tratamiento de patologías tales como la trombosis, la metástasis de tumores sólidos cancerosos, la restenosis posterior a la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) o la osteoporosis.

Existen diferentes proteínas naturales presentes en la matriz extracelular que actúan como ligandos selectivos de integrina (Tabla 1.1). Mientras que un ligando puede ser selectivo para una sola integrina, hay otros ligandos que interactúan con más de una integrina, dependiendo de cual esté expresada en la célula en ese momento.

**Tabla 1. 1. Diferentes tipos de integrinas y sus ligandos naturales**

Integrina	Ligando (proteína)
$\alpha_2\beta_1$	colágeno, laminina
$\alpha_3\beta_1$	laminina, colágeno I, epiligrina, fibronectina
$\alpha_4\beta_1$	fibronectina, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina
$\alpha_v\beta_1$	fibronectina, vitronectina
$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha_{IIb}\beta_3$	fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, vWF
$\alpha_v\beta_3$	vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, colágeno, trombina, osteopontina, tenascina

En varios de estos ligandos hay una secuencia peptídica mínima común, la tríada Arg-Gli-Asp (RGD), implicada en el reconocimiento de integrinas tales como la  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_v$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ;

---

**1994**, 19, 125. c) L. Liaw, M. Almeida, C. E. Hart, S. M. Schwartz, C. M. Giachelli, *Circ. Res.* **1994**, 74, 214.

<sup>12</sup> a) L. T. Duong, G. A. Rodan, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2001**, 2, 95. b) P. G. Robey, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, 28, 227. c) V. W. Engleman, G. A. Nickols, F. P. Ross, M. A. Horton, D. W. Griggs, S. L. Settle, P. G. Ruminiski, S. L. Teitelbaum, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 2284. d) G. Van der Pluijm, H. Mouthaan, C. Baas, H. de Groot, S. Papapoulos, C. Löwik, *J. Bone Miner. Res.* **1994**, 9, 1021. e) M. H. Helfrich, S. Nesbitt, M. Horton, *J. Bone Miner. Res.* **1992**, 7, 345.

Así, durante estos últimos años se han sintetizado diferentes pseudopéptidos de bajo peso molecular, miméticos de RGD, para desarrollar compuestos de alto interés farmacológico. Estas moléculas deben actuar como buenos ligandos (mostrar una preferencia por el centro activo mayor que su ligando natural) y además tener propiedades farmacodinámicas y estabilidad proteolítica superiores a las proteínas naturales.

Sin embargo, el problema es más difícil de lo que parece a primera vista, ya que un ligando con elevada afinidad respecto a la integrina  $\alpha_V\beta_3$  pierde todo su interés como compuesto terapéutico si su afinidad también es elevada frente a otras integrinas, como por ejemplo la  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , puesto que podría generar reacciones adversas a las deseadas como hemorragias, accidentes cardiovasculares, trombos...

Por lo tanto, la cuestión clave a resolver para disponer de ligandos eficaces sería la de obtener la máxima afinidad<sup>13</sup> y selectividad frente a las diferentes integrinas, logrando la máxima eficacia terapéutica con riesgo mínimo de reacciones adversas.

El punto crucial para resolver el problema de la actividad y selectividad parece residir en la identificación y fijación de las diferentes conformaciones de la tríada RGD mediante la estabilización de determinados enlaces de hidrógeno amídicos, con la imposición de restricciones a dicha secuencia o a sus miméticos equivalentes<sup>14</sup>. La presente memoria trata sobre la síntesis de nuevos inhibidores de la integrina  $\alpha_V\beta_3$ .

---

<sup>13</sup> La afinidad o potencia de un ligando se expresa en valores  $IC_{50}$ , correspondientes a la concentración de ligando necesaria para desplazar el 50% de alguna de las proteínas naturales antes mencionadas adheridas a la integrina estudiada. Por ejemplo, cuando se quiere medir la actividad inhibitoria de un ligando frente a la integrina  $\alpha_V\beta_3$ , se suele utilizar la vitronectina que es la proteína natural selectiva de esta integrina; análogamente cuando la actividad a medir es la de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , la proteína a desplazar suele ser el fibrinógeno

<sup>14</sup> Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1992**, 31, 326.

### 1.3. Integrina $\alpha_v\beta_3$ y angiogénesis

Judah Folkman<sup>15</sup> fue el primero en documentar que el crecimiento de un tumor sólido queda restringido a un tamaño de 2-3 mm de diámetro si no se activa el mecanismo de la angiogénesis. Así, mediante la generación de nuevos capilares, el tumor recibe el oxígeno y los nutrientes que necesita.

La angiogénesis<sup>2</sup> es un proceso de muchos pasos, que es regulado por un balance entre factores angiogénicos (factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento endotérmico) y otros antiangiogénicos<sup>16</sup>(angiostatina, endostatina y trombospondina).

Un efecto fácilmente reconocible de la angiogénesis es la capacidad para formar nuevos capilares sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Este fenómeno es esencial en la cicatrización de heridas, durante el desarrollo embrionario, en la menstruación y en los procesos antiinflamatorios, aunque también favorece los procesos de vascularización y metástasis de tumores<sup>17</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, la integrina  $\alpha_v\beta_3$  regula diferentes procesos como la angiogénesis, la migración celular en músculo blando vascular y la adhesión de osteoclastos en la matriz ósea<sup>12</sup>. Además, se ha demostrado, que dicha integrina es un importante receptor que regula el crecimiento de tumores, la invasión local y la metástasis potencial del tumor<sup>18</sup> en procesos cancerosos.

---

<sup>15</sup> J. Folkman, N. Engl. J. Med. **1971**, 285, 1182.

<sup>16</sup> a) L. M. Ellis, W. Liu, F. Fan, Y. D. Jung, N. Reinmuth, O. Stoeltzing, *Oncology* **2002**, 16, 14. b) W. Cai, X. Chen, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2006**, 6, 407. c) P. Carmeliet, R. K. Jain, *Nature* **2000**, 407, 249.

<sup>17</sup> a) G. Poste, I. J. Filder, *Nature* **1980**, 283, 139. b) G. L. Nicholson, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 695, 113. c) L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1986**, 46, 1. d) L. A. Liotta, C. N. Rao, U. M. Wewer, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 1037.

<sup>18</sup> a) J. D. Hood, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 91. b) E. Ruoslati, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 83.

Esta integrina se sobreexpresa en la membrana celular de diferentes tumores malignos promoviendo la adhesión de las células tumorales con diferentes proteínas de la matriz extracelular (MEC), permitiendo a estas células migrar durante la invasión y la extravasación<sup>19</sup>. La sobreexpresión aparece únicamente en las células endoteliales próximas al estímulo, mientras que en el resto de células endoteliales<sup>20</sup> y en la mayoría de los sistemas de órganos en estado normal no se encuentra.

Después de la activación de las células endoteliales, las enzimas proteolíticas como la serina proteasa y la matriz metaloproteínasa (MMP)<sup>21</sup> son excretadas por la célula. Estas enzimas degradan la membrana basal, y es en este punto, donde las integrinas tienen un papel crucial, ya que permiten la migración de las células endoteliales a través de esta membrana basal<sup>22</sup> (Figura 1.3).

Las integrinas no solo están implicadas en procesos de adhesión celular sino que también regulan el crecimiento de las células endoteliales y su supervivencia mediante la inhibición de la apoptosis y diferenciación durante los procesos angiogénicos.

Resumiendo, el tumor requiere de la angiogénesis para nutrirse y para una rápida proliferación de sus células. Estos nuevos vasos sanguíneos generados, además de nutrir al tumor primario, son utilizados por las células tumorales como vía para entrar en el torrente sanguíneo, dando lugar al

---

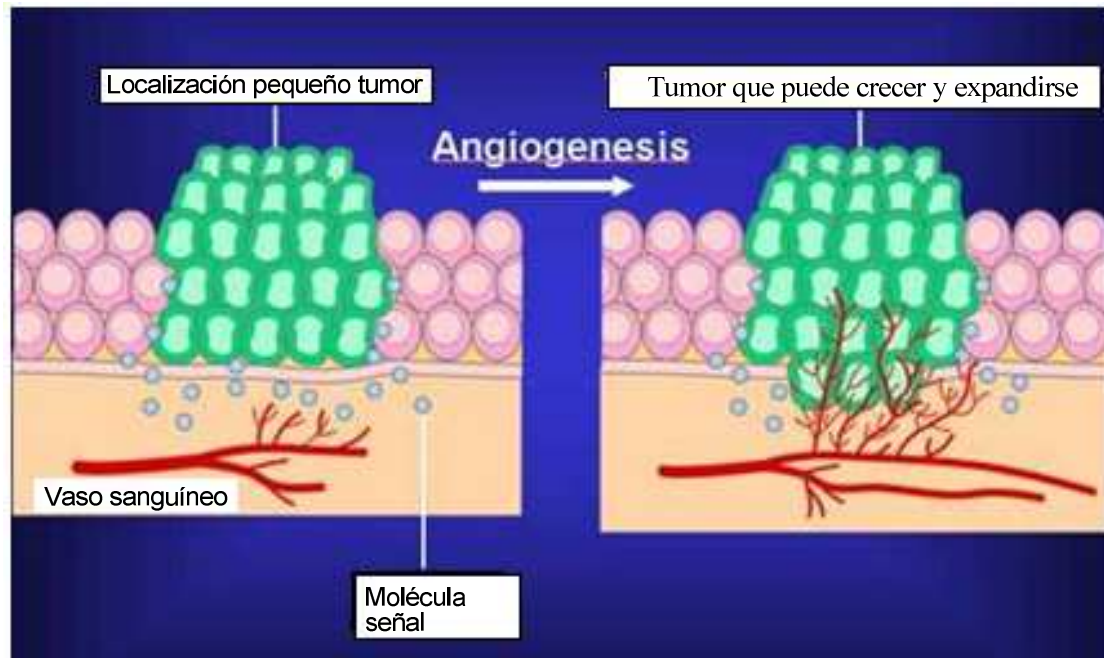
<sup>19</sup> a) Felding-Habermann, *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, 20, 203. b) P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, 264, 569. c) P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, 79, 1157.

<sup>20</sup> a) L. Damjanovich, S. M. Albelda, S. A. Mette, C. A. Buck, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, 6, 197. b) J. E. Bridges, P. Englefield, I. E. Boyd, W. R. Roche, E. J. Thomas, *Int. J. Gynecol. Cancer* **1995**, 5, 187.

<sup>21</sup> a) D. Bourbouli, W. G. Stetler-Stevenson, *Semin. Cancer Biol.* **2010**, 20, 161. b) J. E. Rundhaug, *J. Cell. Moll. Med.* **2005**, 9, 267.

<sup>22</sup> a) D. T. Rutkowski, R. S. Hedge, *J. Cell Biol.* **2010**, 189, 783. b) B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh, *Cancer J. Sci. Am.* **2000**, 6, 245.

fenómeno de metástasis. Durante la metástasis la célula cancerígena origina un elevado número de interacciones adhesivas diferentes, que implican la formación incontrolada de vasos sanguíneos



**Figura 1.3. Esquema general del proceso de angiogénesis inducido por un tumor**

Como consecuencia de estos fenómenos se han diseñado varios antagonistas de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  con el fin de bloquear el mecanismo de angiogénesis que activa un tumor. Además se ha descubierto que estos compuestos no afectan a los vasos sanguíneos preexistentes, por lo que presentan un perfil farmacológico aceptable. Los inhibidores de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  no solo bloquean la angiogénesis induciendo la apoptosis de nuevas células tumorales creadas, sino que en algunos casos puede observarse hasta una regresión en el tamaño de la masa tumoral<sup>23</sup>.

<sup>23</sup> P.C. Brooks, S. Stomblad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1995**, 96, 1815.



### 1.3.1. Diseño de inhibidores selectivos de la integrina $\alpha_v\beta_3$

Hasta la fecha, se han sintetizado diferentes inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Sin embargo, bien sea por problemas de toxicidad, estabilidad metabólica, selectividad, o especificidad no se han conseguido inhibidores suficientemente eficaces y selectivos para dicha integrina. Las diferentes estrategias desarrolladas encaminadas a alcanzar este fin se describen a continuación.

Por un lado, el empleo de anticuerpos monoclonales<sup>24</sup> mAb (monoclonal antibodies). Así el Abegrin<sup>25</sup> (Vitaxin II ó MEDI-522), el CNTO95<sup>26</sup> (Centocor) y el abciximab<sup>27</sup> (C7E3) están siendo analizados como antagonistas de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  y se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos en varias terapias antitumorales.

Por otro lado está el uso de desintegrinas. Estas son una familia de compuestos de bajo peso molecular (47-84 aminoácidos) ricas en cisteína y que presentan la secuencia RGD en su estructura y bloquean la interacción de los ligandos naturales con las integrinas de la pared celular. Son proteínas

---

<sup>24</sup> a) F. Guo, S. Das, B. M. Mueller, C. F. Barbas III, R. A. Lerner, S. C. Sinha, *PNAS* **2006**, *103*, 11009. b) C. C. Kumar, M. Malkowski, Z. Yin, E. Tanghetti, B. Yaremko, T. Nechuta, J. Varner, M. Liu, E. M. Smith, B. Neusdadt, M. Presta, L. Armstrong, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2232.

<sup>25</sup> a) J. C. Gutheil, T. N. Campbell, P. R. Pierce, J. D. Watkins, W. D. Huse, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3056. b) S. R. Patel, J. Jenkins, N. Papadopoulus, M. A. Burgess, C. Plager, J. Gutterman, R. S. Benjamin, *Cancer* **2001**, *92*, 1347. c) J. A. Posey, M. B. Khazaeli, A. del Grosso, M. N. Saleh, C. Y. Lin, W. Huse, A. F. Lobuglio, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2001**, *16*, 125.

<sup>26</sup> a) Q. Chen, C. D. Manning, H. Millar, F. L. MacCabe, C. Ferrante, C. Sharp, L. Shahied-Arruda, P. Doshi, M. T. Nakada, G. M. Anderson, *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 139. b) M. Trikha, Z. Zhou, J. A. Nemeth, Q. Chen, C. Sharp, E. Emmell, J. Giles-Komar, M. T. Nakada, *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 326. c) S. A. Mullamita, N. C. Ton, G. J. M. Parker, A. Jackson, P. J. Julyan, C. Roberts, G. A. Buonaccorsi, Y. Watson, K. Davies, S. Cheung, L. Hope, J. W. Valle, J. A. Radford, J. Lawrance, M. P. Saunders, M. C. Munteanu, M. T. Nakada, J. A. Nemeth, H.M. Davis, Q. Kiao, U. Prabhakar, Z. Lang, R. B. Corrigham. R. A. Beckam, G.C. Jayson, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *25*, 1651.

<sup>27</sup> a) J. A. Varner, M. T. Nakada, R. E. Jordan, B. S. Collier, *Angiogenesis* **1999**, *3*, 53.

aisladas del veneno de las serpientes de la familia Viperidae, y podemos encontrar inhibidores de la integrina  $\alpha_V\beta_3$  como la equistatina<sup>28</sup> y la contortostatina<sup>29</sup>.

Otra estrategia se basa en el uso de silenciadores de ARN (siARN). Esta técnica consigue inhibir la expresión génica, y se está utilizando en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cáncer<sup>30</sup>. El silenciador de ARN consiste en un complejo constituido por múltiples proteínas, denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este complejo se une a una de las cadenas de ARN, y busca al ARN mensajero<sup>31</sup>, (ARNm), al que se adhiere e inicia su degradación total. Una vez degradado, el complejo está libre para buscar una nueva cadena de ARNm. Cuando el ARNm que codifica una proteína determinada desaparece, ésta no puede ser sintetizada, con lo que se elimina el efecto biológico al que da lugar.

La cuarta estrategia se basa en el diseño de péptidos y de peptidomiméticos de RGD. Los peptidomiméticos son sustancias que presentan sustituyentes análogos y la misma estructura secundaria que el péptido natural al que imitan, permitiendo desplazar al péptido original de receptores o enzimas. Se preparan manteniendo la secuencia del péptido natural y alterando mínimamente su entorno a través de aminoácidos o enlaces amídicos modificados (pseudopéptidos) o introduciendo otro tipo de enlaces no amídicos, un enlace éster (depsipéptidos), o heterociclos como lactamas de

---

<sup>28</sup> Z. R. Gan, R. J. Gould, J. W. Jacobs, P. A. Friedman, M. A. Polokoff, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 19827.

<sup>29</sup> S. Swenson, F. Costa, R. Minea, R. P. Sherwin, W. Ernst, G. Fujii, D. Yang, F. S. Markland, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3, 499.

<sup>30</sup> a) U. Fuchs, A. Borkhardt, *Adv. Cancer Res.* **2007**, 96, 75. b) P. Y. Lu, M. C. Woodle, *Methods Mol. Biol.* **2008**, 437, 93. c) L. Cao, P. Du, S. H. Jiang, G. H. Jing, Q. L. Huang, Z. C. Hua, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 851.

<sup>31</sup> El ARN mensajero (ARNm o RNAm) lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína desde el ADN, lugar en que está inscrita, hasta el ribosoma, lugar en que se sintetizan las proteínas de la célula. Es, por tanto, una molécula intermediaria entre el ADN y la proteína y el apelativo de "mensajero" es del todo descriptivo. Para más información, ver: R. Michalak, *J. Evol. Biol.* **2006**, 19, 1768.

diversos tamaños. Estas modificaciones o cambios generalmente otorgan una mayor resistencia metabólica, pues no son reconocidos por las proteasas. Además, la modificación introducida suele restringir la libertad conformacional respecto del péptido natural del que derivan, lo que puede aumentar la selectividad frente al ligando natural al cual imitan.

Estos compuestos también nos dan información acerca de la conformación bioactiva del péptido natural y de su receptor<sup>32</sup>, lo que permite profundizar en el conocimiento de la relación entre estructura y actividad.

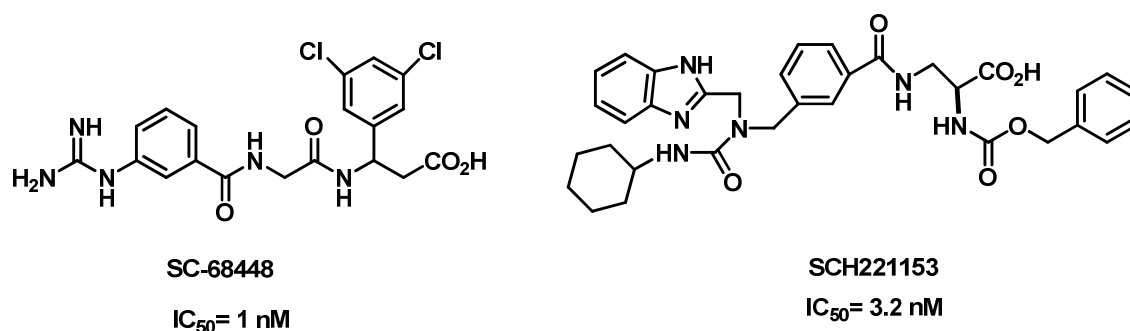
En el caso de los miméticos de la vitronectina existen dos estrategias para el diseño de peptidomiméticos de RGD conformacionalmente restringidos:

La primera de ellas consiste en diseñar pseudopéptidos denominados “miméticos abiertos” (Figura 1.4). Estos compuestos presentan la sustitución de uno o varios de los aminoácidos (arginina, glicina y aspártico) del péptido original RGD por análogos que contengan los grupos polares guanidina y ácido carboxílico, así como grupos hidrofóbicos, como por ejemplo anillos aromáticos, adecuadamente posicionados. Dos ejemplos representativos<sup>33</sup> son los pseudopéptidos SC-68448 y SCH221153. El SC-68448 ha demostrado reducir el crecimiento de un tumor en ratones en un 80% y bloquear completamente el desarrollo de hipercalcemia. El SCH221153 es un buen inhibidor tanto de la integrina  $\alpha_V\beta_3$  ( $IC_{50}$ = 3.2 nM) como de la  $\alpha_V\beta_V$ . ( $IC_{50}$ = 1.7nM).

---

<sup>32</sup> a) G. V. Nikiforovich, G. R. Marshall, S. Achilefu, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, 69, 163. b) G. R. Marshall, *Biopolymers* **2001**, 60, 246.

<sup>33</sup> a) C. P. Carron, D. M. Meyer, V. W. Engleman, J. G. Rico, P. G. Ruminiski, R. L. Ornberg, W. F. Westlin, G. A. Nichols, *J. Endocrinol.* **2000**, 165, 587. b) M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheresh, *Science*. **1995**, 270, 1500.



**Figura 1.4. Ejemplo de miméticos abiertos**

Esta estrategia está fundamentada en tres observaciones relacionadas con la estructura RGD y su interacción con los dominios  $\alpha A$  y  $\beta A$  de la integrina<sup>34</sup>. Así el grupo guanidino de la arginina se coordina con un bolsillo ácido de la rama  $\alpha A$ . El grupo ácido del aspártico interactúa con un bolsillo básico de la rama  $\beta A$  dependiente del ión metálico (MIDAS: Metal Ion-Dependent Adhesion Site). Finalmente, existe un bolsillo hidrofóbico del dominio  $\beta A$  que es cubierto generalmente por un grupo aromático. No hay que descartar sin embargo, la posible existencia de un bolsillo hidrofílico próximo al bolsillo hidrofóbico tal y como parecen sugerir algunos datos de la bibliografía<sup>35</sup>.

La segunda estrategia para el desarrollo de miméticos de la vitronectina consiste en el diseño de ciclopéptidos que contengan la unidad RGD formando parte de una estructura macrocíclica. Además de la menor flexibilidad del péptido o pseudopéptido resultante<sup>36</sup>, la conformación activa puede fijarse

<sup>34</sup> a) S. L. Goodman, G. Hölzeman, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045.

b) J. Samanen, F. Ali, T. Romoff, R. Calvo, E. Sorenson, J. Vasko, B. Storer, D. Berry, D. Bennett, M. Strohsaker, D. Powers, J. Stadel, A. Nichols, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 114. c) J. Singh, S. Adams, M. B. Carter, H. Cuervo, W. C. Lee, R. R. Lobb, R. B. Pepinsky, R. Petter, D. Scott, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1497. d) J. Singh, H. van Vlijmen, Y. S. Liao, W. C. Lee, M. Cornebise, M. Harris, I. H. Shu, A. Gill, J. H. Cuervo, W. M. Abraham, S. P. Adams, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2988. e) G. X. Yang, W. K. Hagmann, *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 369.

<sup>35</sup> R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.

<sup>36</sup> a) C. E. Peishoff, F. R. Ali, J. W. Bean, R. Calvo, C. A. D'Ambrosio, D. S. Eggleston, S. M. Hwan, T. P. Kline, P. F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J. M. Samanen, J. Stadel, J. A. Vasko, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3962. b) R. M. Scarborough, J. W. Rose, M. A. Hsu, D. R. Philips, V. A. Fried, A. M. Campbell, L. Nanizzi, I. F. Charo, *J. Biol. Chem.* **1991**,

mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos dadores de amida y los grupos aceptores carbonilo del ciclo. Por otra parte, los ciclopéptidos tienen una serie de ventajas frente a los péptidos lineales ya que al reducir su flexibilidad conformacional hace que incremente su potencia y selectividad frente a los receptores<sup>37</sup>, además de aumentar las probabilidades para una biodisponibilidad oral<sup>38</sup> respecto al péptido original.

Entre los péptidomiméticos cíclicos que contienen la triada Arg-Gli-Asp (RGD) en su estructura cabe destacar el Eptifibatide<sup>39</sup> y el Cilengitide (Figura 1.5). El Eptifibatide es utilizado hoy en día para reducir el riesgo de episodios isquémicos cardíacos agudos y se comercializa actualmente con el nombre de “Integrilin”®.

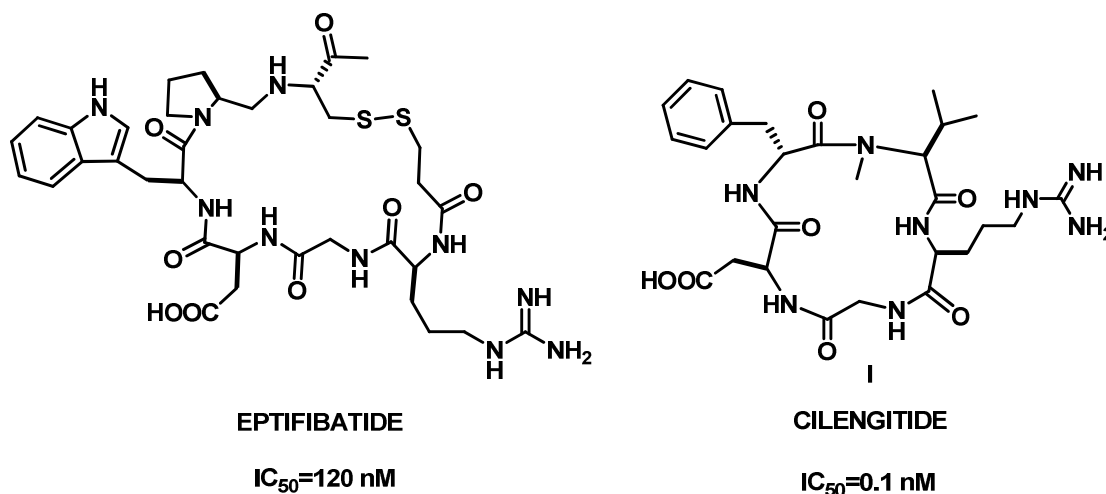
---

266, 9359. c) K. D. Kopple, P. W. Baures, J. W. Bean, C. A. Dámbrósio, J. L. Hughes, C. E. Peishoff, D. S. Eggleston, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9615.

<sup>37</sup> a) Y. Linde, O. Ovadia, E. Safrai, Z. Xiang, F. P. Portillo, D. E. Shalev, C. Haskell-Luevano, A. Hoffman, C. Gilon, *Biopolymers* **2008**, *90*, 671. b) S. Hanessian, G. McNaughton-Smith, H.G. Lombart, W. D. Lubell, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789. c) K. Burgess, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826. d) V. J. Hruby, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 847. e) K. Suat Kee, S. D. S. Jois, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1209.

<sup>38</sup> D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1375.

<sup>39</sup> M. J. Fisher, B. Gunn, C. S. Harms, A. D. Kline, J. T. Mullaney, A. Nunes, R. M. Scarborough, A. E. Arfsten, M. A. Skeleton, S. L. Um, B. G. Utterback, J. A. Jakubowsky, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2085.



**Figura 1.5. Ejemplos de inhibidores cíclicos conteniendo la triada RGD**

El Cilengitide®<sup>40</sup> [ciclo-(RGDf(NMe)Val)] es una de las sustancias inhibidoras de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  más potentes y selectivas que existen y ha sido aceptado como medicamento huérfano para el tratamiento del glioblastoma humano<sup>41</sup> (un tipo de tumor cerebral).

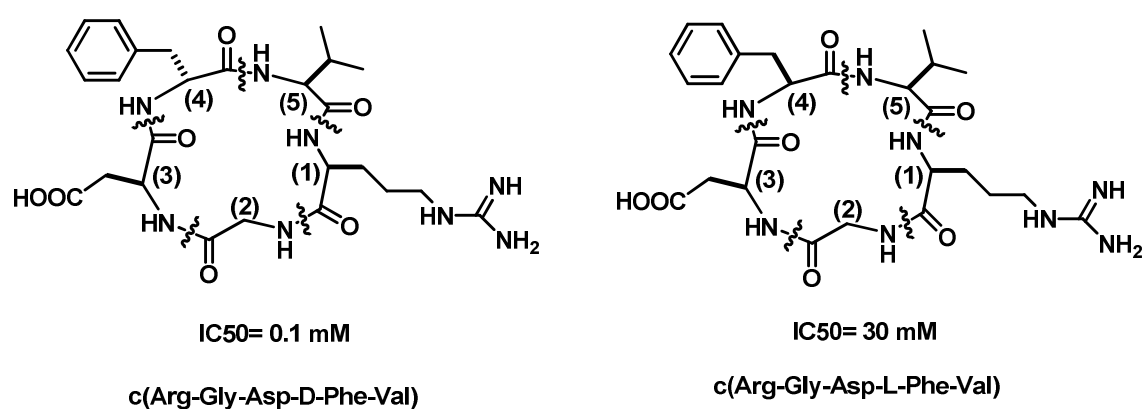
Sobre esta estructura se han concentrado la gran mayoría de las investigaciones en este campo<sup>42</sup>. Por ejemplo, la desmetilación de la (L)-Valina produce una disminución notable en la actividad ( $IC_{50}= 0.1 \mu\text{M}$ ). El cambio de la (D)-fenilalanina por su enantiómero en el compuesto N-desmetilado tampoco ha mejorado la actividad respecto al Cilengitide. También se ha podido

<sup>40</sup> R. Haubner, W. Schmit, G. Hölzeman, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881.

<sup>41</sup> a) D. A. Reardon, K. L. Fink, T. Mikkelsen, T. F. Cloughesy, A. O'Neill, S. Plotkin, M. Glantz, P. Ravin, J. J. Raizer, K. M. Rich, D. Schiff, W. R. Shapiro, S. Burdette-Radoux, E. J. Dropcho, S. M. Wittemer, J. Nippgen, M. Picard, L. B. Nabors, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5610. b) H. Friess, J. M. Langrehr, H. Oettle, J. Raedle, M. Niedergethmann, C. Dittrich, D. K. Hossfeld, H. Stoeger, B. Neyns, P. Herzog, P. I. Piedbois, F. Dobrowolski, W. Scheithauer, R. Hawkins, F. Katz, P. Balcke, J.; Vermorken, S. van Belle, N. Davidson, A. A. Esteve, D. Castellano, J. Kleeff, A. A. Tempia-Caliera, A. Kovar, J. Nippgen, *BMC Cancer* **2006**, *6*, 285.

<sup>42</sup> E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H. J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2761.

determinar que la modificación de la naturaleza de los sustituyentes presentes en la posición  $\alpha$  de los aminoácidos de la parte superior del ciclo, fenil alanina y valina, influyen de manera notable en la actividad de los ciclopéptidos resultantes. Así, con excepción de un ejemplo que se comentará más adelante, la presencia de grupos hidrofílicos sobre el carbono  $\alpha$  del fragmento 4 de los ciclopentapéptidos de RGD, disminuye la actividad antiangiogénica de los compuestos. Cualquier tipo de modificación realizada sobre el fragmento 5 carece de influencia significativa en la bioactividad de los ciclos (Figura 1.6).



**Figura 1.6. Modificaciones realizadas sobre los ciclopéptidos. Numeración arbitraria**

Para intentar mejorar la capacidad antiangiogénica del compuesto de referencia, Cilengitide, se han realizado otras modificaciones que formalmente se basan en la N-metilación<sup>43</sup> sucesiva de los  $\alpha$ -aminoácidos presentes en la estructura; la sustitución de los enlaces amida por aminas o tioamidas<sup>44</sup>; la preparación de depsipéptidos mediante la sustitución sucesiva de los  $\alpha$ -aminoácidos por los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiácidos<sup>45</sup> y la retro-inversión del ciclo<sup>46</sup>. Esta última estrategia consiste en partir de un ciclopéptido de referencia, sintetizar la retrosecuencia de ese compuesto cambiando el orden de conexión

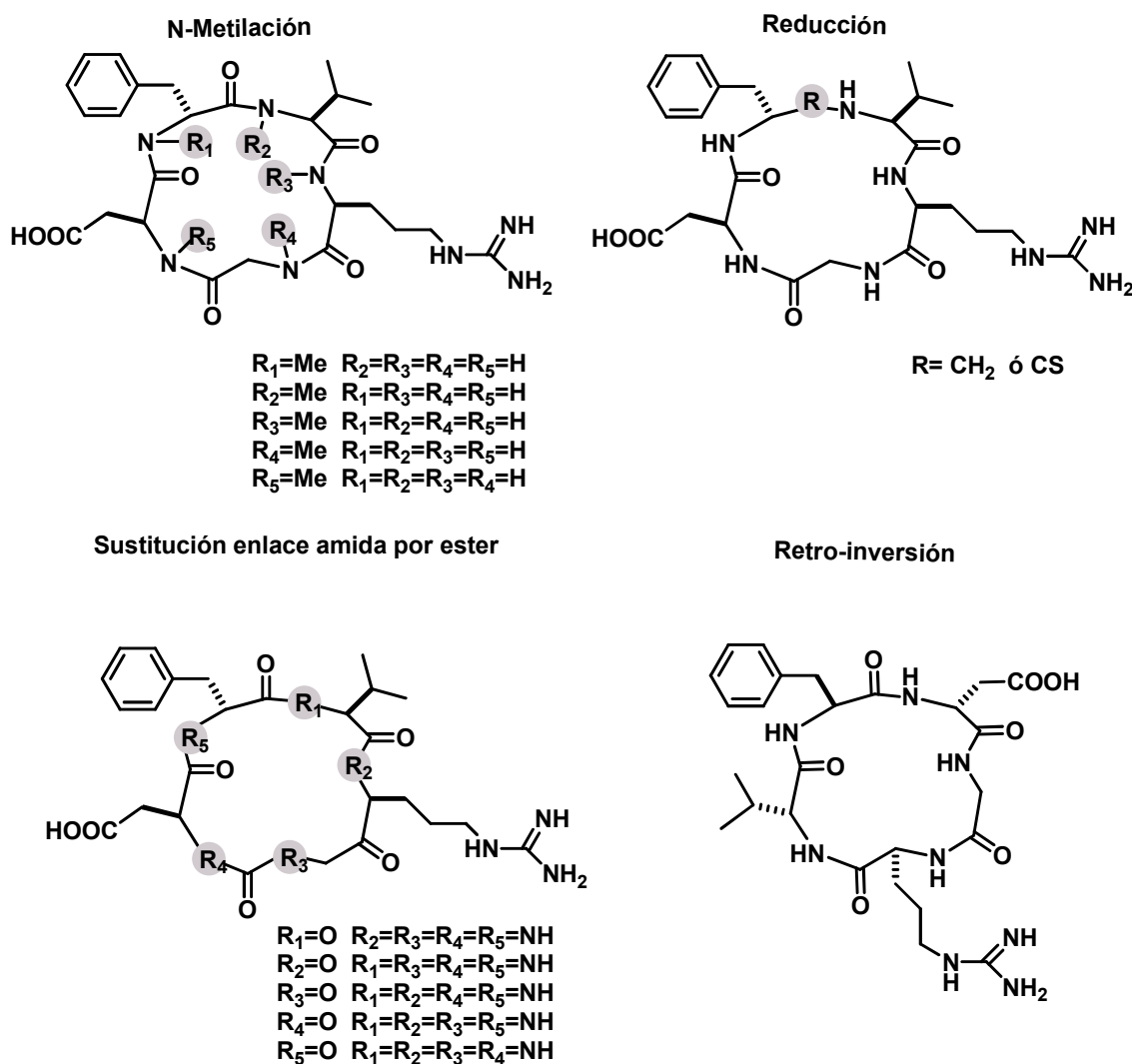
<sup>43</sup> M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzeman, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.

<sup>44</sup> A. Geyer, G. Müller, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7735.

<sup>45</sup> T. Cupido, J. Spengler, J. Ruiz-Rodriguez, J. Adan, F. Mitjans, J. Puilats, F. Albericio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2732.

<sup>46</sup> J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328.

C-N por N-C, e invertir además la configuración de todos los aminoácidos presentes. Por ejemplo, partiendo del ciclo(L-Arg-L-Gli-L-Asp-D-Phe-L-Val) se obtiene el compuesto ciclo(D-Val-L-Phe-D-Asp-D-Gli-D-Arg) representado en la Figura 1.7. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones se ha traducido en una mejora de la actividad con respecto al compuesto de referencia Cilengitide.



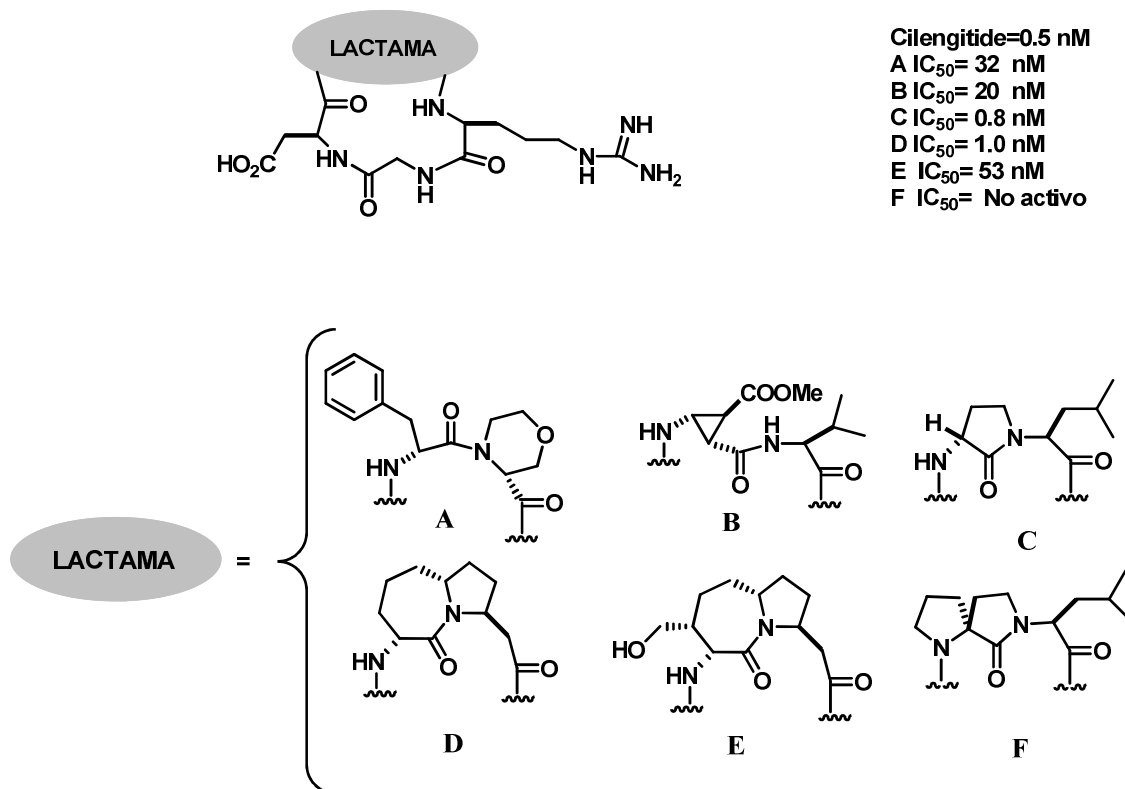
**Figura 1.7. Diferentes estrategias desarrolladas para incrementar la actividad antiangiogénica**

Por último, también se ha ensayado la introducción de ciclos lactámicos y espirolactámicos, llamados “lactamas de Freidinger”<sup>47</sup> ya que como es

<sup>47</sup> a) A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1244. b) J. Gante, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 1699. c) A. J. Souers, J. A. Ellman, *Tetrahedron* **2001**, 57, 7431. c) A. Perdiñ, D. Kikelj, *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1525.



conocido, la inserción de un ciclo adicional dentro de un ciclo reduce aún más las poblaciones conformacionales mayoritarias del péptido. Sin embargo, la introducción de estas lactamas, a pesar de disminuir aún más los grados de libertad conformacional de los compuestos resultantes, no han conseguido incrementar la actividad inhibidora de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  en relación al Cilengitide<sup>47</sup> (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Diferentes tipos de ciclopéptidos con conformaciones restringidas mediante la incorporación de un ciclo, "Lactamas de Freidinger". Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos A<sup>48</sup>, B<sup>49</sup>, C<sup>38</sup>, D<sup>50</sup>, E<sup>51</sup>, y F<sup>38</sup> con respecto al Cilengitide**

<sup>48</sup> N. Cini, A. Trabocchi, G. Menchi, A. Bottoncetti, S. Raspanti, A. Pupi, A. Guarna, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1542.

<sup>49</sup> S. Urman, K. Gaus, Y. Yang, U. Strijowski, N. Sewald, S. De Pol, O. Reiser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3976.

<sup>50</sup> L. Belsivi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Pontenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001.

<sup>51</sup> D. Arosio, L. Manzoni, E. M. V. Araldi, A. Caprini, E. Monferini, C. Scolastico, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1611.

A raíz de la reciente obtención de la estructura de rayos X del segmento extracelular de la integrina  $\alpha\beta_3$  cuando forma un complejo con el Cilengitide<sup>52</sup> ha sido posible una definición más precisa de los centros activos de los dominios  $\alpha A$  y  $\beta A$  de la integrina  $\alpha\beta_3$ . Las modelizaciones llevadas a cabo con la Cilengitide<sup>®</sup> y otros ligandos han permitido establecer cinco centros de interacción posibles, uno de ellos en el dominio  $\alpha A$  y otros cuatro en el dominio  $\beta A$ <sup>53</sup>.

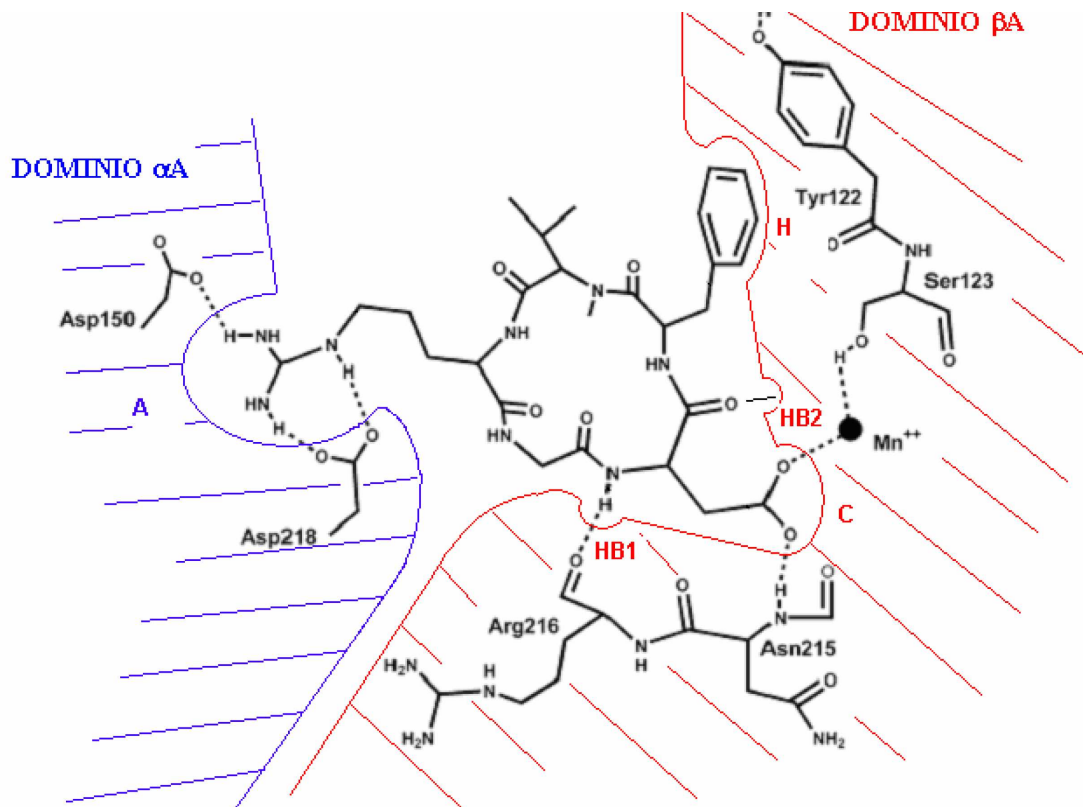


Figura 1.9. Representación de los centros de interacción del Cilengitide con el receptor de la integrina  $\alpha\beta_3$

<sup>52</sup> M. A. Arnaout, S. L. Goodman, J. P. Xiong, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, 19, 495.

<sup>53</sup> a) J. P. Xiong, T. Stehle, R. G. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, 296, 151. b) J. P. Xiong, T. Stehle, R. G. Zhang, B. Diefenbach, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, 294, 339. c) T. Xiao, J. Tagaki, B. S. Collers, J. H. Wang, T. A. Springer, *Nature* **2004**, 432, 59. d) L. Marinelli, A. Lavecchia, K. E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4393.

Los estudios realizados en base a modificaciones estructurales de los ciclopeptidomiméticos de RGD han permitido establecer que la configuración (D o L)<sup>54</sup> de todos los  $\alpha$ -aminoácidos que forman parte de la estructura así como la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares<sup>55</sup> son los factores que determinan la conformación preferente del ciclopeptido.

### 1.3.2. Estructura secundaria: giros $\gamma$ y giros $\beta$

Hoy en día se conoce que muchos péptidos con actividad biológica presentan una conformación  $\gamma$  y/o  $\beta$  girada en su estructura.

Se denominan giros a los cambios de dirección en la cadena peptídica. Constan de unos pocos aminoácidos y el giro  $\beta$  es el más abundante en las proteínas naturales.

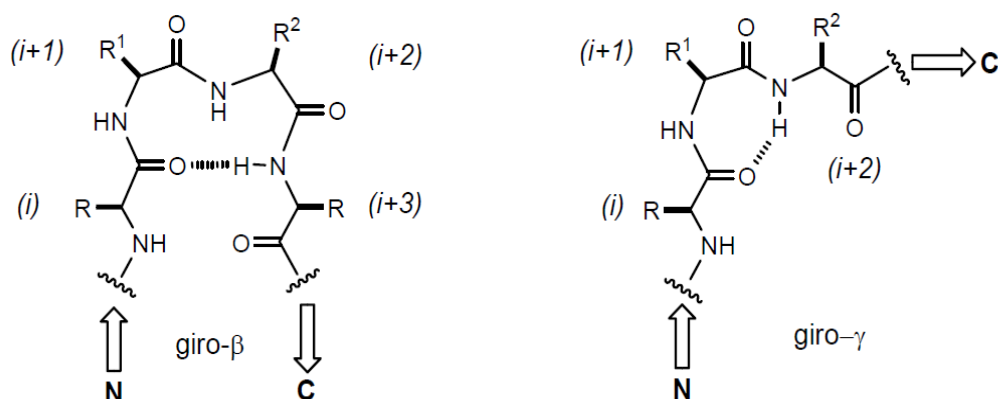


Figura 1.10. Representación de un giro  $\beta$  y un giro  $\alpha$

El giro  $\beta$  fue definido por primera vez en 1968 por Venkatachalam<sup>56</sup>. Las estructuras de giro beta típicas están constituidas por cuatro aminoácidos que forman un pseudociclo de 10 átomos en el que el grupo amida del residuo  $(i+3)$  actúa como donador en un enlace de hidrógeno al carbonilo del residuo  $(i)$  (Figura 1.11). Otra característica de los giros  $\beta$ , es que la distancia entre los carbonos

<sup>54</sup> a) H. Matter, H. Kessler, *J. Am Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3347. b) R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1375.

<sup>55</sup> C. A. Bewley, H. Hey, D. H. Williams, D. J. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4314.

<sup>56</sup> C. M. Vankatachalam, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.

$\alpha$  de los residuos (i) e (i+3) es menor de  $7 \text{ \AA}^{57}$ , y que los residuos (i+1) e (i+2), no describen una estructura helicoidal.

Por su parte, los giros  $\beta$  están formados por tres aminoácidos, generando un pseudociclo de 7 átomos. En este caso el enlace de hidrógeno también se forma entre el carbonilo del primer aminoácido (i) y el grupo amida del último (i+2), pero únicamente queda un residuo interno (i+1).

Existen diferentes tipos de giros- $\beta$  (Figura 1.11), que se clasifican en función de los valores de los ángulos diedros  $\phi$  (en torno al enlace N-C $\alpha$ ) y  $\psi$  (en torno al enlace C $\alpha$ -C=O) de los residuos -(i+1)- e -(i+2)<sup>58</sup>. Otra característica de los giros- $\beta$  es que la longitud media del enlace (i) C=O...H-N (i+3) suele estar comprendida entre 1.8 y 2.5 $\text{\AA}$  para la distancia O.....H y entre 2.4 y 3.3 $\text{\AA}$  para la distancia O.....N.

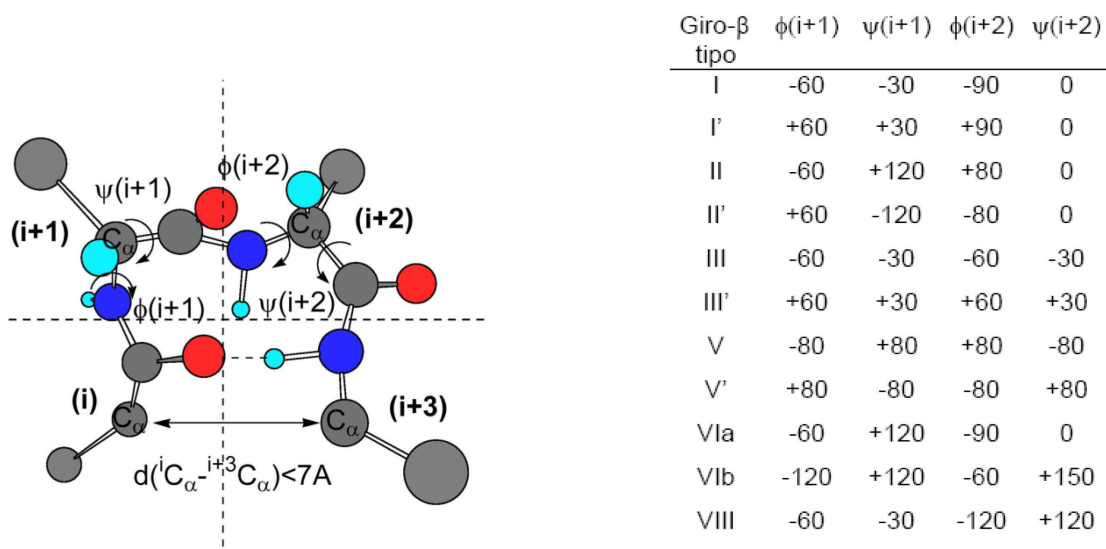


Figura 1.11. Representación de un giro  $\beta$  y su clasificación

<sup>57</sup> W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers* **1983**, 22, 2577.

<sup>58</sup> Para clasificaciones detalladas de los tipos de giros- $\beta$ , ver: a) G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. Smith, A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1. b) C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *Prot. Engineer.* **1990**, 3, 479. c) J. B. Ball, R. A. Hughes, P. F. Alewood, P. R. Andrews, *Tetrahedron* **1993**, 49, 3467. d) K. S. Rotondi, L. M. Gierash, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, 84, 13.

A pesar de que los giros- $\beta$  tipo I representan el 42% de los giros encontrados en estructuras cristalinas de proteínas, la mayoría de los miméticos de giros- $\beta$  descritos son de tipo II, y II' y, en menos ocasiones, de tipo I, III, ó VI<sup>59</sup>.

Por otra parte, solo se presentan dos tipos de giros  $\gamma$ , el normal y el inverso, dependiendo de si el enlace de hidrógeno está por delante o por detrás del plano formado por el enlace peptídico del resto intermedio (i+1) cuando éste se representa con los grupos N- y C- terminales de izquierda a derecha (Figura 1.12).

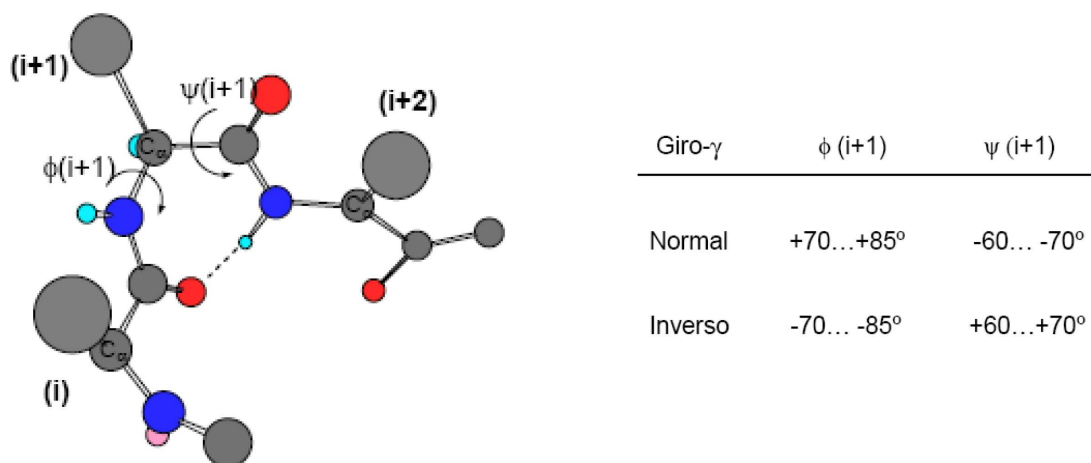


Figura 1.12. Representación de un giro  $\gamma$  y su clasificación

Aquellos giros,  $\beta$  ó  $\gamma$ , en los que no existen enlaces de hidrógeno intramoleculares y cuyos ángulos  $\phi$  y  $\psi$  no se desvían más de  $\pm 30^\circ$  de los valores ideales se conocen como giros abiertos.

La formación de uno u otro tipo de giro, depende de la naturaleza de los residuos que participan en él. Por ejemplo, la presencia de un residuo de

<sup>59</sup> Para miméticos de giros- $\beta$ , ver: a) S. Oishi, *Tetrahedron* **2006**, 62, 1416. b) Y. J. Cheng, L. A. Christianson, H. E. Stanger, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10555. c) Y. J. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3995. d) H. Diaz, J. R. Espina, J. W. Nelly, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8316.

prolina en la posición (i+1), favorece la formación de un giro- $\beta$ <sup>60</sup>. Por otro lado, también es conocida la influencia de la configuración relativa de los residuos centrales -(i+1)-(i+2)- sobre el tipo de giro- $\beta$  que se genera. En general, secuencias homoquirales en estos dos residuos, es decir (L-L) o (D-D), favorecen la formación de giros- $\beta$  de tipo I y I' respectivamente, y secuencias heteroquirales (L-D) o (D-L) favorecen la formación de giros- $\beta$  de tipo II y II'<sup>61</sup>.

Otro factor que influye en el tipo de giro son las cadenas laterales de los aminoácidos contiguos. Dependiendo del ángulo pseudodiedro que formen entre ellos, el esqueleto peptídico se dispondrá de una manera determinada generando uno u otro tipo de confórmero. Este cambio de conformación, dependiendo de la orientación de las cadenas laterales de los residuos, es un factor crítico en la selectividad de los péptidos por sus receptores<sup>62</sup>.

---

<sup>60</sup> B. Laufer, J. Chatterjee, A. O. Frank, H. Kessler, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 141.

<sup>61</sup> a) V. Brenner, F. Piuzzi, I. Dimicoli, B. Tardivel, M. Mons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2463. b) V. J. Hruby, F. A-Obeidi, W. Kazmierski, *Biochem J.* **1990**, *268*, 249.

<sup>62</sup> a) G. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2767. b) A. C. Il Bach, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, A. M. Shaker, W. F. deGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293.

### 1.4. Ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos. Antecedentes

Mediante estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha podido establecer que la inserción de un puente metileno entre las posiciones C $\alpha$  (i+1) y N (i+2) de una cadena peptídica lineal provoca en el peptidomimético  $\beta$ -lactámico resultante una fuerte estabilización de la conformación  $\beta$ -girada de tipo  $\beta$ -II o  $\beta$ -II', según la configuración del estereocentro  $\alpha$ (i+1)<sup>63</sup> (Figura 1.13). Esta aproximación se ha denominado " $\beta$ -Lactam Scaffold-Assisted Design" ( $\beta$ -LSAD) y proporciona pseudopéptidos  $\beta$ -lactámicos que difieren en un único átomo de carbono de los péptidos nativos.

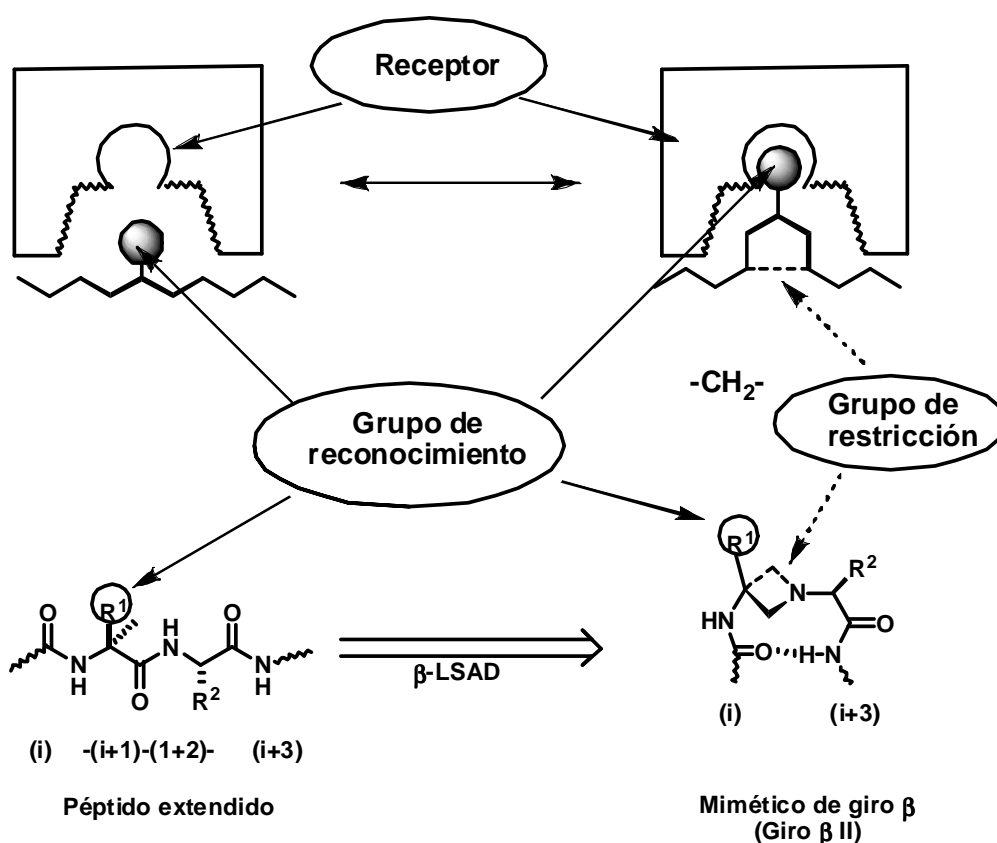


Figura 1.13. Principio de separación de elementos de restricción y de reconocimiento mediante peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos.

<sup>63</sup> a) C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Benito, R. Galarza, U. K. Khamrai, J. Vazquez, B. Pascual-Teresa, P. M. Nieto, A. Linden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3056. b) A. Guerrini, G. Varchi, C. Samori, R. Daniele, B. Arturo, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*(29), 5081. c) J. L. Baeza, M. A. Bonache, R. Gonzalez-Muñiz, M. Martín-Martínez, *Amino Acids* **2010**, *39*, 1299.

Aplicando el diseño  $\beta$ -LSAD Iraida Loinaz<sup>64</sup> sintetizó el primer CPP  $\beta$ -lactámico análogo del compuesto ciclo-[Arg-Gli-Asp-D-Phe-Val] **II** (Figura 1.14).

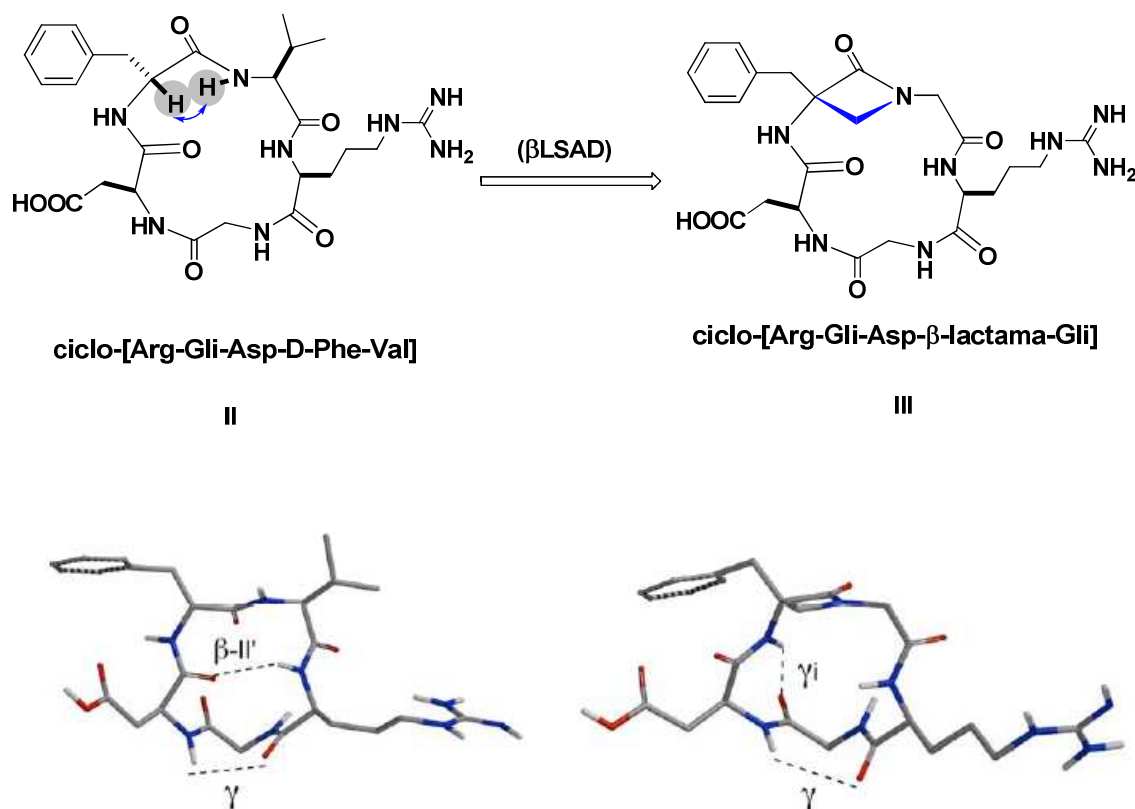


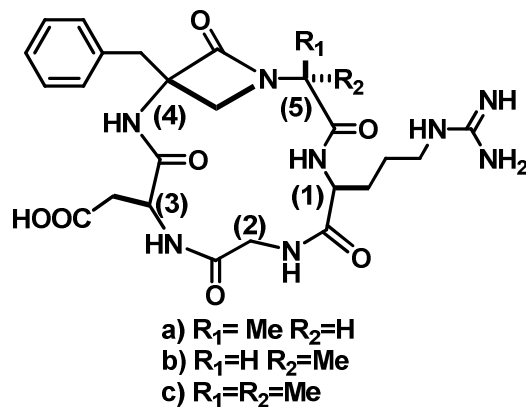
Figura 1.14. Estructura y conformación mayoritaria en disolución acuosa de los ciclopeptidos ciclo-[Arg-Gli-Asp-D-Phe-Val] **II** y ciclo-[Arg-Gli-Asp-( $\beta$ -Lactama)- Gli] **III**.

A partir del estudio conformacional del mimético **III** en disolución acuosa mediante RMN y Dinámica Molecular, se llegó a la conclusión de que la  $\beta$ -lactama, estabilizaba giros- $\gamma$  en ciclopentapéptidos y no giros  $\beta$ , como ocurría en péptidos lineales o en el ciclopentapéptido **II**. Ensayos de inhibición de adhesión de células HUVEC sobreexpresadas en integrina  $\alpha_V\beta_3$  y cultivadas sobre vitronectina, mostraron que el ciclopeptido  $\beta$ -lactámico **III** presenta una potencia inhibitoria del mismo orden o ligeramente superior al Cilengitide y claramente superior al compuesto **II**.

<sup>64</sup> I. Loinaz, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Estudio de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", 2004.



Posteriormente, Joseba Oyarbide<sup>65</sup> sintetizó varios ciclopéptidomiméticos con diferentes sustituciones en el residuo (5) contiguo a la  $\beta$ -lactama (Figura 1.15).

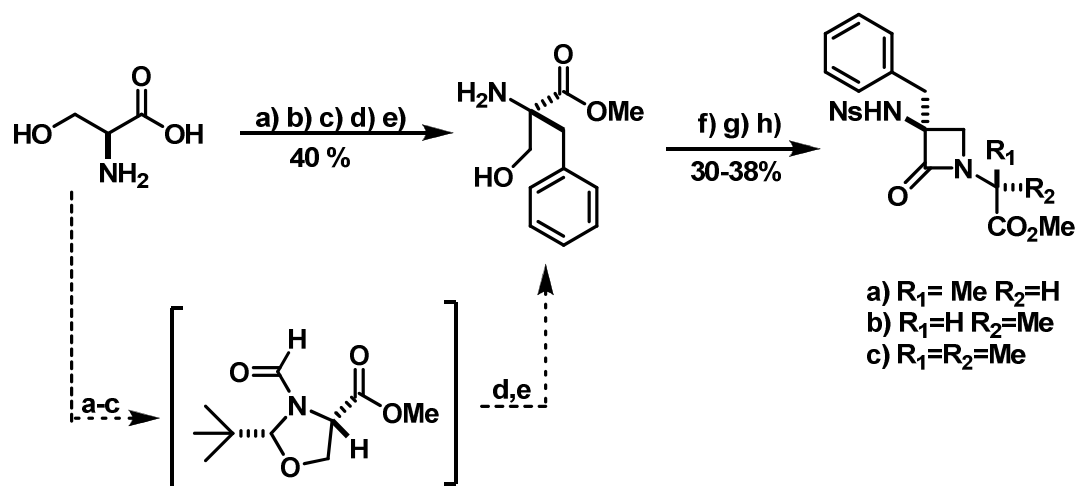


**Figura 1.15. Ciclopéptidomiméticos con diferente sustitución en el residuo 5 y análisis conformacional. Numeración arbitraria.**

De los tres compuestos sintetizados **a**, **b** y **c**, este último fue el que mayor potencia biológica presentó, con un  $\text{IC}_{50}$  de valor ligeramente superior al del compuesto de referencia Cilengitide.

La síntesis de estos tres ciclopeptidomiméticos se realiza a partir de las respectivas  $\beta$ -lactamas 3,3-disustituidas. (Esquema 1.1)

<sup>65</sup> Joseba Oyarbide, Tesis Doctoral, UPV/EHU. "Diseño, síntesis y estudio conformacional de ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD" **2010**.



Esquema 1.1. Esquema sintético para la preparación de  $\beta$ -lactamas 3,3 disustituidas. a)  $\text{MeCOCl/MeOH } 0^\circ\text{C} \rightarrow \text{reflujo } 2\text{h}$ , b)  ${}^t\text{BuCHO, Et}_3\text{N}$ , pentano, reflujo 16h, c) Anhídrido acético-fórmico,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 6h, d) LDA, HMPA,  $\text{BnBr}$ , THF,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h, e) 12M HCl, MeOH, reflujo, 12h, luego  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , EtOAc, f)  $\text{NsCl, KHCO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , reflujo, 16h, g)  $\text{H}_2\text{NCMe}_2\text{CO}_2\text{Me}$ , MeCN, h) LHDS, THF,  $0^\circ\text{C}$

La clave para la preparación de las  $\beta$ -lactamas 3,3-disustituidas consiste en la alquilación diastereoselectiva de la correspondiente oxazolidinona (Esquema 1.1 entre corchetes) con bromuro de bencilo siguiendo el método de Seebach<sup>66</sup>. Mediante este procedimiento se pueden obtener los precursores  $\beta$ -lactámicos con rendimientos globales que oscilan entre el 45-50%. Dichos intermediarios sometidos a ciclación intramolecular de acuerdo con la secuencia sintética del esquema, dan lugar a los productos deseados con rendimientos aceptables.

Por otra parte, estudios realizados por Kessler en ciclopéptidos análogos (Figura 1.16) en los que se modifica el residuo 4, han demostrado que la sustitución en esta posición de la D-fenilalanina por otros residuos portadores de cadenas polares, como por ejemplo la lisina, disminuye en general la actividad del compuesto final. Una excepción la constituye la D-serina en cuyo caso, y sorprendentemente, el compuesto final mostró una actividad similar al Cilengitide. Aunque este hecho puede ser justificado como propone el propio autor, por la posible formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la serina y el grupo fenólico de alguna tirosina perteneciente al

<sup>66</sup> a) D. Seebach, J. D. Aebi, *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 2545. b) D. Seebach, J. D. Aebi, M. Gander-Coquoz, R. Naef, *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 1194.

centro activo de la integrina, apenas se conocen ciclopéptidos de RGD portadores de grupos polares en los residuos 4 y 5 del ciclo<sup>35</sup>.

En este contexto y para continuar además con el estudio conformacional de los ciclos, se decidió reemplazar por primera vez la  $\beta$ -lactama 3,3-disustituida por una 3,4-disustituida incorporando además un grupo hidrofílico en la posición 4 de la  $\beta$ -lactama .

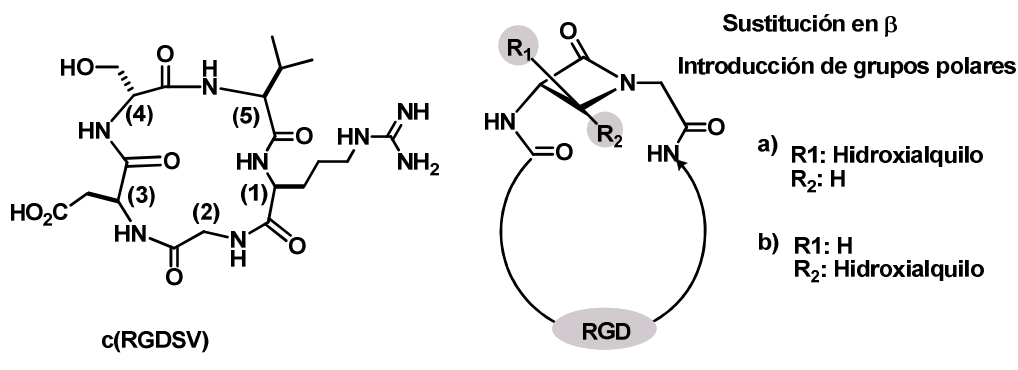


Figura 1.16. c(RGDSV), Ciclo desarrollado por Kessler, y a su derecha la nueva propuesta de síntesis para nuestro laboratorio.

Los antecedentes comentados y el buen resultado obtenido en las simulaciones de interacción con el receptor (“Docking” -12.2 Kcal), realizadas al compuesto **A** (Figura 1.17) hacía suponer que esta propuesta conduciría a resultados interesantes. A continuación se exponen brevemente los objetivos que se pretenden alcanzar.

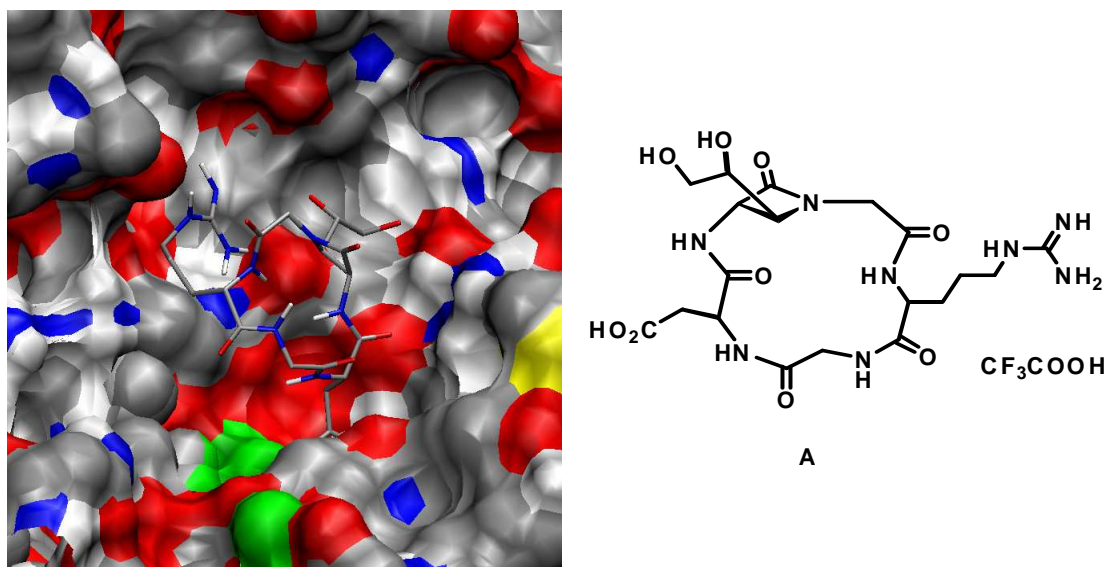


Figura 1.17. Imagen del ligando A dentro del centro activo de la integrina. Imagen del compuesto A.

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

- Síntesis de ciclopeptidos de RGD  $\beta$ -lactámicos 3-4 disustituidos portadores de  $\beta$ -lactamas con el grupo 1,2-propanodiol como agente de reconocimiento

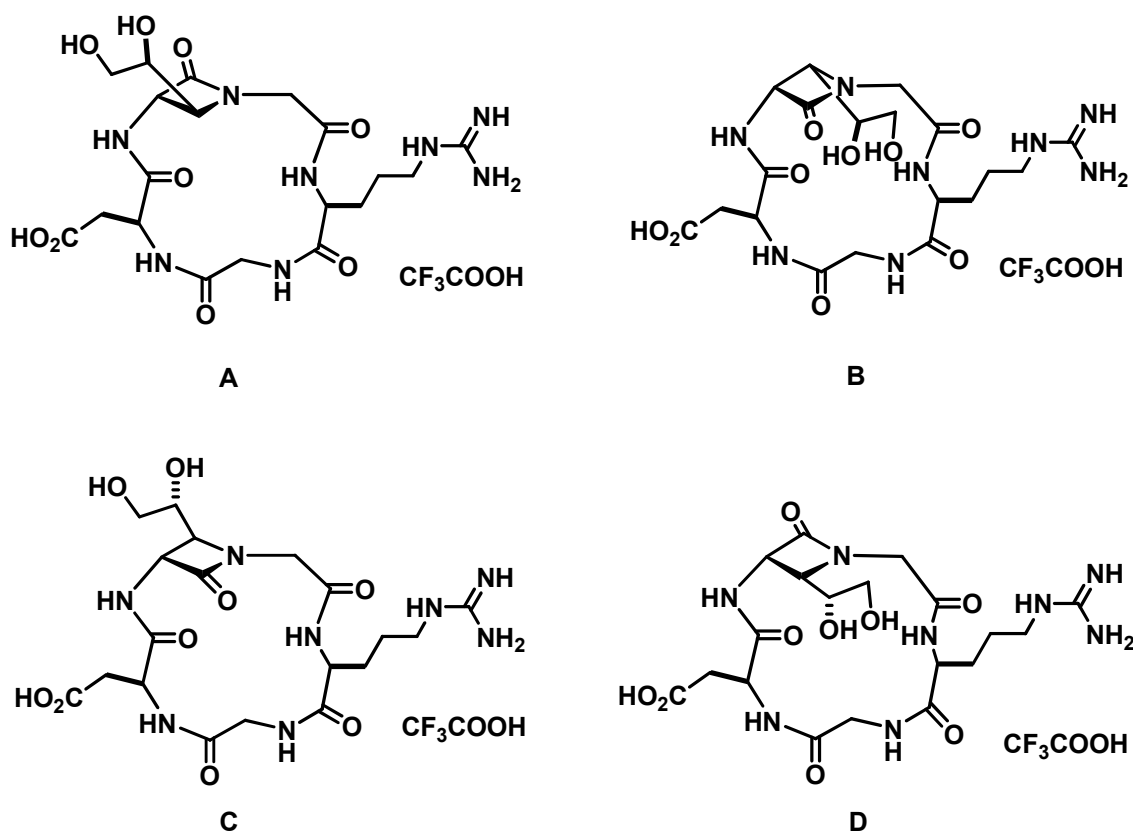


Figura 2. 1. Representación de los 4 CPP a sintetizar

El análisis conformacional y la evaluación biológica frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  de estos compuestos permitiría analizar las analogías y diferencias estructurales y de actividad, con los ciclopeptidomiméticos sintetizados previamente en el laboratorio y con los demás ciclopeptidomiméticos descritos en la bibliografía.

- **Ensayo de inhibición génica de los compuestos utilizando como compuesto de referencia el Cilengitide**

El mecanismo de acción de los ligandos de la integrina incluye tres etapas: interacción ligando-receptor, la transducción de la señal generada al dominio intracelular y su efecto en la activación/inhibición de genes dando lugar a una respuesta biológica. En este apartado pretendemos analizar por primera vez la respuesta bioquímica generada en la tercera etapa.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

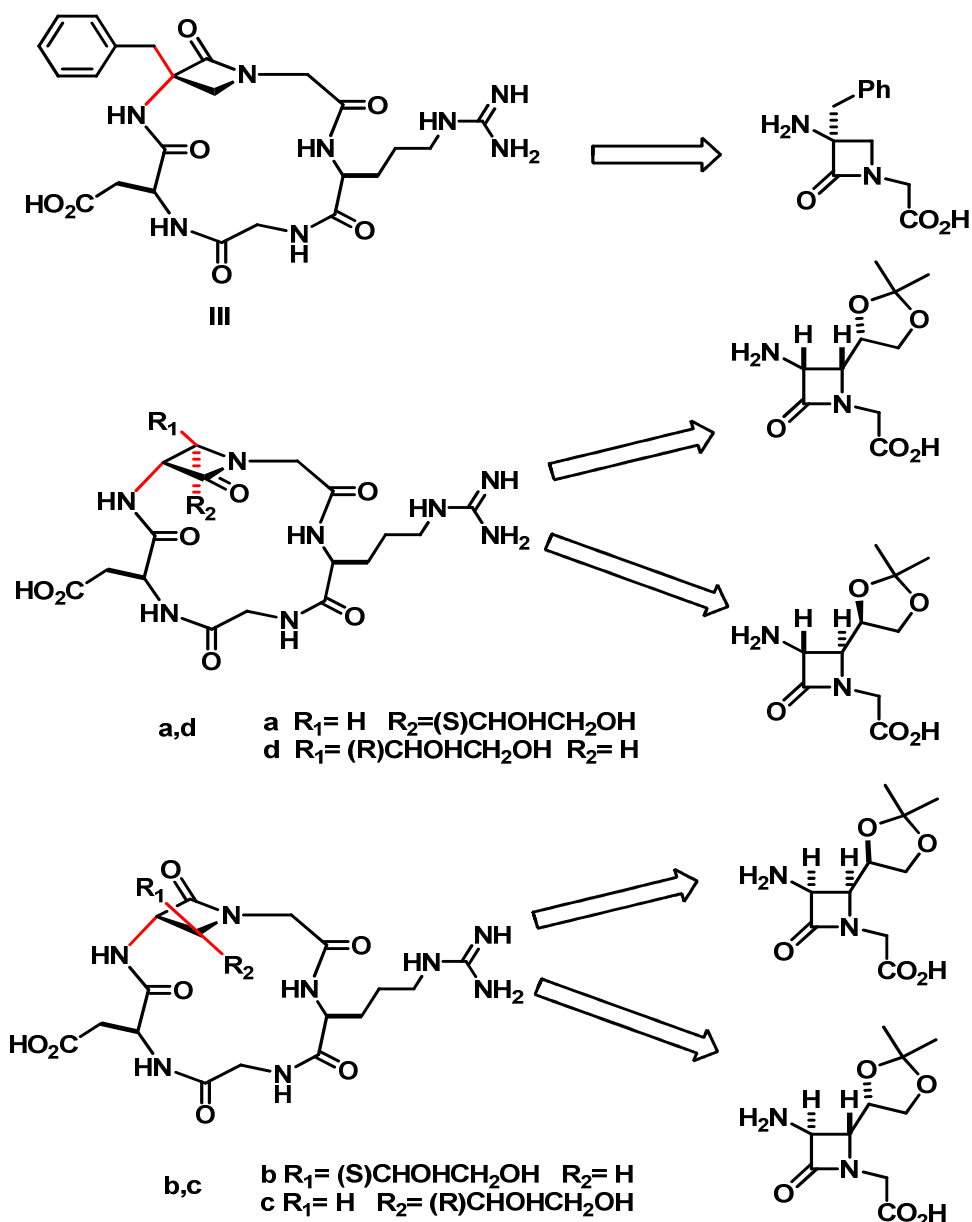




### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos: Modificación de las $\beta$ -lactamas. Fines y planteamiento

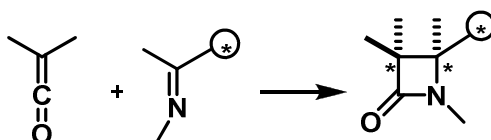
En los siguientes apartados se describirá la síntesis, identificación y análisis conformacional de una serie de ciclopéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos, inspirados en el compuesto **III**, primer ciclopeptidomimético de estas características sintetizado en nuestro laboratorio (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Modificación de la estructura del ciclopentapéptido **III** mediante la utilización de una  $\beta$ -lactama 3,4-disustituida e introducción del grupo polar(-CHOH-CH<sub>2</sub>OH)

Tal y como se recoge en el Esquema 3.1 se realizaron dos tipos de modificaciones respecto al ciclopeptidomimético RGD **III**. Por un lado, se reemplazó la  $\beta$ -lactama 3,3-disustituida, por una  $\beta$ -lactama 3,4-disustituida y por otro, se modificó la polaridad y la ubicación del grupo de reconocimiento. La modificación citada en segundo lugar consiste en la incorporación de un grupo hidrofílico (diol) en la posición C<sub>4</sub> de la  $\beta$ -lactama y la supresión del grupo hidrofóbico (bencilo) de la posición C<sub>3</sub> de la misma.

La preparación de las  $\beta$ -lactamas 3,4-disustituidas por otra parte, presenta una complejidad sintética menor que las 3,3-disustituidas. En nuestro caso, utilizaremos la aproximación cetena-imina, conocida como la reacción de Staudinger<sup>67</sup> en la que se obtienen de forma convergente por cicloadición [2+2] las correspondientes  $\beta$ -lactamas. La interacción entre cetenas aquirales e iminas derivadas de aldehídos homoquirales ha constituido una de las metodologías más exitosas en la versión asimétrica de la reacción de Staudinger en cuanto a diastereoselectividad se refiere (Esquema 3.2). Dicho proceso implica la formación simultánea de dos enlaces carbono-carbono y dos estereocentros y el estereocontrol se puede ejercer mediante el uso de diferentes inductores quirales<sup>68</sup> generalmente comerciales o de fácil preparación como se verá más adelante.



**Esquema 3.2. Aproximación cetena aquiral imina quiral para la formación de  $\beta$ -lactamas**

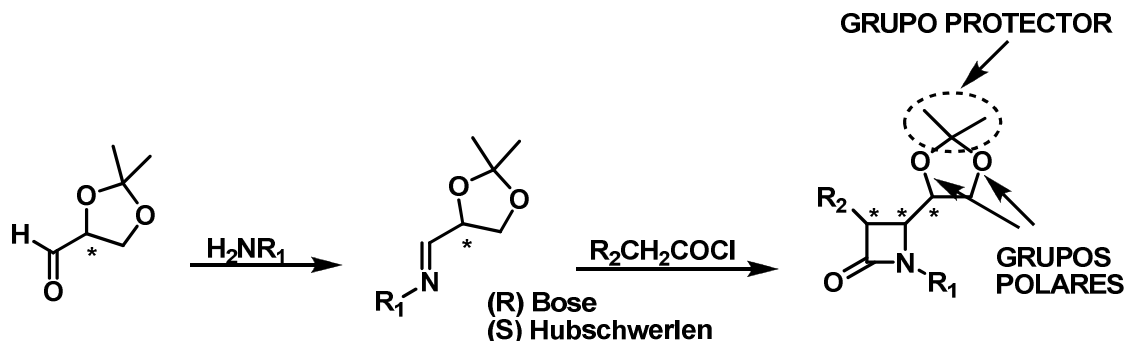
Tras consultar en la bibliografía diferentes inductores quirales, se escogieron para nuestros fines los acetónidos R y S del gliceraldehído desarrollados por Hubschwerlen<sup>69</sup> y Bose<sup>70</sup> respectivamente (Esquema 3.3).

<sup>67</sup> a) H. Staudinger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1907**, 356, 51. b) H. Staudinger, "Die Ketene", Enke, Stuttgart, **1912**, 71.

<sup>68</sup> Revisión: C. Palomo, J. M. Aizpurua, I. Ganboa, M. Oiarbide, *Eur. J. O. C.* **1999**, 12, 3223.

<sup>69</sup> C. Hubschwerlen, G. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2206.

Una vez formada la  $\beta$ -lactama e incorporada al ciclopéptido y tras la consiguiente desprotección, se podría establecer si la hipótesis de una interacción entre el grupo 1,2-propanodiol y un bolsillo hidrofílico del centro activo de la integrina<sup>71</sup> podría ser viable.



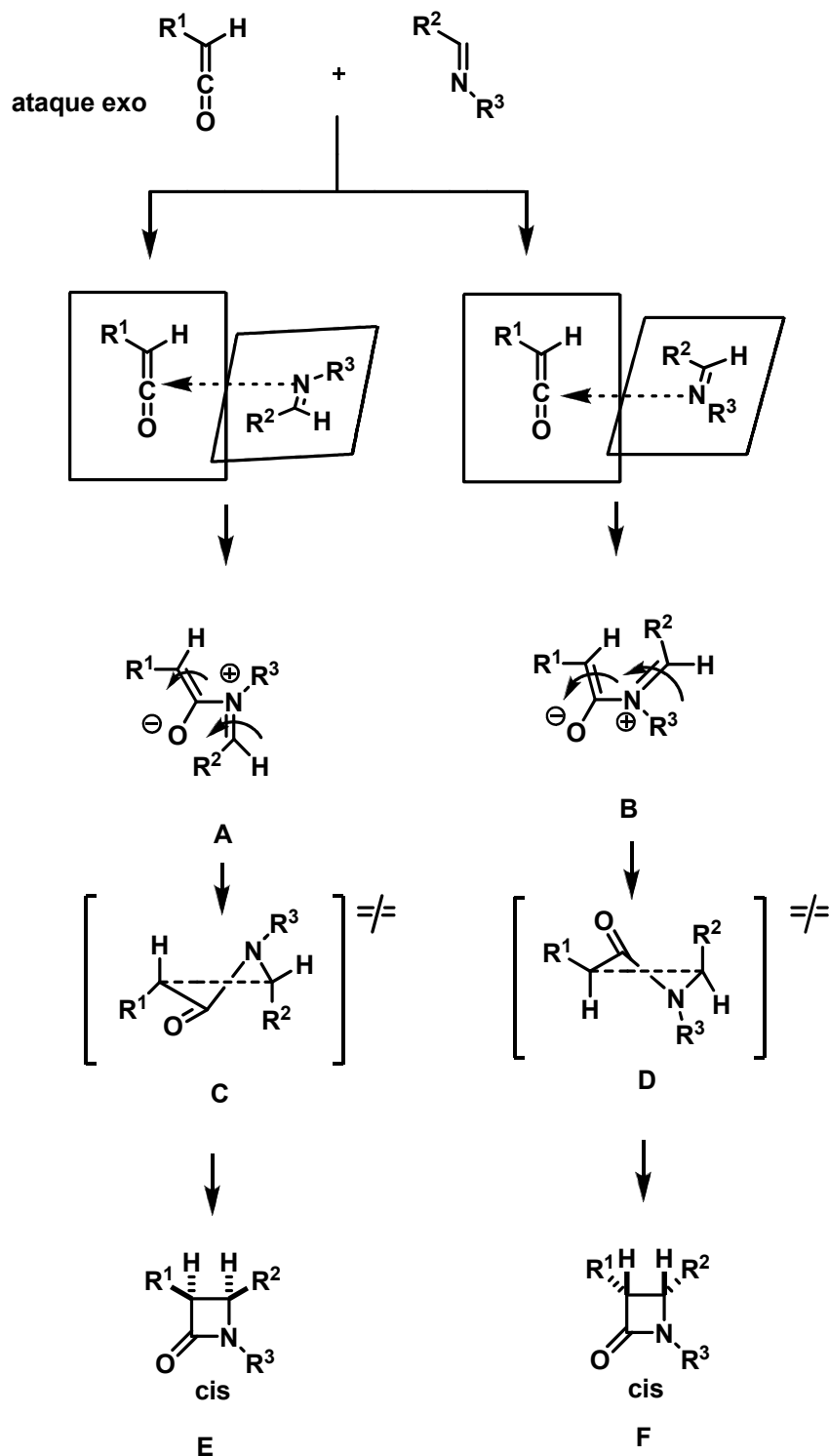
**Esquema 3.3. Esquema general de aplicación de los auxiliares quirales a la síntesis de  $\beta$ -lactamas**

Como precursores de las cetenas, se utilizaron los correspondientes cloruros de ácido y en todos los casos se obtuvieron las  $\beta$ -lactamas de configuración relativa cis, conforme al mecanismo de reacción<sup>72</sup> el cual postula un proceso en dos etapas tal y como se representa en la Esquema 3.4

<sup>70</sup> D. R. Wagle, C. Garai, J. Chiang, M. G. Monteleone, B. E. Kurys, T. W. Strohmeyer, V. R. Hedge, M. S. Manhas, A. K. Bose, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4227.

<sup>71</sup> J.Xie, K. Chen, H. Y. Lee, C. Xu, A. R. Hsu, S. Peng, X. Chen, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542.

<sup>72</sup> a) L. S. Hegedus, J. Montgomery, Y. Narukawa, D. C. Snustad, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 770. b) C. Palomo, F. P. Cossio, C. Cuevas, B. Lecea, A. Mielgo, P. Roman, A. Luque, M. Martinez-Ripoll, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9360. c) F. P. Cossio, J. M. Ugalde, M. C. Lopez, B. Lecea, C. Palomo, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 995. Revisión: A. Arrieta, B. Lecea, F. P. Cossio *Top Heterocycl. Chem*; Heterocyclic Scaffolds,  $\beta$ -Lactams, B.U.W. Maes, B.K. Banik, Springer, U.S.A. **2010**, *22*, 313.



Esquema 3.4. Mecanismo de la reacción de cicloadición: proceso de dos etapas en la que se obtienen únicamente *cis*  $\beta$ -lactamas

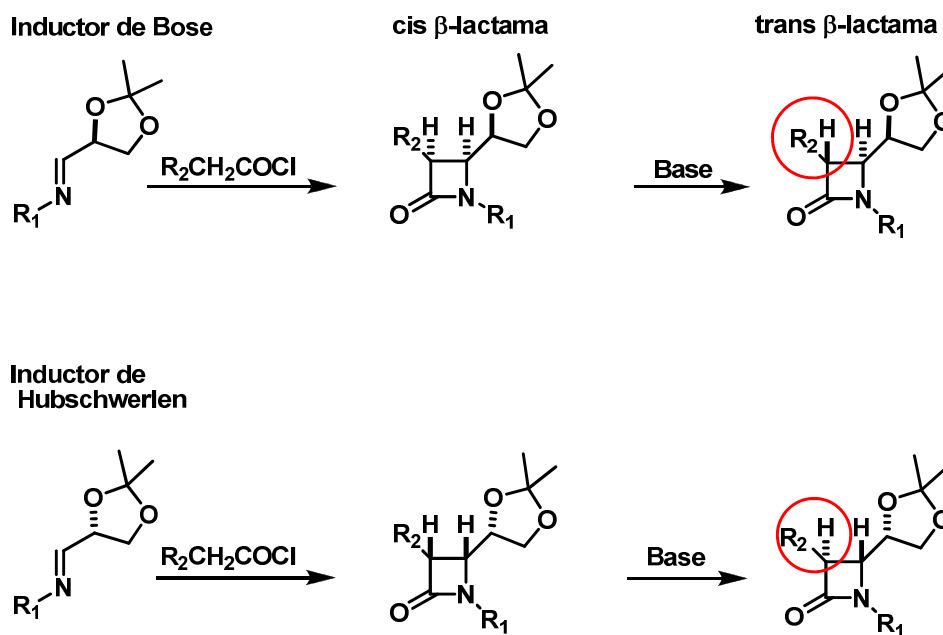
La primera etapa supone la aproximación de la imina a la cetena, que puede tener lugar según las dos orientaciones representadas, para dar dos intermedios zwitteriónicos **A** y **B**. La segunda etapa implica el cierre conrotatorio del sistema azadiénico que conduce a la formación del enlace

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> del anillo de las dos posibles β-lactamas. Tal y como se puede observar en la Esquema 3.4 sólo está permitido uno de los sentidos del cierre conrotatorio para cada intermedio **A** y **B** debido a que el otro sentido estaría impedido por el cruce entre el hidrógeno de la cetena y el grupo R<sub>2</sub> de la imina. Cabe señalar que en ausencia de inductores quirales los dos estados de transición **C** y **D** son degenerados o isoenergéticos, lo que conduce a la obtención de las β-lactamas enantiómeras **E** y **F** en una proporción equimolecular. Sin embargo, la introducción de uno o más inductores quirales conlleva una diferenciación energética de los dos estados de transición **C** y **D** y consiguientemente la obtención de las β-lactamas, ahora diastereómeras **E** y **F** en una proporción no equimolecular. De acuerdo con este mecanismo, el origen de la diastereoselectividad en la obtención de azetidín-2-onas ha de estar relacionado con la diferencia energética entre los dos estados de transición **C** y **D** que dan lugar al anillo

Las trans β-lactamas se prepararon a partir de las cis β-lactamas previamente obtenidas mediante epimerización del C<sub>3</sub> de las mismas por acción de una base de Brønsted<sup>70</sup>. Inicialmente este método nos pareció el más adecuado debido a las dificultades sintéticas que presentaba la obtención directa de trans β-lactamas<sup>73</sup>. Una vez sintetizadas e incorporadas estas β-lactamas a los ciclopentapéptidos, el estudio de cada uno de ellos nos permitiría también establecer la influencia de la configuración de los diversos centros estereogénicos en la actividad biológica.

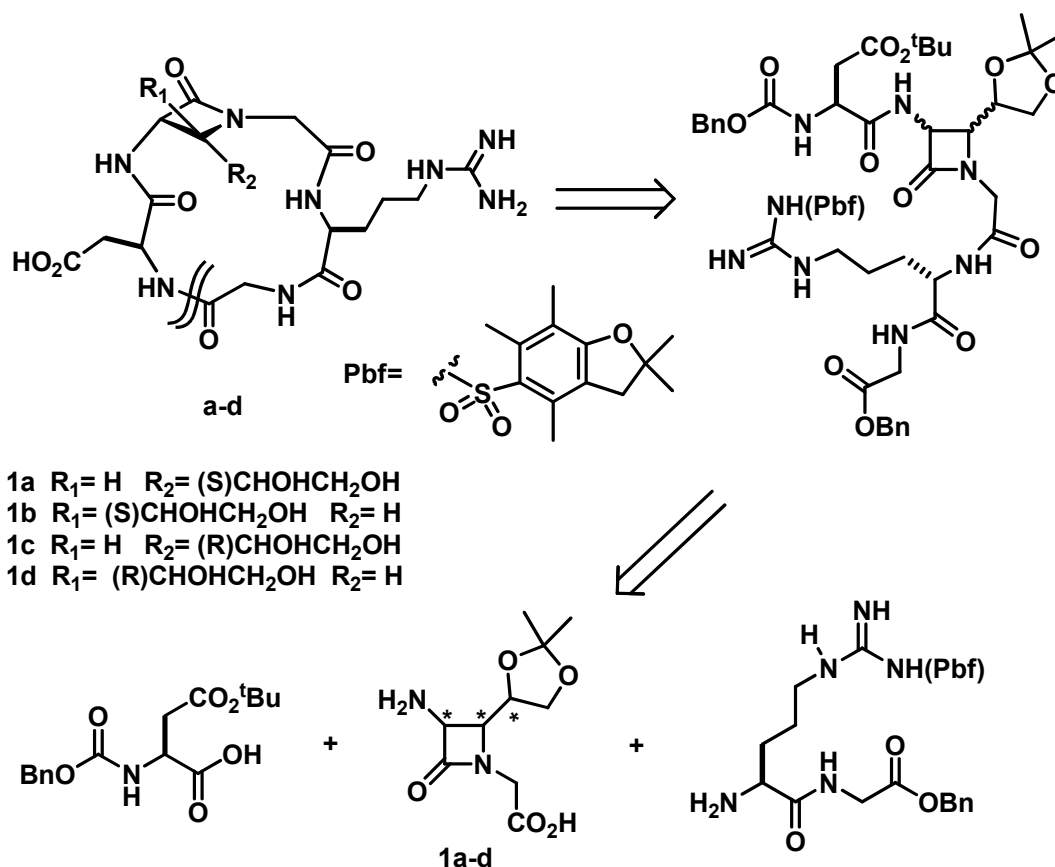
---

<sup>73</sup> Para síntesis de trans β-lactamas ver: a) M. Benaglia, M. Cinquini, F. Cozzi, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 563. b) F. P. Cossio, A. Arrieta, M. Sierra, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 925. c) E. Bandini, G. Martelli, G. Spunta, A. Bongini, M. Panunzio, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4409. La aproximación enolato-imina conduce generalmente también a trans β-lactamas: d) D. J. Hart, D. C. Ha, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1447. e) M.J. Brown, *Heterocycles* **1989**, *29*, 2225.



Esquema 3.5. Estrategia sintética para desarrollar tanto las cis, como las trans  $\beta$ -lactamas

Finalmente, para llevar a cabo la síntesis de los ciclopeptidomiméticos fue necesario disponer de dos sistemas ortogonales de grupos protectores en los precursores lineales. Uno (Bn, Cbz) para proteger los grupos N- y C-terminales durante los correspondientes acoplamientos, y otro para proteger los grupos funcionales reactivos como el ácido carboxílico del aspártico, el grupo guanidinio de la arginina y el diol de la  $\beta$ -lactama (Esquema 3.6).



Para la arginina se optó por el grupo 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf-)<sup>74</sup> (Esquema3.6) ampliamente descrito en la bibliografía como protector eficaz del grupo guanidino. Para el ácido aspártico se empleó el éster de terc-butilo y el diol se protegió mediante el correspondiente acetal.

Todos estos grupos se eliminan con ácido trifluoroacético en la desprotección final y soportan la hidrogenación catalítica previa a la ciclación. Además el grupo Boc se puede eliminar con ácido fórmico sin afectar al grupo Pbf, lo que facilita la preparación del dipéptido (H-Arg(Pbf)-Gli-OBn).

<sup>74</sup> L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829.



Una vez definido el procedimiento sintético para preparar los correspondientes ciclopeptidomiméticos, se abordó en primer lugar la preparación de las correspondientes cis y trans  $\beta$ -lactamas (Figura 3.1).

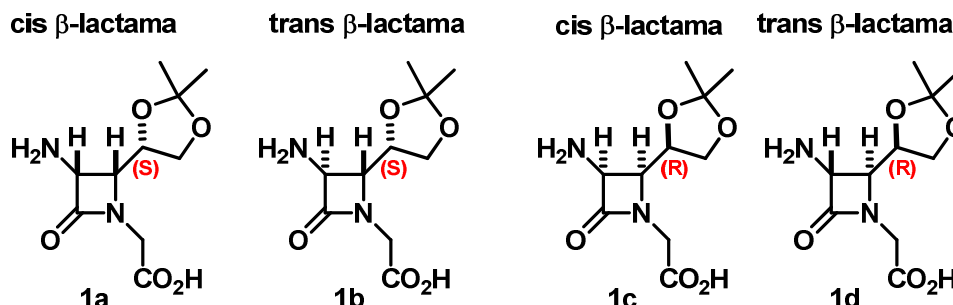
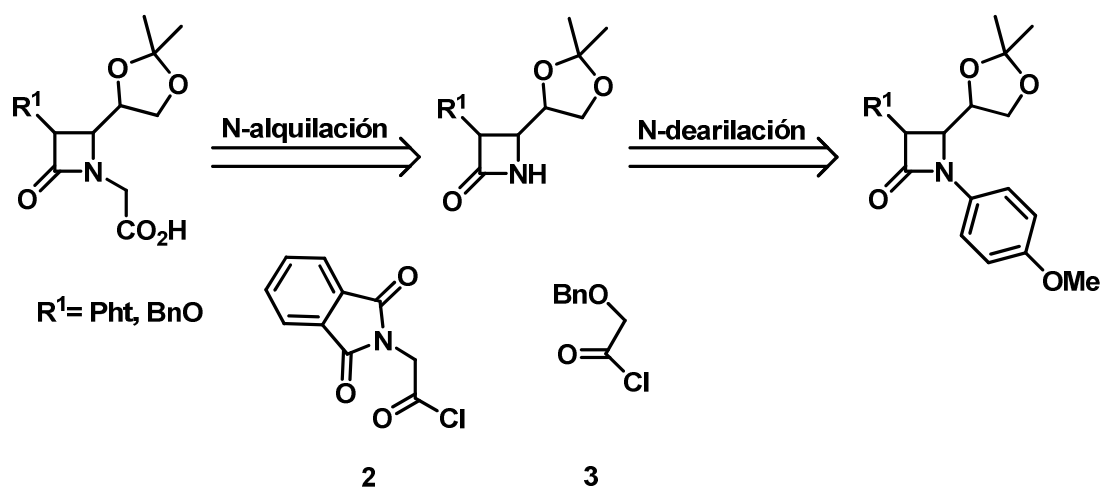


Figura 3.1.  $\beta$ -lactamas requeridas para formar los ciclopentapéptidos. Criterio escogido para la numeración de los diferentes estereoisómeros

Llegados a este punto y para poder seguir sin dificultad la numeración de los diferentes compuestos se procederá a explicar el proceso de elección escogido para facilitar la lectura de esta Tesis. Así, el número define la estructura (siendo el mismo para los diferentes estereoisómeros) y la letra define la configuración relativa en base a dos parámetros: la configuración cis trans de la  $\beta$ -lactama y la configuración absoluta (R o S) del acetónido. Así la letra **a** define una cis  $\beta$ -lactama con una configuración (S) del acetónido. La letra **b** define una trans  $\beta$ -lactama con una configuración (S) del acetónido. La letra **c** define una cis  $\beta$ -lactama con una configuración (R) del acetónido y la letra **d** define una trans  $\beta$ -lactama con una configuración (R) del acetónido. Un ejemplo práctico del criterio escogido se muestra en la Figura 3.1.

### 3.2. Propuesta general para la síntesis de las $\beta$ -lactamas

El estudio se realizó con iminas derivadas del acetónido del gliceraldehído (tanto R como S) siendo la p-anisidina la amina seleccionada para llevar a cabo tal fin. Como es sabido, esta amina da lugar a iminas que tras reacción con cloruros de ácido tales como el cloruro de ftaloil glicina **2** o el cloruro de benciloxiacetilo **3**, conducen a cicloadductos que posteriormente pueden ser N-dearilados<sup>75</sup> de forma simple y eficaz con nitrato de cerio (IV) y amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ , (CAN). La consiguiente N-alquilación con yodoacetato de metilo o de bencilo, procedimiento utilizado desde hace tiempo en el laboratorio<sup>76</sup>, (Esquema 3.9) debería conducir a los compuestos **1a-d**.



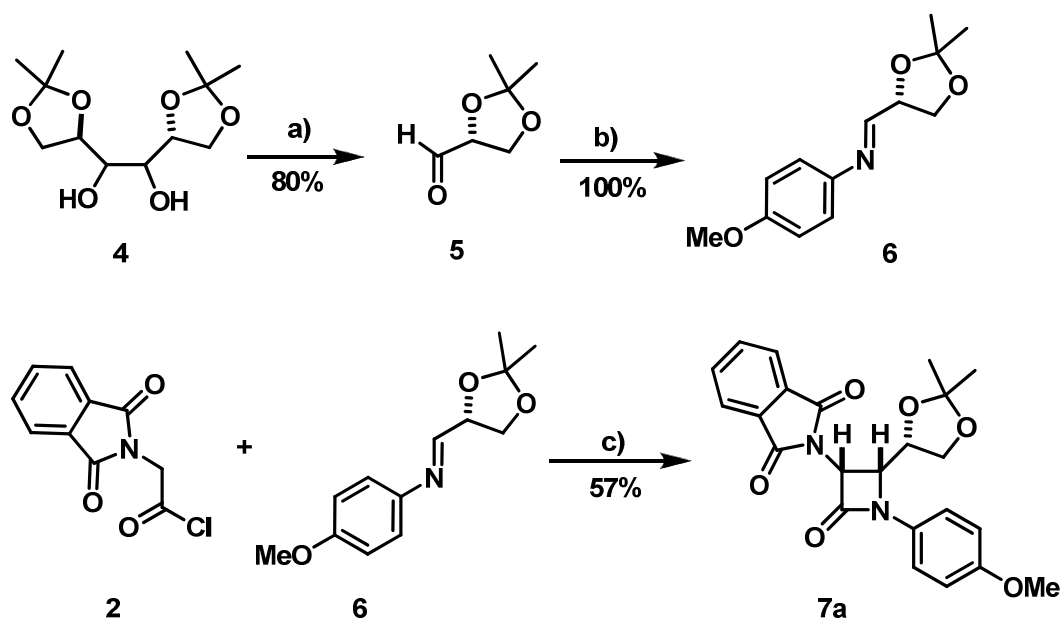
Esquema 3.7. Esquema sintético de la reacción.

Para la obtención de **1a** se partió de la imina **6** que fue preparada por condensación del aldehído **5** con p-anisidina. Por su parte el aldehído **5** se puede obtener de forma sencilla a escala de 0.1 mol a partir del D-isopropiliden-manitol **4** comercial. Una vez obtenida la imina se hizo reaccionar con el cloruro de ácido **2** en presencia de trietilamina sin permitir que la reacción superara los  $-20^\circ\text{C}$  durante la adición. Una vez acabada la adición se dejó que la reacción alcanzara lentamente la temperatura ambiente, obteniendo

<sup>75</sup> D. R. Kronenthal, C. Y. Han, M. K. Taylor, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2765.

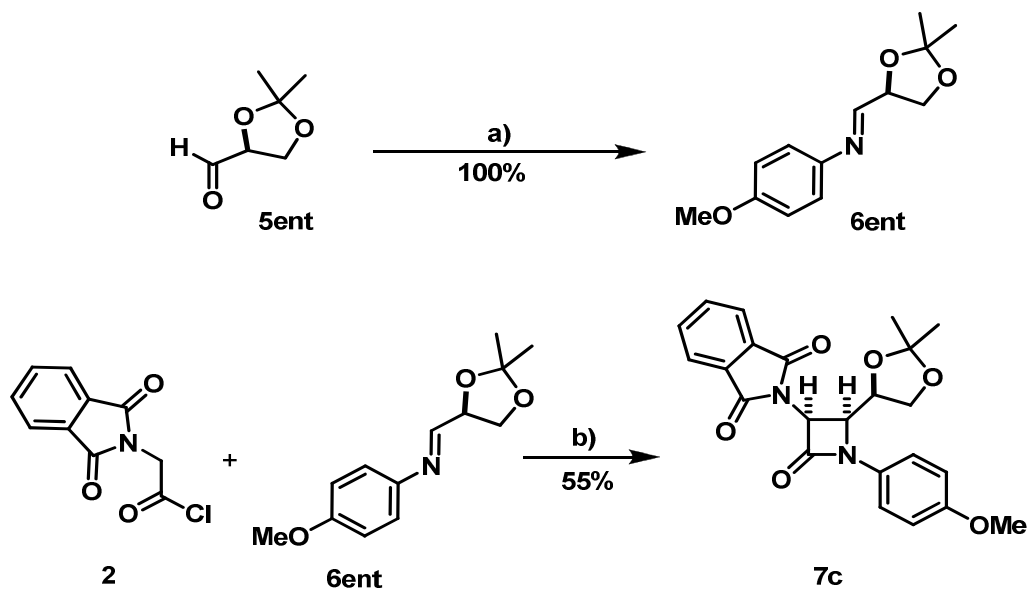
<sup>76</sup> C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Benito, J. I. Miranda, R. M. Fratila, C. Matute, M. Domercq, F. Gago, S. Martin-Santamaria, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243.

la  $\beta$ -lactama **7a** esencialmente como un único diastereómero, con un rendimiento del 57% tras purificación por columna cromatográfica (Esquema 3.8).



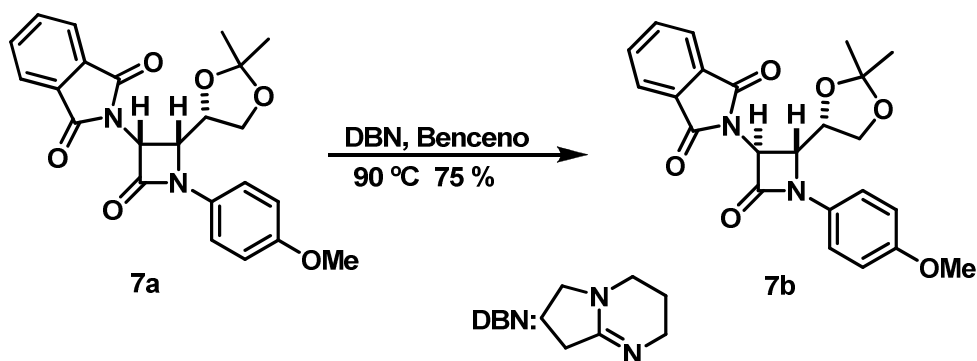
Esquema 3.8. Síntesis de la  $\beta$ -lactama **7a**. a)  $\text{NaIO}_4$  sobre sílica,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  1h, b)  $\text{4-MeOC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h c)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a. 16h

Para la obtención de la cis  $\beta$ -lactama **7c** precursora de **1c** se partió del L-glicerinaldehído comercial y se siguió el mismo procedimiento sintético que para la obtención del producto **7a** (Esquema 3.9). La  $\beta$ -lactama **7c** se obtuvo con un rendimiento del 55% tras purificación por columna cromatográfica



Esquema 3.9. Síntesis de la  $\beta$ -lactama **7c**. a)  $\text{4-MeOC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h b)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a. 16h

Continuando con el planteamiento descrito al inicio de este apartado y tras la obtención de las cis  $\beta$ -lactamas **7a** y **7c**, abordamos la síntesis de las trans  $\beta$ -lactamas, siguiendo el procedimiento descrito por Bose y col. (Esquema 3.10). Este procedimiento consiste en tratar el compuesto **7a** con un equivalente de 1,5-diazabicyclo(4,3,0)-non-5-eno (DBN) como base, en benceno a 90 °C durante 16 horas.



Esquema 3.10. Reacción de epimerización del C<sub>3</sub> de la  $\beta$ -lactama según procedimiento de Bose.

Sorprendentemente en estas condiciones no se observó epimerización alguna. Inicialmente se atribuyó dicha inercia química principalmente al uso de una temperatura de reacción demasiado baja. Por ello procedimos a realizar un estudio, encaminado a buscar las condiciones más adecuadas para obtener la epimerización deseada. Los ensayos realizados se recogen en la Tabla 3.1.

**Tabla 3. 1. Condiciones de reacción utilizadas para la inversión del C<sub>3</sub> de la  $\beta$ -lactama**

Base	Disolvente	Temperatura	Tiempo	Cis / Trans
DBN 1eq	Benceno	80 °C	24 h	100/0
DBN 2eq	Benceno	80 °C	24 h	100/0
DBU 1eq	Benceno	80 °C	24 h	100/0
DBU 2eq	Benceno	80 °C	24 h	100/0
DBN 1eq	DMF	160 °C	24/48 h	90/10
DBN 2eq	DMF	160 °C	24/48 h	90/10
DBU 1eq	DMF	160 °C	24/48 h	87/13
DBU 2eq	DMF	160 °C	24/48 h	87/13
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1eq	DMF	160 °C	24 h	100/0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1eq	MeCN/H <sub>2</sub> O 1/1	100 °C	24 h	100/0

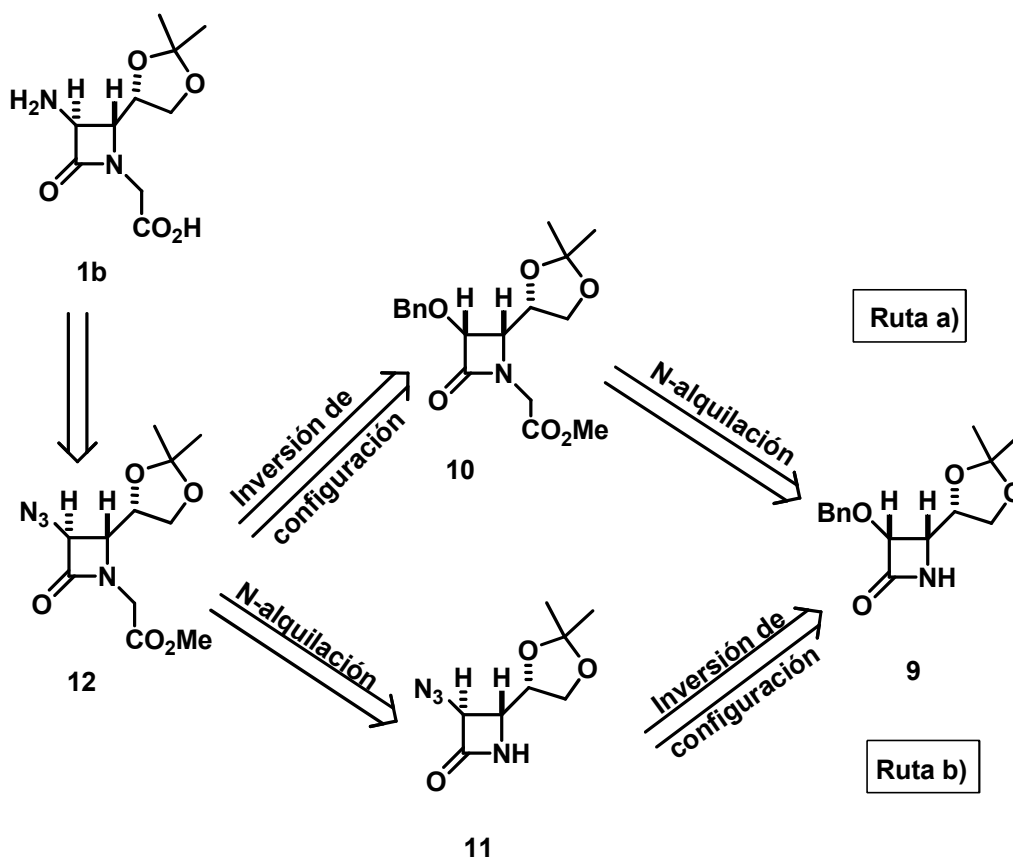
Inicialmente la reacción se llevó a cabo en benceno a 80 °C utilizando 1,5-diazabicyclo(4,3,0)-non-5-eno (DBN) ó 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) previamente destilados, como base. Sin embargo, en ninguno de estos casos se observó isomerización alguna, además se comprobó que la cantidad de base utilizada no afectaba al grado de epimerización. Seguidamente el benceno fue sustituido por la N,N-dimetilformamida (DMF) calentando la reacción a 160 °C. Después de 24 horas a esta temperatura se consiguió una isomerización parcial del 10% y del 13% respectivamente. Estos resultados nos llevaron a pensar que aumentando el tiempo de reacción en estas mismas condiciones podríamos mejorar el rendimiento de la reacción. Sin embargo, a pesar de aumentar el tiempo de reacción de 24 a 48 horas y el número de equivalentes de base utilizados, no se obtuvo una mayor proporción de producto epimerizado, tal y como se pudo determinar a partir del análisis de los crudos de reacción. Tales crudos no fueron purificados. Por último se utilizó un equivalente de carbonato sódico como base utilizando DMF ó una mezcla de acetonitrilo/agua a 100 °C, pero en ninguno de estos casos se observó epimerización alguna obteniendo el producto de partida junto con productos de descomposición de la  $\beta$ -lactama.

Ante la imposibilidad de obtener las trans  $\beta$ -lactamas mediante epimerización directa, se procedió a ensayar la inversión de configuración del

estereocentro C<sub>3</sub> de la β-lactama empleando como sustratos alternativos las 3-hidroxi-β-lactamas y efectuando una reacción de inversión de configuración (S<sub>N</sub>2) sobre el mismo C<sub>3</sub> mediante nucleófilos nitrogenados (ver sección 3.3)

### **3.3. Propuesta para la síntesis de *trans* β-lactamas**

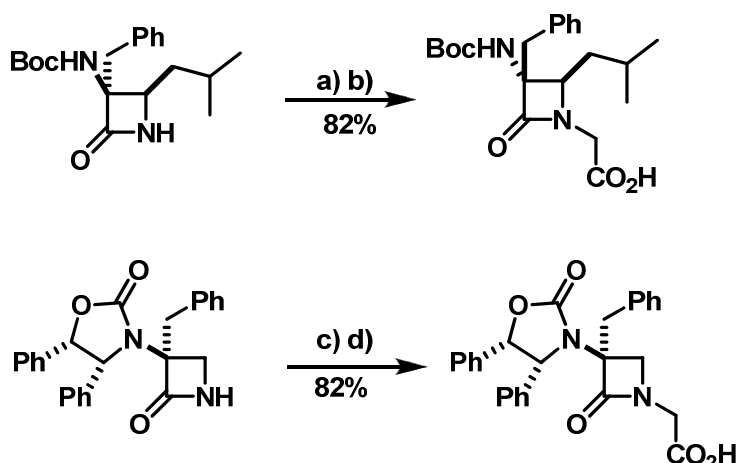
Tal y como se muestra en el análisis retrosintético del Esquema 3.11, nos planteamos dos rutas alternativas para obtener el compuesto **1b**. En ambas se parte del compuesto **7**, pero difieren en el orden de la secuencia sintética a realizar. La ruta a) conlleva primero la manipulación en el N de la β-lactama conduciendo al intermedio **10** y posteriormente la transformación sobre el C<sub>3</sub> de la misma para dar el compuesto **12**, mientras que la ruta b) presenta justamente el orden inverso de síntesis, es decir, primero una inversión de configuración dando el intermedio **11** y subsiguiente N-alquilación de la β-lactama resultante para conducir al compuesto **12**.



Esquema 3.11. Aproximación a la síntesis de la 3-amino-N-carboximetil- $\beta$ -lactama **1b**

De las dos rutas propuestas, decidimos evaluar la ruta **a)** ya que tanto la síntesis de la  $\beta$ -lactama, como la posterior alquilación de la NH- $\beta$ -lactama para obtener el compuesto **10** eran reacciones conocidas en el laboratorio<sup>77</sup>. Por ejemplo, Ana Benito durante la realización de su Tesis Doctoral en nuestro laboratorio preparó una serie de N-carboximetil- $\beta$ -lactamas mediante la alquilación de NH- $\beta$ -lactamas 3,3,4 trisustituidas. De la misma manera, Iraida Loinaz durante la realización de su Tesis Doctoral preparó N-carboximetil- $\beta$ -lactamas a partir de  $\beta$ -lactamas 3,3 disustituidas (Esquema 3.12).

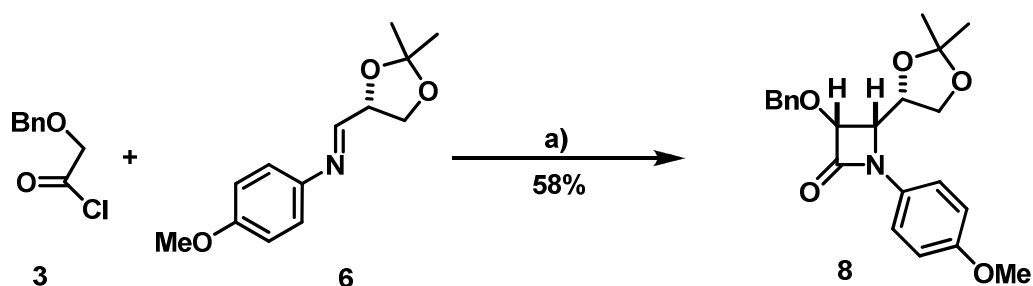
<sup>77</sup> a) C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Benito, J. I. Miranda, R. M. Fratila, C. Matute, M. Domercq, F. Gago, S. Martín-Santamaría, A. Linden. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243. b) I. Loinaz, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Estudio de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", **2004**. pág. 188. c) C. Palomo, J. M. Aizpurua, C. Cuevas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1735.



Esquema 3.12. Procedimiento de Ana Benito: a)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Bn}$  b)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ .  
 Procedimiento de Iraida Loinaz c)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , reflujo d)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O/THF}$

Una vez obtenido el compuesto **10** se abordaría la reacción de inversión de configuración sobre la posición  $\text{C}_3$  de la  $\beta$ -lactama para obtener el compuesto **12**. La posterior reducción del grupo azido a amino y la saponificación del éster metílico nos conduciría al compuesto **1b**.

La síntesis de estos compuestos comenzó con la preparación del compuesto **8** (Esquema 3.13) de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en nuestro laboratorio<sup>77</sup>. Dicho compuesto se obtuvo por cicloadición de la imina **6** con el correspondiente cloruro de ácido **3** en presencia de trietilamina (TEA) como base con un rendimiento del 58% tras purificación en columna cromatográfica.

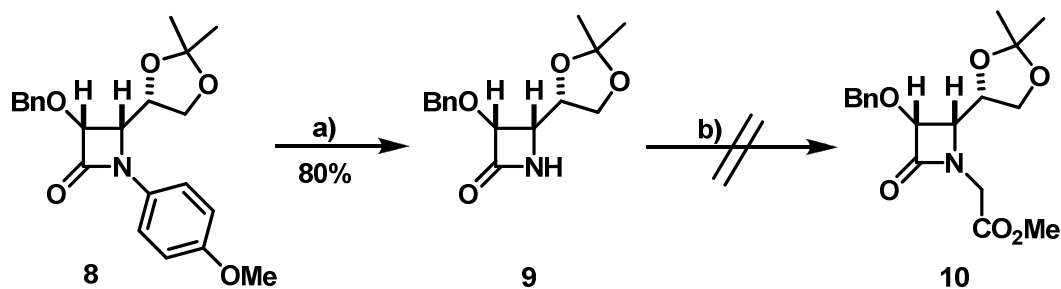


Esquema 3.13. Síntesis de la  $\beta$ -lactama **8**. a)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  16h

Una vez preparada la  $\beta$ -lactama **8**, se procedió a la escisión oxidativa del grupo *p*-metoxifenilo con nitrato de cerio (IV) y amonio (CAN) en una mezcla de diclorometano, acetonitrilo y agua a  $0^\circ\text{C}$  dando lugar al producto **9**



con un rendimiento del 80%. Sin embargo el tratamiento de **9**<sup>76</sup> con 3.5 equivalentes de bromoacetato de metilo en presencia de 2.5 equivalentes de carbonato de cesio en acetonitrilo a 70 °C (Esquema 3.16) no produjo después de 4 horas de reacción la alquilación esperada. Otras condiciones ensayadas también fueron infructuosas (Tabla 3.2).



Esquema 3.14. a) CAN,  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  0 °C 30 min b) Ver condiciones en Tabla 3.2

Tabla 3. 2. Tabla con las diferentes condiciones de reacción ensayadas para la alquilación de la NH  $\beta$ -lactama VI

entrada	reactivo	base	disolvente	aditivo	temperatura	producto
1	$\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{CsCO}_3$	MeCN		90 °C	No reac..
2	$\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{CsCO}_3$	DMF		90-160 °C	No reac
3	$\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	NaH	DMF	15-cor-5	90 -160 °C	Descomp.
4	$\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	MeCN		90 °C	No reac
5	$\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{CsCO}_3$	MeCN		90 °C	No reac
6	$\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{CsCO}_3$	DMF		90 °C	No reac.
7	$\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	NaH	DMF	15-cor-5	90-160 °C-	Descomp.
8	$\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Me}$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	MeCN		90 °C	No reac

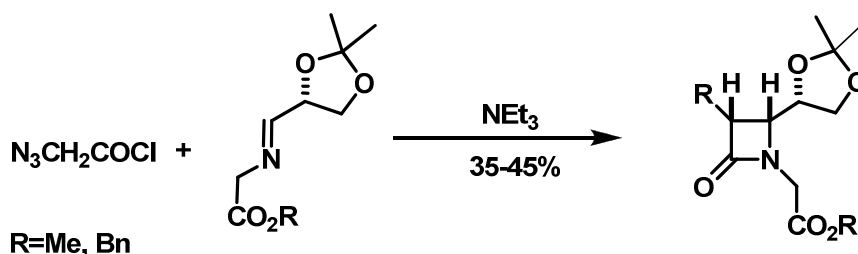
Inicialmente se sustituyó el acetonitrilo por la dimetilformamida (DMF) ya que permitía llevar a cabo la reacción a mayor temperatura (entrada 2), sin embargo, tampoco se observó la alquilación esperada, apareciendo además productos de descomposición, que no fueron identificados. Seguidamente se sustituyó la base por otra más fuerte como el hidruro sódico, añadiendo además en cantidad estequiométrica éter-corona 15-5 (entrada 3).

En estas condiciones tampoco se observó producto de alquilación independientemente de la temperatura de reacción. Utilizando carbonato potásico y carbonato de cesio como bases, en acetonitrilo (entradas 1 y 4) se produjeron resultados idénticos a los anteriores. Finalmente la sustitución del bromoacetato de metilo por el yodoacetato también fue infructuosa (entradas 5-8). En todos los casos, excepto al calentar la reacción a 160 °C se recuperaba parcialmente el producto de partida tras purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna.

De acuerdo con los precedentes presentados al inicio de este apartado, atribuimos la imposibilidad de alquilar la  $\beta$ -lactama **9** al mayor impedimento estérico que presenta el grupo acetónido frente a los diferentes sustituyentes empleados hasta ahora en la posición C<sub>4</sub> de la  $\beta$ -lactama (isobutilo, hidrógeno) ver Esquema 3.12

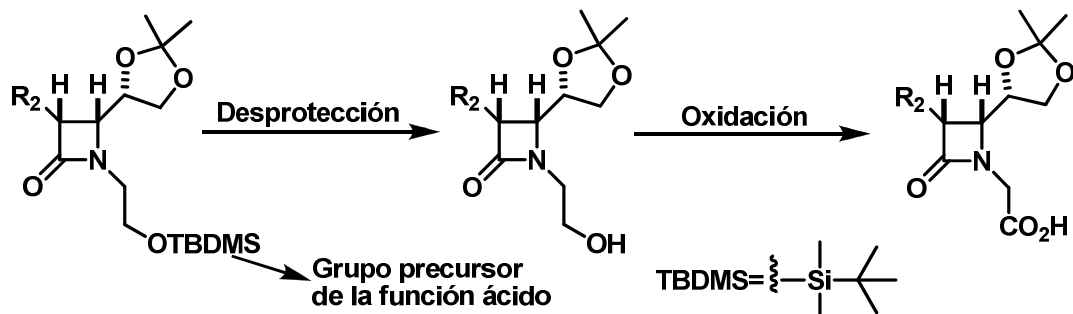
### 3.4. Otras propuestas para la síntesis de *cis* y *trans* $\beta$ -lactamas

Para solventar los problemas anteriores se propusieron dos opciones. La primera opción consistiría en la utilización de iminas derivadas de la glicina (Esquema 3.15) como precursora de la  $\beta$ -lactama. Sin embargo a pesar de que esta opción proporciona de forma directa la integración de la glicina en el anillo  $\beta$ -lactámico durante la etapa de cicloadición, los bajos rendimientos con que generalmente se obtienen los productos correspondientes<sup>70</sup> desaconsejaron su utilización.



Esquema 3.15. Antecedentes descritos en la bibliografía

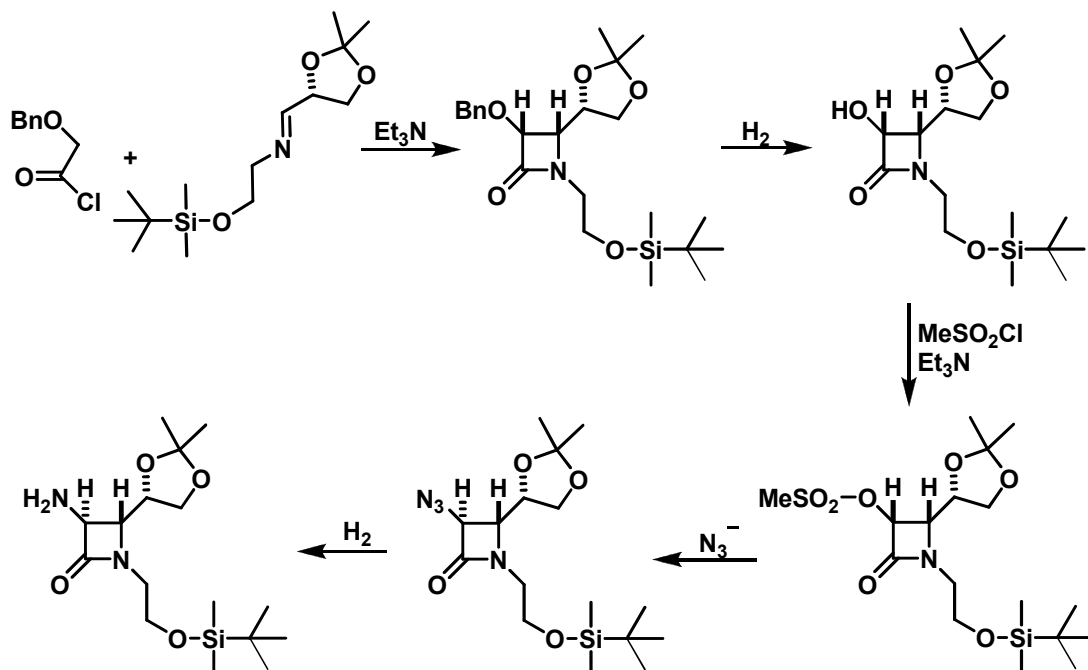
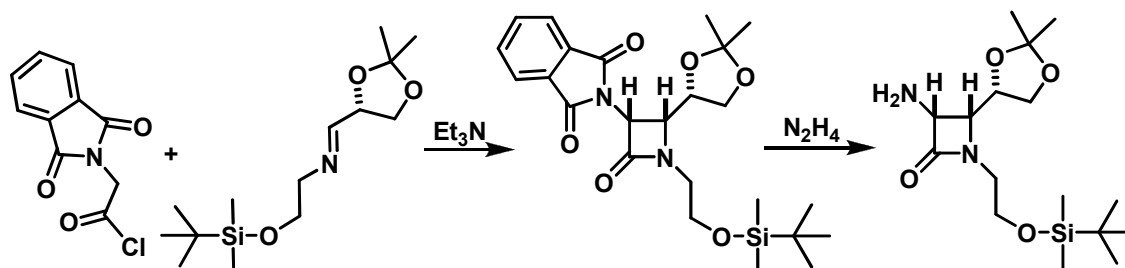
La segunda opción consistiría en la incorporación de un grupo precursor de la función ácido, convenientemente protegido, en la síntesis de la  $\beta$ -lactama (Esquema 3.16)



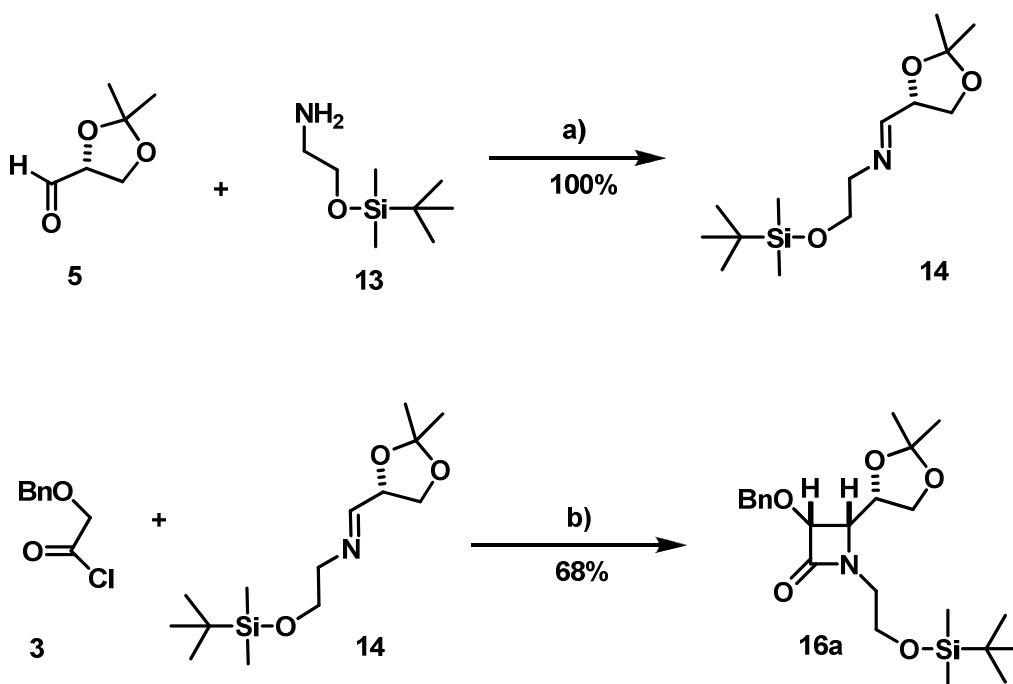
Esquema 3.16. Segunda opción, introduciendo el grupo precursor en la formación de la  $\beta$ -lactama

La alternativa que se consideró más viable fue introducir en el nitrógeno del anillo  $\beta$ -lactámico el grupo terc-butildimetilsililoxi etilo como precursor del correspondiente ácido carboxílico. Tal y como se refleja en el Esquema 3.16, tras desililación y subsiguiente oxidación, este grupo podría ser transformado en dos etapas simples en el ácido carboxílico correspondiente.

Para la obtención de las *cis* 3-amino- $\beta$ -lactamas se pensó en utilizar el cloruro de ftaloil glicina ya que presenta el grupo amino convenientemente protegido y para las *trans* 3-amino- $\beta$ -lactamas se pensó en utilizar el cloruro de benciloxiacetilo ya que permitiría abordar la reacción de inversión de configuración ( $S_N2$ ) planteada en el apartado **1.3** sin problemas aparentes (Esquema 3.17).

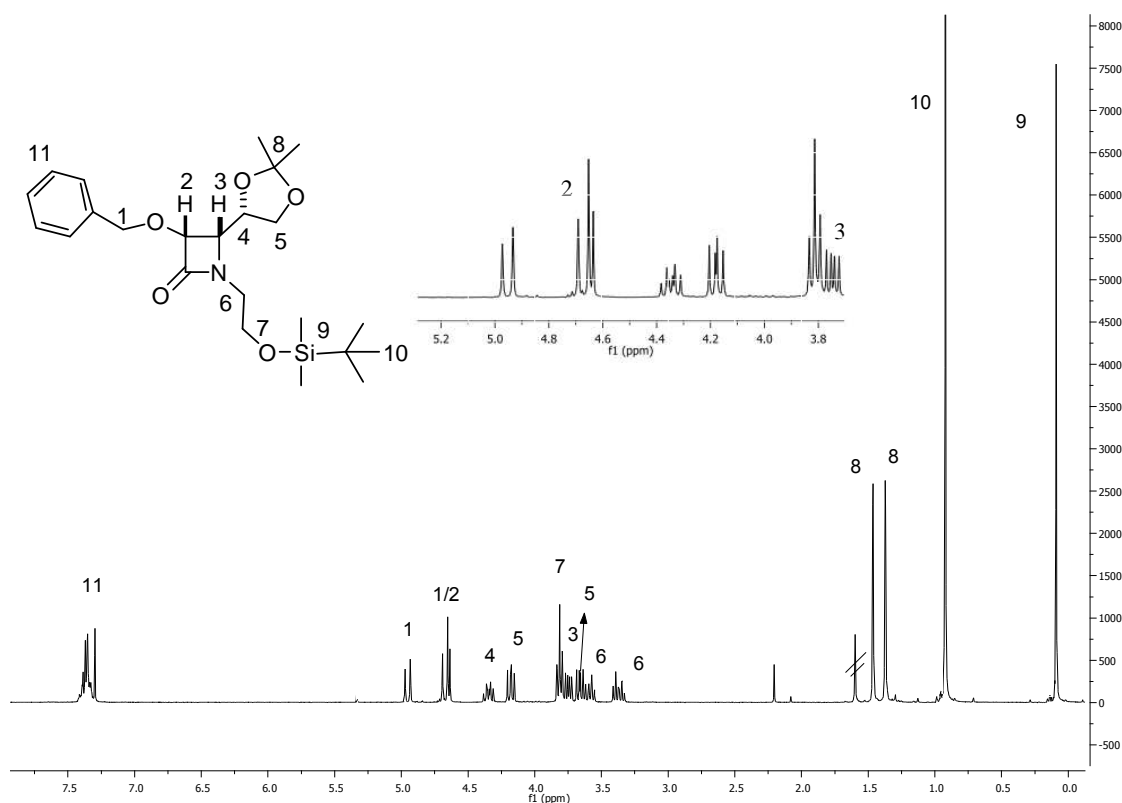
Obtención de trans  $\beta$ -lactamasObtención de cis  $\beta$ -lactamasEsquema 3.17. Propuesta para la síntesis tanto de las cis como de las trans  $\beta$ -lactamas3.4.1. Síntesis de trans  $\beta$ -lactamas

Tras la propuesta de síntesis planteada en el apartado anterior, se procedió en primer lugar a abordar la síntesis de las trans  $\beta$ -lactamas (Esquema 3.18).



Esquema 3.18. Síntesis de la  $\beta$ -lactama **16a**. a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h b)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  16h

Para ello y tras la preparación de la etanolamina protegida como éter de terc-butil-dimetil-sililo se procedió a preparar en las condiciones usuales la imina **14** preparada a partir del aldehído **5** y la amina **13** y se hizo reaccionar con el cloruro de ácido comercial **3** en presencia de trietilamina. Después de 16 horas, se obtuvo un crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice básica ya que la ácida daba lugar a la desprotección del grupo TBDMS. La asignación de los protones en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la  $\beta$ -lactama **16a** se realizó mediante un experimento COSY. En la Figura 3.2 se puede observar el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **16a**.

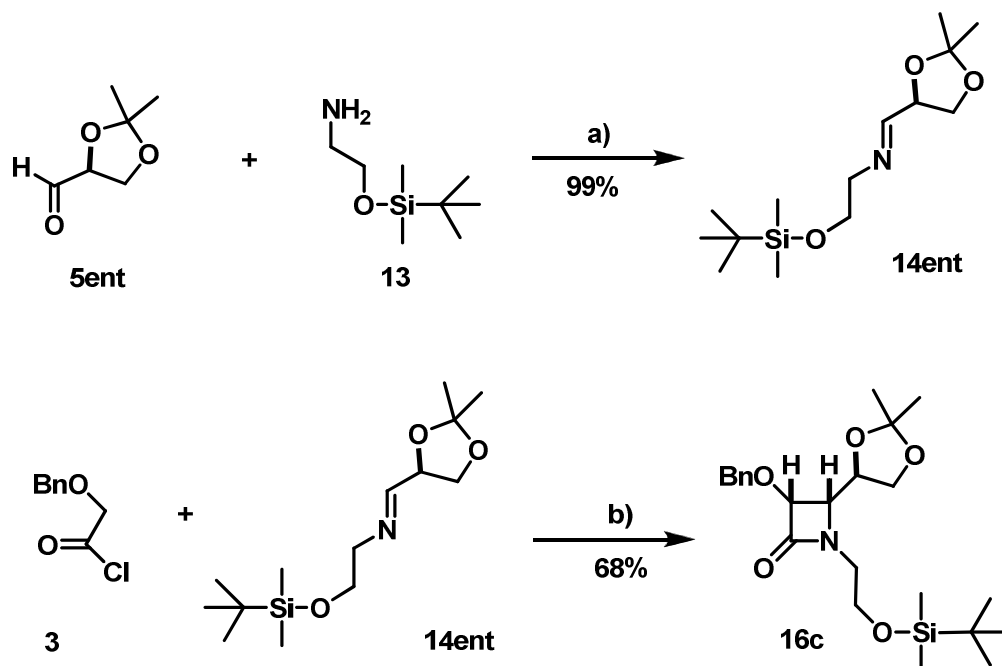


**Figura 3.2. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **16a** en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria**

El producto obtenido presentó una constante de acoplamiento  $J_{2,3} = 5.1$  Hz indicativo de una configuración relativa cis.

La  $\beta$ -lactama **16a** cumple con todos los supuestos que se habían planteado. Posee el grupo diol protegido debidamente posicionado y los distintos alcoholes presentes en el anillo de la  $\beta$ -lactama contienen grupos protectores ortogonales, pudiendo desprotegerse selectivamente en función de las necesidades que plantea la síntesis.

Por otra parte la preparación de la  $\beta$ -lactama **16c**, enantiómero del compuesto **16a**, se realizó a partir del acetónido del (S)-gliceraldehído y se siguió el mismo procedimiento sintético que el utilizado para la obtención del compuesto **16a** (Esquema 3.19).



Esquema 3.19. Síntesis de la  $\beta$ -lactama **12c**. a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h b)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  16h

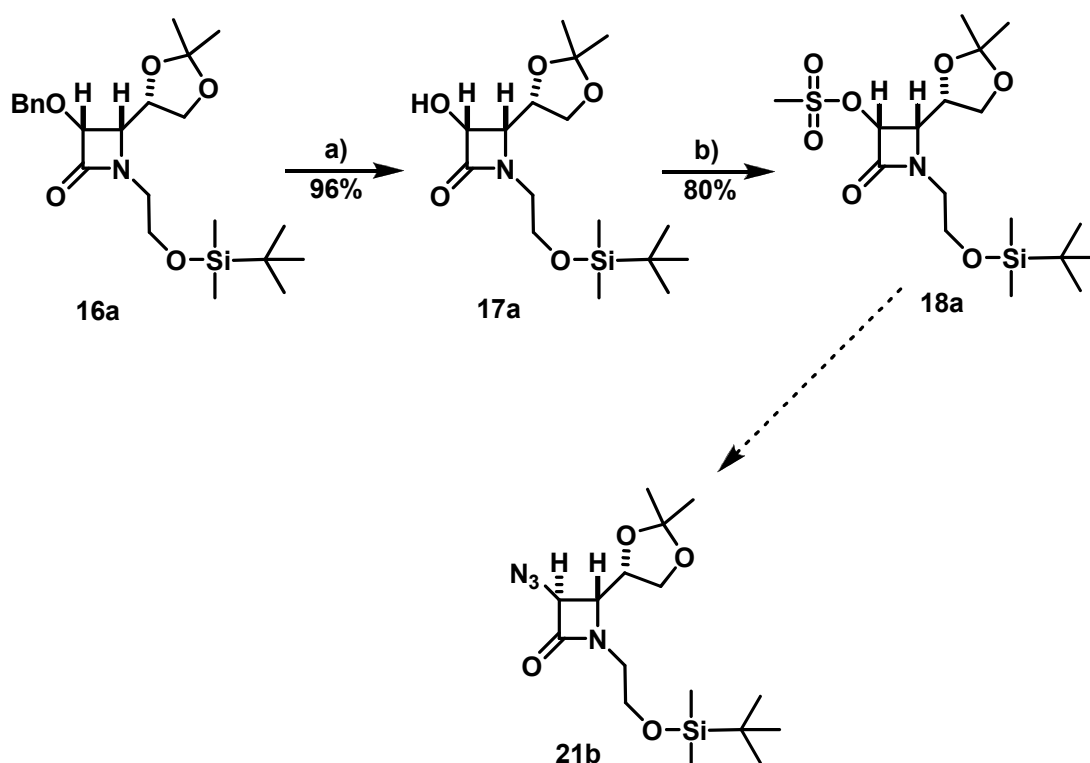
Así, una vez protegida la etanolamina de forma selectiva, se trató con el aldehído **5ent**, enantiómero de **5**, para dar la imina **14ent**, y ésta a su vez se hizo reaccionar con el cloruro de benciloxiacetilo **3** para dar lugar a la *cis*  $\beta$ -lactama **16c**. Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con los de su enantiómero **16a** y sus rotaciones ópticas del mismo valor y de signo contrario.

Tras la obtención de ambos compuestos **16a** y **16c** se procedió en primer lugar a la transformación del primero de ellos en **21b**. Así, el grupo bencilo de la  $\beta$ -lactama se desprotegió selectivamente<sup>78</sup> por hidrogenólisis con paladio y formiato amónico<sup>72</sup> en etanol a reflujo, obteniéndose **17a** con un rendimiento del 96%. Seguidamente se procedió a la transformación de **17a** en **18a**, que conforme a precedentes descritos en la bibliografía<sup>79</sup> nos permitiría

<sup>78</sup> C. Palomo, I. Ganboa, B. Odriozola, A. Linden, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3093.

<sup>79</sup> P. M. Obrien, D. L. Sliskovic, C. J. Blankey, B. D. Roth, M. W. Wilson, K. L. Hamelhele, B. R. Krause, R. L. Stanfield, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1810. b) F. Ornisi, G. Sello, E. Traviani, P. D. Gennaro, *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, 13, 253. c) F. Badalasi, H. K. Nguyen, P. Crotti, J. L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3090.

acceder fácilmente a las trans-3-azido-β-lactamas requeridas, mediante una simple sustitución nucleofílica. (Esquema 3.20).

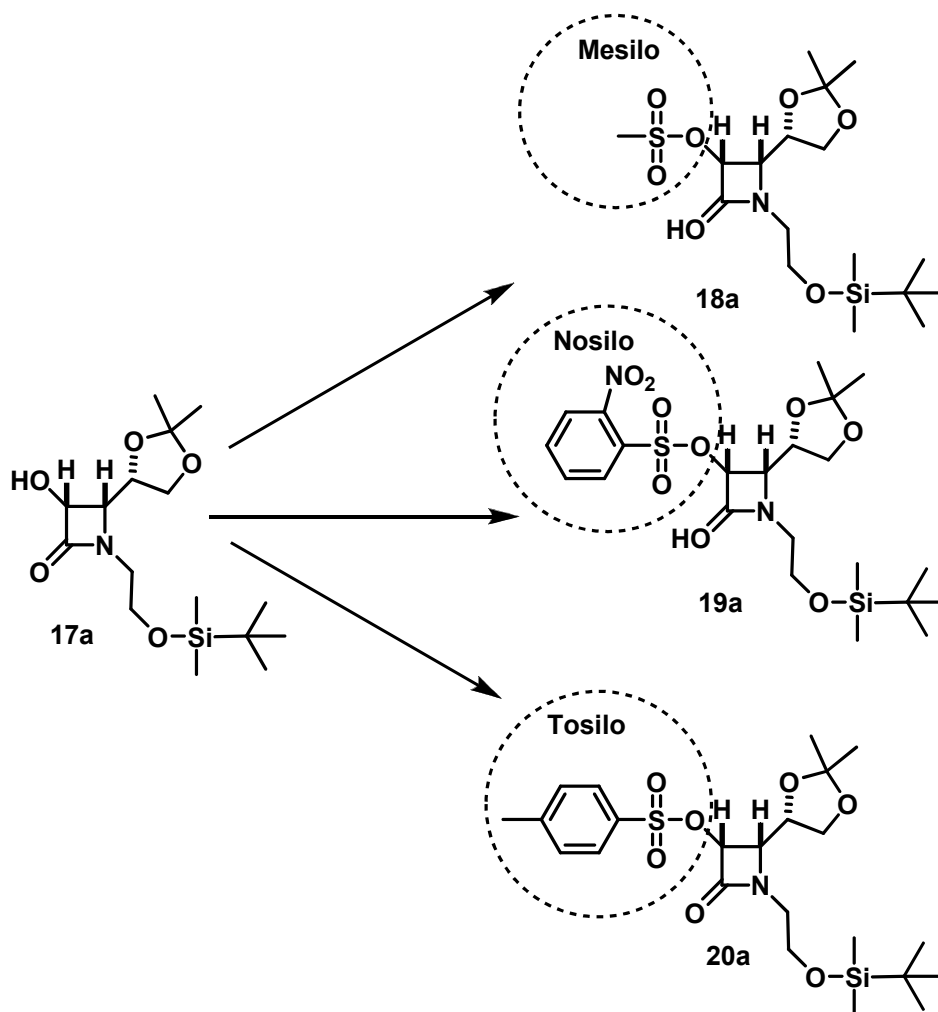


Esquema 3.20. Síntesis del compuesto 18a a)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd 10%, MeOH reflux 1 h, b) Cloruro de mesilo,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  4 h

El compuesto **18a** se obtuvo con un rendimiento del 80% de forma convencional como se indica en la Esquema 3.20. Con este producto, sin embargo, la reacción de sustitución con azida sódica para obtener el compuesto **21b** no fue del todo satisfactoria. Los primeros ensayos se realizaron de acuerdo con el método de Stanfield, es decir, utilizando cinco equivalentes de azida sódica en DMF a diferentes temperaturas de reacción, típicamente entre  $80^\circ\text{C}$  y  $100^\circ\text{C}$ . En todas las condiciones ensayadas se obtuvieron crudos de reacción muy sucios de los que apenas se pudieron aislar cantidades sustanciales del producto deseado (entre un 20-25% de rendimiento).



Utilizando otros grupos salientes tales como el p-toluenbenzenosulfonilo y el o-nitrobenzenosulfonilo (Esquema 3.21), observamos que el control de la temperatura y tiempo de reacción era crítico para obtener los mejores rendimientos. En la Tabla 3.3 se recopilan algunos resultados que sirven para ilustrar esta observación.



Esquema 3.21. Estudio de diversos grupos salientes en la reacción  $S_N2$

Tabla 3. 3. Esquema general de las diferentes condiciones probadas

entrada	Compuesto	Azida sódica	Temperatura	Tiempo	Rendimiento
1	19a/20a	3eq	80 °C	3h	25% / 26%
2	19a/20a	7eq	80 °C	3h	23% / 22%
3	19a/20a	5eq	80 °C	3h	30% / 28%
4	19a/20a	5eq	160 °C	2h	Descomp
5	19a/20a	5eq	160 °C	1h	Descomp
6	19a/20a	5eq	50 °C	8h	15%
7	19a/20a	5eq	t.a.	1h	No hay reac.
8	19a/20a	5eq	t.a.	4h	No hay reac.
9	19a/20a	3eq	120 °C	3h	12%
10	19a/20a	7eq	120°C	3h	10%
11	19a/20a	5eq	80 °C	1h	55% / 40%
12	19a/20a	5eq	80 °C	2h	40% / 30%
13	19a/20a	5eq	80 °C →t.a.	1h+1h	75% / 60%

Comprobamos que utilizando 5 equivalentes de azida (entradas 4 y 5) y calentando la reacción a 160 °C se obtenían productos de descomposición de la  $\beta$ -lactama, mientras que si la reacción se efectuaba a temperatura ambiente (entradas 7 y 8) no se producía transformación alguna, recuperándose el producto de partida. Cuando la reacción fue calentada a 120 °C (entradas 9 y 10) también se obtuvieron crudos de reacción muy sucios con rendimientos muy bajos en torno al 10%. Disminuyendo la temperatura de reacción a 50 °C (entrada 6) se observó una conversión de tan solo un 15% para ambos compuestos (**19a** y **20a**).

Resultados algo mejores se obtuvieron utilizando 5 equivalentes de azida sódica y calentando la reacción a 80 °C durante una hora (entrada 11). En estas condiciones se pudo aislar el producto final **21b** con rendimientos del 55% a partir de **19a** y del 40% a partir de **20a**, recuperándose los productos de partida **19a** y **20a** en un 20% y 18% respectivamente.

Bajo estas mismas condiciones, pero aumentando el tiempo de reacción a dos horas (entrada 12), se obtuvieron nuevamente crudos de reacción muy sucios. Además de no apreciar producto de partida, se constató la presencia de productos de degradación de la  $\beta$ -lactama. Sin embargo, de estos crudos se pudo aislar el producto **21b** con un rendimiento del 40% para el compuesto **19a** y del 30% para el compuesto **20a**.

Los mejores resultados se obtuvieron finalmente tras utilizar 5 equivalentes de azida sódica, calentando la reacción a 80 °C durante una hora y dejando posteriormente que la reacción alcanzara la temperatura ambiente durante otra hora más (entrada 13). Los crudos de reacción resultaron ser bastante limpios obteniéndose el producto **21b** con un rendimiento del 75% a partir de **19a** y del 60% a partir de **20a**.

Una vez purificado el producto **21b** por cromatografía en columna, se procedió a determinar su estructura mediante varias técnicas. El espectro IR mostró una banda característica del grupo azida alrededor de 2100  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.4). El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 3.3). mostró una constante de acoplamiento  $J_{1,2} = 1.8$  Hz para los protones del anillo, indicativo de una configuración relativa trans.

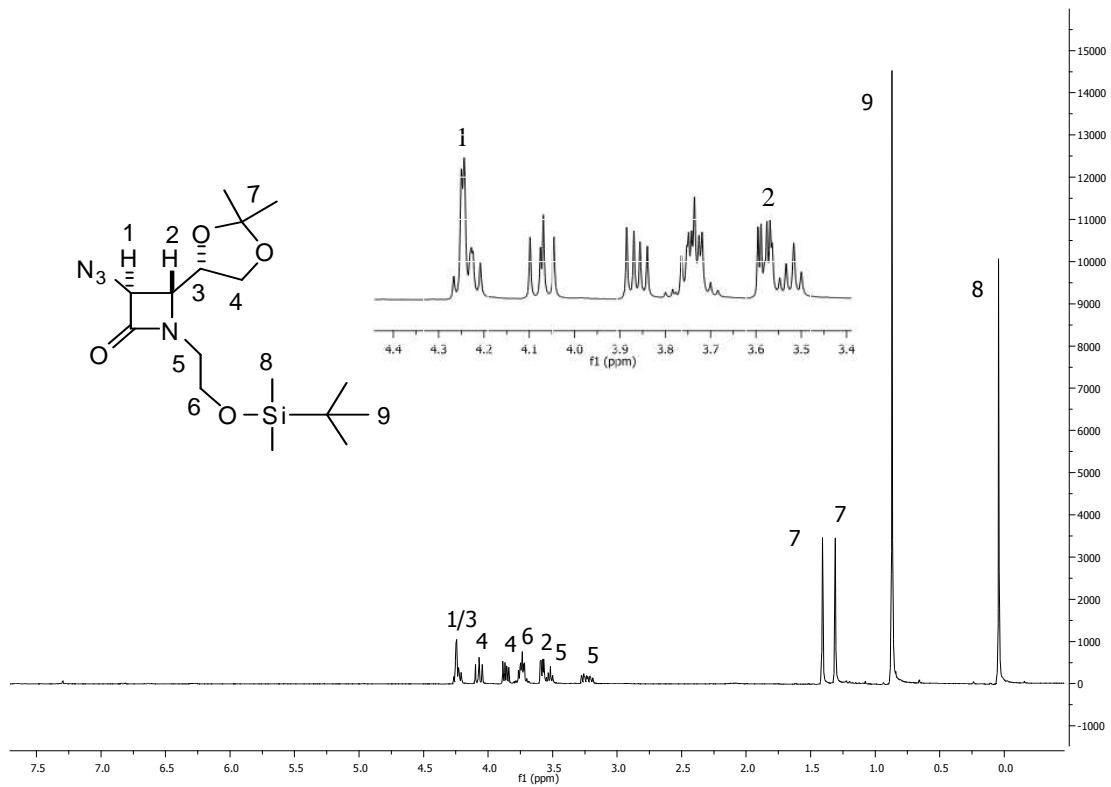


Figura 3.3. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **21b** en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

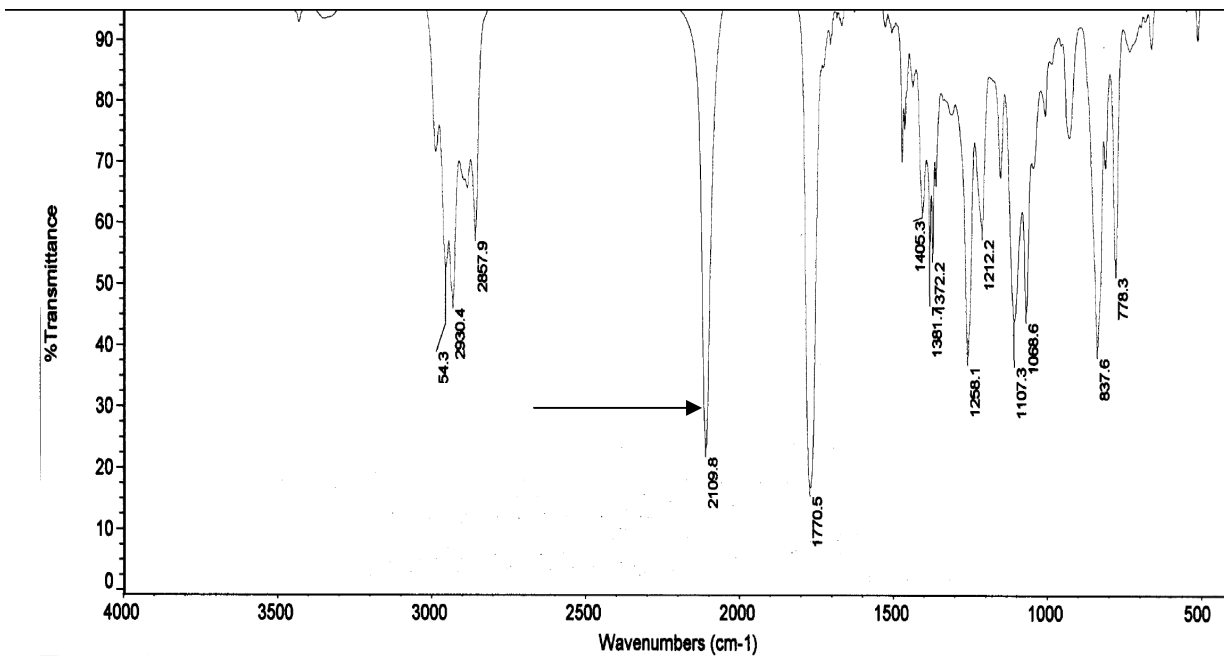
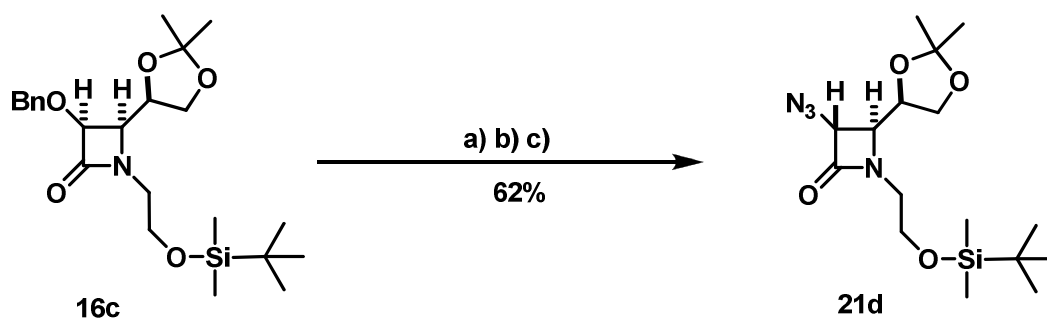


Figura 3.4. IR del compuesto **21b**, la señal a  $2109\text{ cm}^{-1}$  corresponde al grupo azido

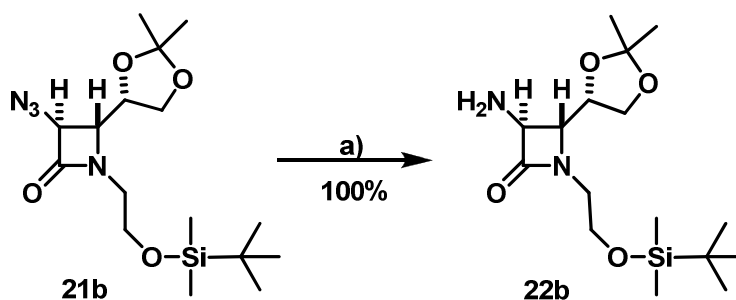
Idénticas transformaciones se llevaron a cabo partiendo del compuesto **16c**, dando lugar al compuesto **21d** en tres etapas y con un rendimiento global del 62% (Esquema 3.24). Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con

los del compuesto **21b** y sus rotaciones ópticas fueron del mismo valor y de signo contrario.



Esquema 3.22. a)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd 10%, MeOH reflux 1 h, b) *o*-Ns-Cl,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  3 h c)  $\text{NaN}_3$ , DMF,  $80^\circ\text{C}$  1 h  $\rightarrow$  t.a. 1h

Una vez obtenidos los compuestos **21b** y **21d** se procedió en primer lugar a la reducción del grupo azida en **21b** por hidrogenación con paladio soportado sobre carbonato cálcico<sup>80</sup>. De este modo se obtuvo el compuesto **22b** con un rendimiento esencialmente cuantitativo. El espectro IR del compuesto **22b** mostró la ausencia de la banda a  $2109\text{ cm}^{-1}$  característica de la función azida y la presencia de bandas anchas entre  $3500$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al grupo amino.

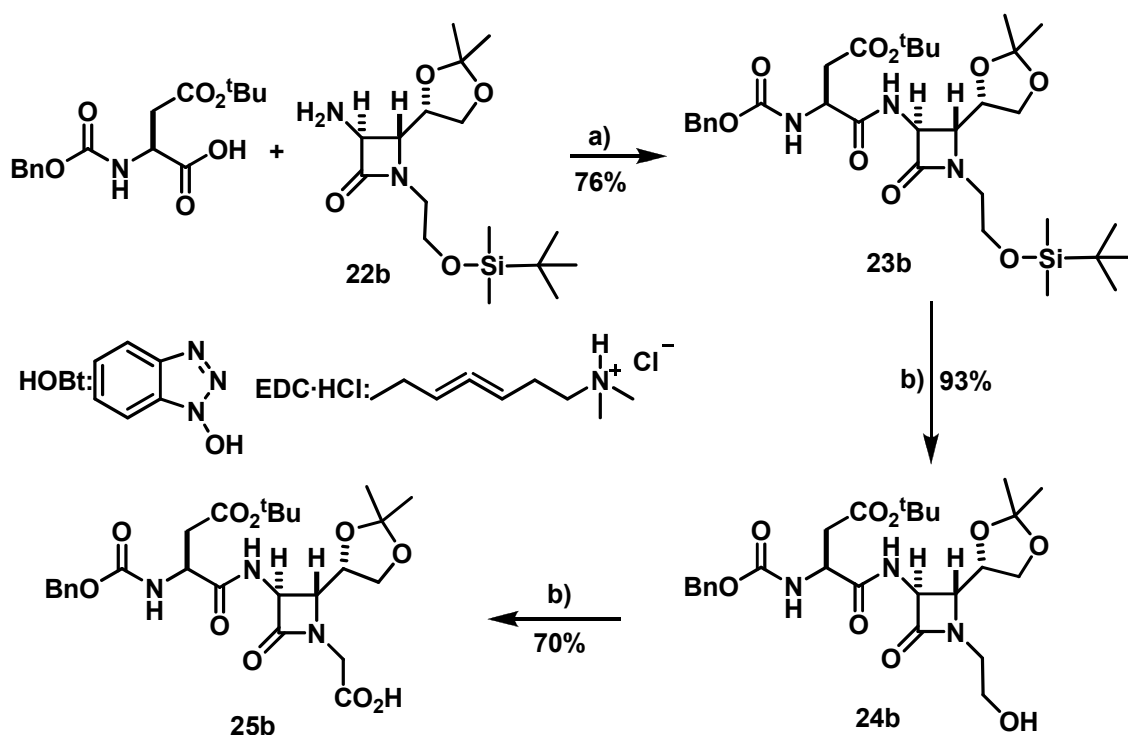


Esquema 3.23. a)  $\text{H}_2$  Pd/ $\text{CaCO}_3$  en EtOH 16h.

A continuación, se abordó la preparación del ciclopéptido de RGD empezando por el acoplamiento del ácido aspártico con la 3-amino- $\beta$ -lactama **22b** obtenida anteriormente, subsiguiente desprotección del éter silílico y posterior oxidación del alcohol a carboxilo (Esquema 3.24)

<sup>80</sup> E. J. Corey, K. C. Nicolau, R.D. Balanson, Y. Machida, *Synthesis* **1975**, 9, 590.

Así, se llevó a cabo la reacción del compuesto **22b** con el compuesto comercial Cbz-Asp(OtBu)-OH, utilizando agentes de acoplamiento como el clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC·HCl), y el 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) en presencia de trietilamina (TEA) como base. Transcurridas 16 horas de reacción a temperatura ambiente, se obtuvo el producto **23b** con un rendimiento del 76% tras purificación de la mezcla por cromatografía a presión en columna de gel de sílice.



Esquema 3.24. Reacción de acoplamiento, desililación y oxidación del alcohol primario.  
 a) Cbz-Asp(OtBu)-OH, EDC ·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 16h 0°C → t.a. b) THF, fluoruro de piridinio, 3h, 0°C → t.a. c) TEMPO, BAIB, MeCN/H<sub>2</sub>O 4h t.a.

Se buscó un procedimiento<sup>81</sup> de desprotección del grupo TBDMS que no afectase al acetónido ni al éster de terc-butilo. Así, se partió del compuesto **23b** y se añadió fluoruro de piridinio en THF. Pasadas 3 horas se obtuvo el compuesto **24b** con un rendimiento del 93% y se utilizó en la subsiguiente oxidación sin purificación previa.

<sup>81</sup> K. C. Nicolau, S. E. Webber, *Synthesis* **1986**, 6, 453.

Para la oxidación del grupo hidroxilo del compuesto **24b** se utilizó el bisacetoxiyodobenceno (BAIB) en cantidad estequiométrica y 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) en cantidad catalítica<sup>82</sup>. Este sistema es capaz de oxidar alcoholes primarios a los correspondientes ácidos carboxílicos en condiciones “neutras” compatibles con otros grupos funcionales lábiles en medio ácido. Los ensayos previos realizados utilizando el reactivo de Jones (solución de trióxido de cromo en ácido sulfúrico) como agente oxidante, provocaron la desprotección de los diferentes grupos protectores obteniéndose principalmente productos de degradación de la  $\beta$ -lactama. Sin embargo, utilizando la combinación de BAIB/TEMPO el producto se obtuvo con un rendimiento del 70% tras purificación en columna cromatográfica de gel de sílice ácida. A continuación se representa la asignación completa del compuesto **25b** en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 3.5).

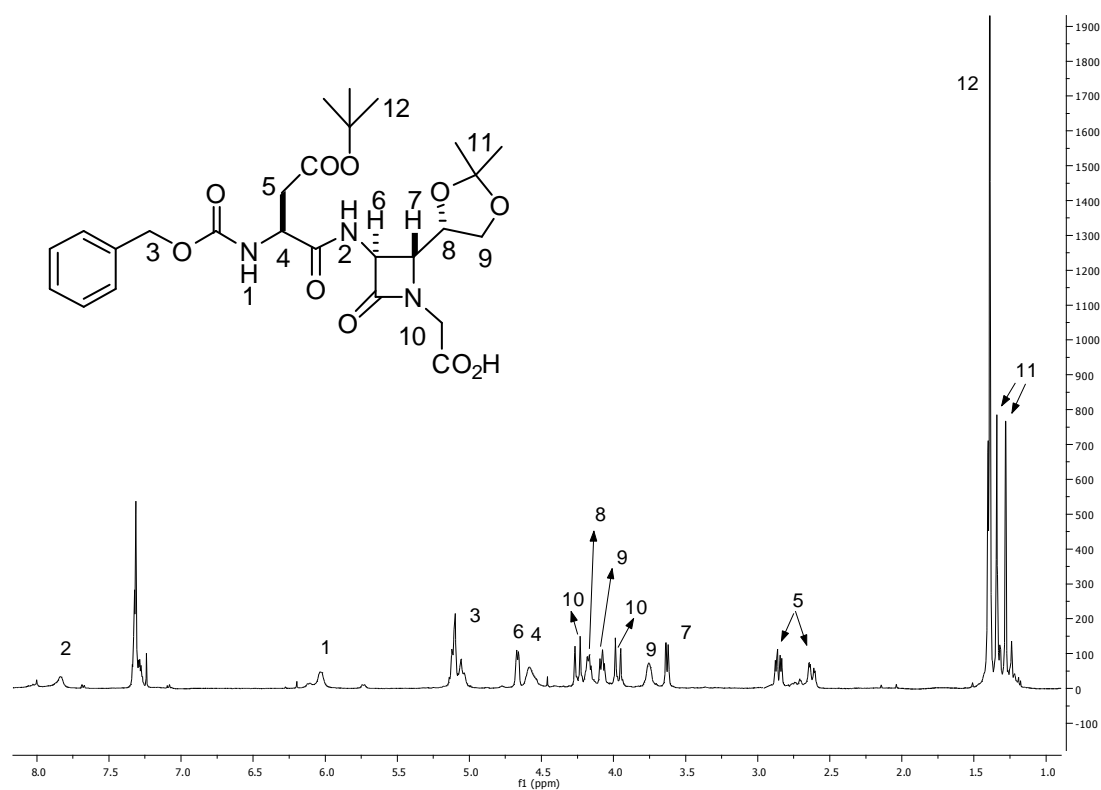


Figura 3.5. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **25b** en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

Como se puede apreciar en el espectro, el protón de amida (1) del residuo de ácido aspártico aparece hacia 6 ppm, y el de la  $\beta$ -lactama (2) hacia

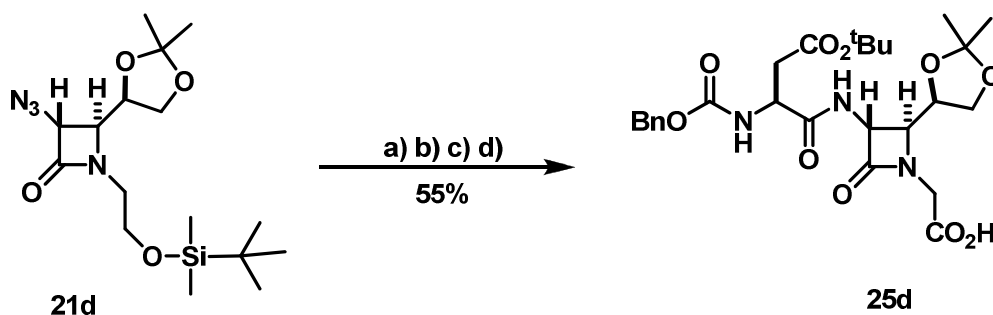
<sup>82</sup> B. Jeffrey, E. S. Widlanski, T. S. Widlanski, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293.

7.8 ppm. El protón del C $\alpha$  del aspártico (4) da una señal de COSY con el protón de amida (a 6 ppm) y con los protones del C $\beta$  del aspártico (5), los cuales dan un doble doblete muy característico a 2.8 y 2.5 ppm (ver pág. 230 del Anexo)

Los protones diastereotópicos numerados como 10 fueron fácilmente identificables ya que sólo presentan señal de COSY entre ellos y además aparecen dando un doblete como un sistema A-B apareciendo hacia 4.2 y 3.9 ppm respectivamente.

Los protones 6, 7, 8 y 9 pertenecientes al residuo de la  $\beta$ -lactama fueron asignados a partir del protón amídico de la  $\beta$ -lactama, siguiendo las señales de cruce del experimento COSY. Cabe destacar que los protones del CH<sub>2</sub> del dioxolano (9) también son diastereotópicos y aparecen hacia 3.7 y 4.1 ppm respectivamente.

Se aplicó la misma ruta de síntesis del compuesto **21b** al compuesto **21d**, para obtener el compuesto **25d** con un rendimiento global en las cuatro etapas del 55% (Esquema 3.25). Al incluir un nuevo estereocentro, por acoplamiento de la amina con el Cbz-Asp(OtBu)-OH, los compuestos **25b** y **25d** son ahora diastereómeros entre si, con la consiguiente diferencia en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.6).



Esquema 3.25. Secuencia sintética para la obtención del compuesto **25d** a partir del compuesto **21d**. a) H<sub>2</sub> Pd/CaCO<sub>3</sub> en EtOH 16h b) Cbz-Asp(OtBu)-OH, EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 16h 0°C → t.a. c) THF, fluoruro de piridinio, 3h, 16h 0°C → t.a. d) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O 4h t.a.



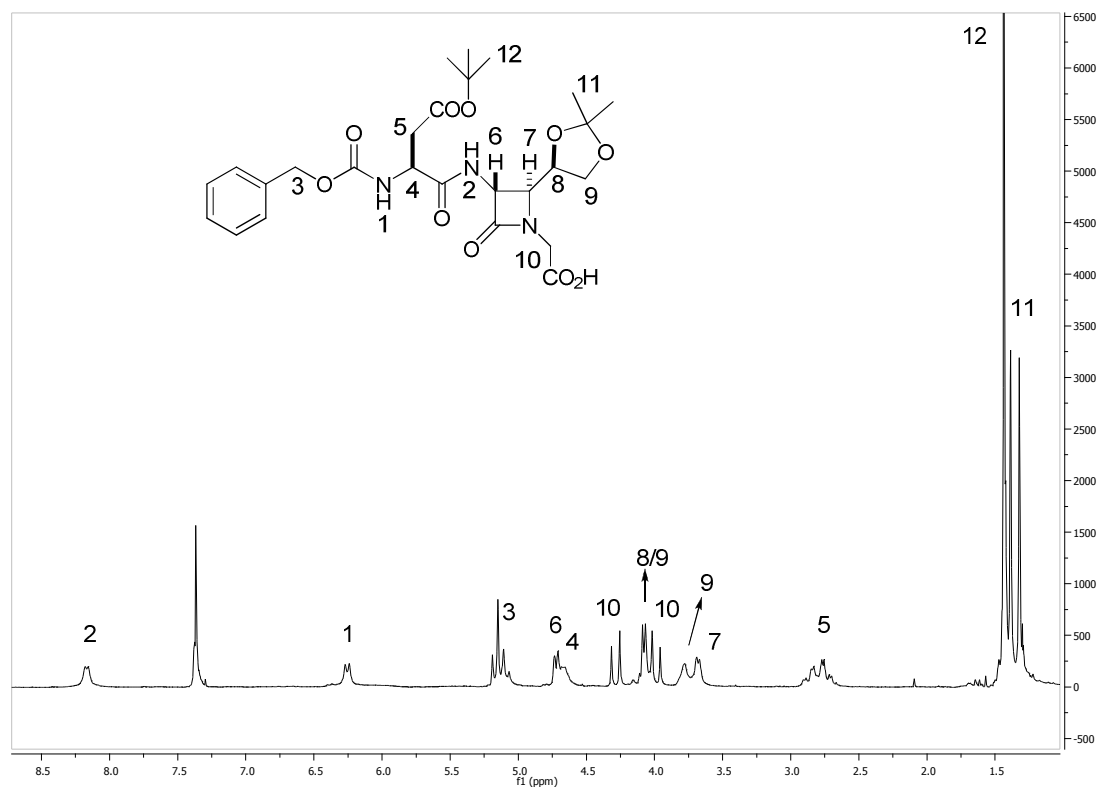


Figura 3.6. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (500MHz) del compuesto **25d** en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

Esta diferencia se puede observar, por ejemplo, en los protones pertenecientes al carbono  $\beta$  del residuo del aspártico (5) y en los desplazamientos de los protones amídicos que en este caso salen a campos más altos así como en el solapamiento de las señales pertenecientes a los protones del acetónido (8 y 9).

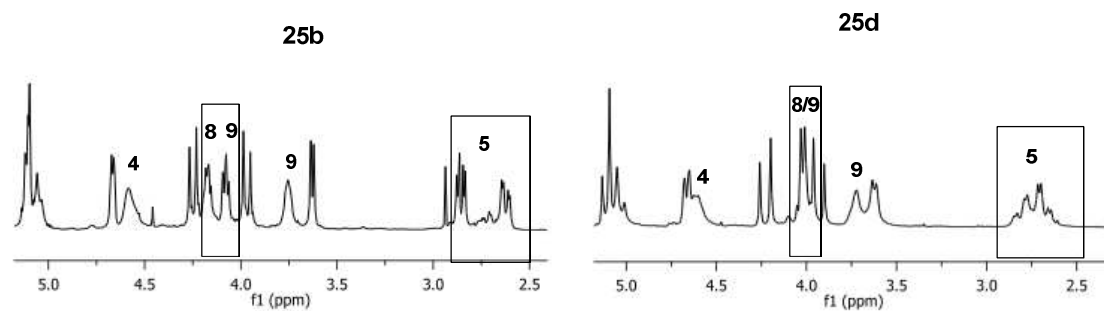
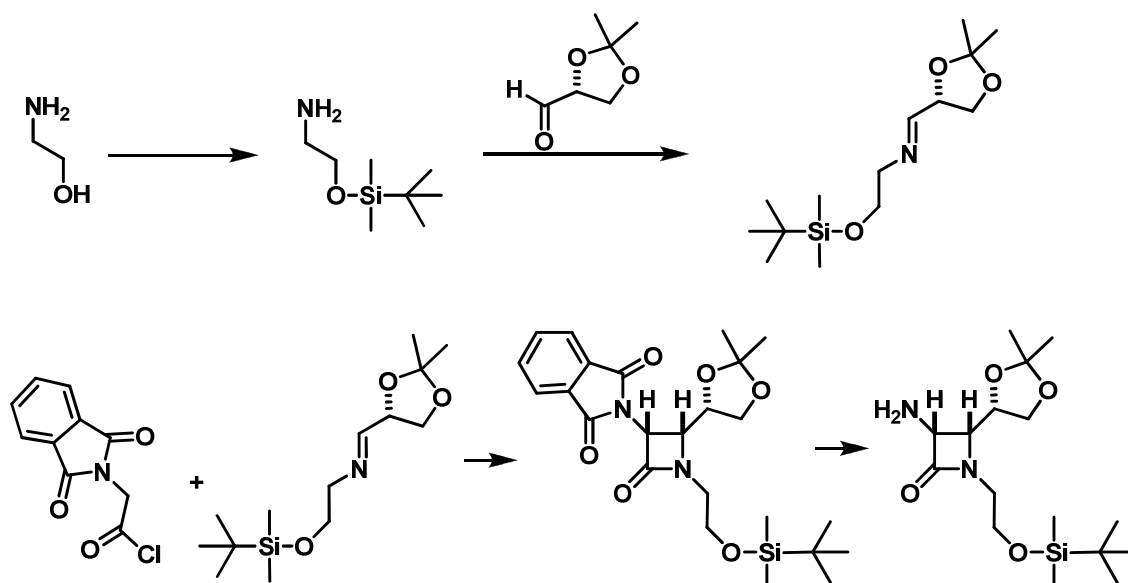


Figura 3.7. Ampliación de la zona entre 2 y 5 ppm de los espectros **25b** y **25d**

El COSY de los compuestos **25b,d** se muestran en el Anexo 6.1 páginas 229-232 de esta tesis. Las regiones ampliadas de los espectros del compuesto **25b** y **25d** se muestran en la Figura 3.7.

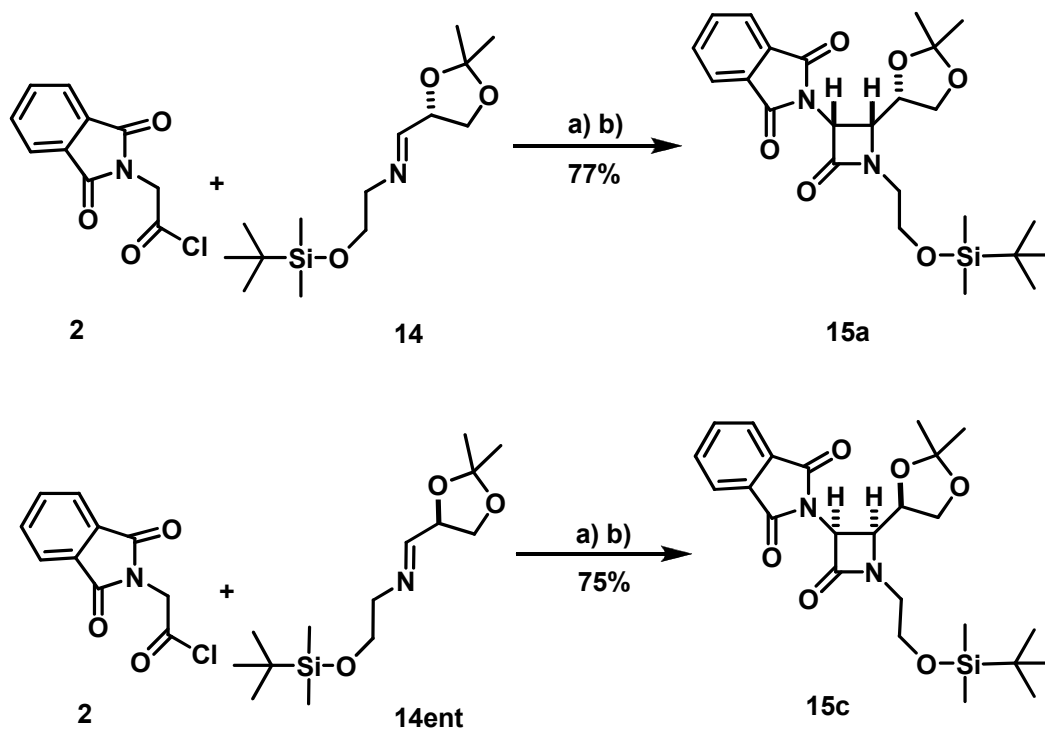
### 3.4.2. Preparación de cis $\beta$ -lactamas

Como se ha comentado anteriormente, las  $\beta$ -lactamas de configuración relativa cis en el anillo, pueden ser preparadas directamente a partir de la reacción de Staudinger (Esquema 3.26).



Esquema 3.26. Estrategia a seguir para la obtención de las  $\beta$ -lactamas cis

En nuestro laboratorio, ya se había descrito la preparación de cis-3-amino- $\beta$ -lactamas utilizando el grupo ftalimidoilo como precursor del grupo amino (Esquema 3.27). La adopción de este procedimiento se realizó por varias razones: a) el grupo ftalimidoilo es un grupo ortogonal respecto al grupo acetal y al grupo TBDMS, b) la desprotección quimioselectiva del grupo ftalimidoilo daría lugar a las cis-3-amino- $\beta$ -lactamas correspondientes.



Esquema 3.27. Obtención de las cis  $\beta$ -lactamas **14a** y **14ent**. a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h b)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  16h

Así, una vez obtenidas las iminas **14** y **14ent** (a partir del R y S gliceraldeído acetónido correspondiente) éstas se hicieron reaccionar en presencia de trietilamina como base con el cloruro de ftaloil glicina comercial **2**, obteniéndose las  $\beta$ -lactamas **15a** y **15c** respectivamente. Los crudos de reacción se purificaron mediante cromatografía de baja presión en columna de gel de sílice básica, obteniéndose rendimientos del 77% para el compuesto **15a** y del 75% para el compuesto **15c** (Esquema 3.27).

Como se puede observar, también aquí los compuestos **15a** y **15c** son enantiómeros entre sí, por lo que el espectro de protón  $^1\text{H}$ -RMN es idéntico en ambos (Figura 3.8).

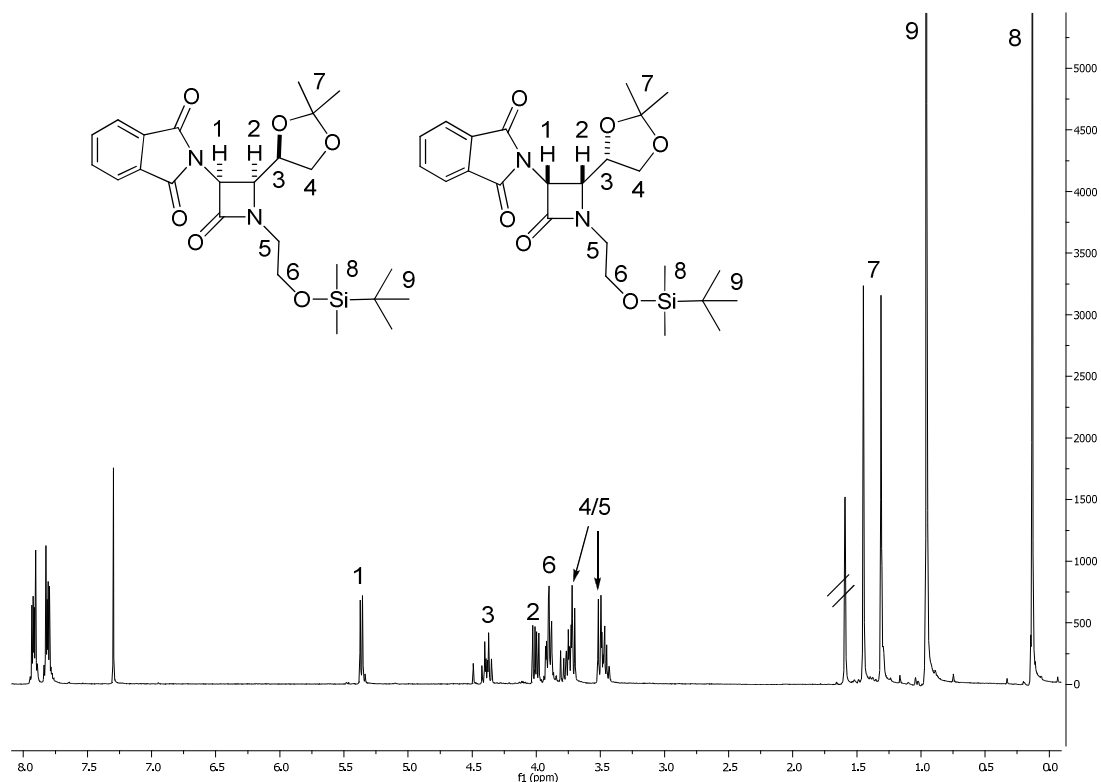
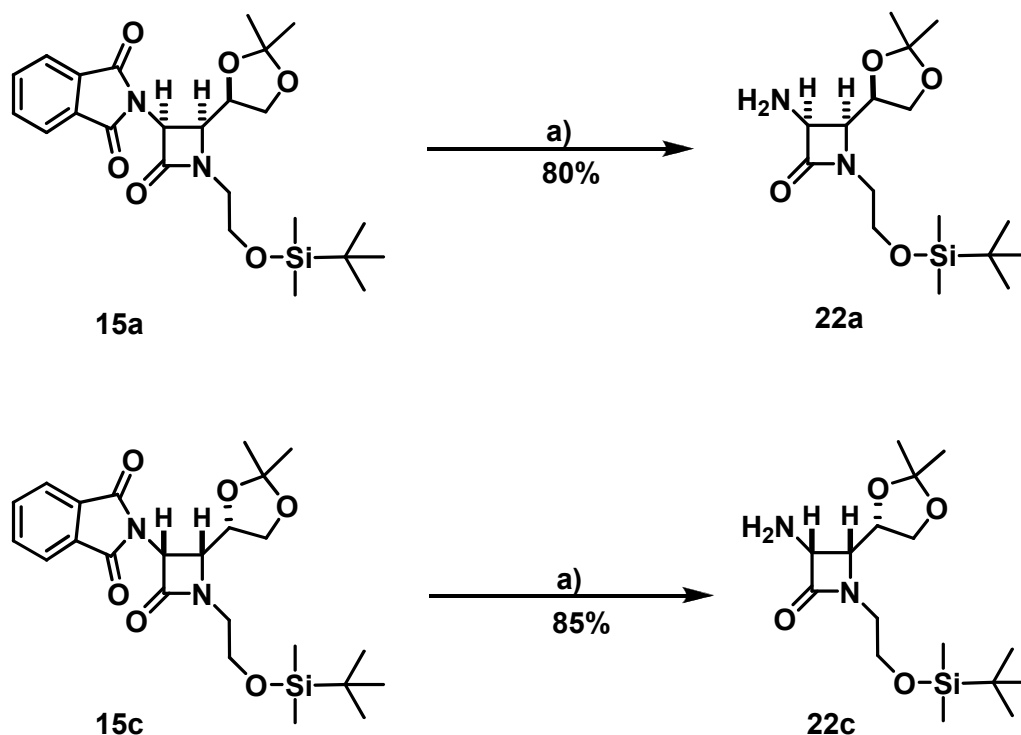


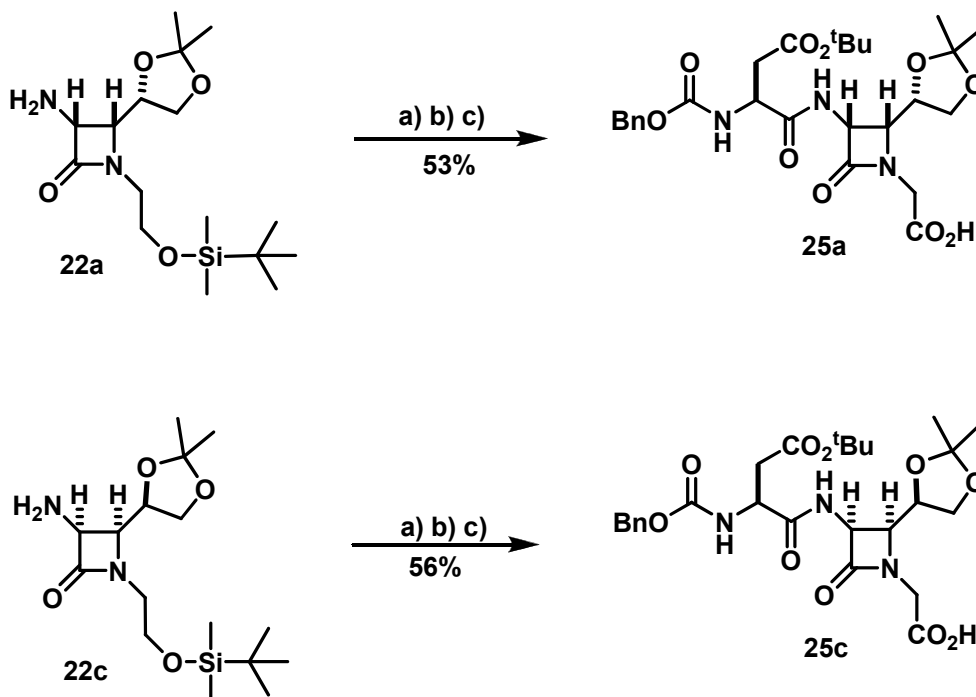
Figura 3.8. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **15a** en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

Los protones identificados como 4 (pertenecientes al acetónido) y 5 (pertenecientes al metileno unido al NH de la  $\beta$ -lactama) son diastereotópicos, y aparecen en la zona de 3.5 a 3.7 ppm. Una vez caracterizada la  $\beta$ -lactama, procedimos a realizar la desprotección del grupo ftalimidoilo con hidrazina monohidratada en etanol a temperatura ambiente, durante 48 h obteniendo el compuesto **22a** con un rendimiento del 85% y el compuesto **22c** con un rendimiento del 80% (Esquema 3.28).



Esquema 3.28. Desprotección del grupo ftalimidoilo a)  $\text{N}_2\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, t.a. 48h

Tras obtener las cis amino- $\beta$ -lactamas correspondientes, se procedió a efectuar el acoplamiento entre los compuestos **22a** y **22c** y el Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH utilizando EDC·HCl y HOBt en diclorometano y en presencia de TEA como base. El posterior tratamiento con fluoruro de piridinio y oxidación del alcohol resultante utilizando BAIB y TEMPO, condujo a los compuestos **25a** y **25c**, con unos rendimientos globales del 53% y del 56%, respectivamente (Esquema 3.29).



Esquema 3.29. Secuencia sintética para la obtención de los compuestos **25a** y **25c** a partir de los compuestos **22a** y **22c**. a) 1, EDC ·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 16h 0°C → t.a. b) THF, fluoruro de piridinio, 3h, 16h 0°C → t.a. c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O 4h t.a.

En la Figura 3.9 y Figura 3.10 se muestran los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **25a** y **25c** y en el Anexo 6.1, páginas 229-232, el experimento COSY de cada uno de los compuestos.

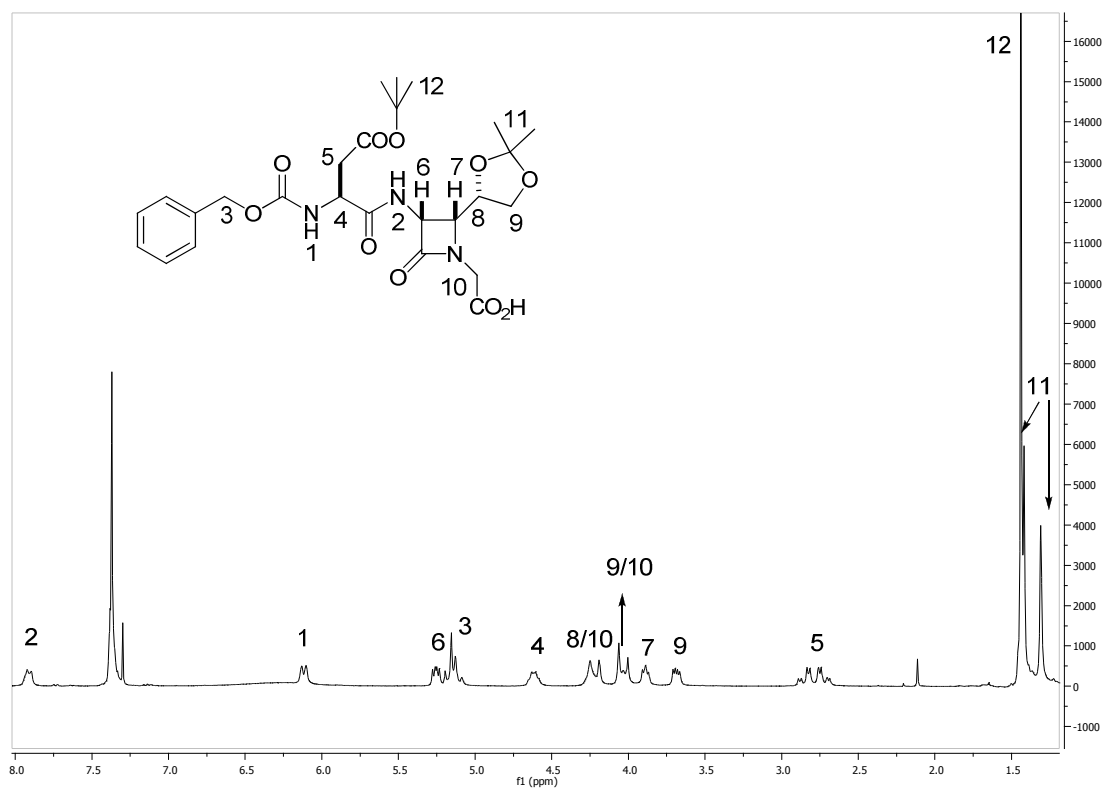


Figura 3.9. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 25a en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

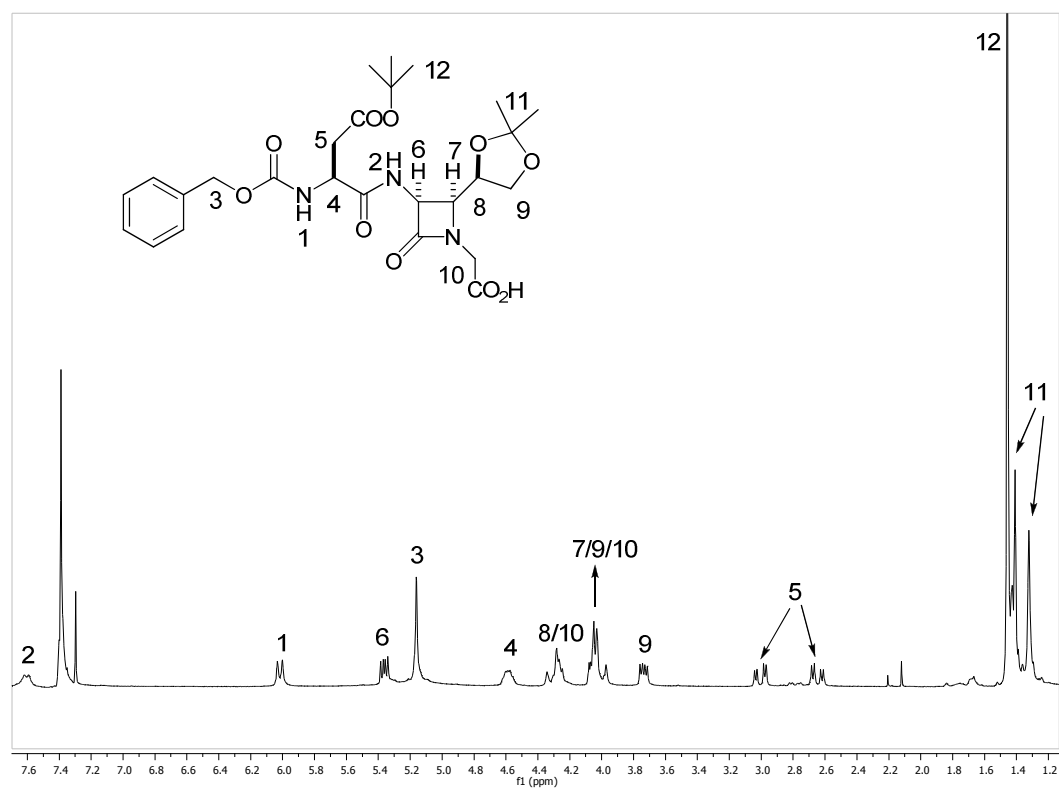


Figura 3.10. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 25c en  $\text{CDCl}_3$ . Numeración de los protones arbitraria

### 3.4.3. Preparación de los pentapéptidos 26a-d y ciclación de los mismos

Una vez sintetizados los compuestos **25a-d** (Figura 3.11) se procedió a estudiar la síntesis de los diferentes pentapéptidos.

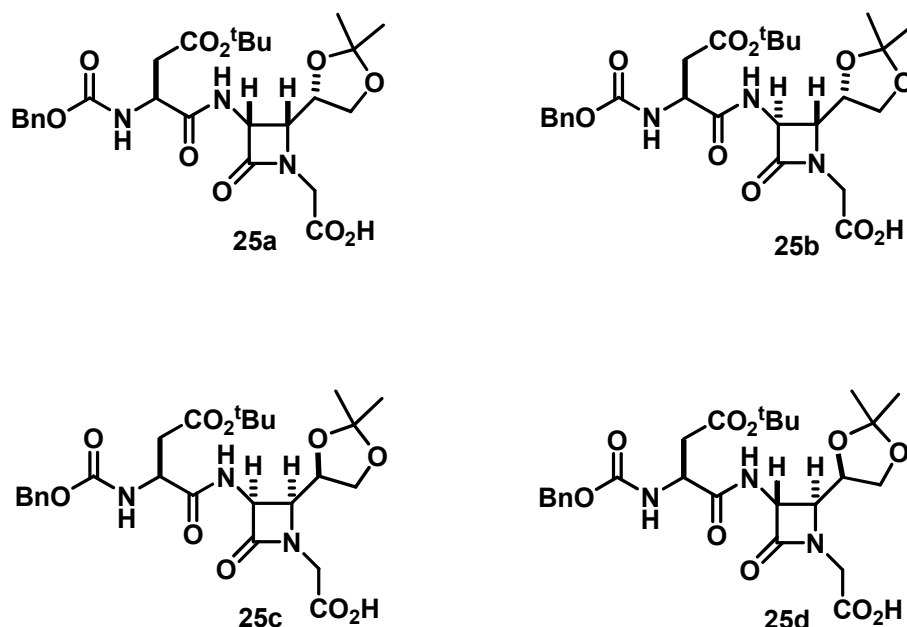
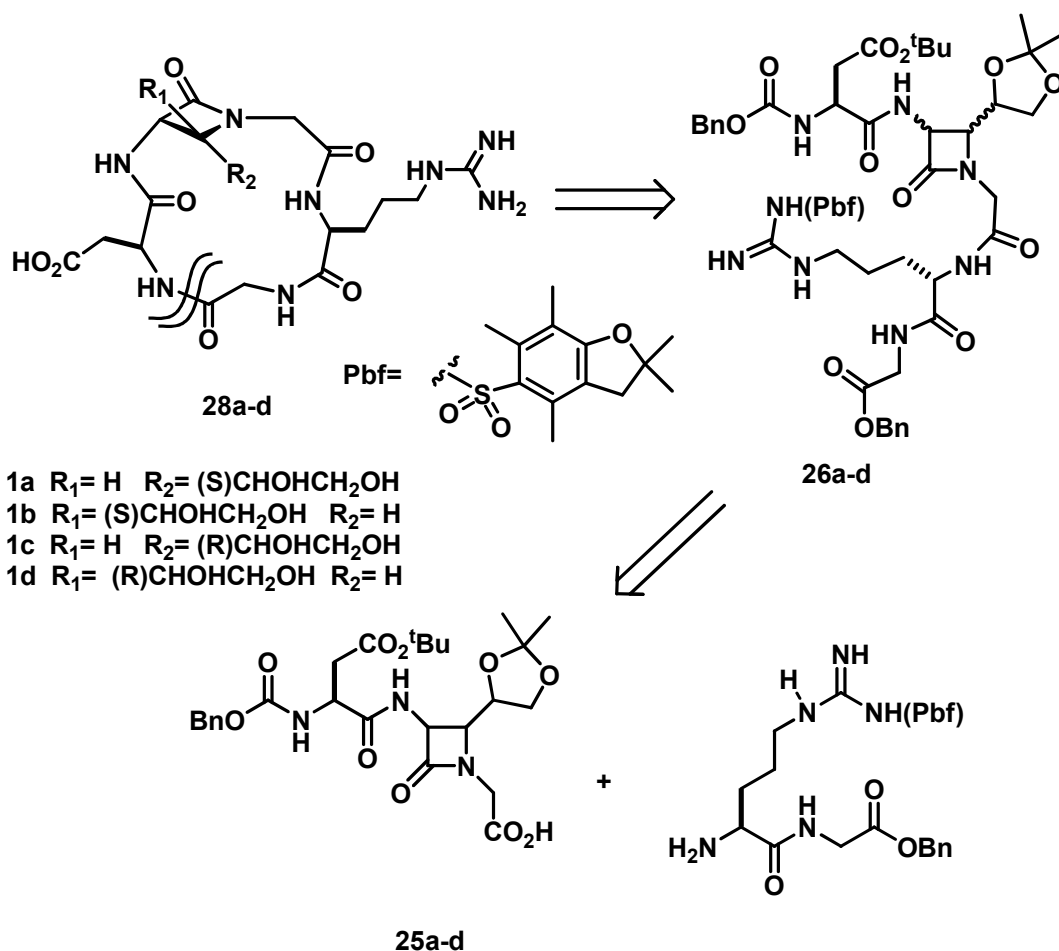


Figura 3.11.

Como se indica en el análisis retrosintético del Esquema 3.30, el acoplamiento de los compuestos **25a-d** con el dipéptido H<sub>2</sub>N-Arg(Pbf)-Gli-OBn nos conduciría a los compuestos **26a-d**, los cuales tras la desprotección de los grupos protectores presentes en los extremos de la cadena, nos permitiría efectuar una ciclación intramolecular para dar los ciclopentapéptidos correspondientes. Por último, la desprotección simultánea de los diferentes grupos protectores en medio ácido nos conduciría a la obtención de las cuatro sales objetivo **28a-d**.

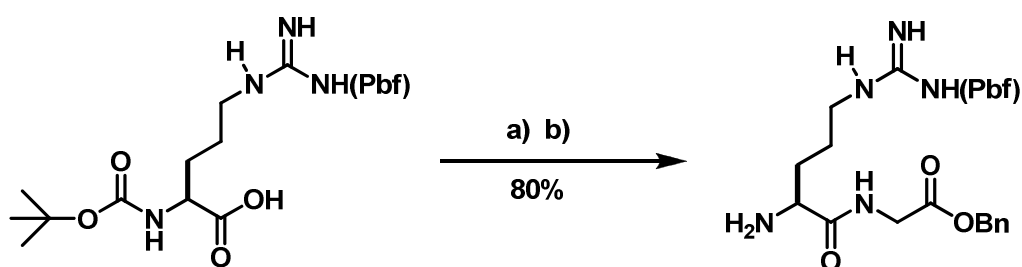




Esquema 3.30. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos **28a-d**

En primer lugar, se procedió a la síntesis del dipéptido  $H_2N$ -Arg(Pbf)-Gli-OBn, por acoplamiento entre la Boc-arginina y el glicinato de bencilo mediante los reactivos de acoplamiento HOBt y EDC·HCl. El péptido intermedio Boc-Arg(Pbf)-Gli-OBn se purificó por cromatografía en columna y se aisló con un rendimiento del 90%. Seguidamente, se desprotegió quimiosselectivamente el grupo Boc de la arginina con ácido fórmico<sup>83</sup>, a temperatura ambiente, obteniendo el dipéptido  $H_2N$ -Arg(Pbf)-Gli-OBn con un rendimiento global del 80% (Esquema 3.31).

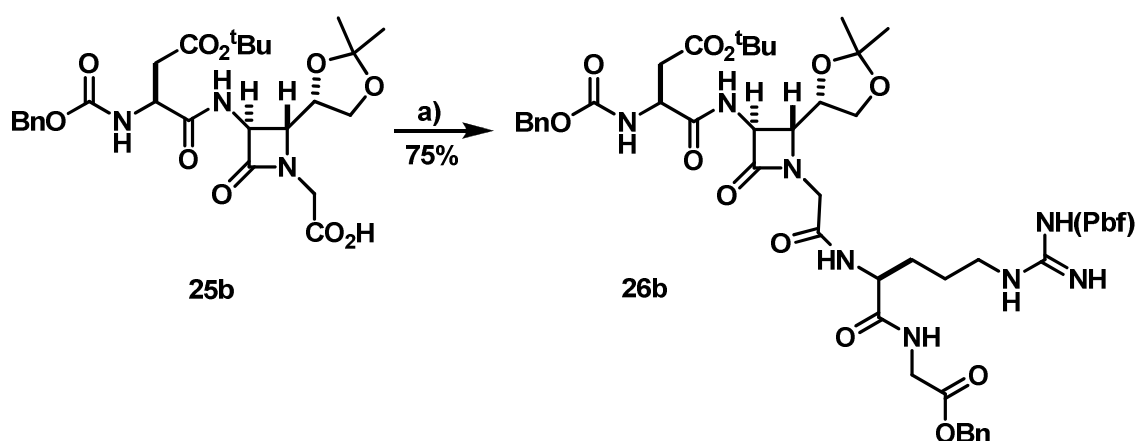
<sup>83</sup> I. Loinaz, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Estudio de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", **2004**. pág 272.



Esquema 3.31. a) H-Gli-OBn, HOBt, EDC-HCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C→t.a. 16h. b) HCO<sub>2</sub>H, t.a. 1.5h

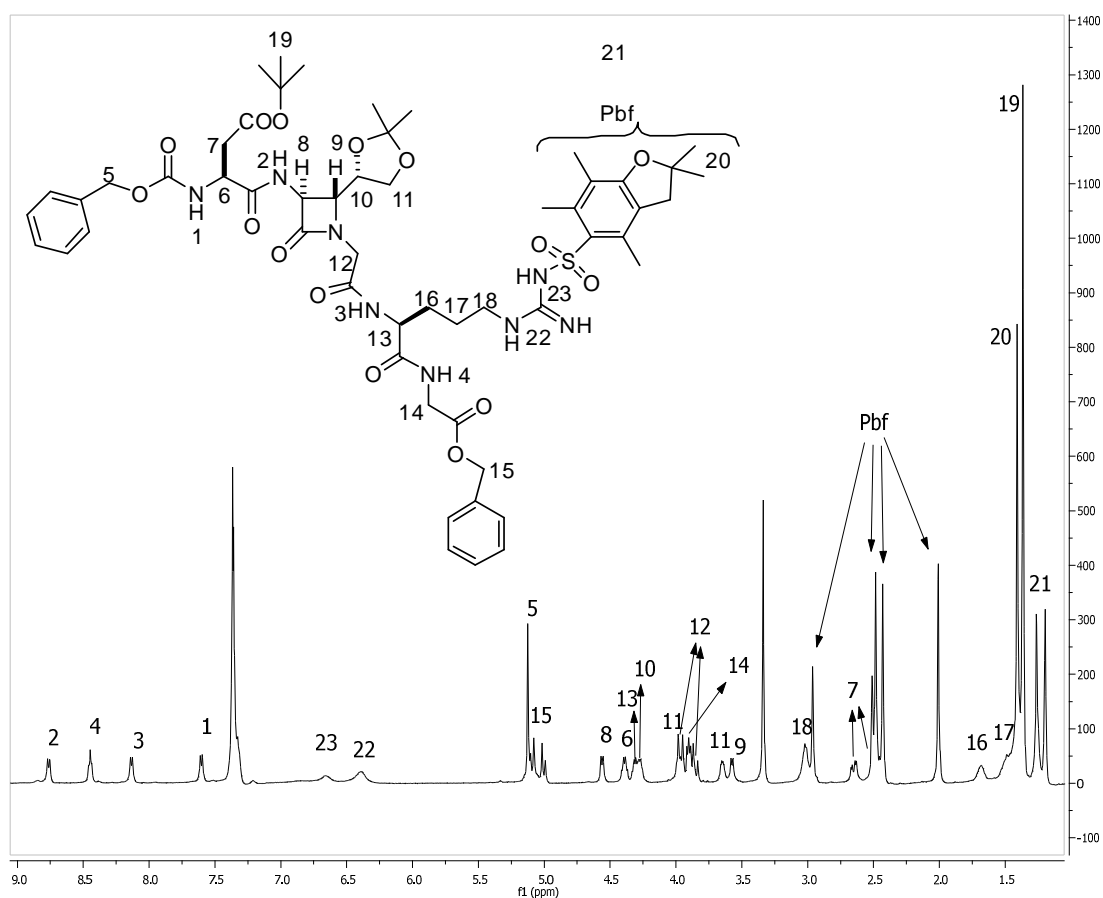
Tras obtener el dipéptido Arg(Pbf)GliOBn, y con el fin de continuar con el orden establecido en esta Tesis en referencia a la síntesis de cis y trans β-lactamas, se procedió primero a acoplar el dipéptido Arg(Pbf)GliOBn a las trans β-lactamas **25b** y **25d** y posteriormente a las cis β-lactamas **25a** y **25c**.

Así, el compuesto **25b** se acopló al dipéptido Arg(Pbf)GliOBn utilizando los reactivos de acoplamiento EDC-HCl, HOBt, en presencia de trietilamina como base y en diclorometano siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de baja presión con gel de sílice, obteniéndose un rendimiento del 75% para el compuesto **26b** (Esquema 3.32).



Esquema 3.32. Acoplamiento peptídico para la formación del compuesto **26b**.  
a) Arg(Pbf)GliOBn, HOBt, EDC-HCl, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C→t.a

La designación estructural del compuesto **26b** se efectuó por <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.12) con la ayuda de un experimento COSY (Figura 3.13 y 3.14).



**Figura 3.12. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 26b en DMSO. Numeración de los protones arbitraria**

La asignación de los protones identificados con el número 12 (Figura 3.10) fue relativamente sencilla, ya que eran los únicos que presentaban un doblete que carecía de señal de cruce con los protones de amida. Los demás protones fueron asignados a partir de los protones de amida de los diferentes residuos. La asignación del  $\text{H}\alpha$ (6) del aspártico, se realiza mediante doble señal de cruce de COSY: la del protón amida y la de los  $\text{H}\beta$  del aspártico(7), que presentan un doblete característico hacia 2.7 y 2.5 ppm.

Para asignar los protones de la arginina, se siguieron los mismos pasos que en el caso del aspártico, a partir del protón de amida de la arginina (3) se asignó el  $\text{H}\alpha$  (13) y a partir de ahí siguiendo las señales de cruce se obtuvieron los demás protones de la cadena de la arginina.

Para los protones de la  $\beta$ -lactama, se siguió el mismo procedimiento y se asignaron los protones identificados como 8, 9, 10 y 11 (ver COSY, Figuras 3.11 y 3.12)

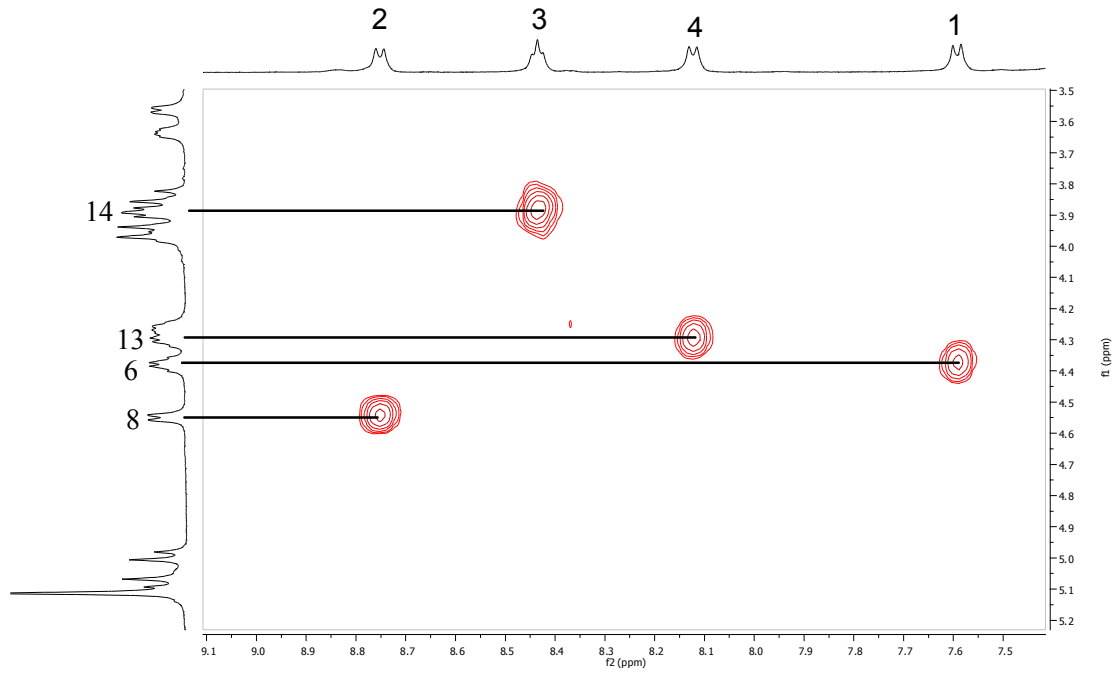


Figura 3.13. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 26b, protones ácidos

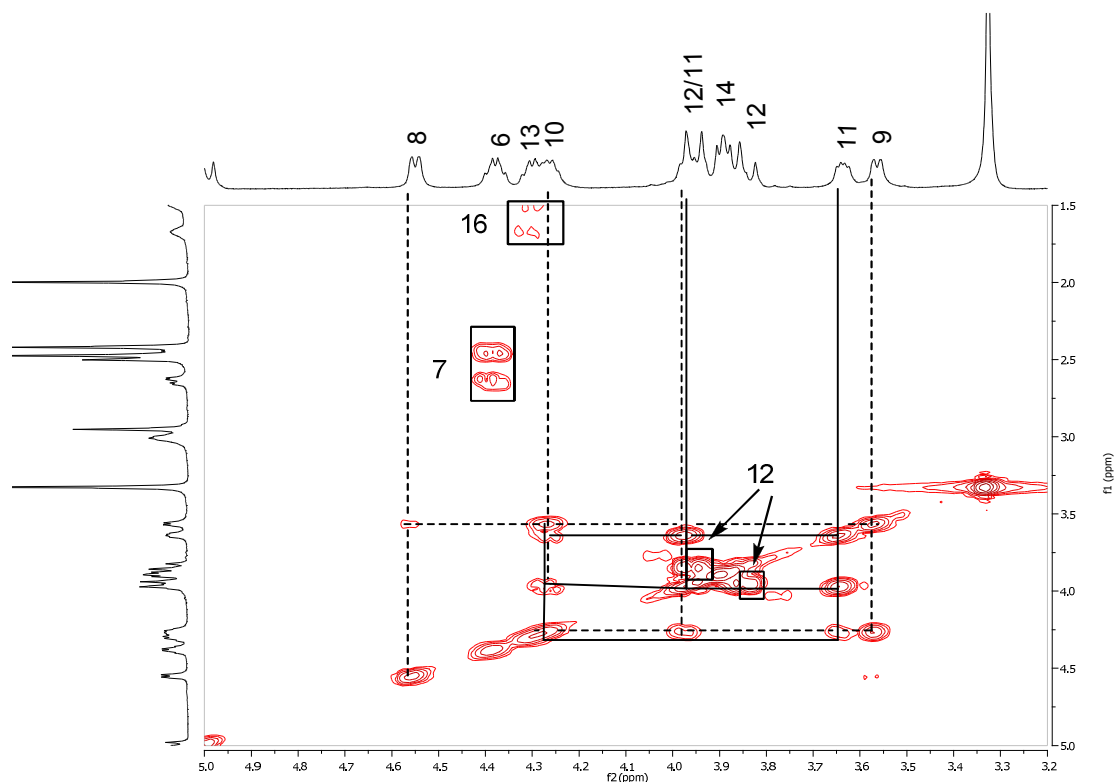
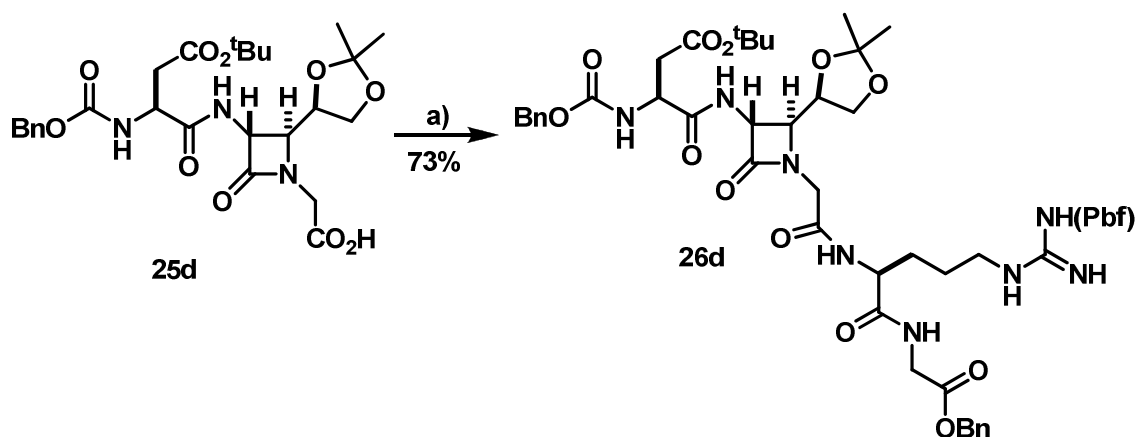


Figura 3.14. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **26b**, región central

El compuesto **25d** se acopló con la Arg(Pbf)GliOBn bajo las mismas condiciones de reacción determinadas para el compuesto **26b**, dando lugar a **26d** (Esquema 3.33) con un rendimiento del 73% después de cromatografía en columna.



Esquema 3.33. Acoplamiento peptídico para la formación del compuesto **26d**. a) Arg(Pbf)GliOBn, HOBt, EDC-HCl, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a

En la Figura 3.15 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y en las Figuras 3.16 y 3.17 se muestran los experimentos de COSY para el compuesto **26d**.

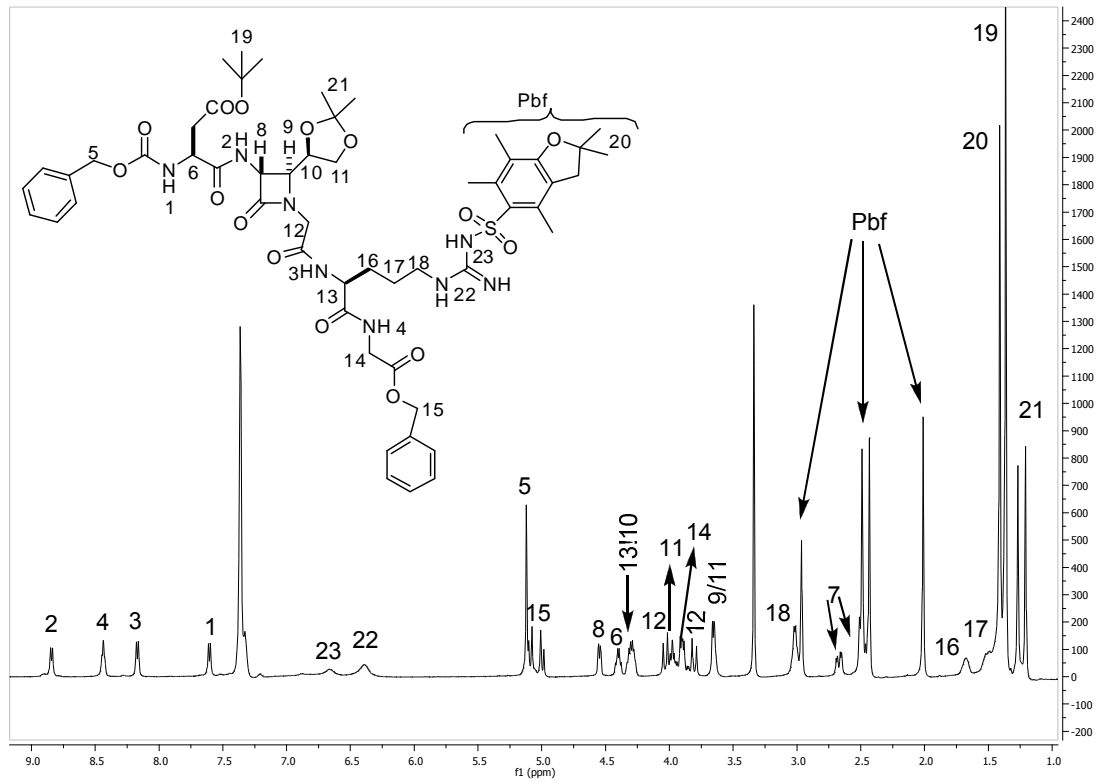


Figura 3.15. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **26d** en DMSO. Numeración de los protones arbitraria

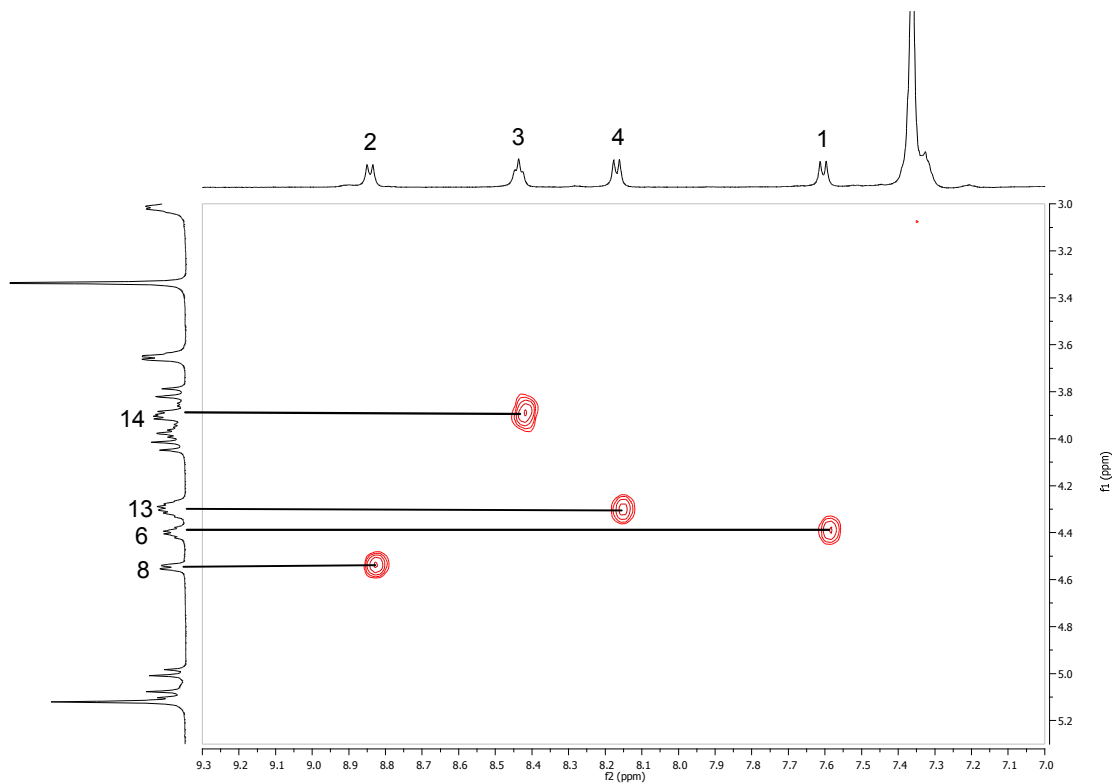


Figura 3.16. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **26d**, protones amídicos.

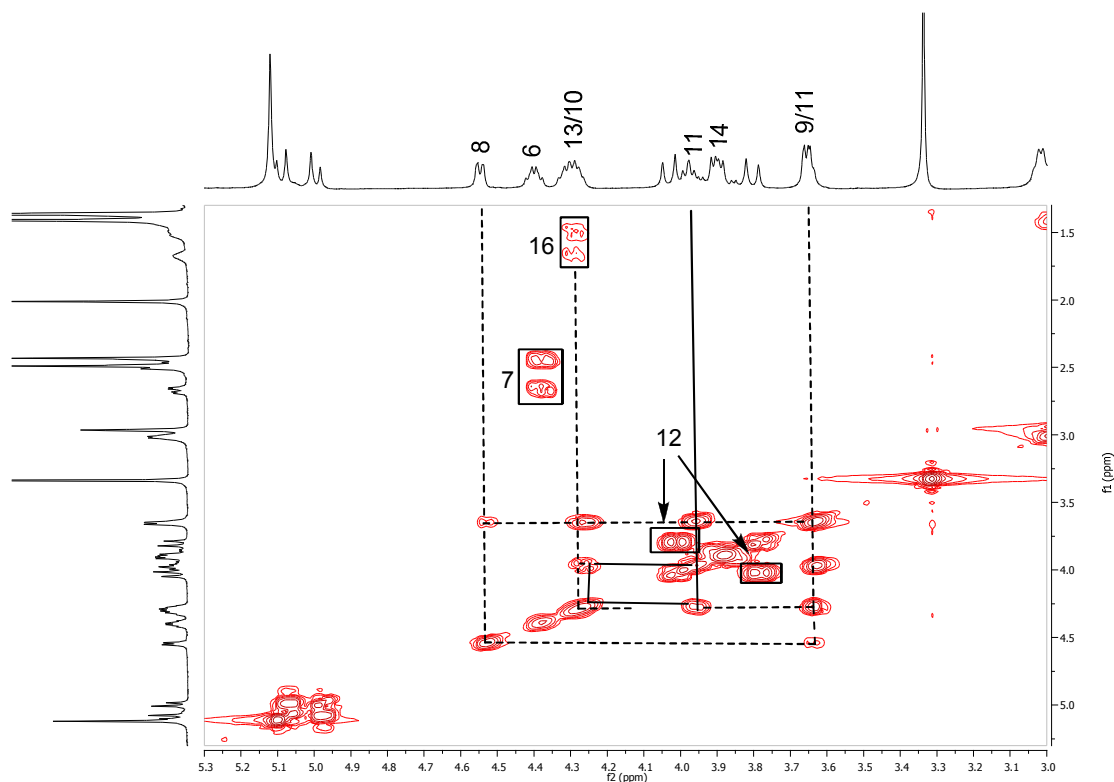
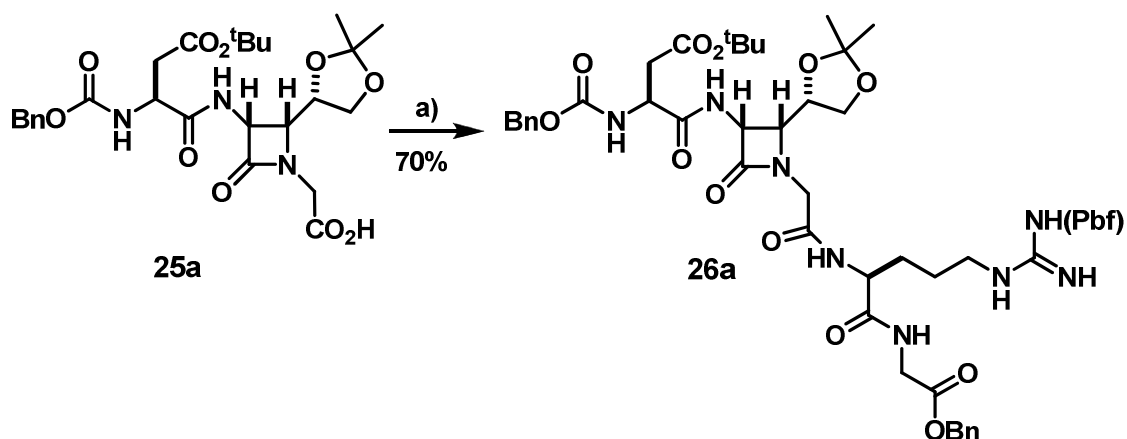


Figura 3.17. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **26d**, región central

Como se puede apreciar los dos espectros de protón (**26b** y **26d**) (Figuras 3.12 y 3.15) son muy similares entre sí, pero presentan algunas diferencias significativas. Así, por ejemplo, en el espectro del compuesto **26d** las señales de los protones 11 y 9 aparecen solapadas mientras que en el espectro del compuesto **26b** se aprecia la multiplicidad de cada señal. Además los protones presentes entre 3.7 y 4.1 ppm están mejor definidos en el espectro de **26d** que en el espectro de **26b**.

Tras la obtención y caracterización de los compuestos **26b** y **26d** que contienen una trans  $\beta$ -lactama, procedimos a preparar los compuestos **26a** y **26c** que contienen una cis  $\beta$ -lactama. Para tal fin, el procedimiento descrito anteriormente fue aplicado al compuesto **25a**, obteniendo el compuesto **26a** con un rendimiento del 70% tras purificación por columna cromatográfica (Esquema 3.34).



Esquema 3.34. Acoplamiento peptídico para la formación del compuesto 26a. a) Arg(Pbf)GliOBn, HOBT, EDC-HCl, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a

En la Figura 3.18 se muestra el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 26a y en las Figuras 3.19 y 3.20 se muestran los experimentos de COSY.

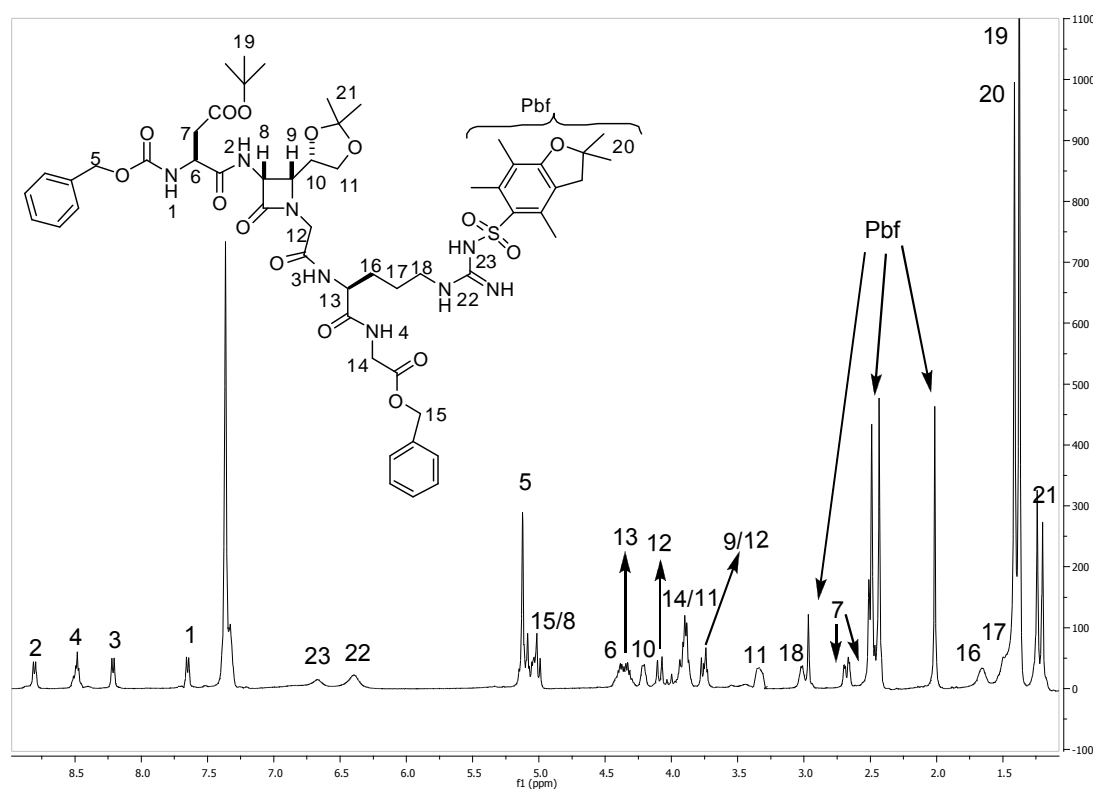


Figura 3.18. Espectro <sup>1</sup>H-RMN (500MHz) del compuesto 26a en DMSO. Numeración de los protones arbitraria



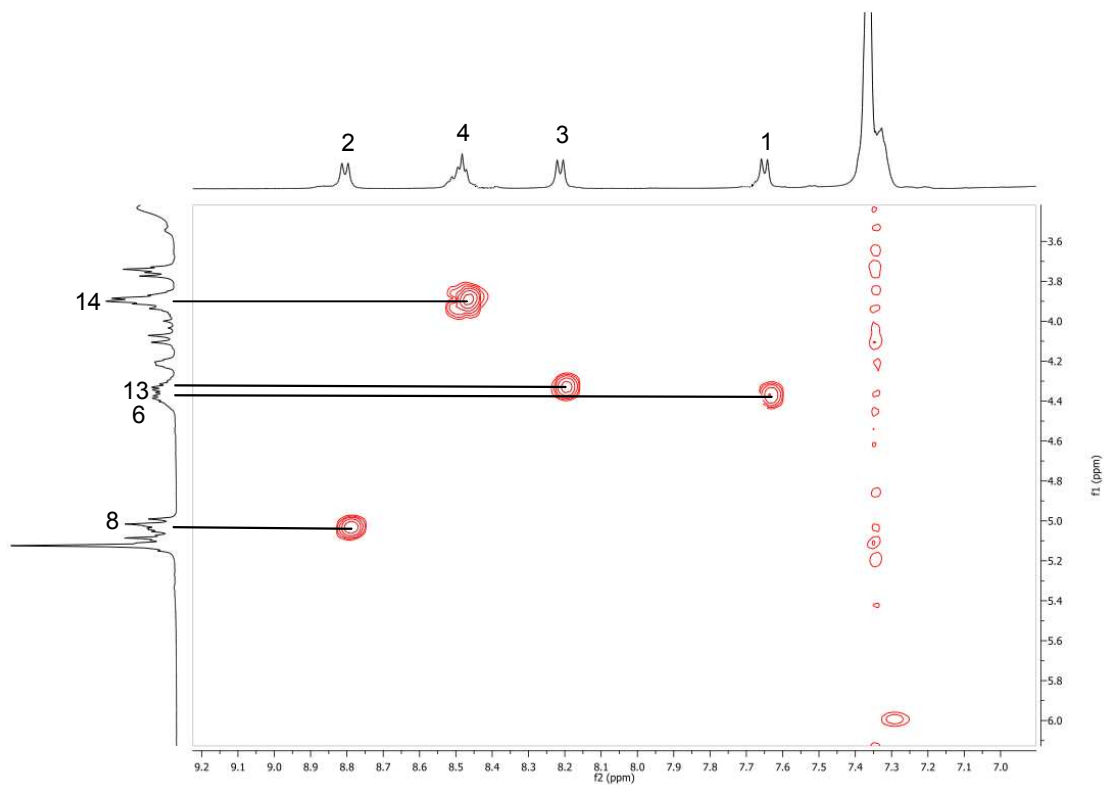


Figura 3.19. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 26a, protones amídicos

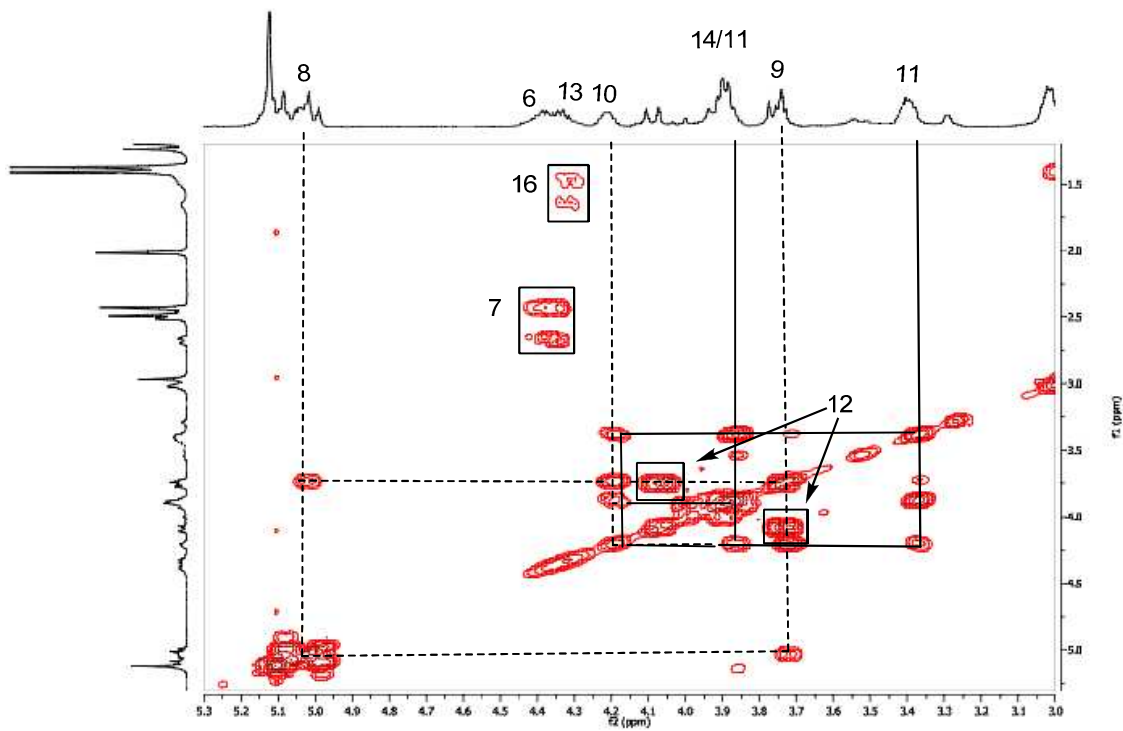


Figura 3.20. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 26a, región central



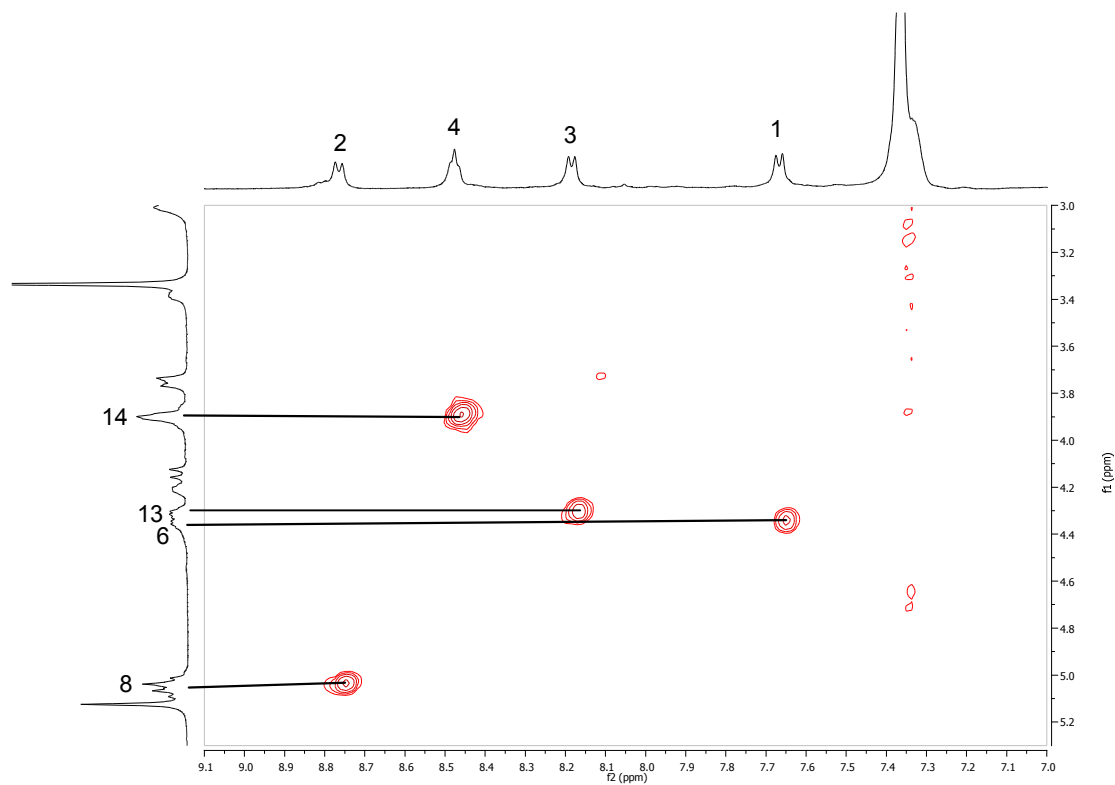


Figura 3.22. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 26c, protones amídicos

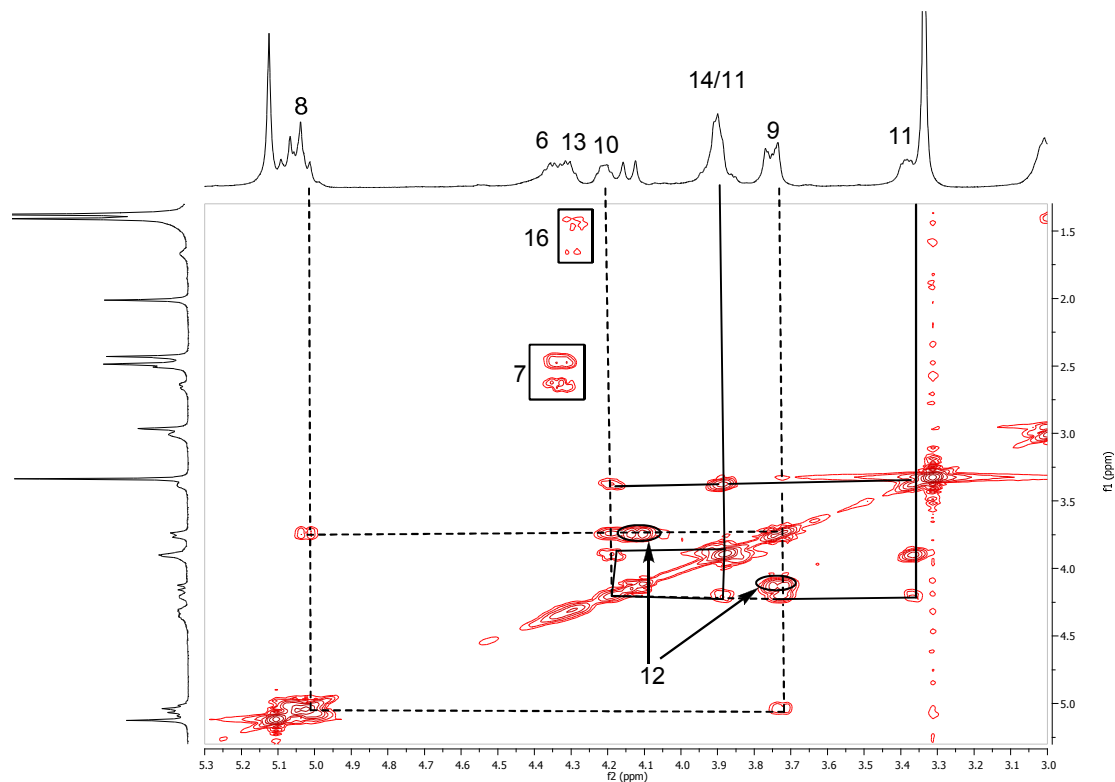


Figura 3.23. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 26c, región central

Analizando los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos que contienen una *cis*  $\beta$ -lactama (compuestos **26a** y **26c**, Figuras 3.18 y 3.21) y comparándolos con los que incluyen una *trans*  $\beta$ -lactama (compuestos **26b** y **26d**, Figuras 3.12 y 3.15) encontramos algunas diferencias. Por ejemplo el protón numerado como 8 aparece más desapantallado en las estructuras que tienen una configuración *cis*, hacia 5 ppm, mientras que en las estructuras que poseen una  $\beta$ -lactama de configuración *trans* aparece hacia 4.5 ppm.

Una vez obtenidos los precursores lineales **26a-d**, se desprotegieron sus extremos amino y carboxilo mediante hidrogenólisis catalizada por paladio/carbono, obteniéndose de forma prácticamente cuantitativa los pseudopéptidos lineales. Tras comprobar por RMN la desaparición de las señales de los grupos protectores Cbz y bencilo, los crudos de reacción se emplearon en la siguiente etapa de ciclación sin ser sometidos a una purificación adicional (Esquema 3.36).

En nuestro laboratorio se encontró<sup>84</sup> que la inserción de un puente metileno entre el  $\text{C}\alpha(i+1)$  y el  $\text{N}(i+2)$  de una cadena peptídica provoca en el mimético resultante una fuerte conformación betagirada tipo  $\beta$ -II o  $\beta$ -II', según la configuración del estereocentro  $\alpha$ . Consecuentemente la inserción de una  $\beta$ -lactama en un pentapéptido acíclico debería provocar el acercamiento de las cadenas laterales facilitando así la ciclación intramolecular (Figura 3.24)

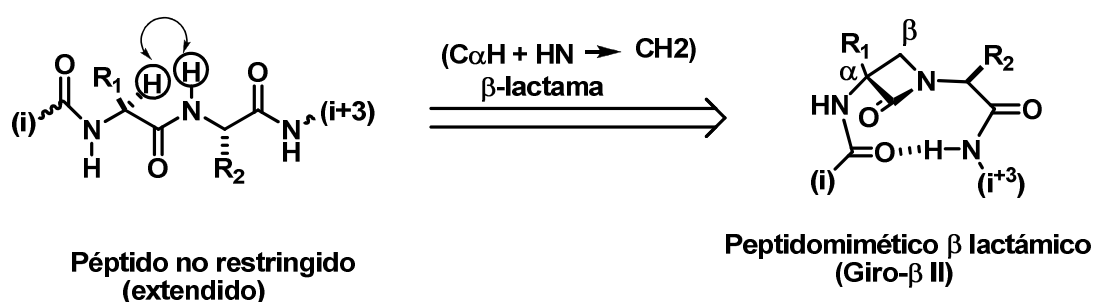
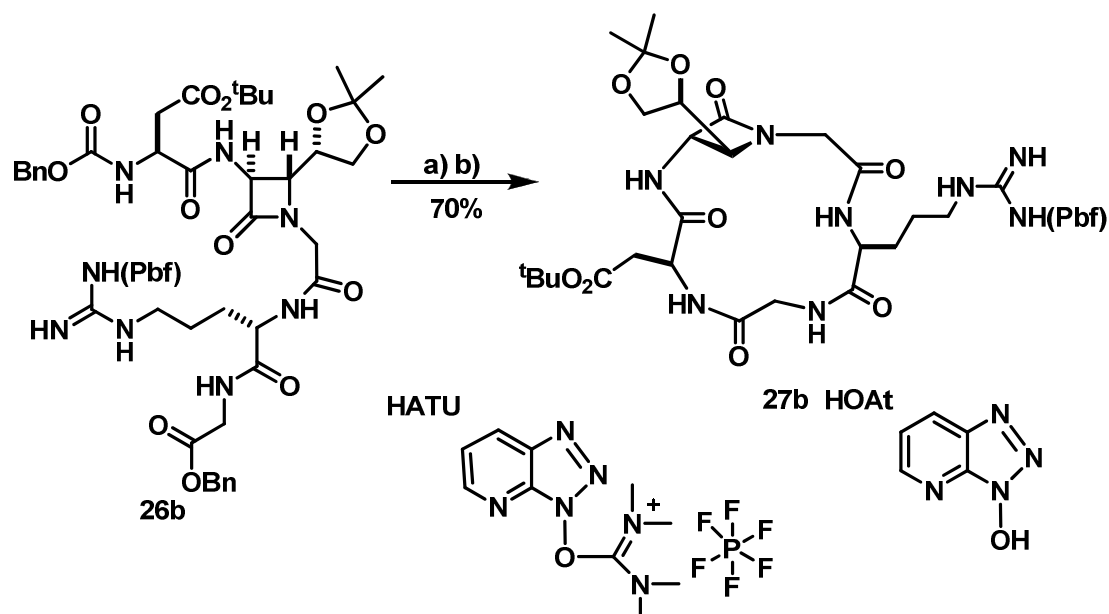


Figura 3.24. Peptidomimético  $\beta$ -lactámico beta girado.

<sup>84</sup> Ana Benito, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Nuevos peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos: diseño, síntesis y análisis estructural" 2003.



Esquema 3.36. Desprotección y ciclación del compuesto **27b**. a) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 16h. b) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -10°C, 24h.

La ciclación se llevó a cabo a -10 °C y a alta dilución (4mM) durante 24h, utilizando hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,NN',N'-tetrametiluronio (HATU) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) como reactivos de acoplamiento, bicarbonato potásico anhidro como base y DMF como disolvente. De esta forma se obtuvo un crudo que se purificó por cromatografía de columna obteniéndose el compuesto **27b** con un rendimiento del 70%.

La asignación estructural de **27b** se efectuó como en los casos anteriores por <sup>1</sup>H-RMN. La integridad de la estructura se comprobó mediante la asignación de las cuatro señales (1, 2, 3, 4) de los protones de amida tras llevar a cabo la ciclación. En la Figura 3.25 se puede observar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN y en las Figuras 3.26 y 3.27 los experimentos de COSY

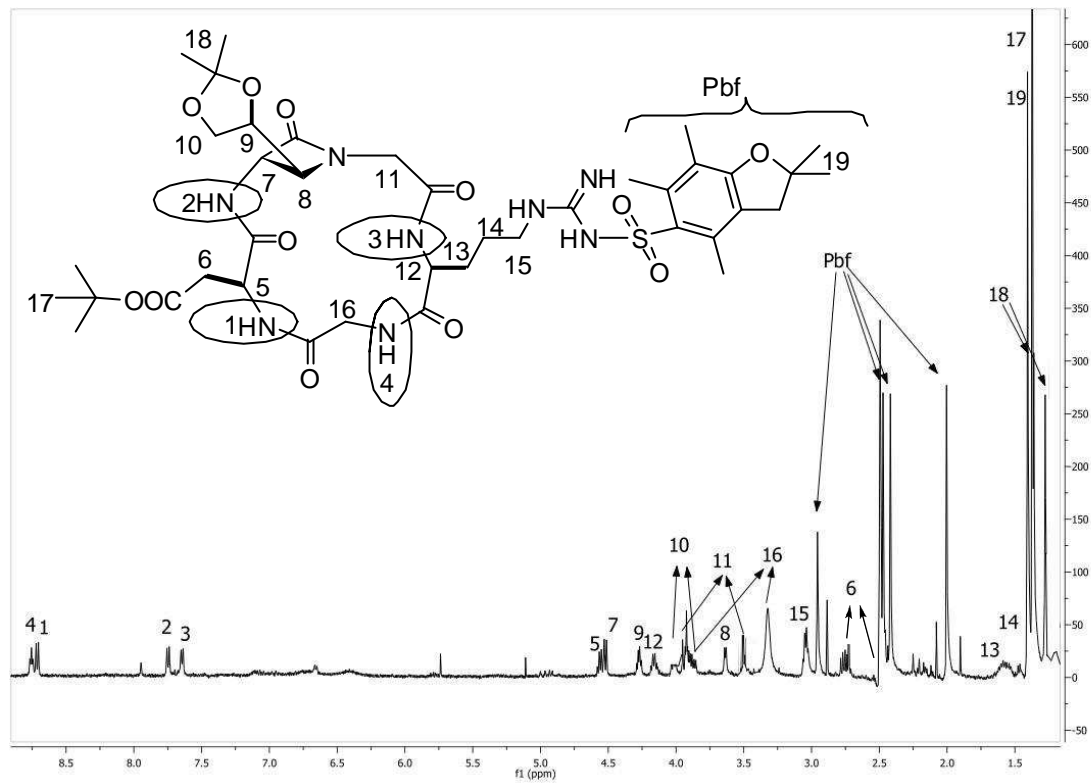


Figura 3.25. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 27b en DMSO. Numeración de los protones arbitraria

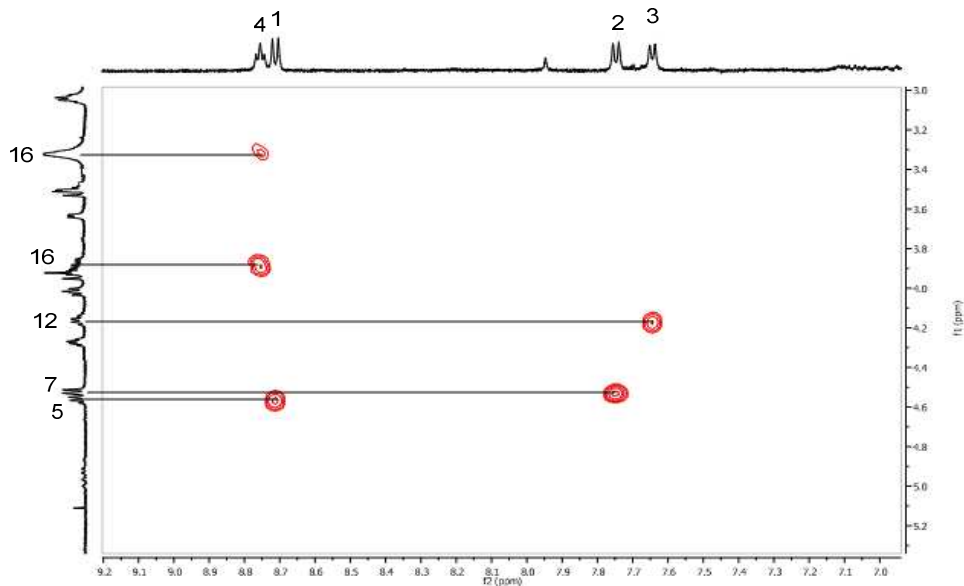


Figura 3.26. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 27b, protones amídicos

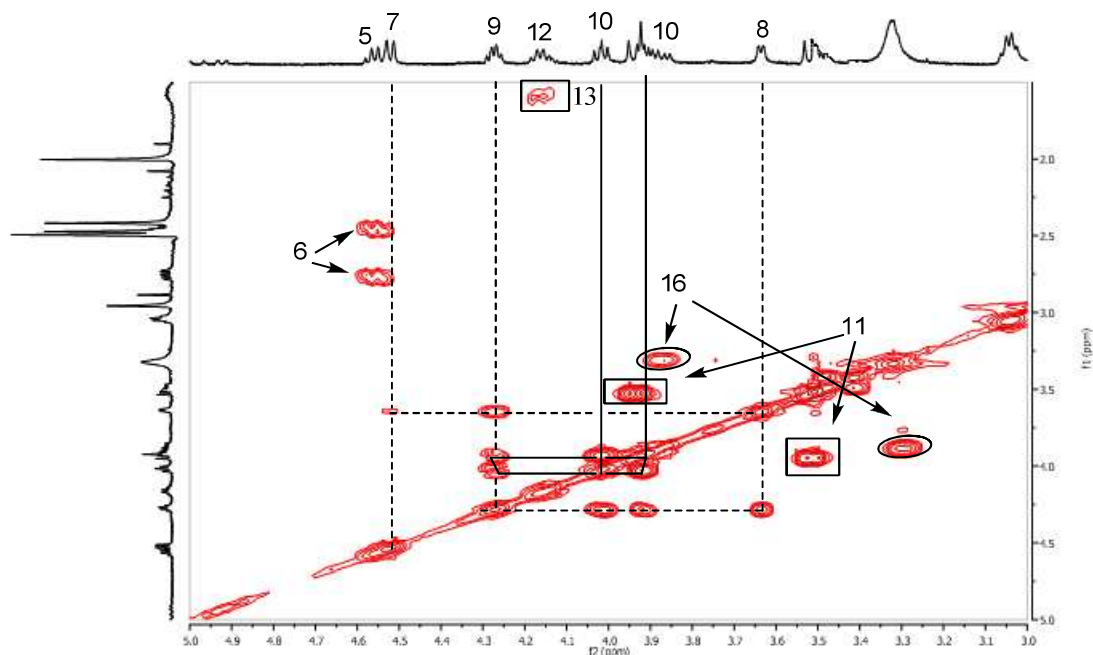
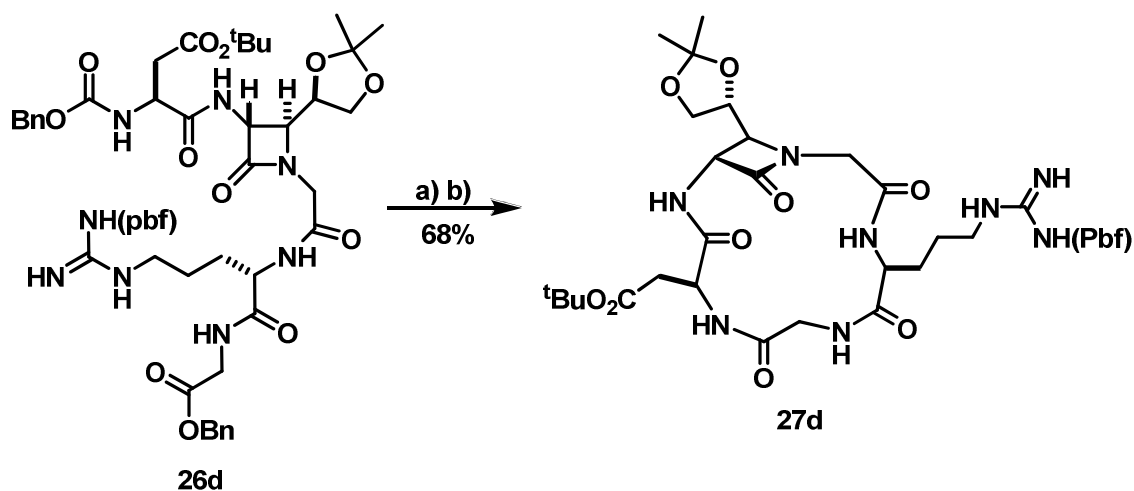


Figura 3.27. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **27b**, región central

Los ciclopéptidos restantes se obtuvieron de forma análoga. Así, se procedió a la desprotección y ciclación del compuesto **26d** bajo las mismas condiciones descritas anteriormente obteniendo el compuesto **27d** con un rendimiento del 68% (Esquema 3.37). Una vez purificado el producto por cromatografía en columna se procedió a la asignación de los diferentes protones mediante experimento COSY.



Esquema 3.37. Desprotección y ciclación del compuesto **27d**. a) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 16h. b) HATU, HOAt, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, -10°C, 24h.

En la Figura 3.28 se presenta el espectro de próton del compuesto **27d** y en las Figuras 3.29 y 3.30 se muestra el experimento de COSY.

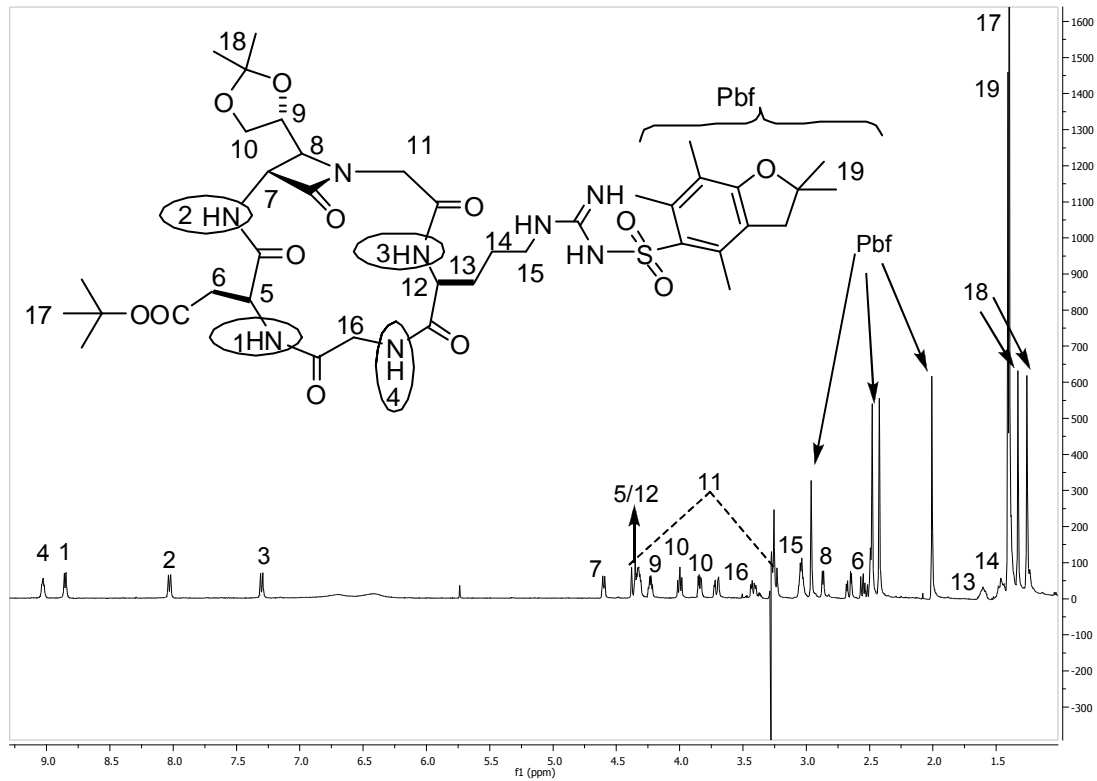


Figura 3.28. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **27d** en DMSO. Numeración de los protones arbitraria

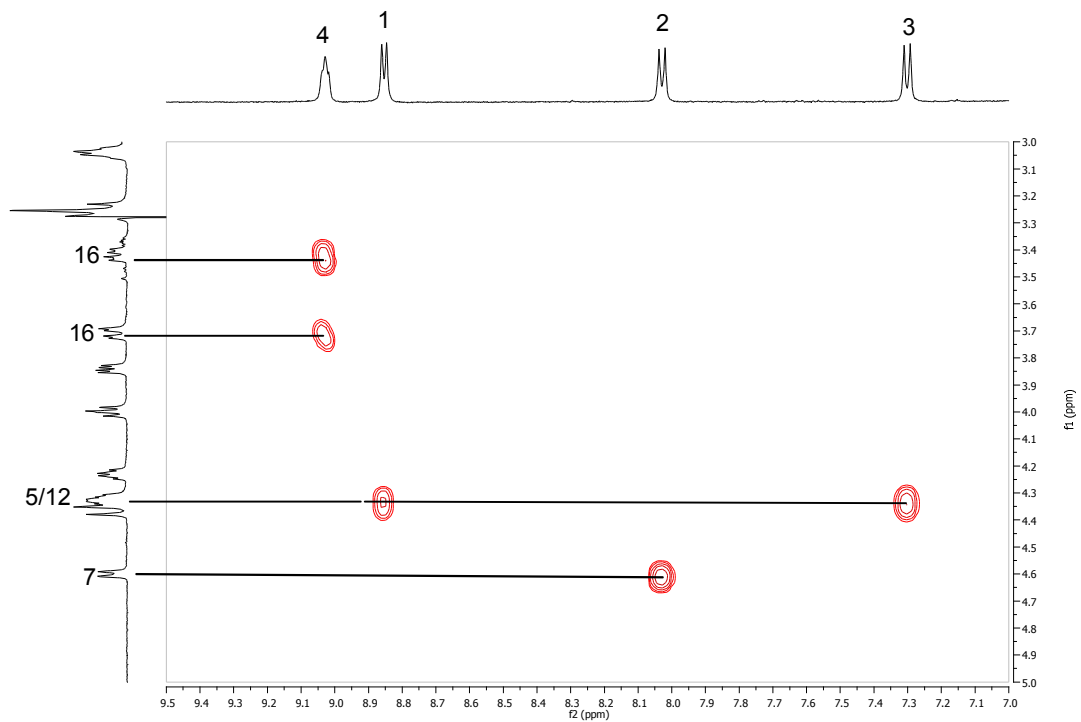


Figura 3.29. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **27d**, protones amídicos



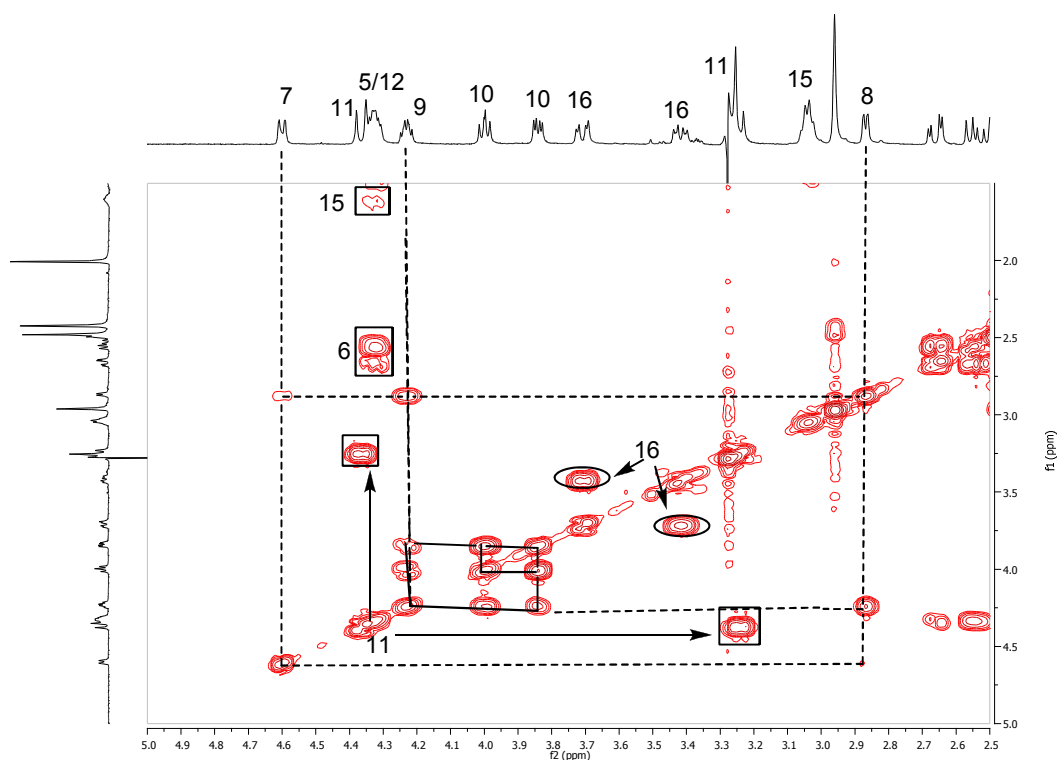
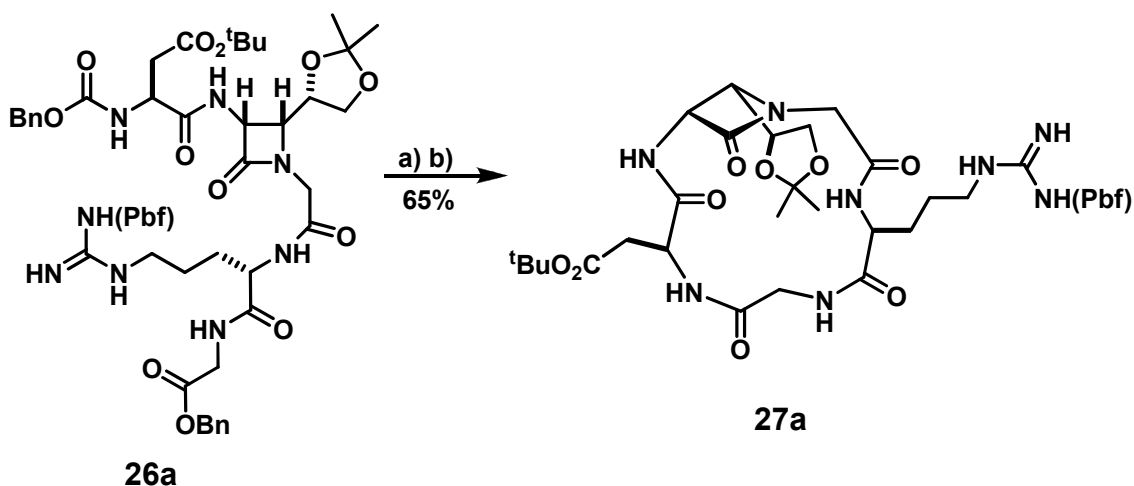


Figura 3.30. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **27d**, región central

Se repitió el proceso con los compuestos **26a** y **26c** con idénticos resultados, obteniéndose los compuestos cíclicos **27a** (Esquema 3.38) y **27c** (Esquema 3.39) con unos rendimientos del 65% y del 63% respectivamente.



Esquema 3.38. Desprotección y ciclación del compuesto **26a** a) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 16h. b) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -10°C, 24h.

En la Figura 3.31 se muestra el experimento de próton para el compuesto **27a** y en las Figuras 3.32 y 3.33 el experimento de COSY.

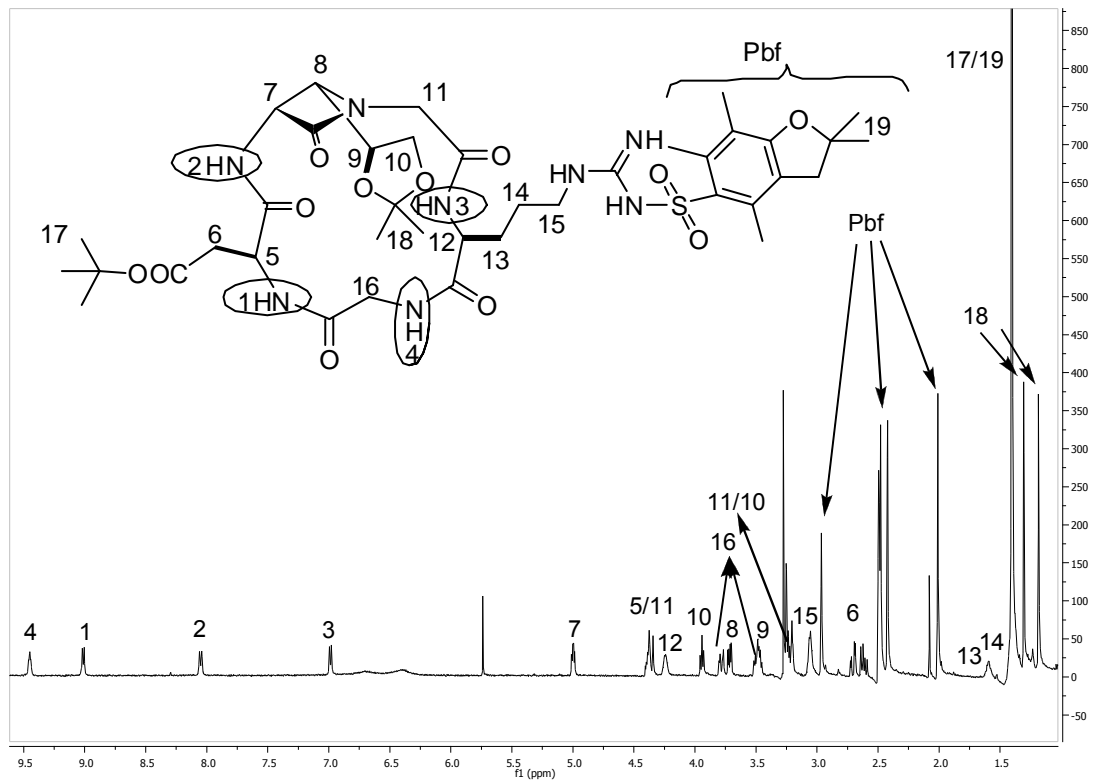


Figura 3.31. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 27a en DMSO. Numeración de los protones arbitraria

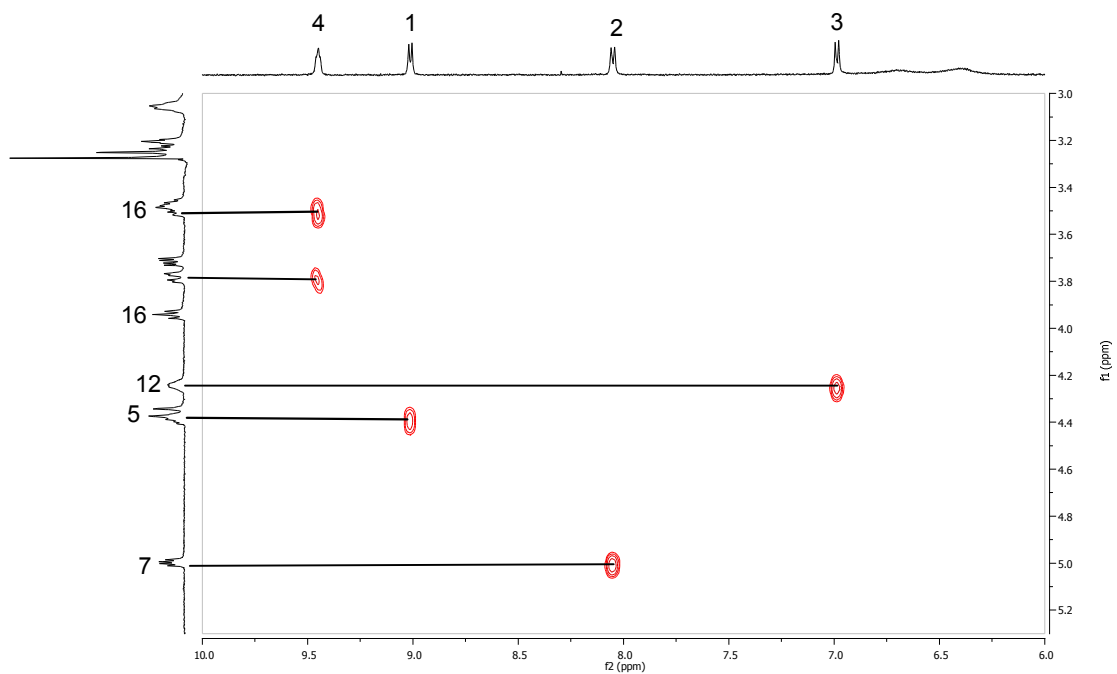


Figura 3.32. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 27a, protones amídicos

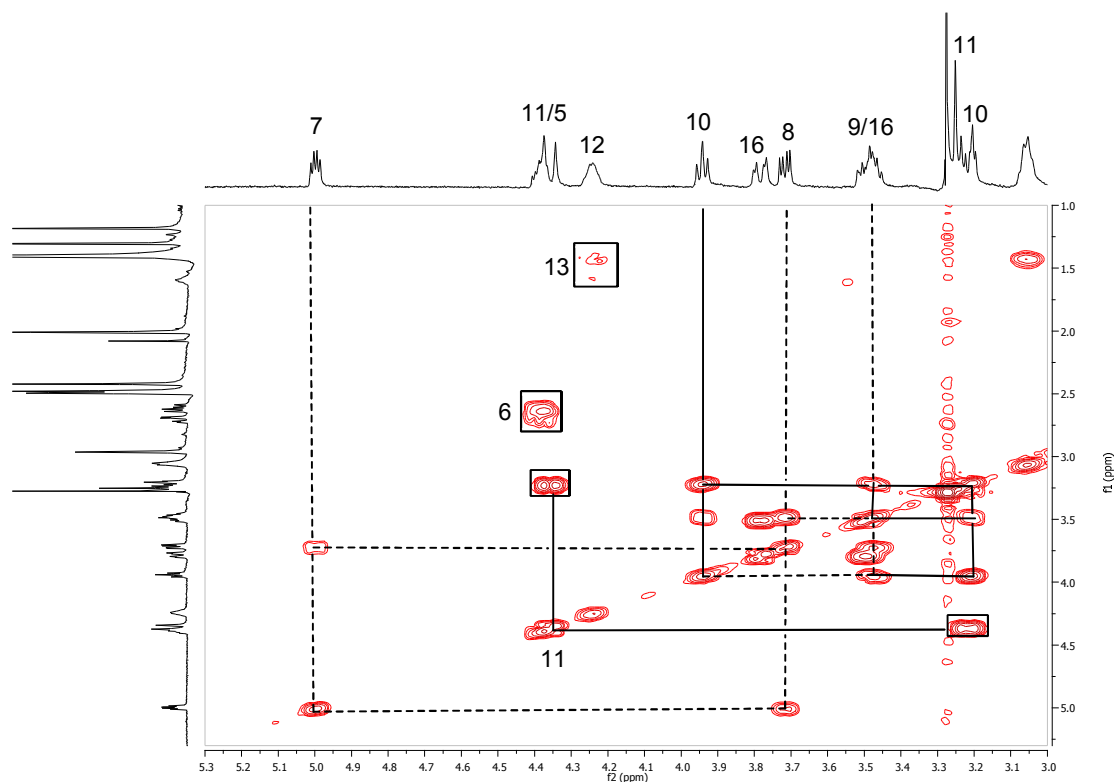
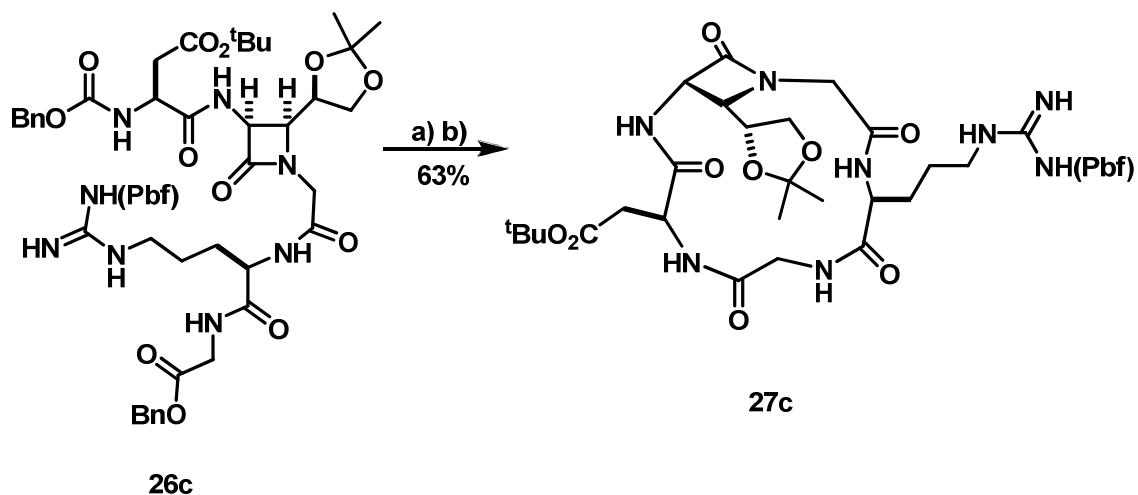


Figura 3.33. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP **27a**, región central



Esquema 3.39. Desprotección y ciclación del compuesto **26c** a) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 16h. b) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -10°C, 24h.

En la Figura 3.34 se muestra el espectro de protón del compuesto **27c** y en las Figuras 3.35 y 3.36 se muestra el experimento de COSY

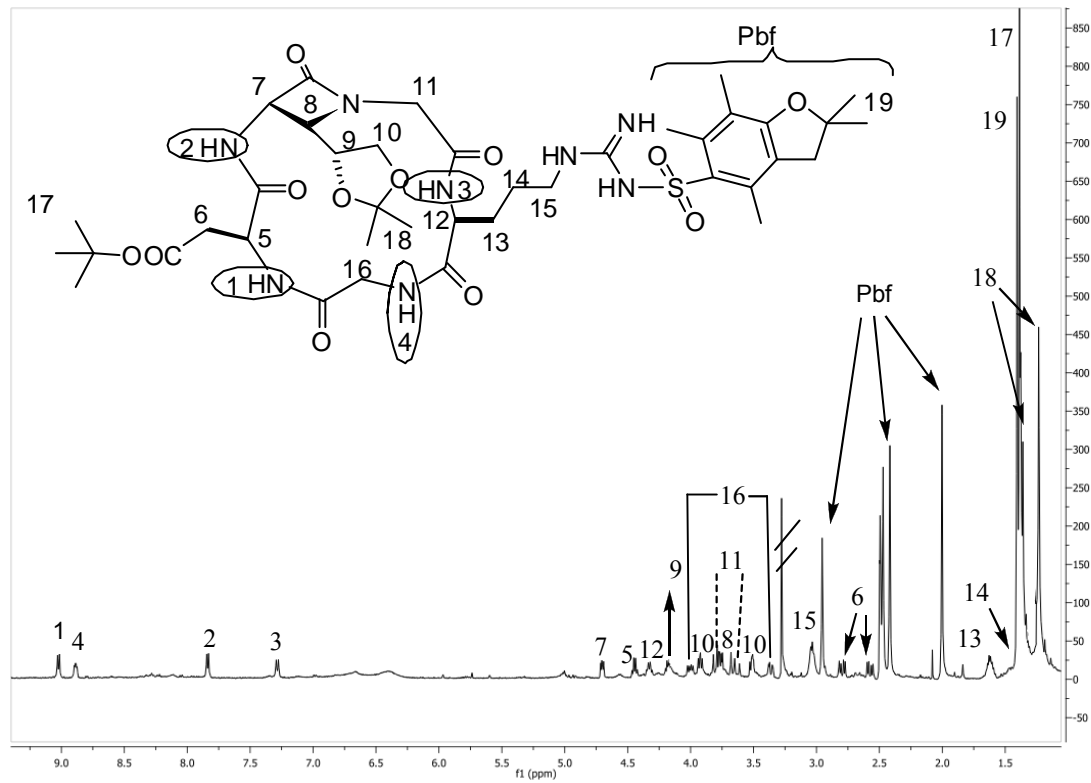


Figura 3.34. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (500MHz) del compuesto 27c en DMSO. Numeración de los protones arbitraria

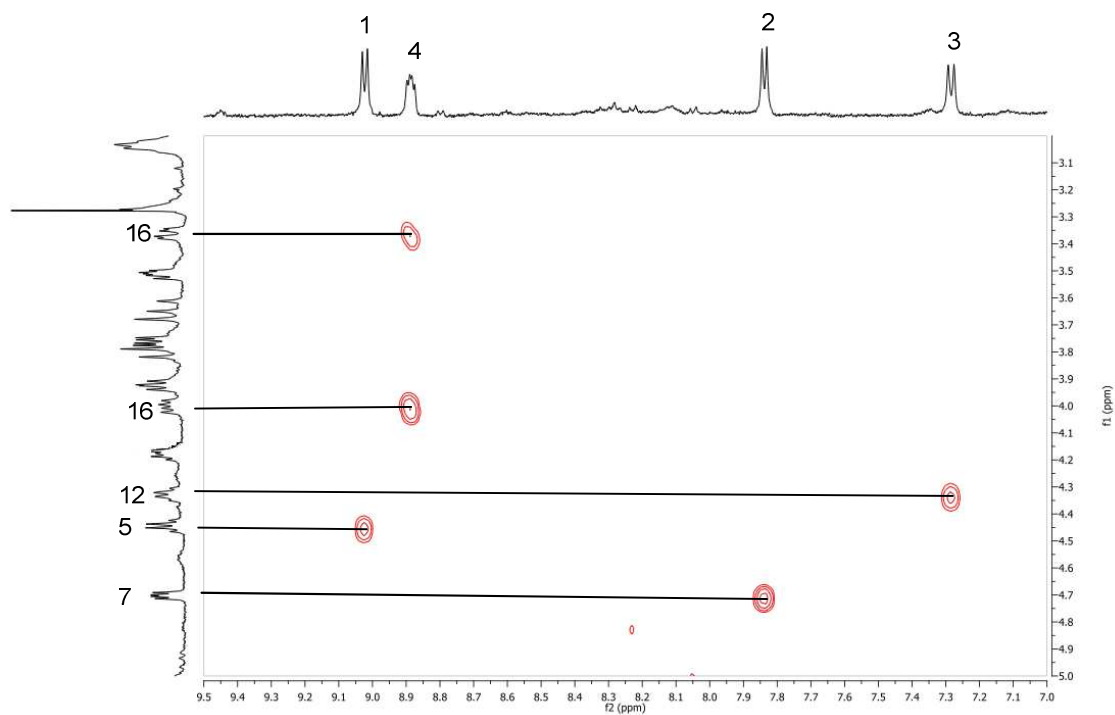


Figura 3.35. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 27c, protones amídicos

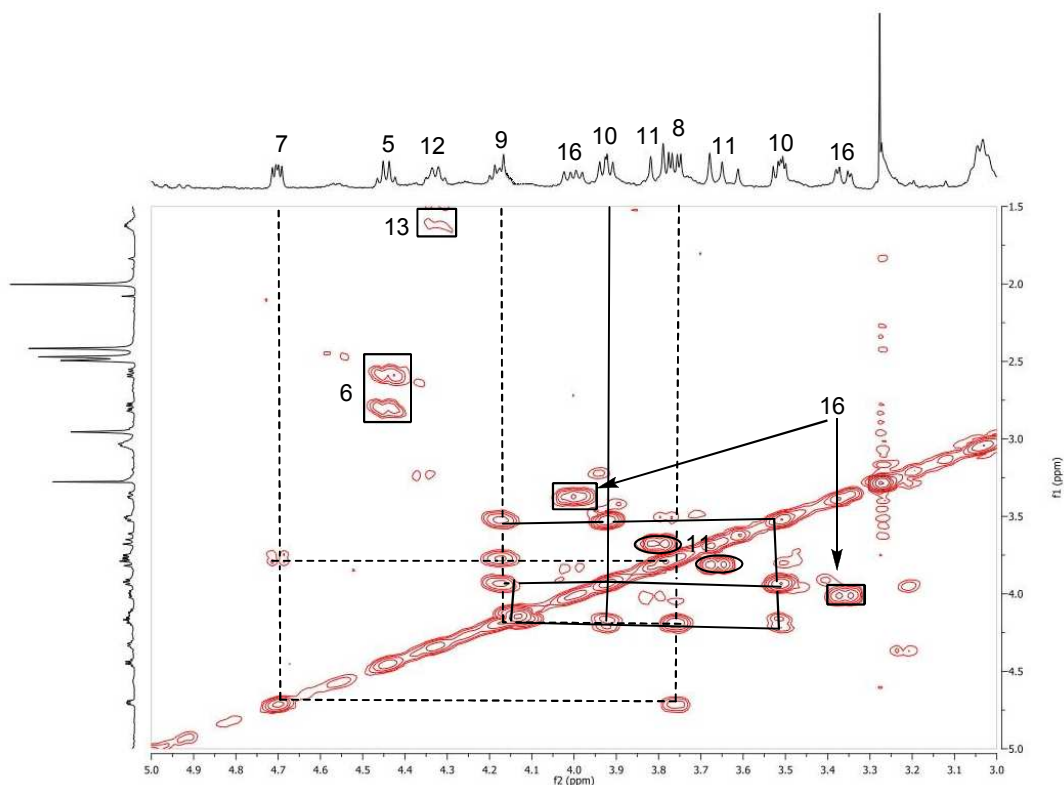
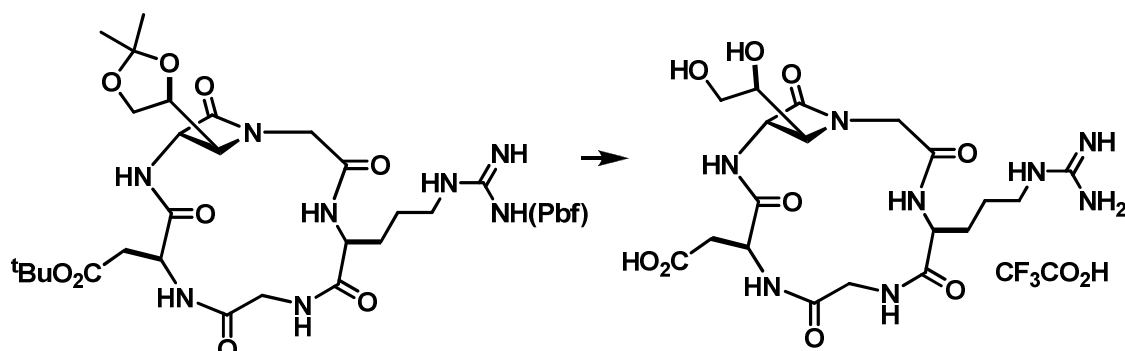


Figura 3.36. Ampliación del espectro COSY en DMSO del CPP 27c, región central

#### 3.4.4. Desprotección final del ciclo

Por último, se procedió a la reacción de desprotección de los grupos guanidino de la arginina y carboxilato del aspártico. En síntesis previas realizadas en el laboratorio<sup>85</sup> se habían conseguido los mejores resultados empleando ácido trifluoroacético concentrado a 35 °C durante 1 hora y haciendo precipitar el producto final con éter diisopropílico, formando la sal trifluoroacética correspondiente (Esquema 3.40).

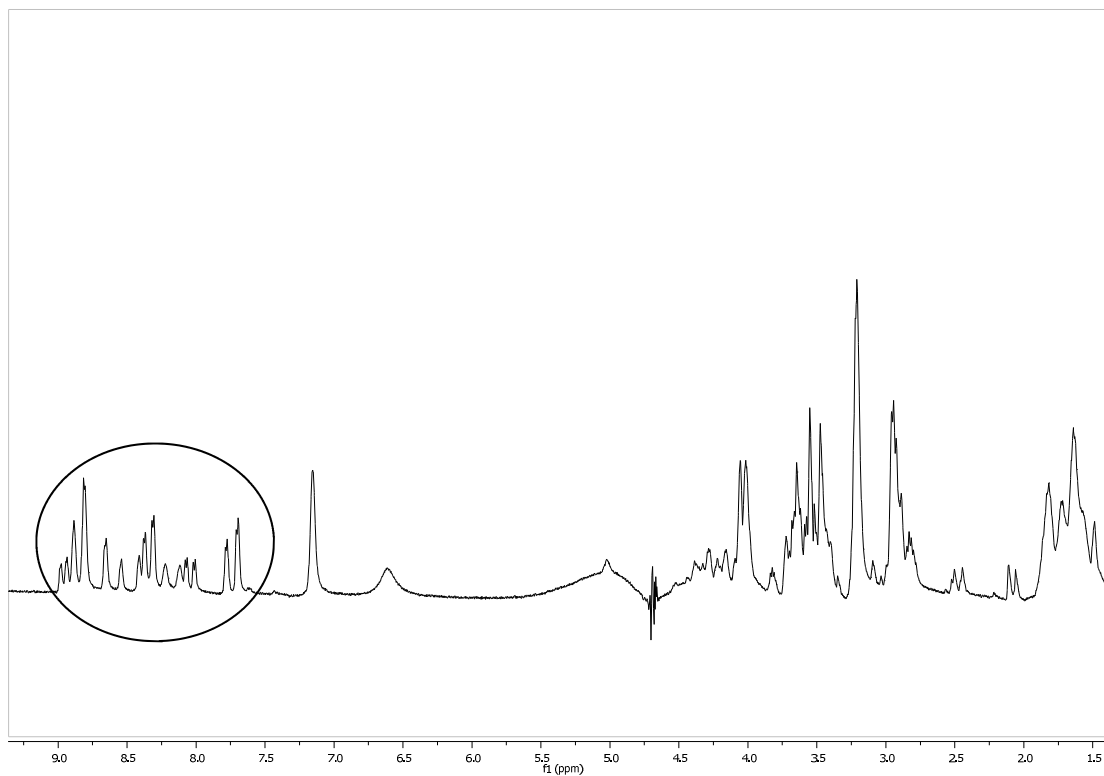
<sup>85</sup> J. Oyarbide, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Diseño, síntesis y estudio conformacional de ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD" **2010**, pág 168.



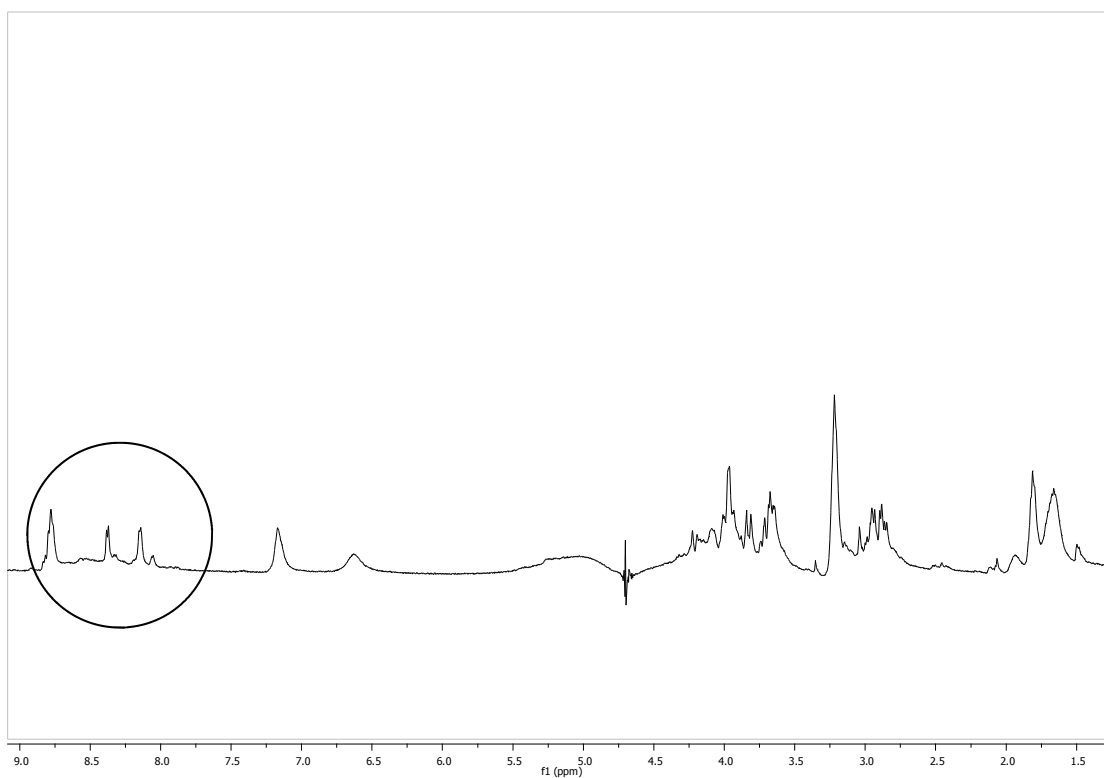
Esquema 3.40. Desprotección final del ciclo. Condiciones generales  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $35^\circ\text{C}$ , 1h, 70%.

Bajo estas condiciones se obtenía un producto que en el espectro de RMN de protón mostraba un desdoblamiento tanto de las señales en los protones amídicos, entre 7 y 9 ppm, como en la zona central del espectro, entre 3 y 5 ppm. (Figuras 3.37-40). Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se adquirieron en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) empleando una secuencia de WATERGATE de presaturación de la señal del agua.

A continuación se pueden observar los espectros de las sales **28a-d** y comprobar cómo bajo estas condiciones, aparecen múltiples señales en la región de 7-10 ppm características de las señales de amida. Señales que no se corresponden con la estructura del compuesto deseado.



**Figura 3.37. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (500MHz) del compuestos 28a, en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1).**



**Figura 3.38. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (500MHz) del compuestos 28b, en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1).**

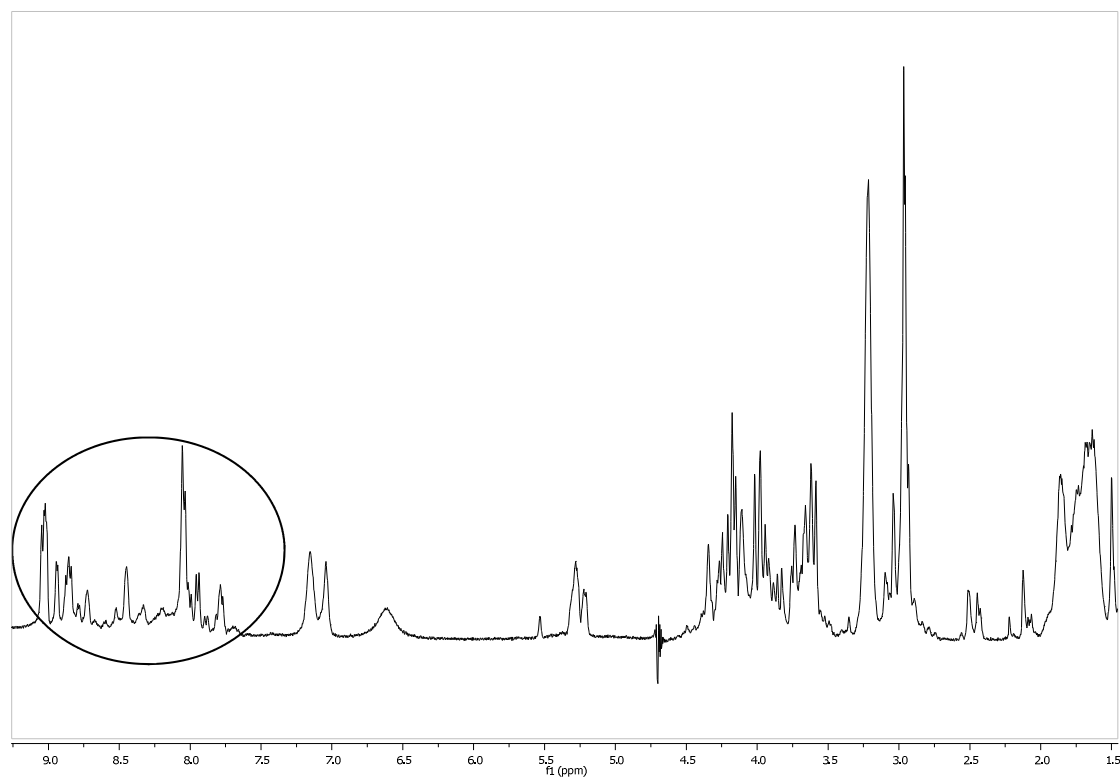


Figura 3.39. Espectro <sup>1</sup>H-RMN (500MHz) del compuestos 28c, en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1).

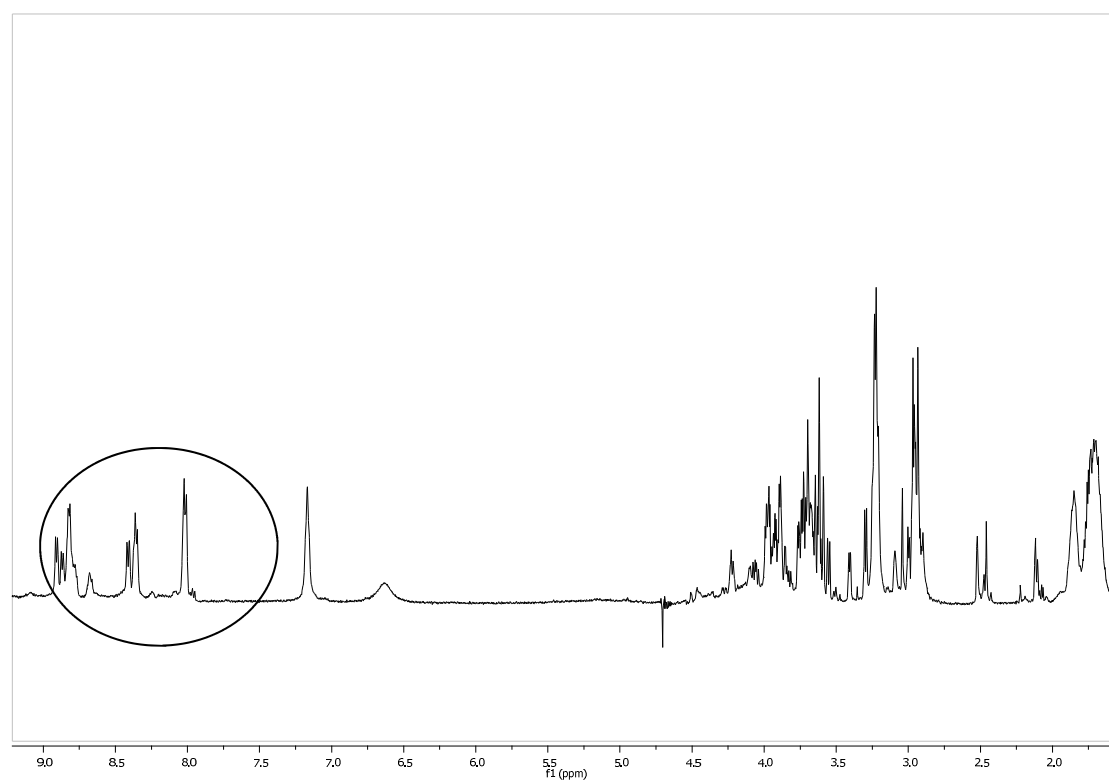
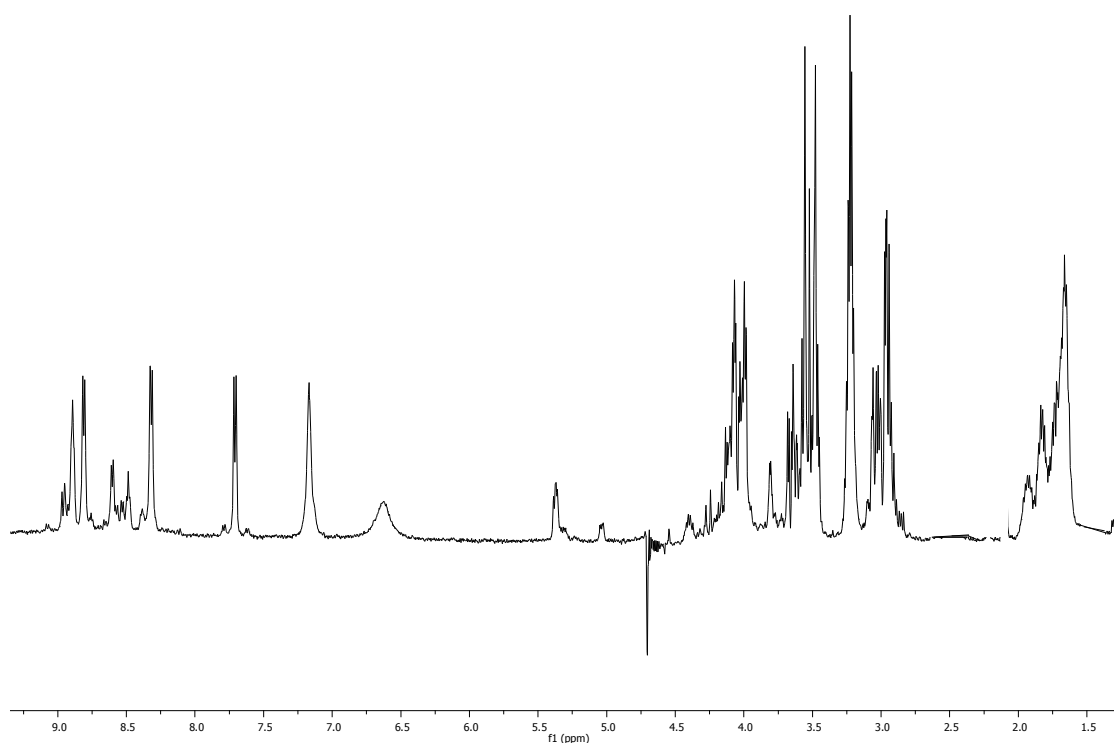


Figura 3.40. Espectro <sup>1</sup>H-RMN (500MHz) del compuestos 28d, en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1).



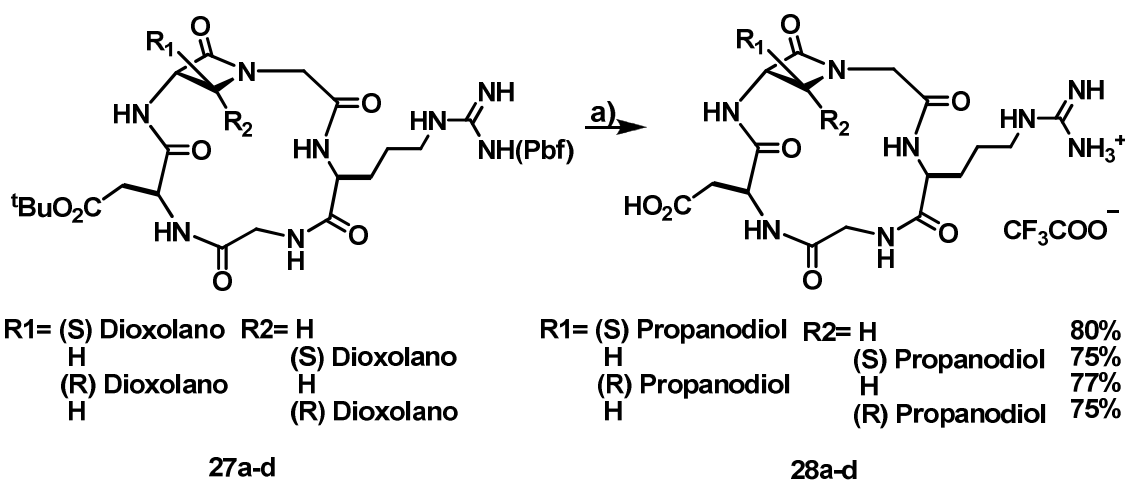
Los intentos de llevar a cabo la desprotección utilizando una mezcla de disolventes, cloroformo/ácido trifluoroacético (1/3) a 35 °C también fueron infructuosos. En estas condiciones la desprotección era más lenta, debido a la menor concentración de ácido, y los compuestos a desproteger eran estables durante más tiempo en el medio de reacción. A pesar de obtener un crudo de reacción más limpio, todavía se observaba gran cantidad de impurezas. En la Figura 3.41 se muestra el espectro del compuesto **28c**, desprotegido en las condiciones descritas, donde se observa la multiplicidad de las señales de amida (región entre 10 y 7 ppm) en el espectro.



**Figura 3.41. Espectro del compuesto 28c en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) multiplicidad en las señales de amida**

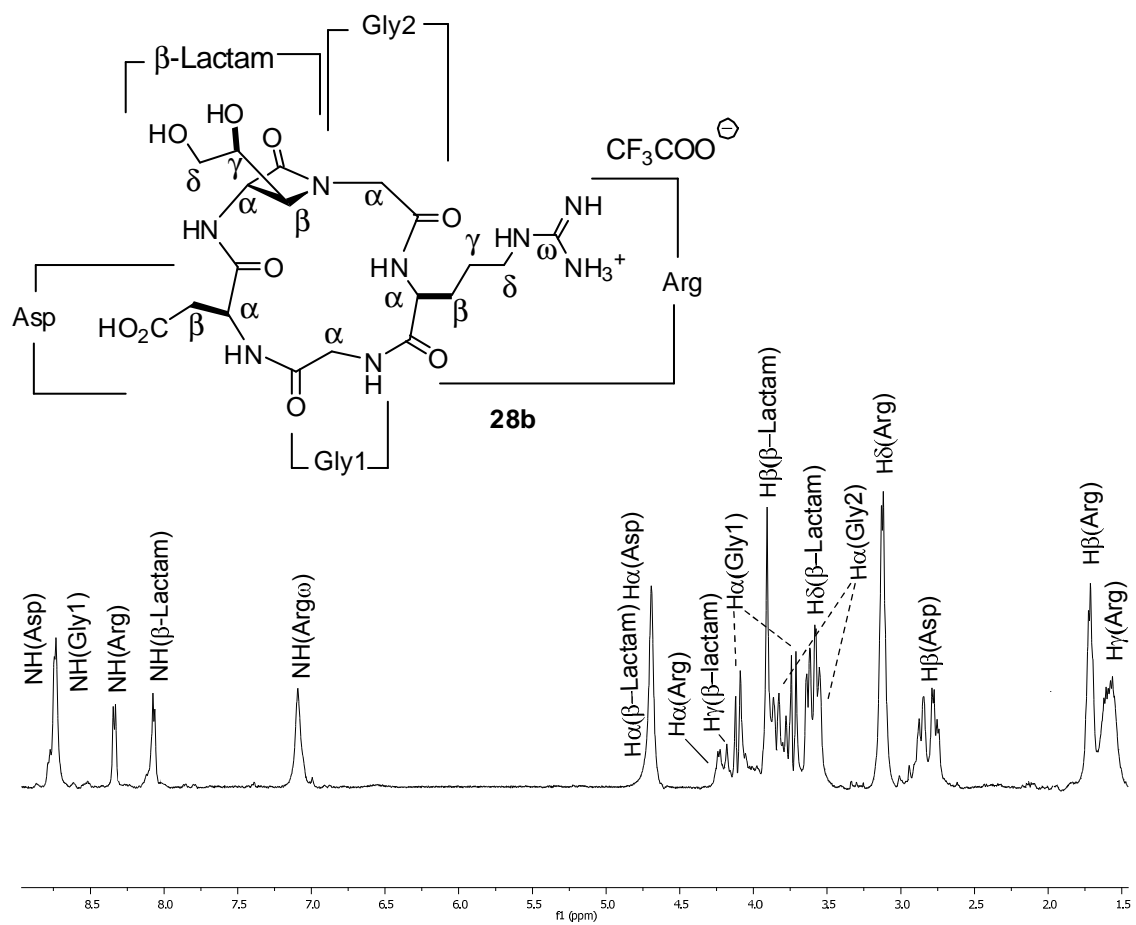
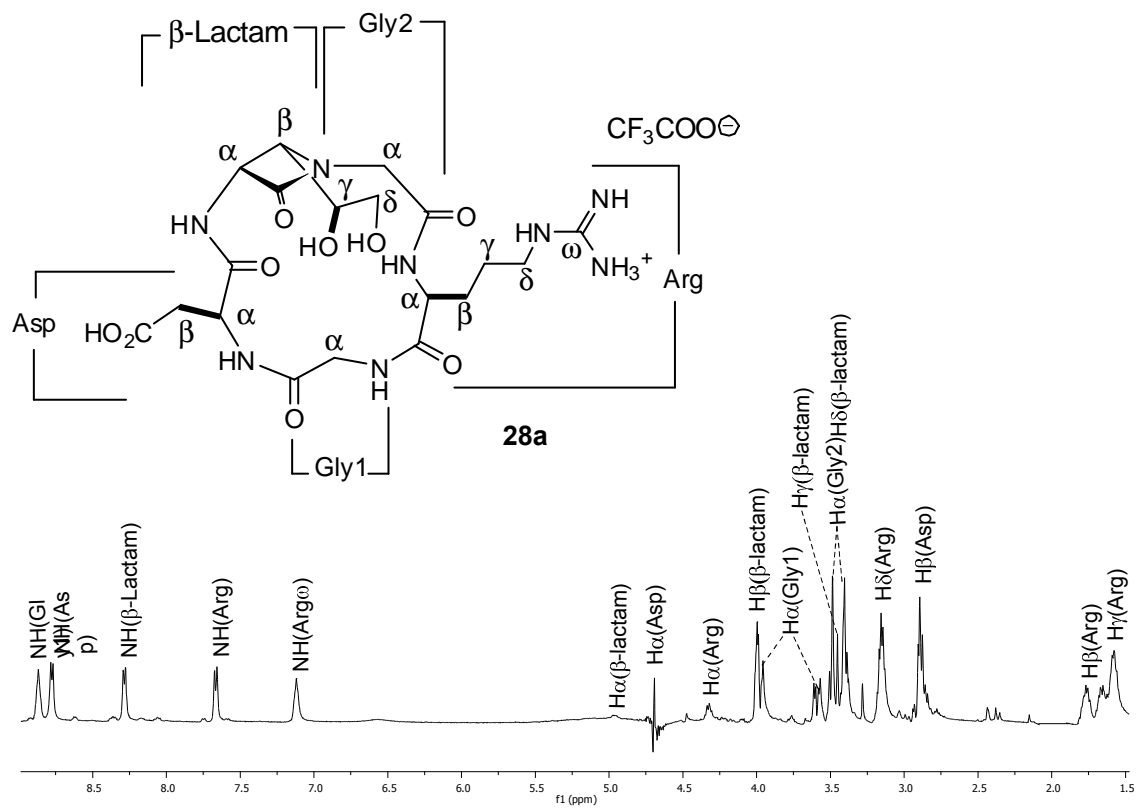
Los resultados obtenidos nos llevaron a la conclusión de que los posibles carbocationes formados en esta etapa de desprotección podrían dar reacciones secundarias y/o que la sal generada como producto final no era estable a esa temperatura.

De cualquier forma, después de varios intentos se pudo determinar que las condiciones óptimas consistían en mantener la reacción a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  en ácido trifluoroacético y en una concentración del ciclo de  $0.1\text{ mM}$  durante  $16\text{ h}$  (Esquema 3.41). Bajo estas condiciones se obtuvo un único juego de señales en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  y un crudo de reacción bastante limpio. Las sales correspondientes se hicieron precipitar con eter diisopropílico y se lavaron con metanol centrifugando la suspensión para aislar el producto, obteniéndose los compuestos **28a-d** con buenos rendimientos (Figura 3.42).



Esquema 3.41. Condiciones para la desprotección final de los compuestos **28a-d**. a)  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $16\text{ h}$ .

La determinación estructural se realizó mediante diversos experimentos de RMN tales como COSY, NOESY, ROESY, TOCSY adjuntos en el Anexo **6.2.1**, **6.2.2**, **6.2.3** y **6.2.4**, páginas 233-245



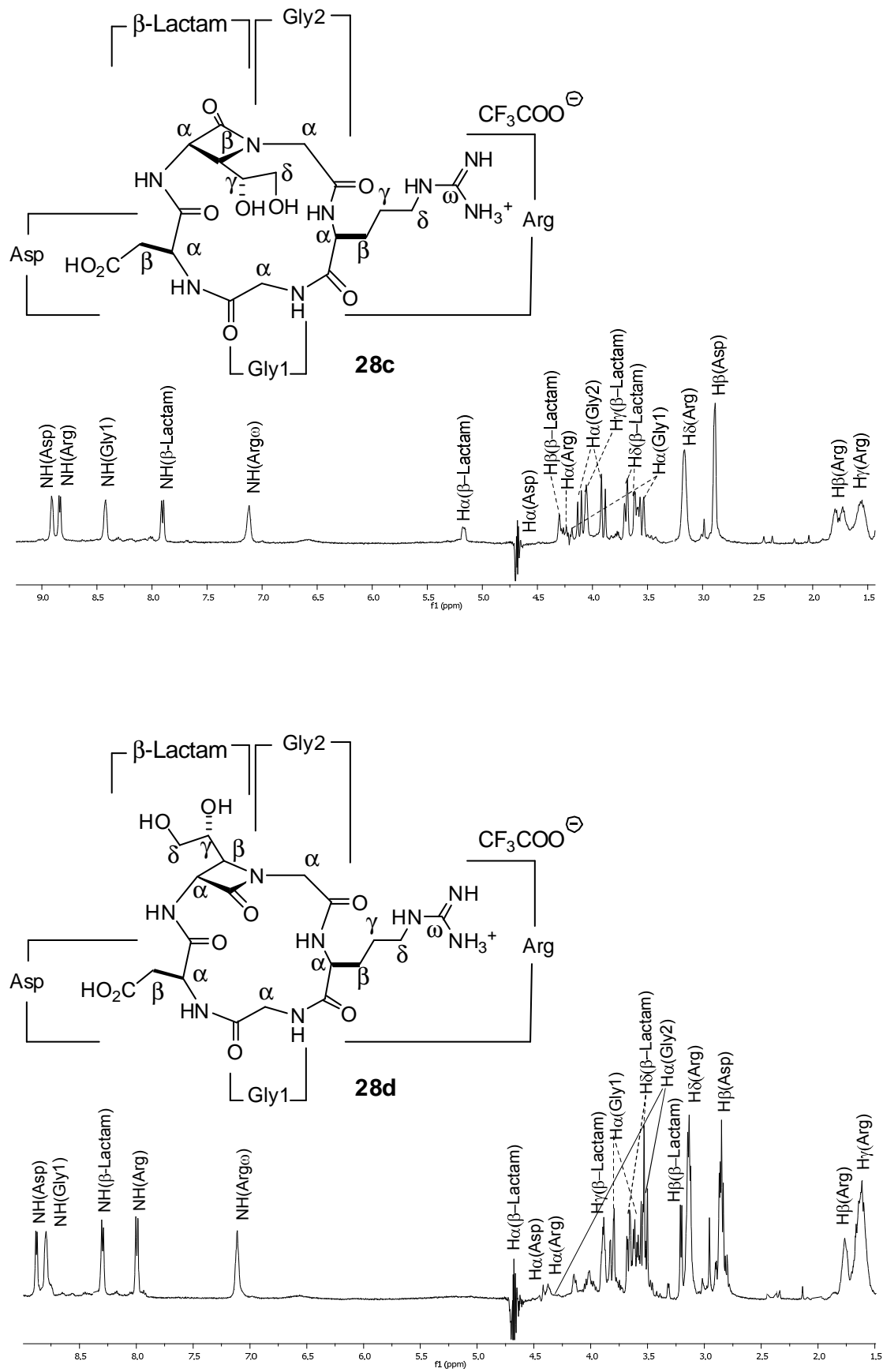


Figura 3.42.  $^1\text{H}$  RMN (500MHz) de los CPP 28a 28b 28c y 28d en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) a 300K.

La pureza de los productos finales **28a-d**, se determinó mediante análisis por HPLC comprobando la existencia de un único producto. Los cromatogramas de cada uno de los compuestos se muestran en el Anexo. **6.2.1**, **6.2.2**, **6.2.3**, y **6.2.4**

### **3.5. Análisis conformacional de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD**

Tras sintetizar los diferentes miméticos de ciclopéptidos RGD se pasó a realizar el análisis conformacional de los compuestos **28a-d** mediante técnicas de RMN basadas en el método ISPA<sup>86</sup> (*Isolated Spin-Pair Approximation*).

Este estudio conformacional permitiría:

1. Confirmar el “Docking” previo, cuya discusión se verá más adelante.
2. Estudiar la disposición espacial de los grupos de interacción con el receptor.
3. Estudiar la interacción del compuesto con el centro activo de la integrina.
4. Encontrar una relación entre estructura y actividad.

En nuestro caso, el análisis se llevó a cabo con las sales trifluoroacéticas de los ciclos de los cuatro productos **28a-d**, utilizando una mezcla de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) como disolvente para imitar, de la manera más fidedigna posible, los medios fisiológicos.

---

<sup>86</sup> a) D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis* VCH Publishers: New York, **1989**. b) P. D. Thomas, V. J. Basus, T. L. James, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1237.

El análisis mediante RMN es particularmente eficaz para el estudio conformacional de péptidos, ya que permite determinar la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, las distancias interprotónicas y los ángulos diedros  $J(\text{HC}\alpha\text{-NH})$ . Además, la combinación de estos datos con cálculos de modelización molecular permitiría conocer las diferentes poblaciones de conformeros de los ciclopeptidos en disolución.

Una forma de medir la formación y estabilidad de los enlaces de hidrógeno intramoleculares es a través del coeficiente térmico de los diferentes protones amídicos  $(\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T)^{87}$ .

En todos los casos se utilizó la misma nomenclatura posicional para la asignación de los protones, numerando cada resto a partir de la  $\beta$ -lactama e indicándose ésta como " $\beta$ -Lactam".

La nomenclatura posicional para la asignación de los protones fue la mostrada en la Figura.3.41. Se designó cada aminoácido del ciclo con su acrónimo y sus protones se localizaron según la nomenclatura general ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc...) excepto para el fragmento de la  $\beta$ -lactama que se indicó como " $\beta$ -Lactam". Manteniendo este mismo orden para los cuatro diastereoisómeros **28a-d**.

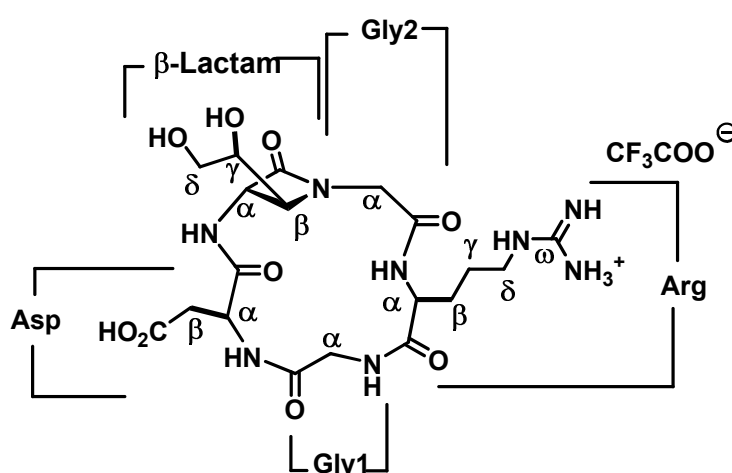


Figura 3.43. Nomenclatura utilizada en los ciclopeptidomiméticos

<sup>87</sup> a) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, 21, 512.

Los estudios se realizaron a una concentración de 1mM y a una temperatura de 300 K en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1). En primer lugar se llevó a cabo la asignación de todas las señales a partir de los espectros 1H, COSY, ROESY y TOCSY de los ciclos **28a**, **28b**, **28c**, **28d**. Los correspondientes espectros completos de los compuestos aparecen en el Anexo **6.2.1**, **6.2.2**, **6.2.3**, y **6.2.4**

Se identificaron las señales de amida NH que aparecen como dobletes para los residuos de la β-lactama, la arginina y el aspártico por tener en todos los casos un protón en el carbono adyacente y triplete para la glicina por presentar dos protones en el carbono adyacente. A través de las señales de cruce del espectro COSY se fueron asignando los diferentes juegos de señales de cada ciclo. Debido a la gran concurrencia de señales en un rango estrecho del espectro (entre 3.5 y 4.5 ppm), utilizamos la ayuda de experimentos TOCSY y ROESY para asignar los demás protones de los compuestos **28a-d**.

Tras asignar las señales de los espectros, se realizó una deriva térmica entre 300K y 325K en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) con intervalos de 5K y se calcularon los coeficientes térmicos ( $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ ) de los protones amida de los diferentes ciclos para saber si aquellos participaban o no en enlaces de hidrógeno intramoleculares. En la Tabla 3.4 se muestran los valores del desplazamiento químico en ppm de los diferentes NH amídicos, los correspondientes coeficientes térmicos y la asignación de los diferentes protones de cada uno de los compuestos **28a**, **28b**, **28c**, **28d**

**Tabla 3. 4. Valores del desplazamiento químico en ppm de los H de los CPP 28a-d y el valor de sus derivas térmicas**

<b>Compuesto 28a</b>							
Residuo	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ω</sup>	N-H	Δδ/ΔT
Asp	4.60	2.86				8.82	-5.49
β -Lac	4.99	4.04	3.38	3.44/3.53		8.33	-4.32
Gli2	3.49/3.40						
Arg	4.32	1.81/1.70	1.62	3.20	7.14	7.71	-5.72
Gli1	3.99/3.63					8.91	-7.49

<b>Compuesto 28b</b>							
Residuo	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ω</sup>	N-H	Δδ/ΔT
Asp	4.68	2.87				8.76	-7.66
β-Lac	4.70	3.56	3.92	3.62/3.58		8.09	-3.83
Gli2	4.12/3.74						
Arg	4.21	1.73/1.60	1.60	3.13	7.11	8.35	-7.87
Gli1	3.84/3.60					8.75	-7.58

<b>Compuesto 28c</b>							
Residuo	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ω</sup>	N-H	Δδ/ΔT
Asp	4.46	2.85				8.89	-7.93
β -Lac	5.13	4.28	4.02	3.66/3.56		7.87	-4.3
Gli2	4.08/3.86						
Arg	4.25	1.75/1.7	1.51	3.13	7.09	8.82	-5.05
Gli1	3.51/4.23					8.40	-6.1

<b>Compuesto 28d</b>							
Residuo	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ω</sup>	N-H	Δδ/ΔT
Asp	4.53	2.88				8.92	-8.74
β -Lac	4.78	3.24	3.92	3.68/3.54		8.34	-4.4
Gli2	4.47/3.65						
Arg	4.40	1.82/1.6	1.66	3.19	7.16	8.03	-8.28
Gli1	3.86/3.65					8.83	-7.22



En agua, el valor límite del coeficiente térmico para que un NH amídico participe en un enlace de hidrógeno intramolecular es de  $-4\text{ppb/K}^{88}$ . Por lo tanto, se puede considerar que los protones amídicos cuyos coeficientes térmicos sean menores o iguales a esta medida (en valor absoluto) participan en cierta medida en enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Fijándonos en los valores de los coeficientes térmicos de los cuatro compuestos, podemos deducir que muestran comportamientos similares. La estructura presenta los coeficientes térmicos de la arginina, glicina y aspártico con valores superiores a  $-4\text{ppb/K}$  y presenta un coeficiente térmico, en el caso de la  $[\beta\text{-Lactama}]$  en torno a  $-4\text{ppb/K}$ . en todos los compuestos.

Por tanto, no existiría enlace de hidrógeno en ninguna de las cuatro estructuras y si lo hubiere, sería un giro  $\gamma$  (natural o inverso) de carácter muy débil en torno al NH de la  $\beta\text{-lactama}$  y el carbonilo de la glicina

Los cuatro compuestos presentan una tendencia homogénea. Parece ser que ni la configuración del estero-centro  $\gamma$  del 1,2-propanodiol ni la configuración cis, trans de la  $\beta\text{-lactama}$  afectan de forma significativa a la conformación del ciclo.

Seguidamente se determinaron las distancias interprotónicas mediante integración de las señales de cruce significativas de los espectros 2D ROESY siguiendo el método ISPA (*Isolated Spin-Pair Approximation*). Para completar el análisis, las estructuras se modelizaron introduciendo los valores anteriores como restricciones en cálculos de dinámica molecular, los cuales se especificarán más adelante.

Para elucidar la conformación detallada de las diferentes familias conformacionales, se integraron las señales de cruce de los espectros ROESY. En la Tabla 3.5 se muestran los principales valores promedio para cada ciclopéptido  $\beta\text{-lactámico}$ .

---

<sup>88</sup> T. Cierpicki, J. Otlewski, *J. Biomolec. NMR* **2001**, 21, 249.

**Tabla 3.5. Distancias (en Å) interprotónicas significativas obtenidas a través del experimento ROESY**

<b>Compuesto 28a</b>	<b>(Å)</b>	<b>Compuesto 28b</b>	<b>(Å)</b>
H <sup>δ</sup> βlac/ H <sup>δ</sup> Arg	3.21	NHGli1/H <sup>α</sup> Arg	2.67
H <sup>δ</sup> βlac/H <sup>α</sup> Arg	4.87	NHArg/HGlic2	2.76
H <sup>δ</sup> βlac/NHArg	3.97	H <sup>β</sup> βlac/NHArg	2.89
NHArg/ HGlic2	2.89	NHβlac/H <sup>α</sup> Asp	3.38
NHβlac/ H <sup>γ</sup> βlac	3.30	NHAsp/NHβlac	3.81
NHAsp/HGlic1	2.63	H <sup>δ</sup> βlac/HGlic2	3.04
NHβlac/ H <sup>α</sup> Asp	3.13	NHβlac/H <sup>β</sup> βlac	2.70
NHGlic/ H <sup>α</sup> Arg	2.81	NHβlac/H <sup>γ</sup> βlac	4.51
		H <sup>α</sup> Arg/HGlic2	4.63

<b>Compuesto 28c</b>	<b>(Å)</b>	<b>Compuesto 28d</b>	<b>(Å)</b>
NHAsp/NHβlac	3.09	NHAsp/NHβlac	3.37
NHAsp/HGlic1	2.43	NHAsp/HGlic1	2.27
NHArg/HGlic2	2.77	NHGlic/H <sup>α</sup> Arg	2.49
NHβlac/H <sup>β</sup> βlac	3.86	NHβlac/H <sup>β</sup> βlac	3.14
NHβlac/H <sup>γ</sup> βlac	2.73	H <sup>α</sup> Arg/HGlic1	2.77
HGlic2/H <sup>β</sup> βlac	3.07	NHβlac/H <sup>α</sup> Asp	3.10
NHGlic/ H <sup>α</sup> Arg	3.76	HGlic2/H <sup>γ</sup> βlac	3.30
NHArg/ H <sup>δ</sup> βlac	3.97	NHGlic/H <sup>α</sup> Arg	3.23

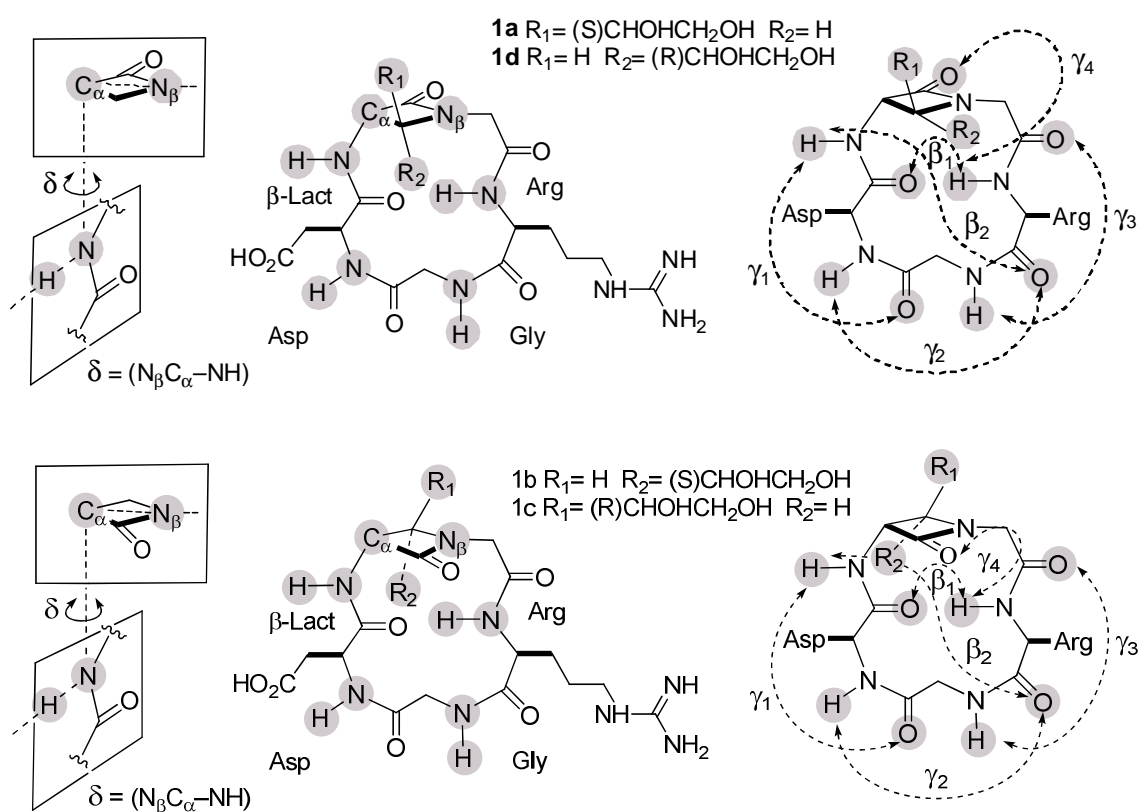
Seguidamente, se emplearon las distancias interprotónicas de la **Tabla 3.5** como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o clusters más relevantes para los pseudopéptidos cíclicos **28a-d**. Para ello, se siguió el método *simulated annealing*<sup>89</sup> realizando una dinámica libre desde 1000 K hasta 300 K aplicando las restricciones conformacionales una vez se empieza a bajar la temperatura, modelizando el enfriamiento de 100 estructuras posibles de los pseudopéptidos cíclicos **28a-d**. El margen aplicado a cada restricción de

<sup>89</sup> X. Daires, K. Gademan, H. Schäfer, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393.

distancia interprotónica fue de  $\pm 0.3$  Å y las simulaciones se efectuaron empleando el programa X-PLOR-NIH 2.16<sup>90</sup>.

De las 100 estructuras resultantes se seleccionaron aquellas que cumplieran todas las restricciones o que únicamente violaban una de ellas. Dichas estructuras se agruparon en diferentes clusters reuniéndolas según los conjuntos de orientaciones de los grupos amida con respecto al plano medio molecular de cada ciclopéptido definido por el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta$ . Este ángulo indica la orientación de los diferentes grupos amida con respecto a un plano imaginario perpendicular al anillo  $\beta$ -lactámico. Así, valores positivos del ángulo  $\delta$  indican que el hidrógeno del enlace amida está orientado hacia delante del ciclo, mientras que un valor negativo de  $\delta$  indica que el enlace está orientado hacia atrás.

**Tabla 3. 6. Clusters conformacionales de los ciclopéptidos 1a-d definidos según el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta$  <sup>a)</sup>.**



<sup>90</sup> C. D. Schwieters, J. Kuszewski, G. M. Clore, *Prog. Nucl. Magn. Spectrosc.* **2006**, *48*, 47.

Cluster (n) <sup>b)</sup>	$\delta = (\text{N}\beta\text{C}\alpha\text{-NH})$				Distancia $\text{CQ}\cdots\text{HN}$ (Å) <sup>c)</sup>					
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-Lac}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gli}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\langle\gamma_1\rangle(\phi;\psi)_{\text{Asp}}$ <sup>d)</sup>	$\langle\gamma_2\rangle$	$\langle\gamma_3\rangle$	$\langle\gamma_4\rangle$	$\langle\beta_1\rangle$	$\langle\beta_2\rangle$
<b>28a</b> (33)	-8.7	+34	-72	+127	2.8 (-50;-11)	4.1	4.0	3.7	5.5	5.3
<b>28a</b> (21)	-7.7	+56	-60	-148	2.7 (-76;+2)	3.6	4.2	3.2	5.0	5.0
<b>28a</b> (8)	18	-105	-75	122	1.6 (+67;-61)	5.1	4.2	3.7	5.5	5.4
<b>28a</b> (4)	+72	-100	-79	-117	2,2 (+54;-90)	5.1	4.2	4.0	5.2	5.8
<b>28a</b> (3)	+75	-96	-56	-130	2,2 (+54;-90)	4.9	4.6	3.6	4.4	5.8
<b>28a</b> (2)	21	-103	-71	-130	1.6 (+67;-61)	5.1	4.1	3.8	5.5	5.4
<b>28b</b> (24)	-44	+60	-59,6	-143	2.4 (-93;46)	3.6	4.4	3.7	4.9	5.6
<b>28b</b> (9)	-2.7	+53.8	-61.6	-155	3.0 (-78;-10)	3.7	4.4	3.2	5.1	5.3
<b>28b</b> (5)	-48	+42	-65	+131	2.7 (-99;32)	3.0	3.9	4.0	4.8	5.3
<b>28b</b> (4)	-0.6	+51	-50	+124	2.8(-62;-18)	3.7	4.2	3.5	5.3	5.2
<b>28b</b> (7)	+84	+78	-55	-128	4.4 (-74;-76)	3.7	4.6	3.5	3.9	5.8
<b>28b</b> (4)	+122	+79	+79	+108	4.8 (-72;-121)	3.9	4.9	4.5	3.9	6.2
<b>28c</b> (31)	24	77	89	123	3.0 (-75;-12)	5.0	4.5	3.0	5.8	5.3
<b>28c</b> (21)	24	75	-52	120	3.1 (-73;-15)	3.8	3.2	2.8	5.8	5.1
<b>28c</b> (15)	13	75	-55	-133	2.9 (-81;+12)	4.2	4.3	3.3	5.2	5.3
<b>28c</b> (9)	14	85	95	-130	2.9 (-96;+15)	4.9	4.5	3.4	5.4	5.3
<b>28c</b> (7)	-88	-76	77	-130	4.5 (+62;+94)	3.1	5.0	3.4	3.8	6.4
<b>28c</b> (6)	-95	-80	72	119	4.6 (+67;+93)	2.9	5.3	2.6	3.3	5.8
<b>28d</b> (38)	+48	93	-72	+109	2.7(-49;-26)	4.8	3.6	3.3	6.3	5.4
<b>28d</b> (12)	+47	91	-84	-96	2.7 (-49;-27)	4.9	4.3	4.9	6.0	4.5
<b>28d</b> (29)	+43	-82	-64	120	1.7 (+68;-60)	5.1	4.0	3.1	5.7	5.5
<b>28d</b> (4)	+48	-79	-74	-113	1.6 (+68;-61)	5.1	4.3	4.3	5.4	4.9

a) Una orientación anterior o posterior del enlace  $\text{CON-H}$  al plano medio del macrociclo se corresponde, respectivamente, con un signo positivo  $\delta$  (+) o negativo  $\delta$  (-).

b) Entre paréntesis se indica el número de estructuras que incumplen una o ninguna de las restricciones de distancia interprotónica.

c) Los valores resaltados indican distancias de enlace de hidrógeno.

d) Valores promedio de los ángulos diedros internos del residuo Asp. Ángulos diedros canónicos de un giro  $\gamma^i$  de tipo inverso :  $\langle\phi\rangle = -65$ ;  $\langle\psi\rangle = +65$ .

Una vez agrupadas las diferentes conformaciones (Tabla 3.7), podemos comprobar que cada compuesto presenta dos familias de conformeros, una mayoritaria y otra minoritaria. La familia mayoritaria de los compuestos **28a** y **28b**, presenta una estructura en la que el NH del residuo de la  $\beta$ -lactama y de la glicina1 presenta un ángulo  $\delta$  negativo y el residuo del aspártico presenta un ángulo  $\delta$  positivo. La familia mayoritaria de los compuestos **28c** y **28d** presenta una estructura en la que el NH del residuo de la  $\beta$ -lactama y el aspártico presentan valores positivos del ángulo  $\delta$  y el residuo de la glicina1 presenta un ángulo  $\delta$  negativo. Además, el compuesto **28c** presenta otra familia mayoritaria en la que presenta valores positivos de  $\delta$  para los residuos del aspártico, la  $\beta$ -lactama y la glicina1. En todas las familias de los compuestos **28a-d** se engloba tanto un valor positivo como negativo del ángulo  $\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$ . dentro de la misma familia conformacional.

La razón podría argumentarse en la ausencia de sustituyente en el carbono  $\alpha$  de la glicina2, el residuo de la arginina presenta mayor libertad de giro, y el NH del residuo de la arginina pueda estar tanto por delante como por detrás del plano formado por el C-N de la  $\beta$ -lactama y por el propio ciclo.

Así englobaremos las estructuras de cada compuesto en dos familias, dependiendo del signo del ángulo  $\delta$  formado por cada residuo del ciclo. Reuniremos los cluster o estructuras que presenten el mismo signo al medir el ángulo pseudodiedro  $\delta$  de los residuos de la  $\beta$ -lactama, el aspártico y la glicina en la misma familia. La familia M perteneciente a la familia mayoritaria de estructuras y la familia m perteneciente a la familia minoritaria de estructuras.

Tabla 3. 7. Tabla con las diferentes familias formadas para cada compuesto

Familia	Cluster (n) <sup>b)</sup>	$\delta = (N\beta C\alpha-NH)$				
		$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-Lac}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gli}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\langle\gamma_1\rangle (\phi;\psi)_{\text{Asp}}$
28a "M"	54	-	+	-	-/+	>2.3
28b "M"	42	-	+	-	-/+	>2.3
28c "M <sub>1</sub> "	40	+	+	+	-/+	>2.3
28c "M <sub>2</sub> "	36	+	+	-	-/+	>2.3
28d "M"	50	+	+	-	-/+	>2.3
28a "m"	17	+	-	-	-/+	<2.3
28b "m"	7	+	-	-/+	-/+	>2.3
28c "m"	20	-	-	+	-/+	>2.3
28d "m"	33	+	-	-	-/+	<2.3

La familia mayoritaria M del compuesto **28a** presenta 54 estructuras en las cuales el ángulo  $\delta$  de cada residuo es negativo para la  $\beta$ -lactama y para la glicina, y positivo para el aspártico. Además los valores de la distancia  $\gamma_1$  son mayores que 2.4 Å, por lo que se descarta la presencia de enlaces de hidrógeno en la estructura. Como hemos comentado anteriormente el ángulo  $\delta$  para la arginina presenta estructuras positivas y otras negativas, a consecuencia de la libertad de giro que le otorga, por un lado la ausencia de sustituyente en el C $\alpha$  del residuo Gli2 y por otro, su proximidad con la Gli1.

La familia mayoritaria M del compuesto **28b** presenta la misma conformación que el compuesto **28a**. Además, aunque el valor de la distancia  $\gamma_1$  es de 2.4 Å, los ángulos de enlace  $\phi, \psi$  se alejan de los valores canónicos para que se de un giro  $\gamma_1$ . El valor de 2.4 Å está en el límite para constatar la presencia o no de enlace de hidrógeno. Este dato concuerda con el valor medido de la deriva térmica (-3.8) y corrobora que este compuesto o no presenta enlace de hidrógeno en su estructura, o si lo presenta es de carácter muy débil.

La familia mayoritaria M del compuesto **28c** presenta dos grandes familias mayoritarias, la familia M<sub>1</sub> con 40 estructuras que cumplen todas las

restricciones y en los que el valor del ángulo  $\delta$  de los 3 residuos ( $\beta$ -lactama, aspártico, glicina) son de valor positivo y el valor del ángulo  $\delta$  de la arginina presenta valores tanto positivos como negativos, y otra estructura mayoritaria  $M_2$  con 36 estructuras, en la que se da una inversión del residuo de la glicina, siendo ahora el valor del ángulo  $\delta$  del residuo de la glicina negativo y el de la  $\beta$ -lactama y el aspártico positivo. Podemos observar que esta estructura tiene una gran flexibilidad debido a su libertad de giro. Además, estas conformaciones tampoco presentan enlace de hidrógeno en su estructura, dato corroborado al realizar la deriva térmica del compuesto.

Por último, la familia mayoritaria M del compuesto **28d** presenta un número de 50 clusters. La diferencia entre esta estructura y la de los compuestos **28a** y **28b** radica en que el NH de la  $\beta$ -lactama aparece por detrás del plano  $\delta$  ( $N_\beta C_\alpha$ -NH). Tampoco presenta ningún enlace de hidrógeno en su estructura, dato que viene reforzado por los valores de la deriva térmica medidos experimentalmente.

Las familias minoritarias de los compuestos **28a-d** presentan diferentes conformaciones respecto a la mayoritaria. Generalmente debido a la rotación o giro de algún residuo ( $\beta$ -lactama, aspártico, glicina) del compuesto. Así las familias "m" de los compuestos **28a** y **28b** presentan un giro que coloca al NH del residuo de la  $\beta$ -lactama hacia fuera del plano presentando un ángulo  $\delta$  positivo. La única diferencia entre las conformaciones de los compuestos **28a** y **28b** es que el compuesto **28a** presenta 10 conformaciones en las que aparece un giro  $\gamma^j$ , mientras que en la familia m del compuesto **28b** no aparece ninguna conformación con enlace de hidrógeno en su estructura.

Además, la familia m del compuesto **28c** presenta un giro en el NH de la  $\beta$ -lactama con respecto a la familia M, y además no presenta enlace de hidrógeno en ninguna de sus conformaciones. Por último, la familia m del compuesto **28d**, presenta una conformación en la que se da un giro en el residuo del aspártico con respecto a la familia M. Esta conformación además presenta un giro  $\gamma^j$ , entre el NH de la  $\beta$ -lactama y el CO de la glicina.

Como conclusión, los 4 compuestos **28a-d** presentan, a la vista de los resultados obtenidos, estructuras bastante flexibles. El hecho de no tener ningún sustituyente en el carbono  $\alpha$  de la glicina 2 hace que el residuo de la arginina tenga mucha libertad de giro dentro del ciclo, como demuestran los valores negativos y positivos del ángulo pseudodiedro  $\delta$  de dicho aminoácido en los diferentes CPP **28a-d**. Además la monosustitución en el carbono 3 de la  $\beta$ -lactama permite a su vez libertad de giro en el residuo del NH de la  $\beta$ -lactama, así como en el residuo del aspártico. Por último, la ausencia de enlaces de hidrógeno en las estructuras **28a-d** evita la fijación de determinadas conformaciones aumentando los grados de libertad. A continuación se representan las familias conformacionales mayoritarias y minoritarias de los compuestos **28a-d**.



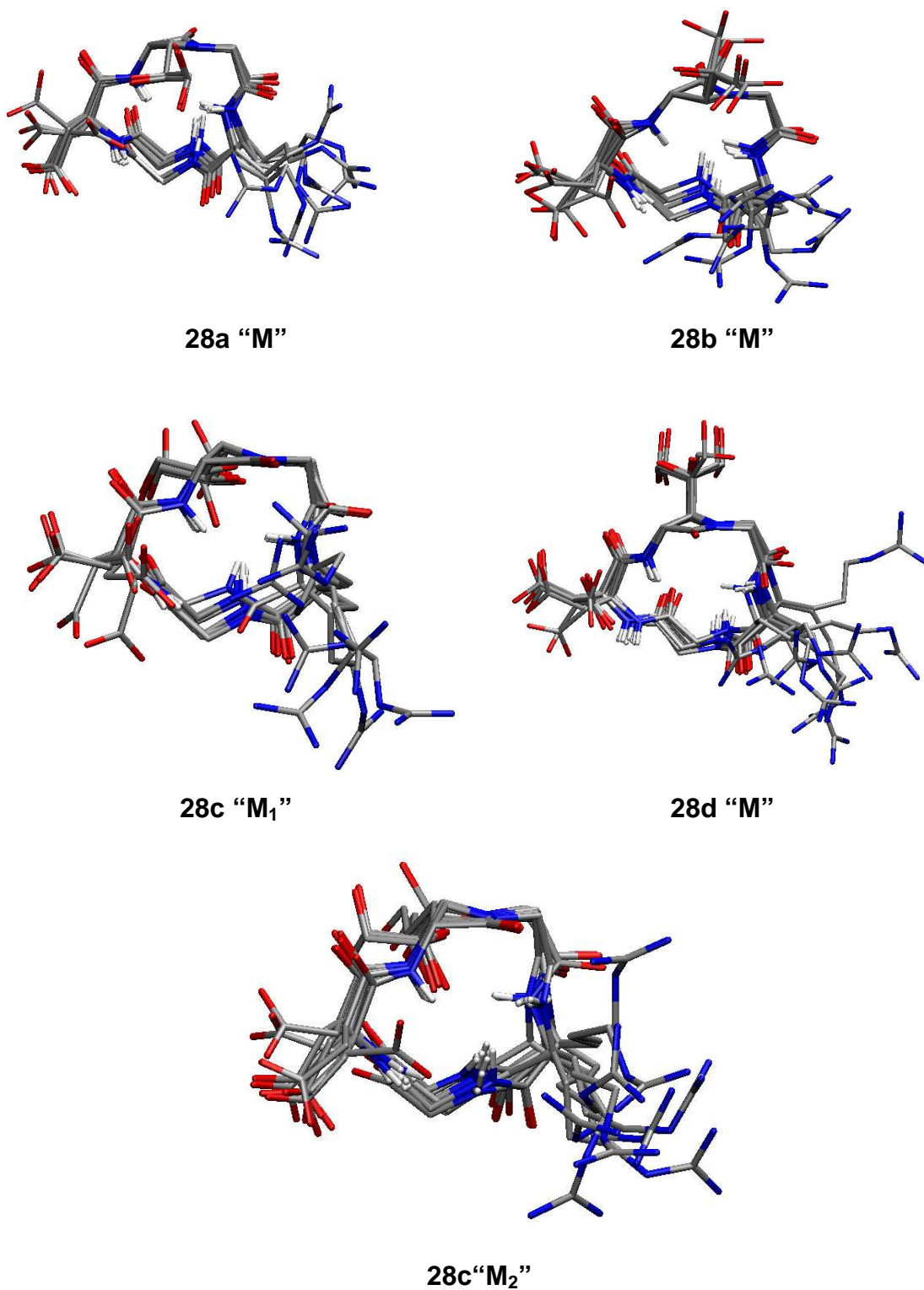


Figura 3.44. Representación de las familias conformacionales mayoritarias de los compuestos 28a-d

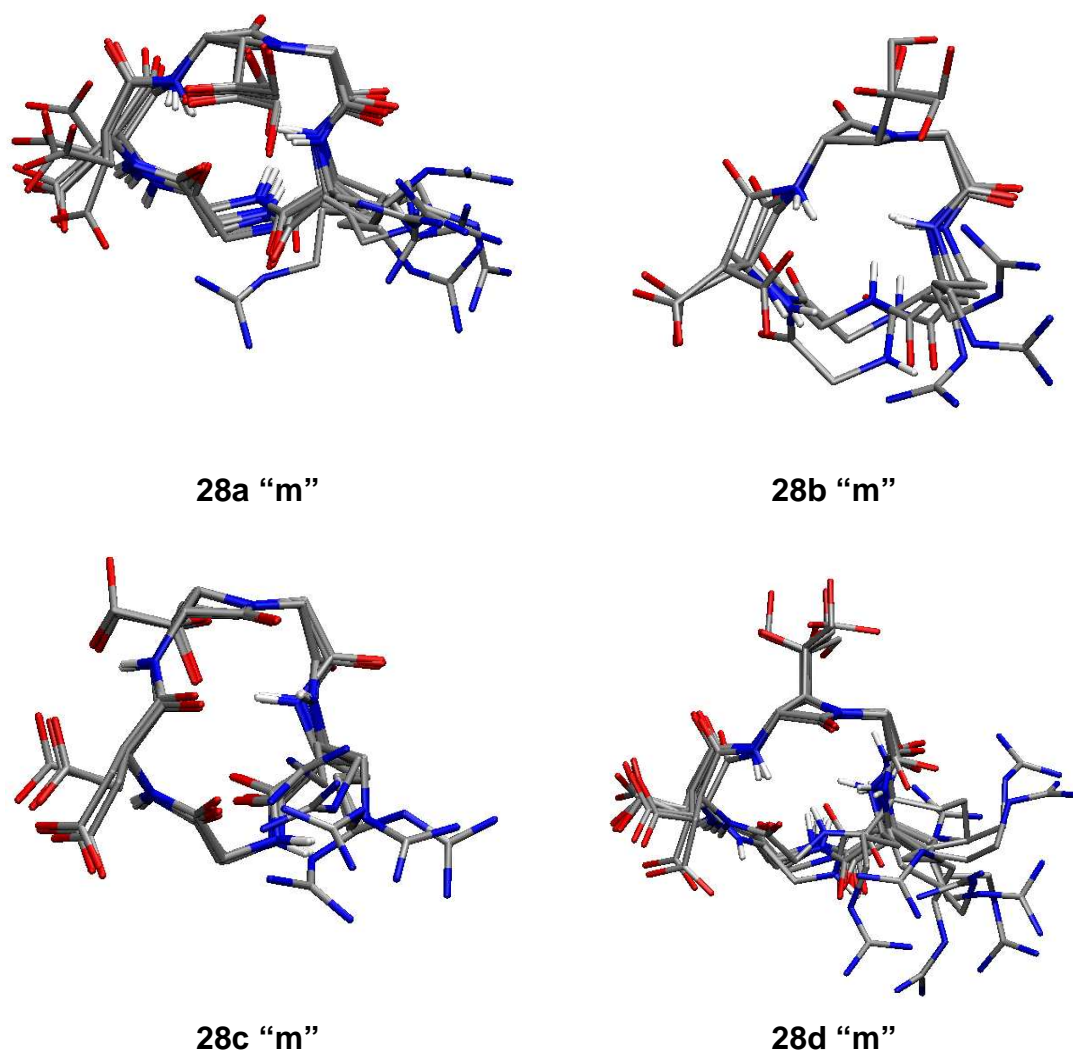


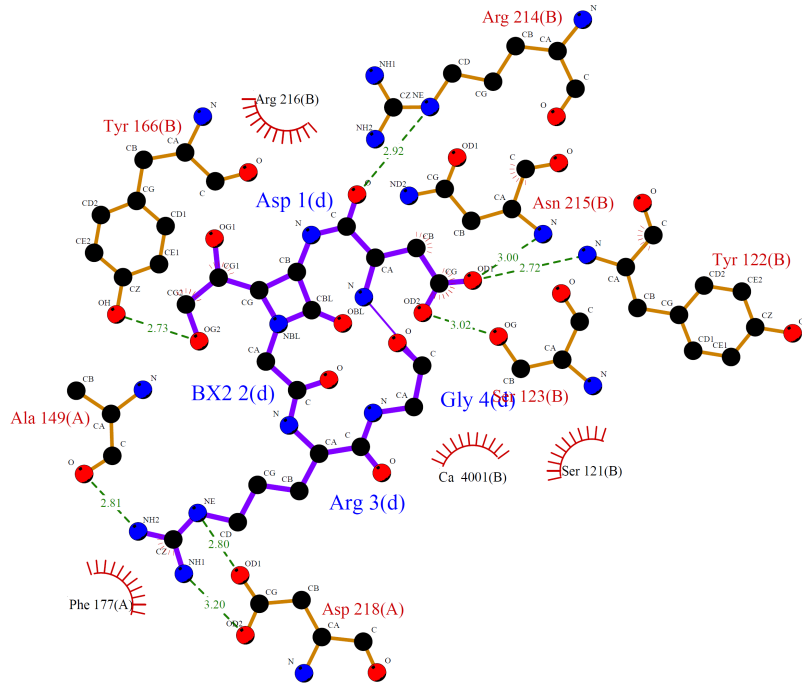
Figura 3.45. Representación de las familias conformacionales minoritarias de los compuestos 28a-d

### 3.6. Modelización de la interacción RGD/integrina $\alpha_v\beta_3$ (Docking)

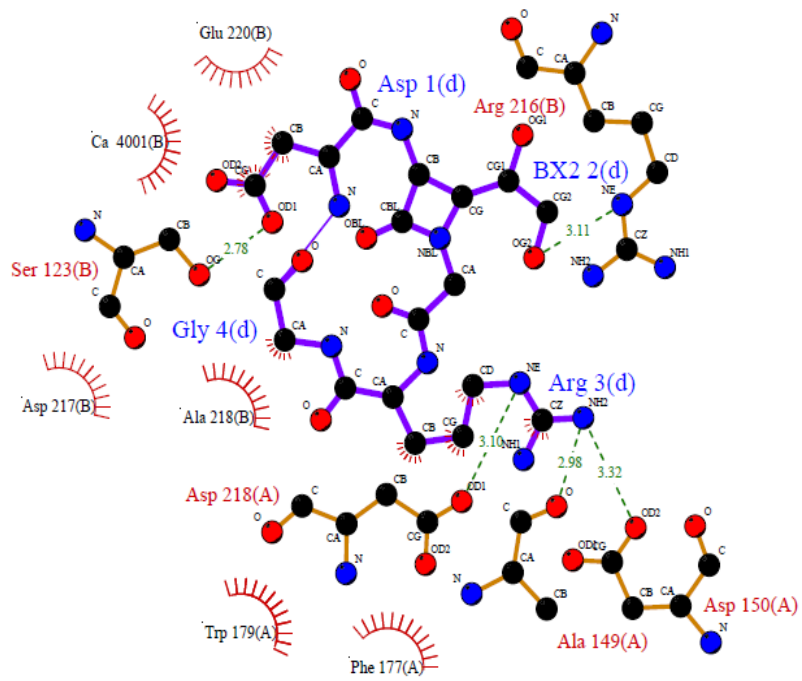
Una vez estudiada las posibles conformaciones que adoptan los cuatro compuestos, procedimos a realizar un estudio teórico de interacción con el centro activo de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Para ello, se seleccionaron las estructuras de cada compuesto englobadas en las familias mayoritarias, dando por sentado que el ligando se encontrará mayoritariamente en esa conformación a la hora de interaccionar con el centro activo de la integrina. Para realizar los estudios de Docking y se utilizó el programa Docking Autodock 3.05. Se seleccionó una de las conformaciones de cada subgrupo pertenecientes a la familia mayoritaria de cada compuesto **28a-d**. Así el compuesto **28a** presenta dos subfamilias de estructuras que forman la familia mayoritaria **28a“M”**, el compuesto **28b** presenta cuatro subfamilias de estructuras que forman la familia mayoritaria **28b “M”**. El compuesto **28d** presenta dos subfamilias que forman la familia mayoritaria **28d“M”** y por último, cada familia mayoritaria del compuesto **28c** (la “**M**<sub>1</sub>” y la “**M**<sub>2</sub>”) está formada a su vez por dos subfamilias.

El ensayo de Docking se ha realizado escogiendo la conformación promedio de cada una de las subfamilias y calculando la energía de Docking. Se repitió el cálculo 100 veces y se agruparon en clusters en función de la energía, tomando como referencia para nuestro cálculo, el cluster de menor energía de Docking.

A continuación se va a presentar el cluster de menor energía de cada familia **28a-d**, sus interacciones con el centro activo de la integrina y su energía de Docking. Los demás clusters de menor energía, pertenecientes a las subfamilias de los compuestos **28a-d** se presentan en el Anexo **6.3** páginas 245-247.

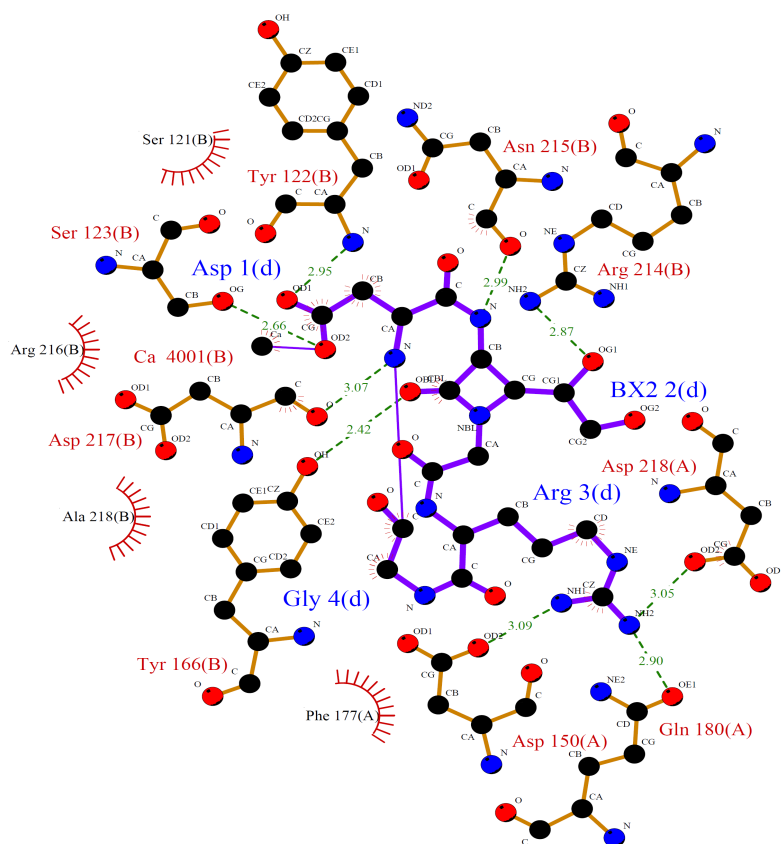


28a "M" / -13.2 Kcal



28b "M" / -14.8 Kcal

## 28c "M" / -14.7 Kcal



## 28d "M" / -15.5 Kcal



Viendo los resultados del Docking, podemos predecir que los compuestos **28b** y **28c** así como el compuesto **28d** presentan energías de Docking superiores o muy similares al compuesto de referencia la Cilengitide®, el cual presenta una energía mínima de Docking de -14.9 Kcal. Lo que si parece claro, es que el compuesto **28a** es el que mayor valor de docking presenta, y por tanto debería presentar menor interacción con el centro activo que los demás compuestos.

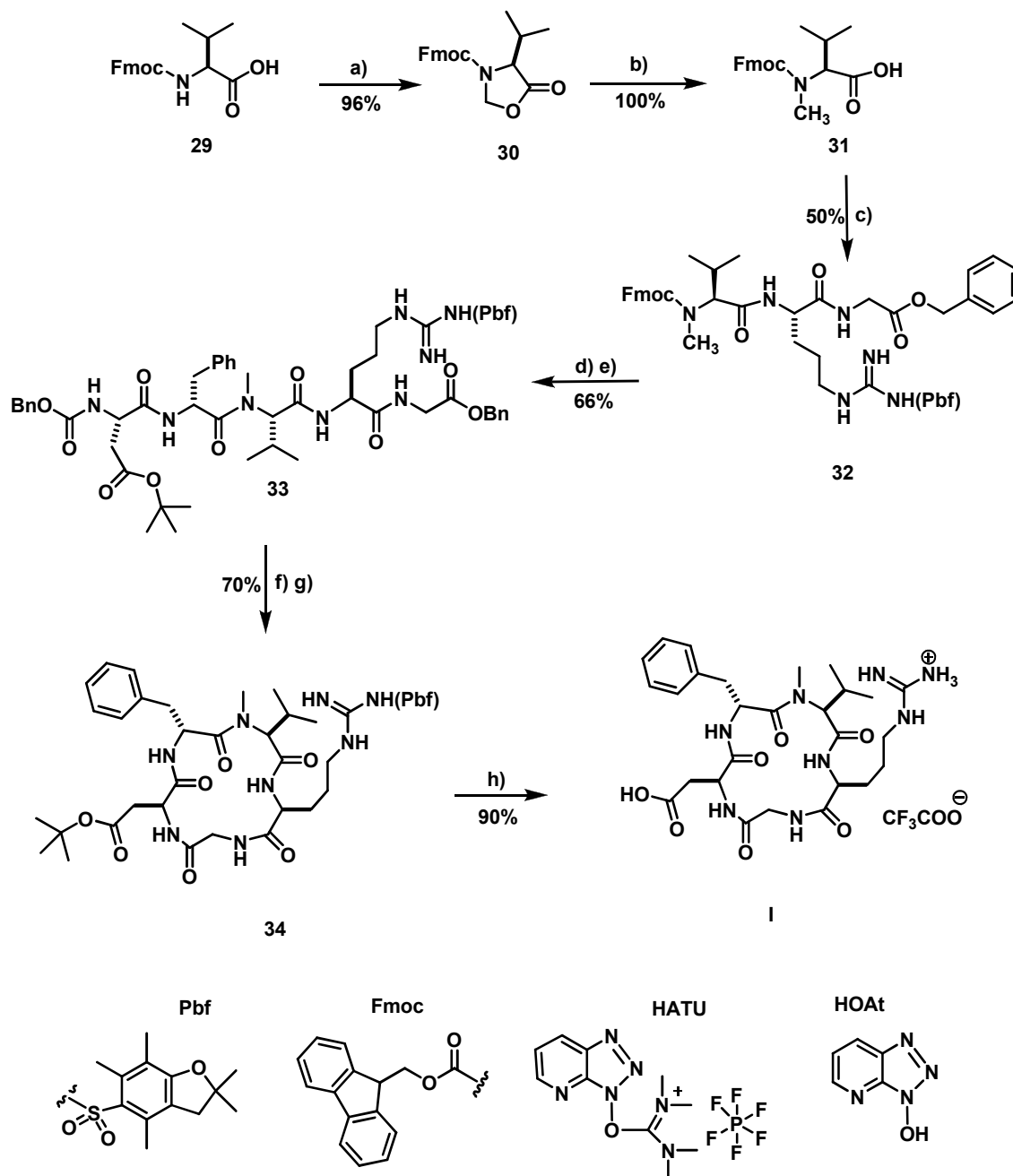
Esta técnica, presenta varias limitaciones, ya que este programa mantiene el centro activo de la integrina fijo, así como la estructura de ciclo de nuestros compuestos permitiendo moverse libremente solo a las cadenas laterales. Por tanto, estos valores, solo nos van a permitir tener una idea orientativa sobre la actividad de los compuestos en comparación con el compuesto de referencia, el Cilengitide®.

### 3.7. Síntesis del Cilengitide

Una vez realizado el estudio conformacional de los 4 compuestos, se procedió a sintetizar el Cilengitide® para utilizarlo como referencia tanto en el estudio de la actividad biológica como en el posterior ensayo génico de los compuestos. La síntesis del compuesto fue llevada conjuntamente por nosotros y el doctor Joseba Oyarbide según el procedimiento descrito en la bibliografía<sup>91</sup> que se indica a continuación (Esquema 3.42).

---

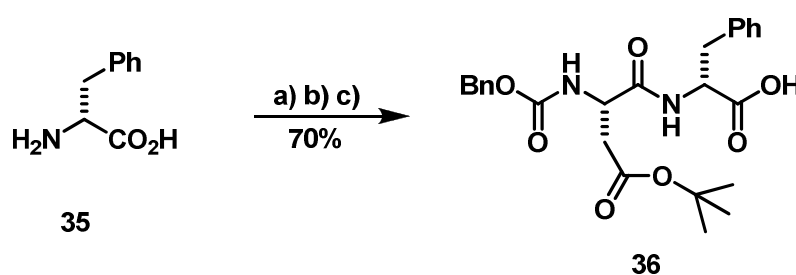
<sup>91</sup> a) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzeman, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033. b) R. M. Freidinger, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77.



Esquema 3.42. a) Paraformaldehído, p-Tos-OH,  $C_6H_5CH_3$  Dean-Stark 30' b)  $Et_3SiH$ , TFA,  $CHCl_3$ , t.a. 22h c) H-Arg(Pbf)-Gli-OBn, EEDQ,  $CH_2Cl_2$  -15°C->r.t. 16h d) Piperidina, DMF t.a. 20' e) Z-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-D-Phe-OH, HATU,  $KHCO_3$ , DMF, 0°C-> t.a. 16h f)  $H_2$ , Pd/C 20%, MeOH t.a. 2h g) HATU, HOAT, DIPEA, DMF -15°C 24h h) TFA, 30°C 2h ->Diisopropileter

Para ello se partió de la Fmoc-L-Valina comercial, se disolvió en tolueno y se le añadió paraformaldehído y ácido paratoluensulfónico. La mezcla se llevó a reflujo durante 30 minutos en un sistema Dean-Stark, pasado ese tiempo se enfrió el sistema y tras los lavados ácidos y básicos se obtuvo el compuesto **30** con un rendimiento del 96%. Dicho compuesto se disolvió en cloroformo y ácido trifluoroacético y se le añadió trietilsilano, la mezcla se agitó

a temperatura ambiente durante 22h y tras cristalización con éter se obtuvo el compuesto **31** con un rendimiento cuantitativo. El siguiente paso es el acoplamiento peptídico entre el dipéptido H-Arg(Pbf)-Gli-OBn cuya síntesis ha sido abordada anteriormente en esta tesis, y el compuesto **31** utilizando el reactivo de acoplamiento 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) en diclorometano a -15 °C durante 16 horas. Tras purificar el compuesto mediante columna cromatográfica se obtuvo el producto **32** con un rendimiento del 50%. Tras desproteger el grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) mediante piperidina en DMF se procedió a acoplarle el Z-Asp(OtBu)-D-Phe-OH cuya síntesis se resume en el Esquema 3.46.



Esquema 3.43. a) AcCl, MeOH, 65 °C 2h b) Z-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, EDC, HOBT, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t, a, 16h c) NaOH, H<sub>2</sub>O/THF

El acoplamiento del compuesto **36** con el compuesto **32** desprotegido, utilizando HATU como agente acoplante y carbonato potásico como base en DMF nos condujo tras purificación en columna cromatográfica al producto **33** con un rendimiento del 66%. Una vez llegados a este punto se procedió a la desprotección selectiva de los grupos protectores bencilo presentes en ambos extremos de la cadena peptídica mediante hidrogenólisis y el producto obtenido se usó en la siguiente etapa de ciclación sin mayor purificación. La ciclación se llevó a cabo en condiciones de alta dilución usando HATU, HOAt y DIPEA en DMF a -15 °C durante 24 horas, obteniendo tras purificación en columna el producto **34** con un rendimiento del 70%. Como última etapa en la síntesis del Cilengitide se procedió a desproteger los grupos protectores 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) y el grupo terc-butilo en trifluoroacético a 30 °C durante dos horas. La sal correspondiente se hizo precipitar con éter diisopropílico y se lavó con metanol, centrifugando la suspensión para aislar el producto, obteniendo el Cilengitide® I con un rendimiento del 90%. Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con los de la bibliografía<sup>6</sup>.



### **3.8. Estudio de la actividad biológica de ciclopeptidos $\beta$ -lactámicos tipo RGD**

Una vez estudiadas las energías de Docking de los cuatro compuestos **28a-d** y viendo que estos presentaban, en la mayoría de los casos, valores similares o mejores que el compuesto de referencia, procedimos a verificar estos resultados experimentalmente. Para ello realizamos un estudio de la actividad biológica de los compuestos, a fin de constatar y contrastar los valores obtenidos teóricamente con los obtenidos experimentalmente.

Los ensayos consistieron en cultivar células HUVEC sobreexpresadas en la integrina  $\alpha v \beta_3$  en placas petri de superficie funcionalizada con vitronectina, bajo condiciones atmosféricas, de pH y temperatura adecuadas para obtener una capa de células homogénea. Seguidamente, se aplicó tripsina (una enzima proteolítica) para romper la interacción de los receptores celulares con la vitronectina, permitiendo la liberación de la capa celular. Las células fueron colocadas en placas de cultivo que contenían diferentes concentraciones de los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos **28a-d**. Como referencia se empleó el Cilengitide® I, el cual fue sintetizado previamente en nuestro laboratorio. A continuación se volvieron a cultivar las células así tratadas en las condiciones originales durante 20 minutos en otra placa idéntica a la inicial de tal forma que sólo las células cuyos receptores no habían sido bloqueados por los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos pudieran adherirse a la placa funcionalizada con vitronectina. La comparación del número de células adheridas inicialmente frente a las adheridas tras ser tratadas con distintas concentraciones de dichos ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos proporcionó los valores de inhibición de adhesión celular (Figura 3.46).

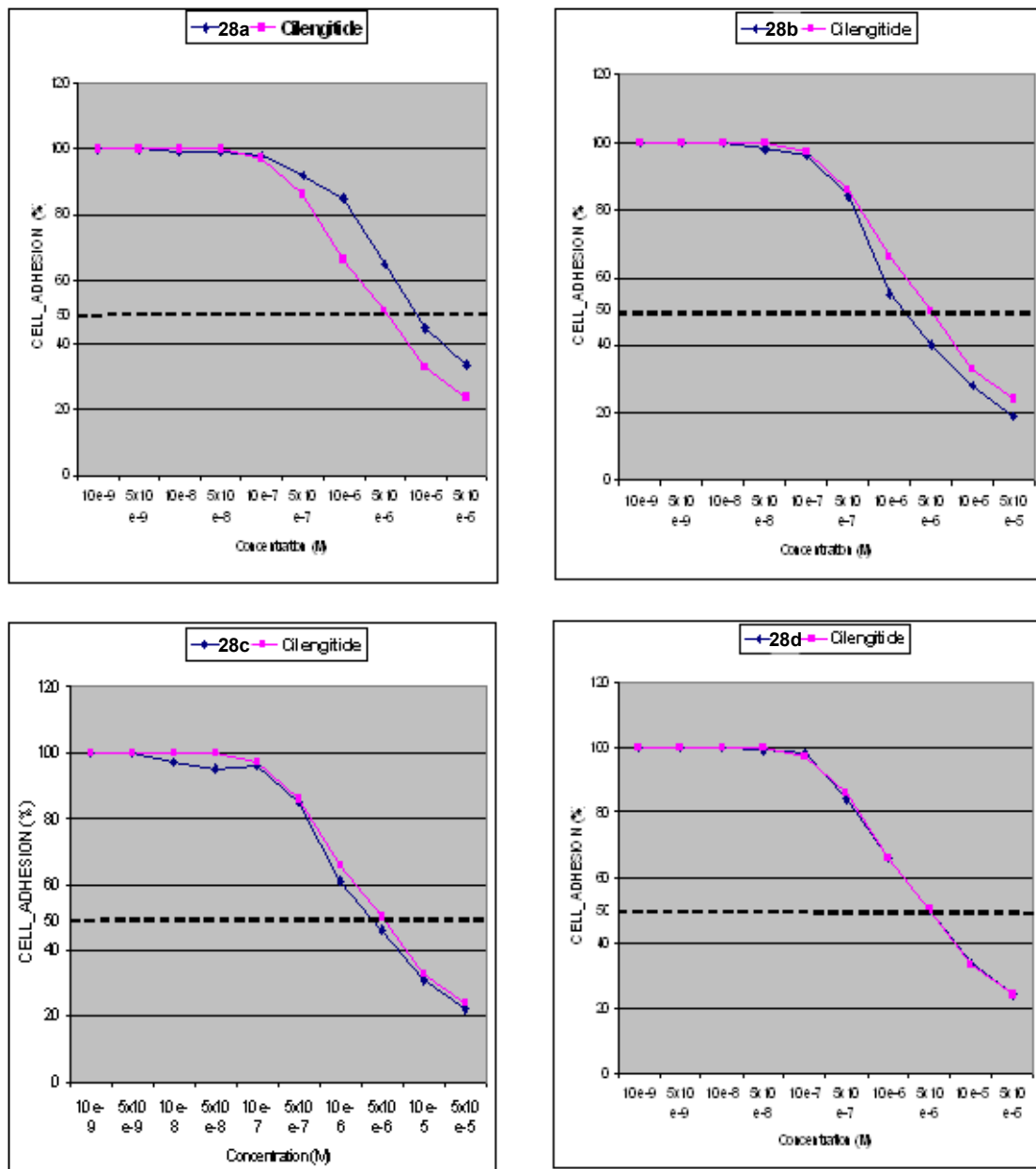


Figura 3.46. **Gráficas de inhibición de la adhesión sobre vitronectina de células HUVEC sobreexpresadas en integrina  $\alpha V\beta 3$  mediante la adición de los ciclopéptidos RGD 28a, 28b, 28c y 28d (color azul), comparadas con la inhibición del cilengitide (color rosa) en las que la ordenada representa el % de inhibición y la abcisa la concentración del correspondiente ciclopéptido RGD.**

El valor de  $IC_{50}$  para este ensayo se determinó midiendo la concentración mínima de ciclopéptido necesaria para reducir el porcentaje de adhesión celular al 50% (marcado punteado en las gráficas de la Figura 3.46) y se comparó con el del Cilengitide **I** que presentó una  $IC_{50}$  consistente con los datos descritos en la bibliografía<sup>92</sup>.

Los valores de  $IC_{50}$  para los diferentes compuestos fueron: el Cilengitide presentó un  $IC_{50}$  de 5  $\mu$ M, el compuesto **28b** presentó un valor de 1  $\mu$ M, el compuesto **28a** presentó un valor de 10  $\mu$ M el compuesto **28d** presentó un valor de 5  $\mu$ M y el compuesto **28c** presentó un valor de 4  $\mu$ M.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la  $IC_{50}$  del ciclomimético  $\beta$ -lactámico de RGD **28b** frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  es menor que el del Cilengitide (**I**), por lo que la sustitución del grupo bencilo por el (S) propanodiol, en posición trans con la  $\beta$ -lactama afecta positivamente a la inhibición. Este compuesto presenta una potencia de inhibición de 4 a 5 veces mayor que el compuesto de referencia Cilengitide **I**.

Por el contrario, los  $IC_{50}$  de los compuestos **28c** y **28d** frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  presentan el mismo valor (**28d**) o un valor ligeramente inferior (**28c**) que el compuesto de referencia **I**. Por último, el peor resultado se obtiene al medir el  $IC_{50}$  del compuesto **28a**, ya que presenta un valor superior al compuesto de referencia.

Viendo estos resultados y comparándolos con los resultados obtenidos teóricamente se comprueba que existen algunas similitudes y también diferencias. Así, el compuesto **28a** es el que presenta menor actividad y el compuesto **28c** presenta una actividad ligeramente superior al Cilengitide (parecido al análisis de Docking). Por contra, contradiciendo los valores teóricos, el compuesto **28d** presenta la misma actividad que el Cilengitide,

---

<sup>92</sup> a) M. Kawaguchi, R. Hosotani, S. Ohishi, N. Fujii, S. S. Tulachan, M. Koizumi, E. Toyoda, T. Masui, S. Nakajima, S. Tsuji, J. Ida, K. Fujimoto, M. Wada, R. Doi, M. Imamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 288, 711.

mientras que el compuesto **28b** presenta una actividad mayor. Como ya hemos indicado anteriormente, estos resultados vienen a confirmar que los cálculos de Docking realizados son orientativos, aunque válidos en cierta medida.

A la vista de los resultados, si representamos los cuatro compuestos en el espacio (Figura 3.47) introduciendo a la  $\beta$ -lactama del CPP en la intersección de los dos planos (vertical y horizontal) manteniendo la estructura del CPP de RGD dentro del plano vertical, podremos observar que el grupo diol de cada compuesto **28a-d** cubre espacialmente cada uno de los cuadrantes formados por la intersección de los dos planos.

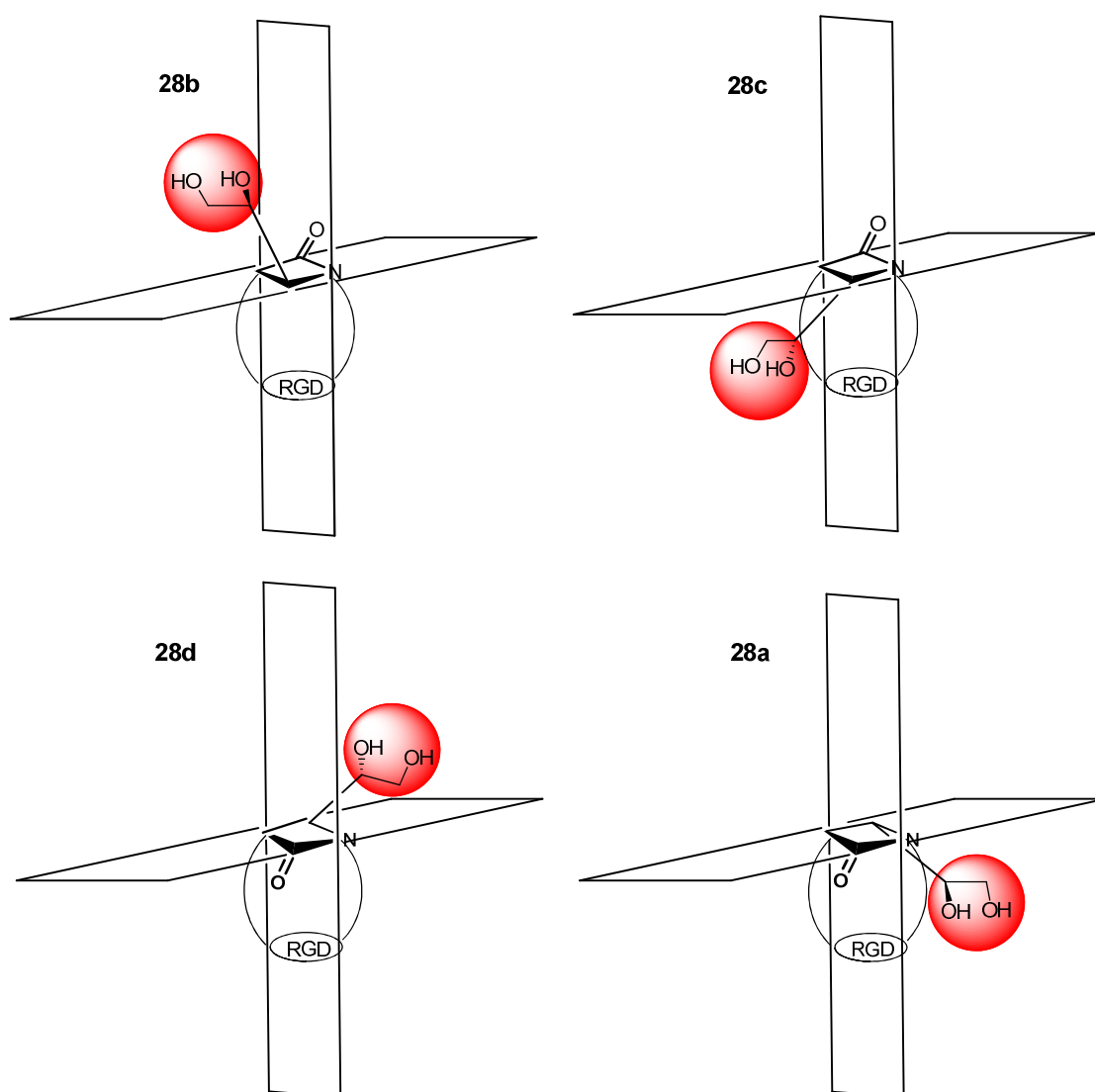
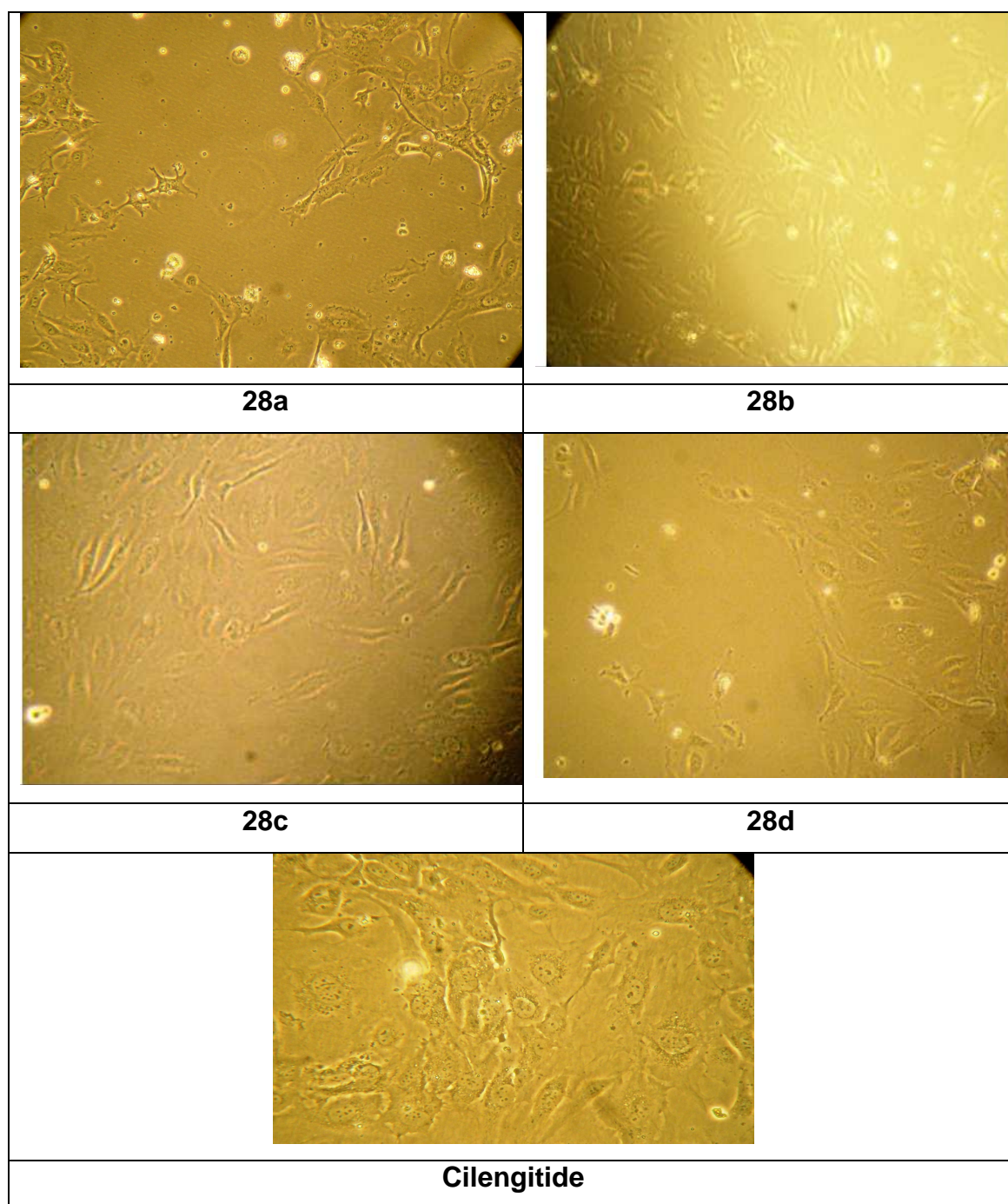


Figura 3.47. Disposición espacial del grupo de reconocimiento hidrofílico en los compuestos 28a-d

Así, el grupo diol del compuesto **28b** cubriría espacialmente el cuadrante superior anterior dentro del centro activo de la integrina, el grupo diol del compuesto **28a** el cuadrante inferior posterior, el grupo diol del compuesto **28d** el cuadrante superior posterior y el grupo diol del compuesto **28c** el cuadrante inferior anterior. Si por orden de inhibición, el compuesto más activo es el **28b** seguido por los compuestos **28c**, **28d** y por último el **28a** parece obvio indicar que el grupo diol del compuesto **28b** interacciona con un pocket hidrofílico del centro activo de la integrina situado espacialmente en ese cuadrante.

Además la presencia del pocket hidrofílico en ese cuadrante viene reforzado por los datos de inhibición de los demás compuestos. El grupo diol de los compuestos **28c** y **28d** podría interactuar parcialmente con ese receptor hidrofílico presente en el primer cuadrante. Por último, los datos de inhibición del compuesto **28a** no hacen sino certificar esta teoría. Este compuesto presenta la peor inhibición, ya que al encontrarse el grupo diol del compuesto en el cuadrante inferior trasero, es físicamente imposible que interaccione con el pocket hidrofílico presente espacialmente en el cuadrante superior delantero.

Una vez realizado el ensayo de inhibición de adhesión de los compuestos **28a-d** se comprobó que estos compuestos no presentaban ninguna toxicidad, ya que no aparecían signos de muerte celular, tampoco se observaron transformaciones morfológicas (como la formación de vesículas) ni destrucción celular y las células presentaban una proliferación y un comportamiento normal. En la Figura 3.48 se muestra las imágenes de las células una vez realizado el ensayo.



**Figura 3.48.** Imagen de las células HUVEC tras el ensayo del test de adhesión con los compuestos 28a-d y el Cilengitide

### 3.9. Análisis génico del compuesto 28b

Una vez realizados los ensayos de inhibición, y con el fin de avanzar en la comprensión de los mecanismos intracelulares que se activan tras interaccionar nuestros compuestos con el dominio extracelular de los receptores, se pasó a estudiar el efecto de dicha interacción en la actividad génica (Figura 3.49).

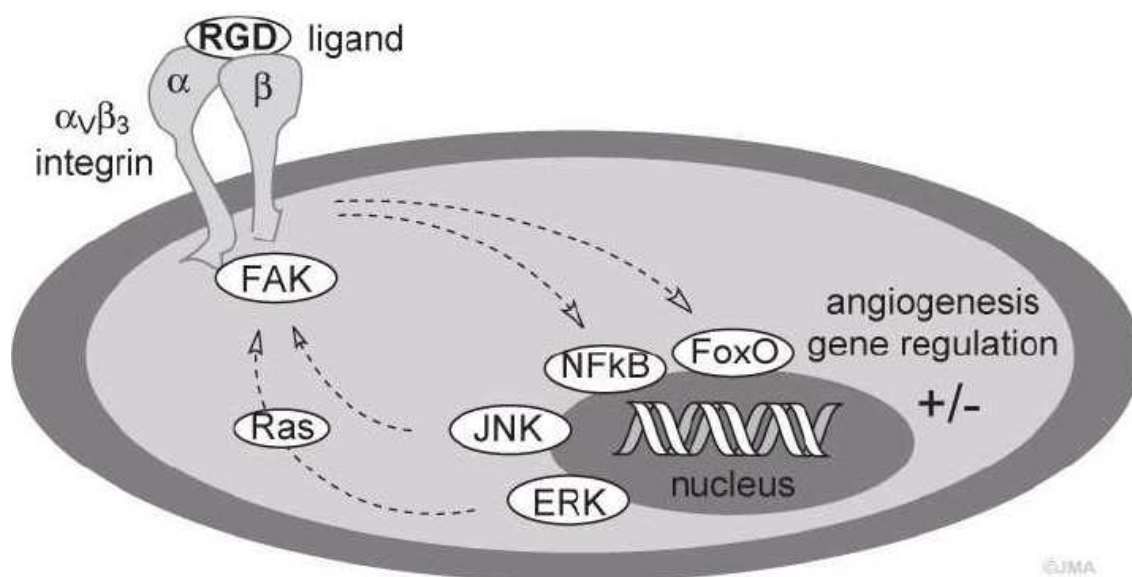


Figura 3.49. Esquema general de la interacción de un compuesto con la integrina y la transducción de la señal al interior de la célula

A pesar de que hoy en día se desconocen los mecanismos que se ponen en funcionamiento cuando los dominios extracelulares de una integrina interaccionan con un ligando RGD, es posible conocer las variaciones de expresión génica causadas por la cascada de señalización intracelular generada por la misma. En este sentido, el análisis por microarrays<sup>93</sup> es una técnica estandarizada para el análisis de la expresión génica, que se ha utilizado para determinar la actividad angiogénica y por tanto, está siendo

<sup>93</sup> a) A.Saidi, S. Javerzat, A. Bellahcene, J. De Vos, L. Bello, V. Castronovo, M. Deprez, H. Loiseau, A. Bikfalvi, M. Hagerdon, *Int. J. Cancer* **2008**, 122, 2187. b) R. Cavill, J. K. Sidhu, W. Kilarski, S. Javerzat, M. Hagerdon, T. M. D. Ebbels, A. Bikfalvi, H. C. Keun, *J. Proteome. Res.* **2010**, 9, 3126. c) V. G. Tusher, R. Tibshirani, R. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 5116.

utilizada durante estos últimos años como técnica complementaria para el estudio de diferentes tipos de enfermedades como el cancer...

Para realizar el ensayo, de entre los cuatro compuestos sintetizados **28a-d**, se eligió el compuesto **28b** por presentar el mejor resultado en el ensayo de inhibición. Se escogió también el compuesto de referencia **I**, (Cilengitide) y por último un compuesto sintetizado por el doctor Joseba Oyarbide bajo la supervisión de Jesús María Aizpurua (compuesto **35**). Este último compuesto presentaba la peculiaridad de ser un tetrapéptido  $\beta$ -lactámico de RD en el cual se había eliminado el residuo de la glicina (Figura 3.50) y presentaba una inhibición de la adhesión ligeramente mayor que el Cilengitide<sup>94</sup>. Este último compuesto (el tetrapéptido) actuaba como control negativo.

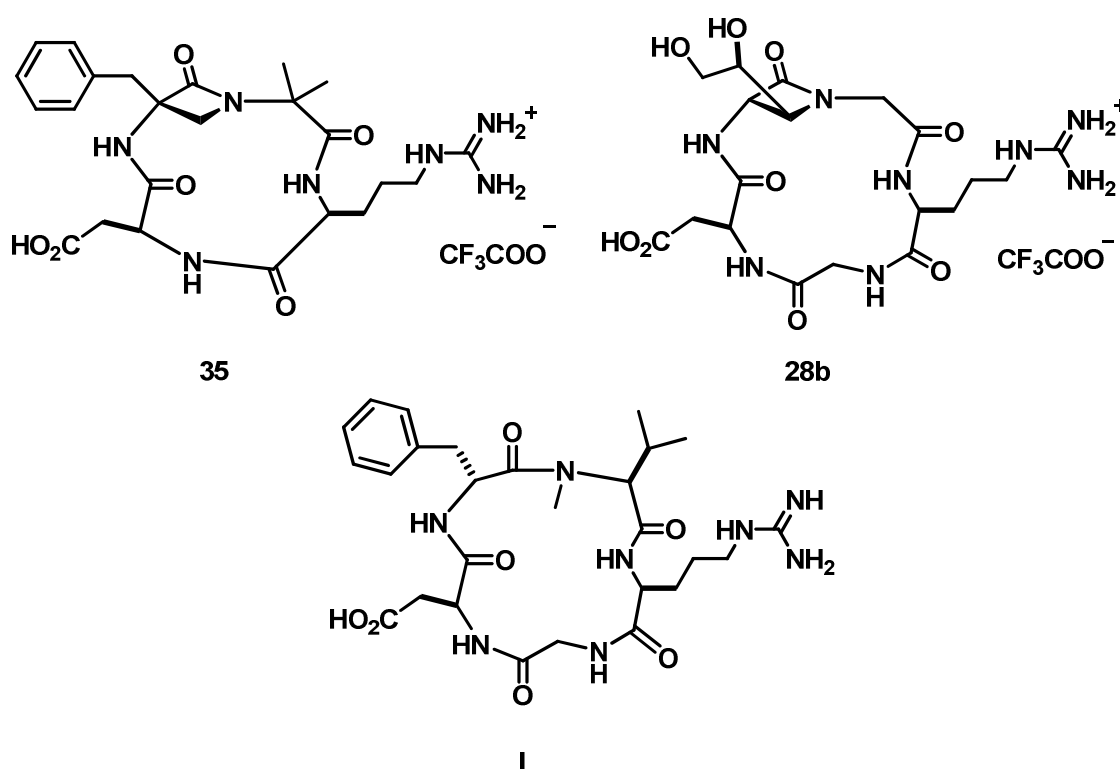


Figura 3.50. Compuestos seleccionados para realizar el ensayo de expresión génica

El ensayo se realizó en la empresa Genetadi Biotech S. L. (Parque Tecnológico de Bizkaia). Para estudiar los efectos intracelulares causados por

<sup>94</sup> J. Oyarbide, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Diseño, síntesis y estudio conformacional de ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD" **2010**, pág 117.



los compuestos de RGD, se realizó un ensayo de expresión génica a un cultivo celular entero. Células HUVEC fueron tratadas separadamente con una concentración  $10^{-2}$  mM del Cilengitide, el compuesto **28b** y el compuesto **35** durante 48 horas. Para medir y analizar los datos se utilizó un array de CGH y expresión génica G2505-B.

El análisis simultáneo de todas las expresiones génicas humanas por microarray, nos permitió identificar qué genes humanos eran inducidos, inhibidos o afectados después de que los compuestos de RGD interaccionaran con los receptores de integrina  $\alpha_v\beta_3$  de las células HUVEC (Figura 3.51). Posteriormente se seleccionó un set específico de 17 genes relacionados con la angiogénesis y la adhesión celular. Diez de estos genes fueron activados y siete de estos genes fueron inhibidos después del tratamiento con el Cilengitide. Un comportamiento similar presenta el compuesto **28b** ya que tiene el mismo comportamiento en 15 de los 17 genes analizados. La diferencia en el comportamiento de los dos genes, indica la gran especificidad de la actividad celular “in vivo” después de la interacción entre el receptor y el ligando. Estos compuestos actúan como antagonistas de la angiogénesis.

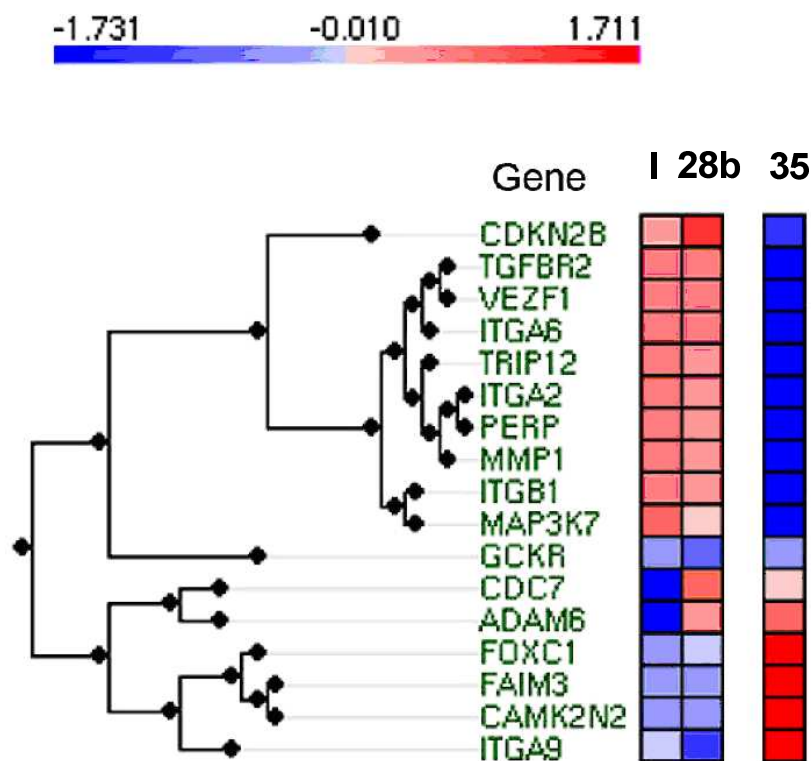


Figura 3.51. Datos de expresión génica de los compuestos I, 28b y 35

Por último, cabe destacar el comportamiento en la expresión génica del compuesto **35** después del tratamiento con el receptor de las células. Dicho compuesto presenta una actividad inhibitoria ligeramente superior al Cilengitide, pero al contrario de este, tiene un comportamiento totalmente contrario. Estos dos compuestos difieren en 15 de los 17 genes analizados. Así, todo gen activado por el Cilengitide, es inhibido por el compuesto **35** y viceversa. Por tanto el comportamiento del tetrapéptido es el de un agonista de la angiogénesis.

En vista de estos resultados podemos extraer las siguientes conclusiones. Por una parte, la gran especificidad del centro activo de la integrina para desencadenar diferentes tipos de mecanismos intercelulares. Por ejemplo, tanto el compuesto **28b** como el compuesto **1** a pesar de tener una estructura similar, presentan ligeras variaciones en la expresión génica. Por otra parte, la segunda conclusión a resaltar, trata sobre la insuficiencia de los test de adhesión celular a la hora de valorar el comportamiento antiangiogénico de los compuestos. El compuesto **35** a pesar de presentar una inhibición celular superior al Cilengitide, desencadena mecanismos intracelulares totalmente opuestos. Mientras el Cilengitide actúa como un antagonista de la angiogénesis, el compuesto **35** actúa como un agonista de la angiogénesis. Por tanto, queda demostrado la necesidad del uso combinado de estas dos técnicas (el ensayo de inhibición de adhesión junto con el ensayo de la expresión génica) para obtener información mucho más precisa acerca del comportamiento de un compuesto y los mecanismos internos que este desencadena en las células una vez interacciona con los receptores de membrana.



## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1. Materiales y métodos**

#### **4.1.1. Sistemas, disolventes y reactivos**

De forma general, las reacciones que requieren condiciones anhidras se llevaron a cabo en sistemas de vidrio secados en horno (120°C), bajo atmósfera de nitrógeno y usando técnicas convencionales de transferencia con jeringa. Los disolventes anhidros empleados en las reacciones se prepararon empleando técnicas habituales<sup>95</sup>. El Et<sub>2</sub>O y el THF se destilaron en presencia de sodio metal y benzofenona como indicador antes de su utilización. El CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el acetonitrilo se secaron por destilación sobre CaH<sub>2</sub>. El tolueno anhidro, adquirido de la casa Panreac, se almacenó sobre sodio hilado. La DMF se secó por destilación sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se almacenó sobre tamiz molecular de 4Å.

Los disolventes utilizados como eluyentes en cromatografía de columna fueron de calidad industrial y se purificaron previamente por destilación. Los disolventes comerciales EtOH, iPrOH, MeOH y hexano de grado HPLC fueron empleados sin destilación previa.

La eliminación de los disolventes a presión reducida se efectuó en rotavapores Büchi R-110 y R-200.

Los reactivos químicos y los agentes de acoplamiento utilizados se adquirieron de diferentes casas comerciales (Aldrich, Merck, Acros, Fluka, Alfa Aesar, TCI, etc.) y se utilizaron sin purificación a no ser que se especifique lo contrario.

---

<sup>95</sup> D. D. Perrin, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals* **1989**, (Pergamon Press, Oxford, 2ª edición).

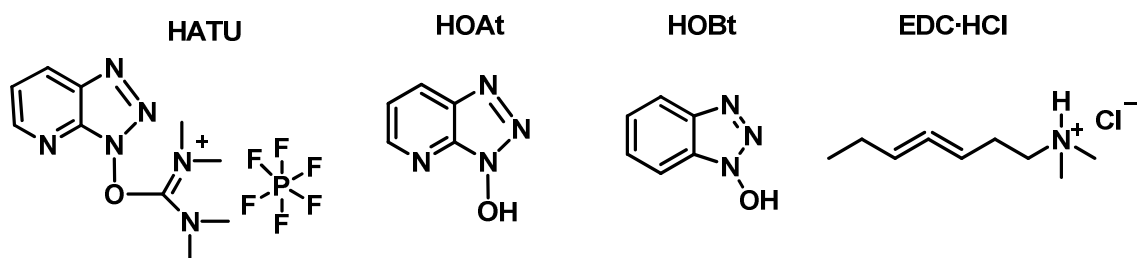


Figura 4.1. Diferentes agentes de acoplamiento usados en esta Tesis

#### 4.1.2. Cromatografía

La purificación de los productos de reacción se llevó a cabo en cromatografía de columna utilizando gel de sílice Merck 60 230–400 mesh (0.040–0.063 mm) como fase estacionaria. La gel de sílice básica se preparó mediante agitación mecánica de gel de sílice ácida comercial con una disolución saturada de bicarbonato sódico (300 mL de disolución por 100 g de gel de sílice) y posterior filtrado y evaporación del agua residual en un horno a 80°C durante 72 h.

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice soportada sobre placas de aluminio (TLC) (Merck, Kieselgel 60 F–254). El revelado se realizó con luz ultravioleta ( $\lambda=254$  nm) y por calefacción en contacto con una disolución preparada a partir de agua (470 mL), molibdato amónico (21 g), sulfato de cerio (1 g), y ácido sulfúrico concentrado (31 mL).

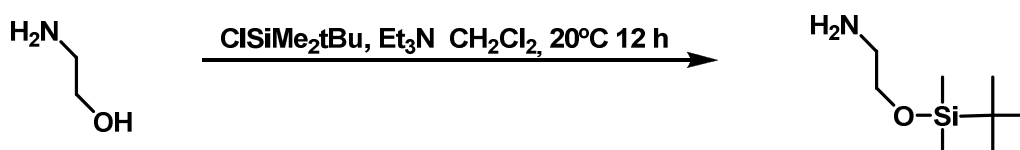
#### 4.1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN fueron registrados en espectrómetros Varian Gemini 200, Bruker Advance–DPX–300 y Bruker Advance–500. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), salvo que se especifique lo contrario. Los valores de desplazamientos químicos se expresan en unidades  $\delta$  (ppm) respecto a la señal interna del  $\text{CHCl}_3$  residual,  $\delta = 7.27$  ppm para  $^1\text{H}$  RMN y  $\delta = 77.0$  ppm para  $^{13}\text{C}$  RMN.

#### 4.1.4. Polarimetría, puntos de fusión, IR, análisis elemental y masas exactas

Los valores de rotación óptica fueron medidos en un polarímetro Perkin–Elmer 243B a  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  y se expresan como valores específicos ( $[\alpha]$ ) con indicación de disolvente y la concentración utilizados (g/mL). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP–20 y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Nicolet Avatar 360 FT–IR. Los análisis elementales se realizaron en un aparato Leco CHNS–932. La medición de las masas exactas se realizó por inyección directa en un espectrómetro de masas Micromass con un analizador de tiempo de vuelo (TOF).

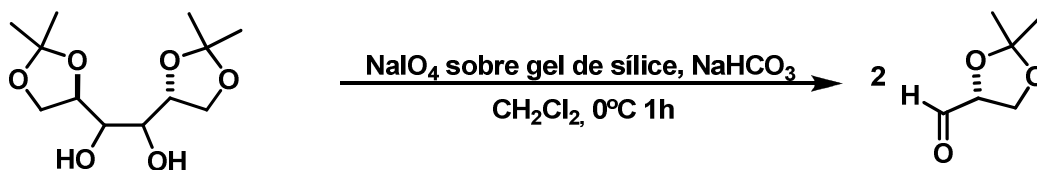
#### 4.2. Síntesis de la 2-(terc-butildimetilsililo)etanolamina<sup>96</sup>



Sobre una disolución de la etanolamina (200 mmol, 27.8 mL) y TEA (400 mmol, 56 mL) en diclorometano seco (275 mL), en atmósfera de N<sub>2</sub>, se añadió gota a gota una disolución de <sup>t</sup>BuMe<sub>2</sub>SiCl (200 mmol, 30.1 g) en diclorometano seco (275 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se lavó con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (200 mL). Se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x100 mL) y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida tras lo cual se obtuvo un crudo que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación.

<sup>96</sup> M. Kurosu, M. Michio, R. Lawrence, T. J. Grinsteiner, K. Yoshito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6627.



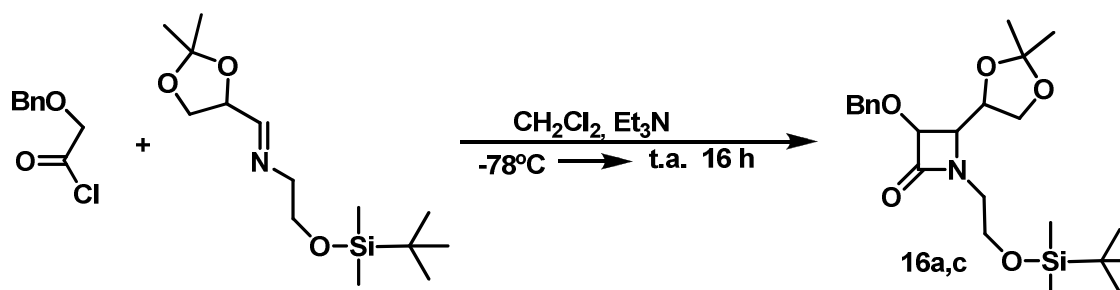
**4.3. Síntesis del (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-carbaldehído<sup>97</sup>**

Se enfrió una suspensión de 23 g de periodato sódico sobre sílica gel en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) a  $0^\circ\text{C}$ . A esta mezcla se le añadió una disolución de 1,2:5,6-Di-O-isopropiliden-D-manitol (10 mmol, 2.63 g) y  $\text{NaHCO}_3$  (2.5 g) disuelta en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL). La reacción se mantuvo a  $0^\circ\text{C}$  bajo intensa agitación durante 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se filtró sobre una placa filtrante y se lavó la sílica con más  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x40 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se evaporó a presión reducida tras lo cual se obtuvo un crudo que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación.

<sup>97</sup> K. A. Ahrendt, R. M. Williams, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4539.

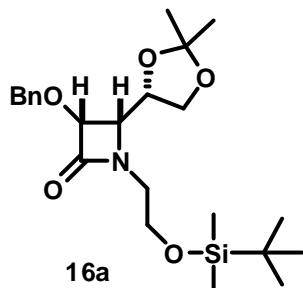
#### 4.4. Procedimiento general de síntesis de las $\beta$ -Lactamas 16a,c. Reacción de Staudinger

##### RUTA A



Sobre una disolución del correspondiente aldehído (6.1 mmol, 790 mg) en diclorometano (30 mL) a 0 °C se adicionó la etanolamina sililada (6.1 mmol, 1 g) y tamiz molecular (4Å). La mezcla de reacción fue agitada durante 60 minutos a la misma temperatura. Pasado ese tiempo se adicionó vía cánula a otro matraz bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La disolución se enfrió a -78 °C y se añadió trietilamina (12.2 mmol, 1.82 mL). A continuación se adicionó gota a gota y a la misma temperatura una disolución del cloruro de benciloxiacetilo (6.1 mmol, 1 mL) comercial disuelto en diclorometano (20 mL). Una vez finalizada la adición se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente manteniéndola en agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se adicionó agua (30 mL), la fase orgánica se decantó, se lavó sucesivamente con una disolución 0.1N de HCl (30 mL) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La evaporación del disolvente a presión reducida dio lugar a la correspondiente  $\beta$ -lactama que fue convenientemente purificada mediante cromatografía líquida sobre gel de sílice básica (EtOAc : Hex / 95 : 5)

**4.4.1. (3R,4S)-3-Benciloxi-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona**



Fórmula empírica:  $C_{23}H_{37}NO_5Si$

Peso Molecular: 435.63

Rendimiento: 68% (1.9 g); aceite.

$[\alpha]_D^{25} = -56.36^\circ$  (c= 0.5  $CH_2Cl_2$ ).

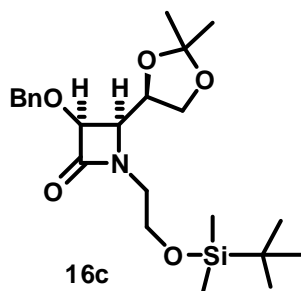
IR( $cm^{-1}$ , KBr): 2985, 2953, 2928, 2856, 1761.

$^1H$ -NMR ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): **7.30** (5H, m, arom.); **4.89** (1H, d, H, BnO  $J=11.7Hz$ ); **4.61** (1H, d, H, BnO  $J=11.7Hz$ ); **4.58** (1H, d,  $H^{\alpha}_R[\beta-lac]$   $J=5.1Hz$ ); **4.29** (1H, m,  $H_S$ dioxo); **4.11** (1H, dd,  $CH_2$ -dioxo  $J=6.7Hz$ ,  $J=8.7Hz$ ); **3.75** (2H, t,  $CH_2$ -O-Si,  $J=6.1Hz$ ); **3.68** (1H, dd,  $H^{\beta}_S[\beta-lac]$ ,  $J=5.1Hz$ ,  $J=8.9Hz$ ); **3.60** (1H, dd,  $CH_2$ -dioxo  $J=6.6Hz$ ,  $J=8.7Hz$ ); **3.53** (1H, m, N- $CH_2$ ); **3.30** (1H, m, N- $CH_2$ ); **1.40** (3H, s,  $CH_3$ -dioxo); **1.31** (3H, s,  $CH_3$ -dioxo); **0.86** (9H, s,  $tBu$ ); **0.02** (6H, s,  $CH_3$ -Si- $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR: 167.8, 136.8, 128.5, 128.0, 127.8, 109.6, 80.6, 77.2, 72.8, 66.8, 60.9, 59.9, 45.9, 26.9, 26.4, 25.2, 18.2, -5.3.

#### 4.4.2. (3S,4R)-3-Benziloxi-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona

Se utilizó el mismo procedimiento general de síntesis utilizado en el apartado 4.4 a partir del (S)2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-carbaldehído



Fórmula empírica: C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>Si

Peso Molecular: 435.63

Rendimiento: 70% (1.9 g); aceite.

$[\alpha]_D^{25} = +55.83^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

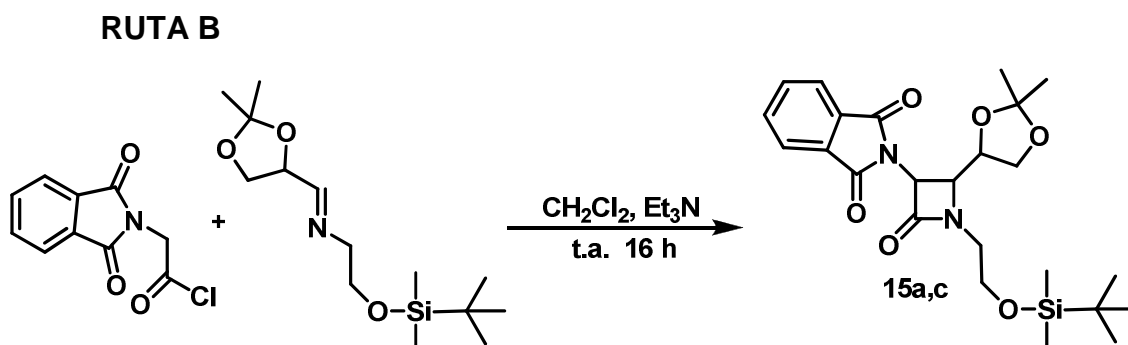
IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2985, 2953, 2928, 2856, 1761.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.30** (5H, m, arom.); **4.89** (1H, d, H<sub>i</sub>, BnO J=11.7Hz ); **4.61** (1H, d, H<sub>i</sub>, BnO J=11.7Hz); **4.58** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac] J=5.1Hz); **4.29** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.11** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.7Hz, J=8.7Hz); **3.75** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=6.1Hz); **3.68** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac], J=5.1Hz, J=8.9Hz); **3.60** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.6Hz, J=8.7Hz); **3.53** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.30** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.40** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.31** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.86** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.02** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 167.8, 136.8, 128.5, 128.0, 127.8, 109.6, 80.6, 77.2, 72.8, 66.8, 60.9, 59.9, 45.9, 26.9, 26.4, 25.2, 18.2, -5.3.

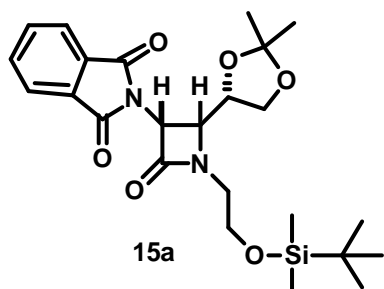
#### 4.5. Procedimiento general de síntesis de las $\beta$ -Lactamas 15a,c.

##### Reacción de Staudinger



Sobre una disolución del correspondiente aldehído (6.1 mmol, 790 mg) en diclorometano seco (30 mL) a 0 °C se adicionó la etanolamina sililada (6.1 mmol, 1 g) y tamiz molecular (4Å). La mezcla de reacción fue agitada durante 60 minutos a la misma temperatura. Pasado ese tiempo se adicionó vía cánula a otro matraz bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Se dejó que la disolución alcanzara la temperatura ambiente y se añadió TEA. (12.2 mmol, 1,82 mL). A continuación se adicionó gota a gota y a la misma temperatura una disolución de cloruro de ftaloilglicina (6.1 mmol, 1.4 g) comercial disuelto en diclorometano seco (20 mL). Una vez finalizada la adición se dejó la mezcla en agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se adicionó agua (30 mL), la fase orgánica se decantó, se lavó sucesivamente con una disolución 0.1N de HCl (30 mL) y una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación del disolvente a presión reducida dio lugar a la correspondiente  $\beta$ -lactama que fue convenientemente purificada mediante cromatografía líquida con gel de sílice básica (EtOAc : Hex / 95 : 5).

**4.5.1. (3R,4S)-3-Ftalimidoil-1-[2-(terc-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si

Peso Molecular: 474.62

Rendimiento: 77% (2.2 g); aceite.

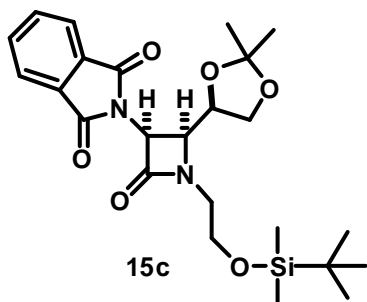
$[\alpha]_D^{25} = -70.54^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2985, 2954, 2930, 2884, 2857, 1768, 1724.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.87** (2H, m, arom.); **7.78** (2H, m, arom) **5.31** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac] J=5.3Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **3.95** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac], J=5.3Hz, J=9.1Hz); **3.84** (2H, dt, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=1.6Hz, J=6.0Hz, J=5.8Hz); **3.72** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=5.9Hz, J=12.1Hz); **3.66** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.42** (2H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, N-CH<sub>2</sub>); **1.39** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.25** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.90** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.06** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 167.2, 163.5, 134.9, 131.3, 124.0, 110.1, 76.3, 66.0, 61.9, 60.0, 54.9, 44.4, 26.8, 26.0, 25.3, 18.3, -5.2, -5.3.

**4.5.2. (3S,4R)-3-Ftalimidoil-1-[2-(terc-butildimetilsililoxi)etil]-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si

Peso Molecular: 474.62

Rendimiento: 75% (2.1 g); aceite.

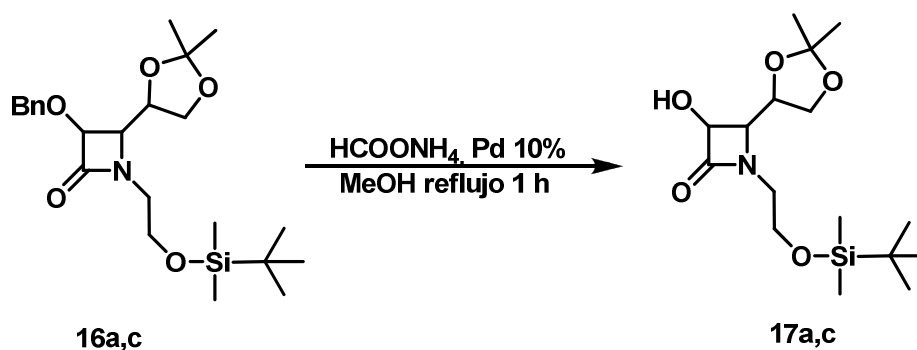
$[\alpha]_D^{25} = +68.94^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2985, 2954, 2930, 2884, 2857, 1768, 1724.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.87** (2H, m, arom.); **7.78** (2H, m, arom) **5.31** (1H, d, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lac] J=5.3Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **3.95** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lac], J=5.3Hz, J=9.1Hz); **3.84** (2H, dt, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=1.6Hz, J=6.0Hz, J=5.8Hz); **3.72** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=5.9Hz, J=12.1Hz); **3.66** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.42** (2H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, N-CH<sub>2</sub>); **1.39** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.25** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.90** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.06** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 167.2, 163.5, 134.9, 131.3, 124.0, 110.1, 76.3, 66.0, 61.9, 60.0, 54.9, 44.4, 26.8, 26.0, 25.3, 18.3, -5.2, -5.3.

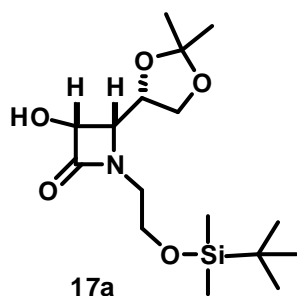
**4.6. Procedimiento general para la desprotección del grupo bencilo en 17a,c**



Sobre una disolución de la correspondiente  $\beta$ -lactama (5 mmol, 2.2 g) en metanol (50 mL) y bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó formiato amónico (31 mmol, 2.0 g) y paladio al 10% sobre carbono (1.8 g) y la suspensión resultante se calentó a reflujo durante una hora. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre celita, se diluyó con diclorometano (75 mL) y se lavó con HCl 0.1N (25 mL). La fase orgánica fue separada y secada con  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue cristalizado en hexano.



**4.6.1. (3R,4S)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-hidroxi-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>Si

Peso Molecular: 345.19

Rendimiento: 96% (1.6g).

$[\alpha]_D^{25} = -66.40^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3261, 2987, 2955, 2937, 2895, 2858, 1720.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.80** (1H, d, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac] J=4.9 Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.18** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=7.00Hz, J=8.83Hz); **3.91** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac], J=5.2Hz, J=8.9Hz); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=7.0Hz, J=8.8Hz); **3.73** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.6Hz); **3.60** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.24 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.33** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.86** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.03** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 170.8, 109.9, 76.8, 75.3, 66.7, 62.2, 60.2, 43.6, 26.8, 25.9, 25.2, 18.3, -5.3.

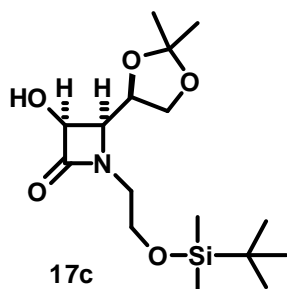
**Punto de fusión:** 142°C (cristalizado en hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 55.62; H, 9.04; N, 4.05.

**Encontrado:** C, 55.38; H, 9.20; N, 4.00.

**4.6.2. (3S,4R)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-hidroxi-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>Si

Peso Molecular: 345.19

Rendimiento: 95% (1.6g).

$[\alpha]_D^{25} = +65.13^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3261, 2987, 2955, 2937, 2895, 2858, 1720.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.80** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac] J=4.9Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.18** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=7.00Hz, J=8.83Hz); **3.91** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac], J=5.2Hz, J=8.9Hz); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=7.0Hz, J=8.8Hz); **3.73** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.6Hz); **3.60** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.24** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.33** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.86** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.03** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 170.8, 109.9, 76.8, 75.3, 66.7, 62.2, 60.2, 43.6, 26.8, 25.9, 25.2, 18.3, -5.3.

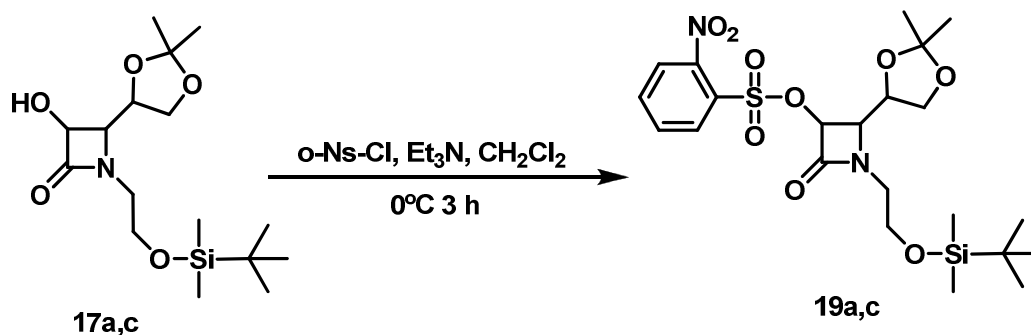
**Punto de fusión:** 142°C (cristalizado en hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 55.62; H, 9.04; N, 4.05.

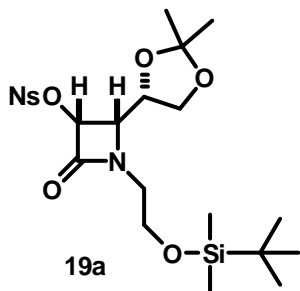
**Encontrado:** C, 55.46; H, 9.12; N, 4.00.

**4.7. Procedimiento general para la protección del grupo hidroxilo en las 3-hidroxi- $\beta$ -lactamas 19a,c**



Una disolución de la  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -lactama correspondiente (8.6 mmol, 3 g) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) en atmósfera de  $\text{N}_2$ , fue enfriada a 0 °C. Posteriormente se adicionó TEA (17.3 mmol, 2.5 mL) y se mantuvo en agitación durante diez minutos. A continuación se añadió, a la misma temperatura, el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (9.5 mmol, 2.1 g). La reacción se mantuvo 3 horas en agitación a 0 °C y tras comprobar por T.L.C. (EtOAc : Hex / 1 : 1) que no quedaba producto de partida se lavó con una disolución saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica fue separada y secada con  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue utilizado en la siguiente reacción sin mayor purificación.

**4.7.1. (3R,4S)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>SSi

Peso Molecular: 530.66

Rendimiento: 88% (4.0 g); aceite.

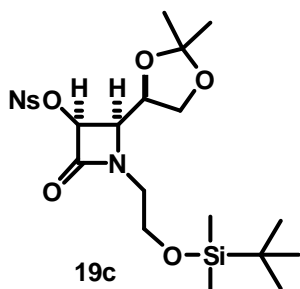
$[\alpha]_D^{25} = +60.91^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2986, 2953, 2903, 2885, 2857, 1772.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **8.23** (1H, m, arom.); **7.84** (1H, m, arom.); **7.78** (2H, m, arom.); **5.58** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac] J=5.0Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.21** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.6Hz, J=9.0Hz); **3.90** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac], J=5.0Hz, J=8.7Hz); **3.76** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.6Hz, J=9.0Hz); **3.70** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.8Hz); **3.53** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.31** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.34** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.85** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.02** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 162.1, 135.7, 132.8, 131.8, 129.9, 125.2, 110.0, 80.2, 76.4, 66.7, 60.1, 59.8, 44.3, 26.9, 25.9, 25.0, 18.2, -5.2.

**4.7.2. (3S,4R)-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>SSi

Peso Molecular: 530.66

Rendimiento: 90% (4.1 g); aceite.

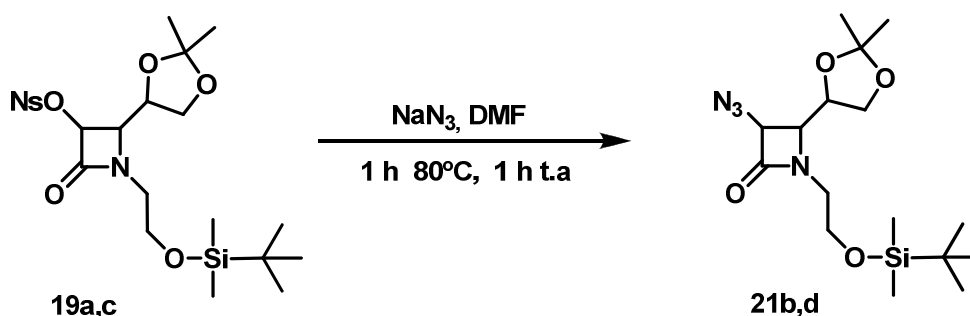
$[\alpha]_D^{25} = -60.01^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2986, 2953, 2903, 2885, 2857, 1772.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **8.23** (1H, m, arom.); **7.84** (1H, m, arom.); **7.78** (2H, m, arom.); **5.58** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac] J=5.0Hz); **4.33** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.21** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.6Hz, J=9.0Hz); **3.90** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac], J=5.0Hz, J=8.7Hz); **3.76** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=6.6Hz, J=9.0Hz); **3.70** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.8Hz); **3.53** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.31** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.34** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.85** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.02** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

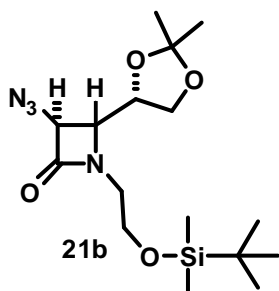
<sup>13</sup>C-NMR: 162.1, 135.7, 132.8, 131.8, 129.9, 125.2, 110.0, 80.2, 76.4, 66.7, 60.1, 59.8, 44.3, 26.9, 25.9, 25.0, 18.2, -5.2.

**4.8. Procedimiento general para la preparación de las trans-3-azido- $\beta$ -lactamas 21b,d**



Se calentó a 80 °C una disolución del compuesto nosilado (8.1 mmol, 4.3 g) en DMF (50 mL). Una vez alcanzada dicha temperatura se adicionó la azida sódica (40.5 mmol, 2.7 g) y se dejó la reacción durante una hora a esa temperatura. Pasado esse tiempo se sacó el matraz del baño y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una hora más. Tras comprobar por T.L.C. (EtOAc : Hex / 1 : 1) que no quedaba producto de partida, la mezcla se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  (25 mL). Se extrajo varias veces la fase acuosa con dietil éter (4x25 mL). Se juntaron las fases orgánicas y se lavaron varias veces con una disolución saturada de NaCl (3x25 mL). La fase orgánica fue separada y secada con  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue purificado por cromatografía en columna con sílica básica (EtOAc : Hex / 5 : 95)

**4.8.1. (3S,4R)-3-Azido-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 370.52

Rendimiento: 75% (2.3 g); aceite.

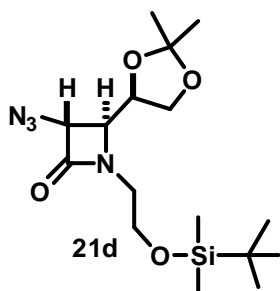
$[\alpha]_D^{25} = -123.26^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2954, 2930, 2903, 2857, 2109, 1770.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.19** (1H, d, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lac] J=1.88 Hz); **4.17** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=4.8 Hz, J=8.8 Hz); **3.68** (3H, m, CHH-dioxo, CH<sub>2</sub>-O-Si,); **3.53** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac], J=2.1Hz, J=5.9Hz); **3.46** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.18** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.35** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.25** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.81** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.01** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 163.7, 110.5, 75.6, 65.6, 65.2, 62.1, 61.0, 44.0, 26.6, 26.1, 24.8, 18.2, -5.6.

**4.8.2. (3R,4S)-3-Azido-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 370.52

Rendimiento: 73% (2.2 g); aceite.

$[\alpha]_D^{25} = +121.60^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

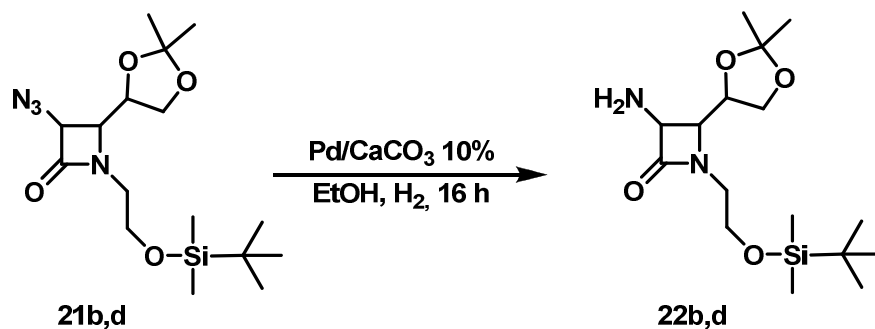
IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 2954, 2930, 2903, 2857, 2109, 1770.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.19** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac] J=1.88 Hz); **4.17** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=4.8Hz, J=8.8Hz); **3.68** (3H, m, CHH-dioxo, CH<sub>2</sub>-O-Si,); **3.53** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac], J=2.1Hz, J=5.9Hz); **3.46** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.18** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.35** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.25** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.81** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.01** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 163.7, 110.5, 75.6, 65.6, 65.2, 62.1, 61.0, 44.0, 26.6, 26.1, 24.8, 18.2, -5.6.

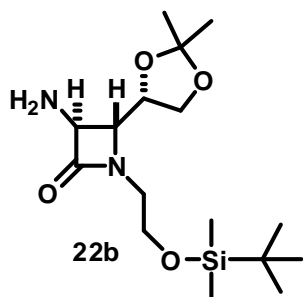


**4.9. Procedimiento general para la reducción del grupo azida a grupo amino en 22b,d**



Sobre una disolución de la azida (2.7 mmol, 1 g) en EtOH (20 mL) se añadió el catalizador de Lindlar (200 mg, 5% Pd/CaCO<sub>3</sub>) y se mantuvo bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (P= 1atm) 16 horas. El catalizador se eliminó mediante filtración sobre celita y el residuo fue evaporado a presión reducida para obtener el compuesto que se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

**4.9.1. (3S,4R)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 344.21

Rendimiento: 100% (940 mg); aceite.

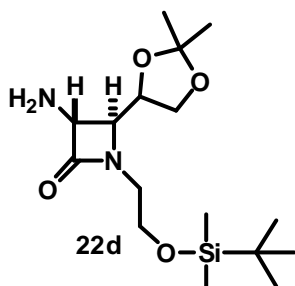
$[\alpha]_D^{25} = -9.04^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3392, 3333, 2985, 2954, 2930, 2885, 2857, 1750.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.11** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.04** (1H, dd, CH<sub>H</sub>-dioxo J=6.7Hz, J=8.3Hz); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub> dioxo J=6.7Hz, J=8.3Hz); **3.71** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.8Hz); **3.65** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac] J=2.0Hz); **3.46** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.32** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac], J=2.2Hz, J=7.1Hz); **3.21** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.53** (2H, b.s., NH<sub>2</sub>); **1.37** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.83** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.00** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 170.5, 110.2, 77.6, 66.1, 65.4, 62.1, 60.6, 43.6, 26.8, 26.0, 25.2, 18.3, -5.2.

**4.9.2. (3R,4S)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 344.21

Rendimiento: 100% (940 mg); aceite.

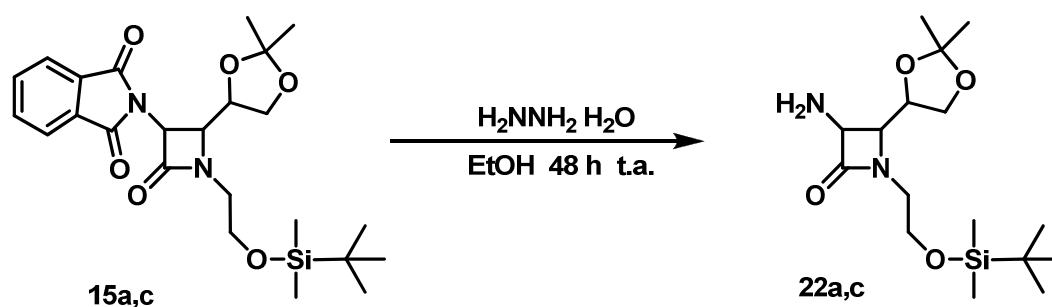
$[\alpha]_D^{25} = +10.21^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3392, 3333, 2985, 2954, 2930, 2885, 2857, 1750.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.11** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.04** (1H, dd, CHH-dioxo J=6.7Hz, J=8.3Hz); **3.81** (1H, dd, CH<sub>2</sub> dioxo J=6.7Hz, J=8.3Hz); **3.71** (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J=5.8Hz); **3.65** (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac] J=2.0Hz); **3.46** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.32** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac], J=2.2Hz, J=7.1Hz); **3.21** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.53** (2H, b.s., NH<sub>2</sub>); **1.37** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.83** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.00** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

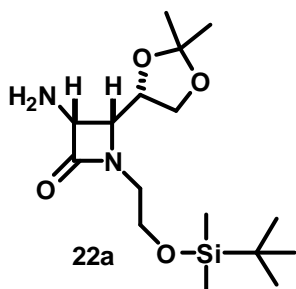
<sup>13</sup>C-NMR: 170.5, 110.2, 77.6, 66.1, 65.4, 62.1, 60.6, 43.6, 26.8, 26.0, 25.2, 18.3, -5.2.

**4.10. Procedimiento general para la desprotección del grupo ftalimido en 22a,c.**



En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó la correspondiente ftalimido-β-lactama (6 mmol, 2.8 g) en etanol (50 mL). Sobre la disolución se vertió hidracina monohidratada (28 mmol, 1.5 mL) y se agitó vigorosamente la reacción durante 48 horas. Pasado ese tiempo la reacción se filtró, y el precipitado se lavó varias veces con éter (3x50 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación del disolvente a presión reducida dio lugar a la correspondiente β-lactama que fue utilizada en la siguiente reacción sin mayor purificación.

**4.10.1. (3R,4R)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidín-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 344.21

Rendimiento: 85% (1.8 g); aceite.

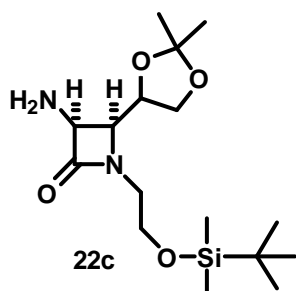
$[\alpha]_D^{25} = -57.80^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3389, 3331, 2985, 2954, 2930, 2885, 2857, 1750.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.10** (3H, m, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac], H<sub>S</sub>dioxo, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.76** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.64** (3H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac], CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.48** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.13** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.89** (2H, b.s., NH<sub>2</sub>); **1.32** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.23** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.77** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **-0.06** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 170.9, 109.6, 76.0, 66.1, 61.4, 61.0, 60.8, 43.3, 26.6, 25.9, 25.0, 18.2, -5.4.

**4.10.2. (3S,4S)-3-Amino-1-(2-(terc-butildimetilsililo)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-azetidina-2-ona**



Fórmula empírica: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Si

Peso Molecular: 344.21

Rendimiento: 80% (1.7 g); aceite.

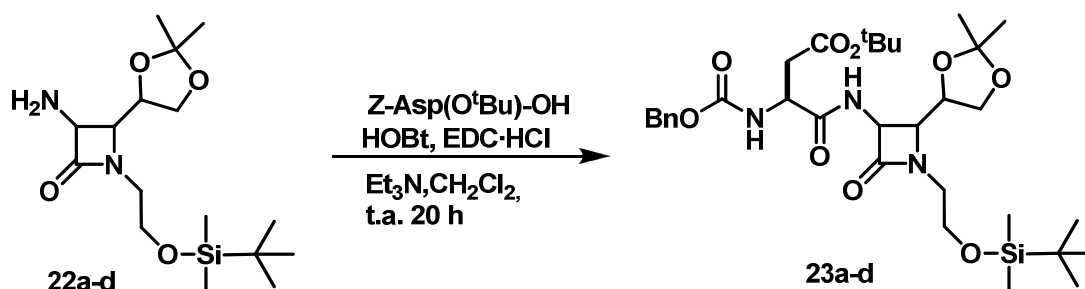
$[\alpha]_D^{25} = +55.00^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3389, 3331, 2985, 2954, 2930, 2885, 2857, 1750.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **4.10** (3H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac], H<sub>R</sub>dioxo, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.76** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.64** (3H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac], CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.48** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.13** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **1.89** (2H, b.s., NH<sub>2</sub>); **1.32** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.23** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.77** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **-0.06** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

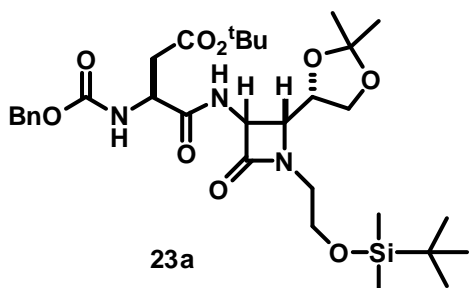
<sup>13</sup>C-NMR: 170.9, 109.6, 76.0, 66.1, 61.4, 61.0, 60.8, 43.3, 26.6, 25.9, 25.0, 18.2, -5.4.

#### 4.11. Descripción general del acoplamiento del Z-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH con las $\alpha$ -amino $\beta$ -lactamas **23a-d**



En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se vertió una disolución de la correspondiente  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactama (8.5 mmol, 2.8 g) y el ácido (8.5 mmol, 2.8g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (190 mL) a 0 °C. Sobre la disolución resultante se adicionaron consecutivamente la TEA (17 mmol, 2.5 mL), EDC·HCl(13.6 mmol, 2.6 g), y HOBt (11.9 mmol, 1.8 g) dejando que la disolución alcanzara poco a poco la temperatura ambiente agitando la mezcla de reacción durante 20 horas. Transcurrido ese tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2x40 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x40 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice básica eluyéndose en todos los casos con una mezcla de (EtOAc : Hex / 5 : 95) .

**4.11.1. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililo)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>32</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si

Peso Molecular: 649.84

Rendimiento: 79% (4.35 g).

$[\alpha]_D^{25} = -26.7^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3434, 3320, 2982, 2952, 2930, 2906, 2852, 1761, 1723, 1704, 1667.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.40** (1H, d, NH[β-lac], J=8.6Hz); **7.33** (5H, s, arom.); **5.90** (1H, d, NH-Asp., J=8.1 Hz); **5.28** (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>R</sub> [β-lac], J=5.1Hz, J=9.1Hz); **5.13** (1H, d, CH<sub>2</sub>-Bn, J=12.1Hz); **5.04** (1H, d, CH<sub>2</sub>-Bn, J=12.1Hz); **4.49** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.09** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.00** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.91** (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub> [β-lac], CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.71** (2H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.63** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.21** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **2.82** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=4.8Hz, J=16.79Hz); **2.66** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=5.13 Hz, J=16.79 Hz); **1.40** (12H, m, <sup>t</sup>But, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.88** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.03** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.4, 170.8, 166.0, 156.7, 136.2, 128.7, 128.3, 128.2, 110.2, 81.9, 77.2, 67.4, 66.6, 64.1, 60.5, 58.1, 51.4, 44.1, 37.5, 28.2, 26.8, 26.0, 25.4, 18.4, -5.2.

**Punto de fusión:** 103-106°C (triturado con hexano)

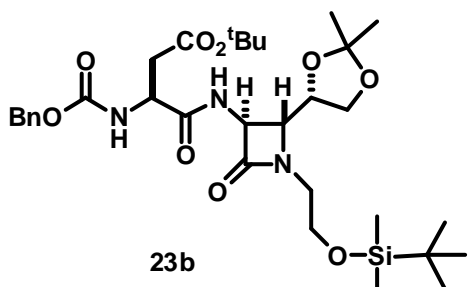
**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 59.14; H, 7.91; N, 6.47.

**Encontrado:** C, 58.80; H, 8.21; N, 6.76.



**4.11.2. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>32</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si

Peso Molecular: 649.84

Rendimiento: 76% (4.20 g).

$[\alpha]_D^{25} = -7.5^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3431, 3321, 2985, 2952, 2929, 2903, 2856, 1764, 1726, 1704, 1667.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.46** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=7.1Hz); **7.24** (5H, m, arom.); **5.88** (1H, d, NH-Asp., J=8.4 Hz); **5.08** (1H, d, CH<sub>2</sub>-Bn, J=12.3 Hz); **5.01** (1H, d, CH<sub>2</sub>-Bn, J=12.3Hz); **4.48** (1H, m, H $\alpha$ -Asp); **4.40** (1H, dd, H $\alpha$ <sub>S</sub> [ $\beta$ -lac], J=7.14Hz, J=1.74Hz); **3.99** (1H, dd, H<sub>S</sub>dioxo, J=6.6Hz, J=12.9Hz); **3.90** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=6.6Hz, J=8.6Hz); **3.66** (3H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.53** (2H, m, H $\beta$ <sub>R</sub> [ $\beta$ -lac], N-CH<sub>2</sub>); **3.25** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **2.77** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=4.4Hz, J=16.9Hz); **2.54** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=5.0Hz, J=16.9Hz); **1.30** (9H, <sup>t</sup>Bu); 1.29 (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.22** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo). **0.78** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.05** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.3, 170.7, 166.1, 156.3, 136.1, 128.7, 128.3, 128.2, 110.2, 81.9, 77.2, 67.4, 66.6, 64.1, 60.5, 58.1, 51.4, 44.1, 37.5, 28.1, 27.1, 26.8, 25.4, 18.4, -5.2.

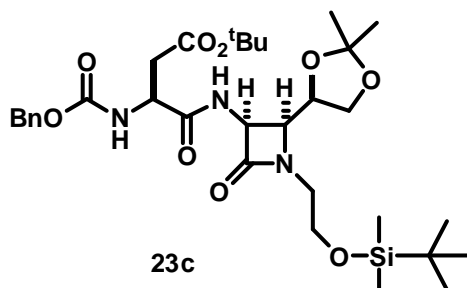
**Punto de fusión:** 122-125 °C; (triturado con hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 59.14; H, 7.91; N, 6.47.

**Encontrado:** C, 59.36; H, 8.09; N, 6.53.

**4.11.3. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililo)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>32</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si

Peso Molecular: 649.84

Rendimiento: 82% (4.53 g).

$[\alpha]_D^{25} = +29.1^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3431, 3320, 2984, 2950, 2926, 2903, 2861, 1764, 1726, 1702, 1669.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.34** (6H, m, , NH[β-lac], arom.); **5.88** (1H, d, NH-Asp., J=6.3Hz); **5.22** (1H, dd, H<sup>α</sup>s [β-lac], J=5.02Hz, J=9.2Hz); **5.11** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.51** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.08** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.04** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo J=7.04Hz, J=8.97 Hz); **3.81** (2H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.71** (2H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub> [β-lac], CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.64** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.21** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **2.99** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=5.5Hz, J=17.36Hz); **2.57** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=4.26Hz, J=17.36Hz); **1.41** (12H, m, <sup>t</sup>But, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.37** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **0.89** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.09** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.3, 171.0, 165.7, 156.2, 136.1, 128.7, 128.4, 128.3, 110.2, 82.1, 77.4, 67.5, 67.0, 64.2, 60.4, 58.2, 51.3, 44.1, 37.6, 28.1, 26.8, 26.0, 25.4, 18.2, -5.2.

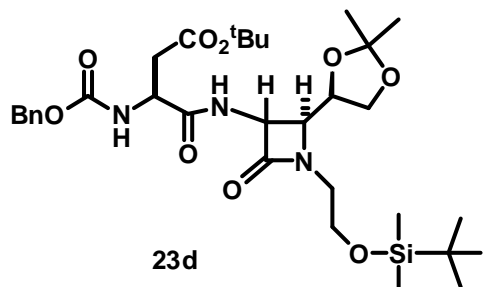
**Punto de fusión:** 95-98°C (triturado con hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 59.14; H, 7.91; N, 6.47.

**Encontrado:** C, 58.60; H, 7.64; N, 6.37.

**4.11.4. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-1-(2-(terc-butildimetilsililo)etil)-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>32</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si

Peso Molecular: 649.84

Rendimiento: 80% (4.42 g).

$[\alpha]_D^{25} = +16.6^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3428, 3320, 2980, 2952, 2924, 2909, 2856, 1765, 1726, 1700, 1668.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.24** (6H, m, NH[ $\beta$ -lac], arom.); **5.77** (1H, d, NH-Asp., J=8.1Hz); **5.01** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.44** (2H, m, H $\alpha$ -Asp, H $\alpha_R$  [ $\beta$ -lac]); **4.01**(2H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, H $R$ dioxolano); **3.67** (3H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-O-Si); **3.39** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **3.32** (1H, dd, H $\beta_S$  [ $\beta$ -lac], J=1.37Hz, J=6.8Hz); **3.23** (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); **2.86** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=5.5Hz, J=17.2Hz); **2.46** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=5.5Hz, J=17.2Hz); **1.31** (9H, <sup>t</sup>Bu); **1.28** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo.); **1.22** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo.); **0.78** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **0.05** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C: 171.3, 165.7, 156.2, 136.1, 128.7, 128.4, 128.3, 110.2, 82.1, 77.3, 67.5, 67.0, 64.2, 60.4, 58.2, 51.29, 44.1, 37.6, 28.1, 26.8, 26.0, 25.4, 18.2, -5.2.

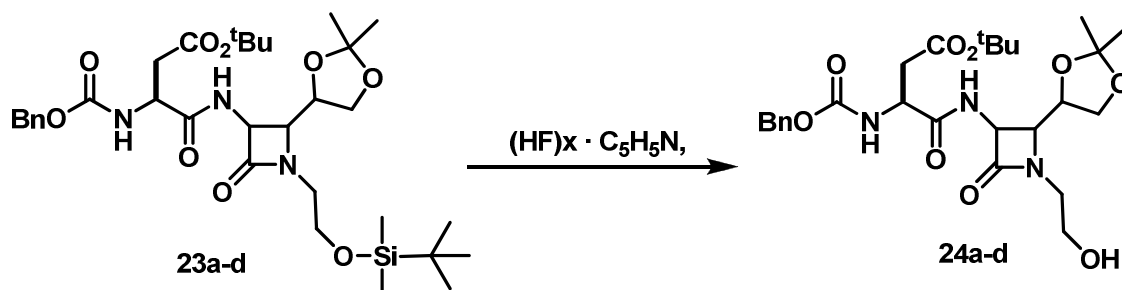
**Punto de fusión:** 120-123°C (triturado con hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 59.14; H, 7.91; N, 6.47.

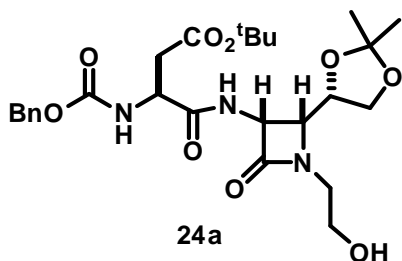
**Encontrado:** C, 60.58; H, 8.03; N, 6.50.

#### 4.12. Procedimiento general para la desprotección del grupo TBDMS en 24a-d



Sobre una disolución del compuesto sililado (2 mmol, 1 g) en THF (20 mL) enfriada a 0 °C y en atmósfera de nitrógeno, se adicionó el fluoruro de piridinio (7.7 mmol, 0.2 mL). La reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 30 minutos y luego se dejó a temperatura ambiente durante 3 h, siguiendo la reacción por T.L.C. (EtOAc : Hex / 1 : 1). Una vez acabada la reacción se añadió  $\text{NaHCO}_3$  hasta neutralizar todo el fluoruro de piridinio que había quedado en exceso, es decir hasta que cesara el borboteo de  $\text{CO}_2$ , y se extrajo con dietil éter (200 mL). La fase orgánica se lavó posteriormente con una disolución saturada de cloruro sódico (50 mL) se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo al cual se le añadió tolueno seco (15 mL) y se evaporó a presión reducida para eliminar las pequeñas trazas de fluoruro de piridinio que hubiesen podido quedar. El crudo obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

**4.12.1. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-1-etoxi-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

Peso Molecular: 535.58

Rendimiento: 98% (1.03 g).

$[\alpha]_D^{25} = -16.0^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3405, 3251, 3034, 2982, 2937, 2883, 1755, 1710, 1677.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.82** (1H, m, NH[ $\beta$ -lac]); **7.28** (5H, m, arom.); **6.03** (1H, d, NH-Asp., J=8.90Hz); **5.23** (1H, m, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub> [ $\beta$ -lac]); **5.06** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.53** (1H, m, H $\alpha$ -Asp); **4.11** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **3.98** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.62** (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH); **3.58** (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub> [ $\beta$ -lac], CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.34** (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **2.70** (2H, dd, H $\beta$ -Asp, J=5.5Hz, J=12.5Hz); **1.35** (12H, m, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.24** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.5, 170.5, 167.9, 156.3, 136.1, 128.7, 128.4, 128.3, 110.1, 81.9, 75.6, 67.4, 66.3, 61.7, 60.2, 56.4, 51.8, 46.6, 37.6, 28.2, 26.8, 25.0.

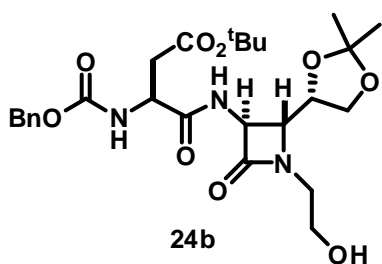
**Punto de fusión:** 124-127°C (cristalizado en hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.31; H, 6.96; N, 7.85.

**Encontrado:** C, 57.85; H, 6.64; N, 7.63.

**4.12.2. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-etoxi-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

Peso Molecular: 535.58

Rendimiento: 93% (0.92 g).

$[\alpha]_D^{25} = -9.3^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3405, 3250, 3034, 2980, 2936, 2885, 1755, 1715, 1677.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.60** (1H, m, NH[β-lac]); **7.26** (5H, m, arom.); **5.97** (1H, d, NH-Asp., J=8.37Hz); **5.05** (2H, m, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.44** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.32** (1H, m, H<sup>α</sup>s [β-lac]); **4.00** (2H, m, H<sub>S</sub>dioxo, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.68** (3H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-OH); **3.56** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub> [β-lac]); **3.49** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **3.20** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **2.76** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=5.3Hz, J=16.9Hz); **2.55** (1H, dd; H<sup>β</sup>-Asp, J=5.3Hz, J=16.9Hz); **1.31** (9H, <sup>t</sup>Bu); 1.29 (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.21** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.8, 170.6, 167.2, 156.1, 136.2, 128.5, 128.2, 128.0, 110.3, 81.7, 77.16, 67.2, 66.4, 62.2, 59.4, 58.0, 51.4, 45.3, 37.7, 28.0, 26.7, 25.3.

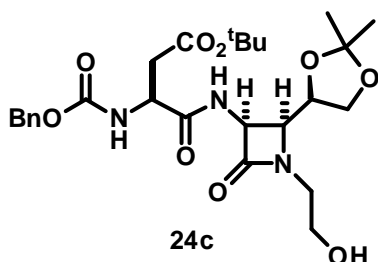
**Punto de fusión:** 148-151°C (cristalizado en hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.31; H, 6.96; N, 7.85.

**Encontrado:** C, 57.80; H, 6.53; N, 7.62.

**4.12.3. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-1-etoxi-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

Peso Molecular: 535.58

Rendimiento: 95% (1.02 g).

$[\alpha]_D^{25} = +37.0^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3406, 3258, 3039, 2981, 2933, 2885, 1755, 1715, 1674.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.49** (1H, m, NH[ $\beta$ -lac]); **7.33** (5H, m, arom.); **5.92** (1H, m, NH-Asp.); **5.23** (1H, m, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>S</sub> [ $\beta$ -lac]); **5.10** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.51** (1H, m, H $\alpha$ -Asp); **4.19** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.03** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.71** (3H, m, CH<sub>2</sub>-OH, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub> [ $\beta$ -lac]); **3.67** (1H, m, CHH-dioxo); **3.44** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **3.32** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **2.98** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=4.4Hz, J=17.3Hz); **2.58** (1H, dd, H $\beta$ -Asp, J=4.4Hz, J=17.3Hz); **1.40** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.39** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.30** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.3, 171.2, 167.6, 156.1, 136.1, 128.6, 128.3, 128.2, 110.0, 81.9, 75.4, 67.4, 66.4, 61.3, 60.1, 56.6, 51.4, 46.3, 37.0, 28.2, 26.7, 25.0.

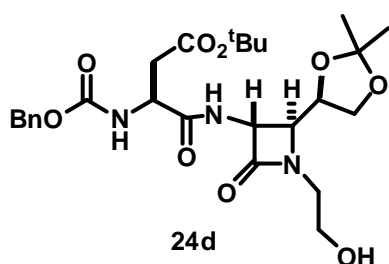
**Punto de fusión:** 120-123°C (cristalizado en hexano)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.31; H, 6.96; N, 7.85.

**Encontrado:** C, 50.06; H, 6.80; N, 7.77.

**4.12.4. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-1-etoxi-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona]**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

Peso Molecular: 535.58

Rendimiento: 96% (1.01 g).

$[\alpha]_D^{25} = +21.2^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3408, 3250, 3032, 2984, 2937, 2885, 1750, 1715, 1677.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **8.12** (1H, m, NH[β-lac]); **7.26** (5H, m, arom.); **6.14** (1H, d, NH-Asp., J=8.92Hz); **5.05** (2H, m, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.55** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.45** (1H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub> [β-lac]); **3.97** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.76** (1H, m, H<sub>R</sub>-dioxo); **3.62** (3H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-OH); **3.59** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **3.46** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub> [β-lac]); **3.10** (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); **2.67** (2H, s (b.s.), H<sup>β</sup>-Asp); **1.31** (9H, <sup>t</sup>Bu); **1.29** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.21** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.7, 170.7, 167.5, 156.3, 136.2, 128.6, 128.2, 128.1, 110.4, 81.7, 77.1, 67.3, 66.5, 62.7, 59.3, 57.6, 51.5, 45.2, 37.8, 28.1, 26.7, 25.3.

**Punto de fusión:** 150-153°C (cristalizado en hexano)

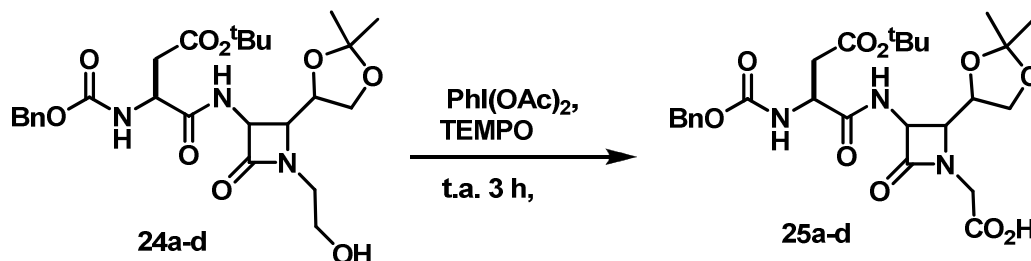
**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.31; H, 6.96; N, 7.85.

**Encontrado:** C, 57.96; H, 6.74; N, 7.70.

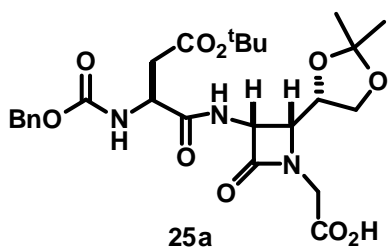


**4.13. Procedimiento general para la transformación de las  $\beta$ -lactamas 24a-d a los ácidos carboxílicos 25a-d**



Sobre una disolución del alcohol (2.8 mmol, 1.5 g) en acetonitrilo/agua : 1/1 (7 mL/7 mL). se adicionó BAIB (6.2 mmol, 2 g) y TEMPO (0.56 mmol, 90 mg) y se mantuvo la reacción con fuerte agitación durante 3 h a temperatura ambiente. Tras comprobar que no quedaba producto de partida T.L.C. (EtOAc : Hex / 5 : 1) se evaporó la mezcla y el producto se extrajo de la fase acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x20 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se secaron con  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se evaporaron a presión reducida obteniendo el producto deseado, el cual fue utilizado en la siguiente reacción sin mayor purificación.

**4.13.1. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

Peso Molecular: 549.23

Rendimiento: 68% ((1.10 g).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -15.3° (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3306, 3035, 2984, 2942, 2850, 1761, 1743, 1662.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.85** (1H, d, NH[β-lac], J=8.13Hz); **7.31** (5H, m, arom.); **6.06** (1H, d, NH-Asp., J=8.7Hz); **5.20** (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[βlac], J=5.1Hz J=8.3Hz); **5.08** (2H, m, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.56** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.15** (2H, m, H<sub>S</sub>dioxo, CH<sub>2</sub>-COOH); **3.97** (2H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-COOH); **3.83** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub> [β-lac]); **3.63** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=4.4Hz, J=8.9Hz); **2.80** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=5.6Hz, J=16.8Hz); **2.66** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=5.6Hz, J=16.8Hz); **1.38** (9H, m, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.36** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo). **1.25** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.6, 170.7, 170.4, 167.4, 156.5, 136.0, 128.6, 128.2, 109.9, 81.9, 75.2, 67.4, 66.2, 61.0, 57.0, 51.6, 43.0, 37.5, 28.0, 26.6, 24.9.

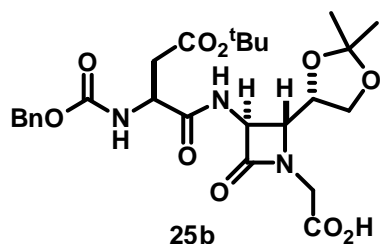
**Punto de fusión:** 108-110°C (triturado en eter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 56.82; H, 6.42; N, 7.65.

**Encontrado:** C, 56.66; H, 5.76; N, 7.38.

**4.13.2. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

Peso Molecular: 549.23

Rendimiento: 70% (1.07 g).

$[\alpha]_D^{25} = -8.8^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3308, 3034, 2980, 2926, 2854, 1760, 1733, 1700.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.95** (1H, d, NH- $\beta$ -lac, J=6.2Hz); **7.31** (5H, m, arom.); **6.04** (1H, d, NH-Asp., J=8.5Hz); **5.09** (2H, m, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.68** (1H, m, H <sup>$\alpha$</sup> s [ $\beta$ -lac]); **4.56** (1H, m, H $\alpha$ -Asp); **4.26** (1H, d, CH<sub>2</sub>-COOH, J=17.9Hz); **4.16** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.07** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo,); **3.95** (1H, d, CH<sub>2</sub>-COOH, J=17.9Hz); **3.75** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.63** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub> [ $\beta$ -lac], J=1.8Hz J=8.2Hz); **2.86** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> -Asp, J=5.5Hz, J=16.8Hz); **2.62** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> -Asp, J=4.7Hz, J=16.8Hz ); **1.39** (9H, <sup>t</sup>Bu); 1.34 (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.7, 171.6, 170.5, 167.6, 156.5, 136.2, 128.7, 128.4, 128.3, 110.1, 81.9, 75.2, 67.4, 66.8, 61.0, 56.6, 51.8, 43.8, 36.9, 28.2, 26.8, 25.1.

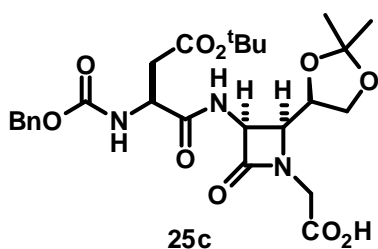
**Punto de fusión:** 128-131°C (triturado en eter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 56.82; H, 6.42; N, 7.65.

**Encontrado:** C, 56.16; H, 5.96; N, 7.08.

**4.13.3. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

Peso Molecular: 549.23

Rendimiento: 72% (1.10g).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +26.4° (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3302, 3034, 2984, 2940, 1760, 1740, 1662.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.55** (1H, d, NH[β-lac], J=7.9Hz); **7.33** (5H, m, arom.); **5.96** (1H, d, NH-Asp. J=9.2Hz); **5.30** (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub> [β-lac], J=5.0Hz J=8.8Hz); **5.10** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.53** (1H, m, H<sup>α</sup>-Asp); **4.21** (2H, m, H<sub>R</sub>dioxo, CH<sub>2</sub>-COOH); **4.00** (3H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, CH<sub>2</sub>-COOH, H<sup>β</sup><sub>S</sub> [β-lac]); **3.68** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=4.5Hz, J=9.1Hz); **2.95** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=4.6Hz, J=17.2Hz); **2.59** (1H, dd, H<sup>β</sup>-Asp, J=4.6Hz, J=17.2Hz); **1.40** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.35** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.27** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.4, 171.1, 167.2, 156.2, 136.0, 128.7, 128.4, 128.3, 110.0, 82.0, 74.9, 67.5, 66.4, 60.7, 57.2, 51.5 43.2, 37.1, 28.1, 26.6, 24.9.

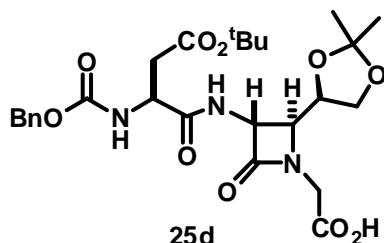
**Punto de fusión:** 117-120°C (triturado en eter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 56.82; H, 6.42; N, 7.65.

**Encontrado:** C, 55.95; H, 6.71; N, 7.82.

**4.13.4. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli**



Fórmula empírica: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

Peso Molecular: 549.23

Rendimiento: 72% (1.11 g).

$[\alpha]_D^{25} = +15.1^\circ$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3305, 3040, 2984, 2929, 2846, 1751, 1740, 1703.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **8.11** (1H, d, NHβ[-lac], J=6.7Hz); **7.35** (5H, m, arom.); **6.19** (1H, d, NH-Asp, J=8.9Hz); **5.10** (2H, m, CH<sub>2</sub>-Bn); **4.66** (2H, m, H $\alpha$ -Asp, H $\alpha$ <sub>R</sub> [β-lac]); **4.23** (1H, d, CH<sub>2</sub>-COOH, J=18.0Hz); **4.05** (2H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo, H<sub>R</sub>dioxo); **3.93** (1H, d, CH<sub>2</sub>-COOH, J=18.0Hz); **3.76** (1H, m, CHH-dioxo); **3.63** (1H, m, H $\beta$ <sub>S</sub> [β-lac]); **2.81** (1H, dd, Hβ-Asp, J=16.9Hz J=5,2Hz); **2.68** (1H, dd, Hβ-Asp, J=16.9Hz J=5,2Hz); **1.42** (9H, <sup>t</sup>Bu); **1.35** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.30** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 171.5, 171.4, 170.2, 167.4, 156.5, 136.0, 128.5, 128.2, 128.1, 109.8, 81.7, 75.0, 67.2, 66.1, 60.8, 56.9, 51.6, 43.6, 37.4, 27.9, 26.5, 24.9.

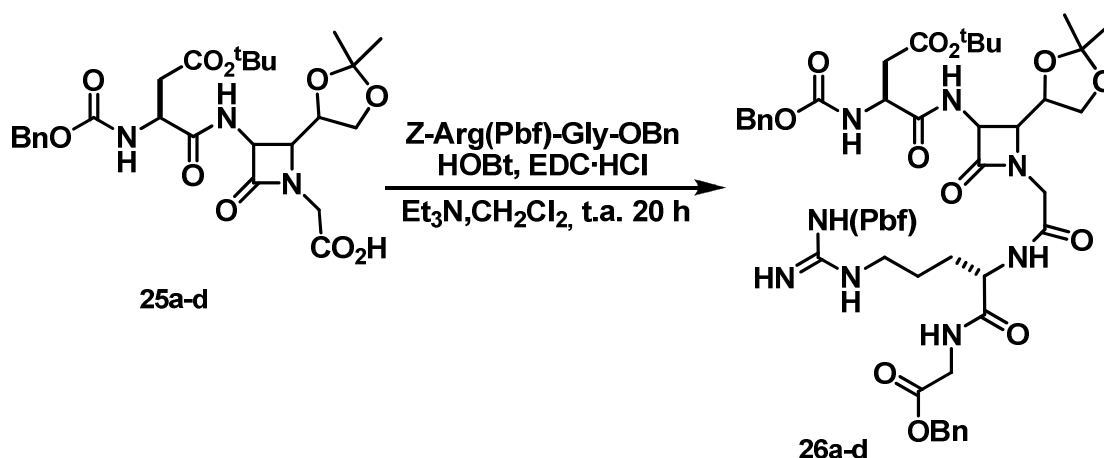
**Punto de fusión:** 120-123°C (triturado en eter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 56.82; H, 6.42; N, 7.65.

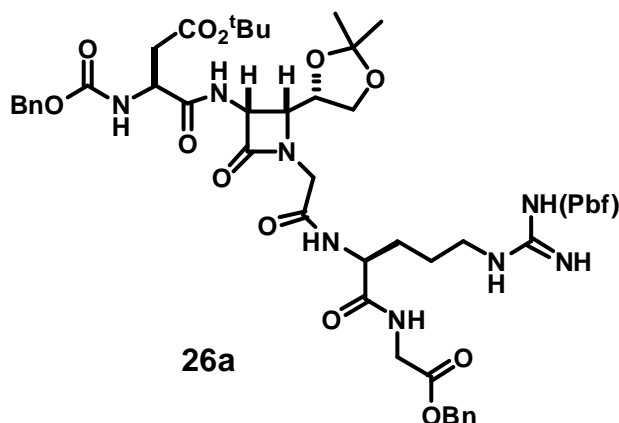
**Encontrado:** C, 55.80; H, 6.66; N, 7.31.

**4.14. Procedimiento general para la síntesis de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-β-lactam-Gli-Arg(Pbf)-GliOBn 26a-d**



En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se vertió una disolución de la amina (1.70 mmol, 1.070 g) y el ácido (1.70 mmol, 0.935 g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (70 mL) a 0 °C. Sobre la disolución se adicionaron consecutivamente TEA (3.42 mmol, 0.50 mL), EDC·HCl (2.72 mmol, 532 mg), y HOBT (2.38 mmol, 370 mg) y se dejó que la disolución alcanzara poco a poco la temperatura ambiente agitando la mezcla de la reacción durante 20 h. Transcurrido ese tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2x40 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x40 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ácida eluyendo una mezcla de (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH / 20 : 1) .

**4.14.1. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn**



Fórmula empírica: C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S

Peso Molecular: 1105.26

Rendimiento: 70% (1.31 g).

$[\alpha]_D^{25} = -17.5$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3327.4, 2977.6, 2934.0, 1758.5, 1726.5, 1665.6, 1547.4.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.81** (1H, m, NH[β-lac]); **7.50** (1H, m, NH[Asp]); **7.42** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **7.28** (10H, m, arom.); **6.28** (2H (b.s.), NH[Guani]); **6.15** (1H, m, NH [Arg]); **6.00** (1H (b.s.), NH[Guani]); **5.06** (5H, m, CH<sub>2</sub>-Ph, H<sup>α</sup>R[β-lac]); **4.55** (2H, m, H<sup>α</sup>[Asp], H<sup>α</sup>[Arg]); **4.32** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.09** (2H, m, H<sup>α</sup> Gli<sub>2</sub>, H<sup>α</sup> Gli<sub>1</sub>); **3.92** (3H, m, H<sup>α</sup> Gli<sub>2</sub>, H<sup>α</sup> Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.80** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac]); **3.65** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.17** (2H, m, H<sub>1δ</sub>[Arg]); **2.91** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.71** (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); **2.54** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.47** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.05** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.89** (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); **1.72** (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); **1.59** (2H, m, H<sub>γ</sub>[Arg]); **1.42** (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>-Pbf); **1.37** ((12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.16** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 172.4, 172.1, 170.5, 170.1, 168.1, 167.4, 159.0, 156.5, 138.6, 136.1, 135.4, 132.6, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 124.9, 117.7, 110.2, 86.6, 82.0, 75.0, 67.4, 67.2, 66.4, 61.7, 57.9, 53.1, 51.7, 45.6, 43.4, 41.4, 37.3, 29.4, 28.7, 28.2, 27.1, 25.6, 25.2, 19.5, 18.1, 12.6.

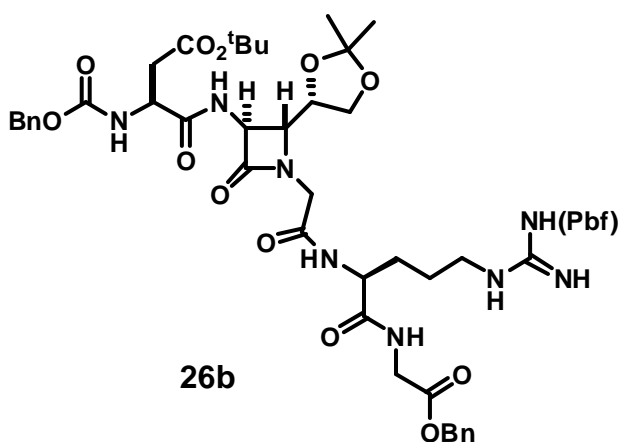
**Punto de fusión:** 125-127°C c.d..(triturado en éter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.84; H, 6.50; N, 11.72.

**Encontrado:** C, 58.01; H, 5.66; N, 10.69.

**4.14.2. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn**



Fórmula empírica: C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S

Peso Molecular: 1105.26

Rendimiento: 75% (1.40g).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -48.1 (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3331.1, 2977.5, 2934.0, 1759.3, 1727.9, 1665.4, 1547.4.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **8.01** (1H, m, NH[Asp]); **7.50** (1H, m, NH[β-lac]); **7.41** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **7.33** (10H, m, arom.); **6.27** (1H, m, NH [Arg]); **6.10** (2H (b.s.), NH[Guani]); **5.89** (1H (b.s.), NH[Guani]); **5.08** (4H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); **4.59** (2H, m, Hα[Asp], Hα[Arg]); **4.30** (1H, m, H<sup>α</sup>S[β-lac]); **4.25** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.20** (1H, d, Hα Gli<sub>2</sub>, J=18.0Hz); **4.11** (2H, m, Hα Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo), **3.98** (1H, d, Hα Gli<sub>2</sub>, J=18.0Hz); **3.94** (2H (b.s.), Hα Gli<sub>1</sub>, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac]); **3.79** (2H, m, Hα Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.22** (1H, m, H<sub>1</sub>δ[Arg]); **3.16** (1H, m, H<sub>2</sub>δ[Arg]); **2.92** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.66** (2H, m, Hβ[Asp]); **2.55** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.49** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.06** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.97** (1H, m, Hβ[Arg]); **1.79** (1H, m, Hβ[Arg]); **1.60** (2H, m, Hγ[Arg]); **1.43** (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>-Pbf); **1.38** ((12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.30** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 172.6, 172.4, 170.5, 170.2, 168.0, 166.9, 158.9, 156.5, 138.5, 136.2, 135.4, 133.2, 132.4, 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 124.8, 117.6, 110.6, 86.5, 82.1, 76.5, 67.5, 67.3, 66.3, 62.4, 59.3, 53.1, 51.4, 45.6, 43.4, 41.4, 40.8, 37.5, 29.4, 28.8, 28.2, 26.9, 25.6, 25.2, 19.4, 18.1, 12.6.

**Punto de fusión:** 115-118°C c.d.( triturado en éter)

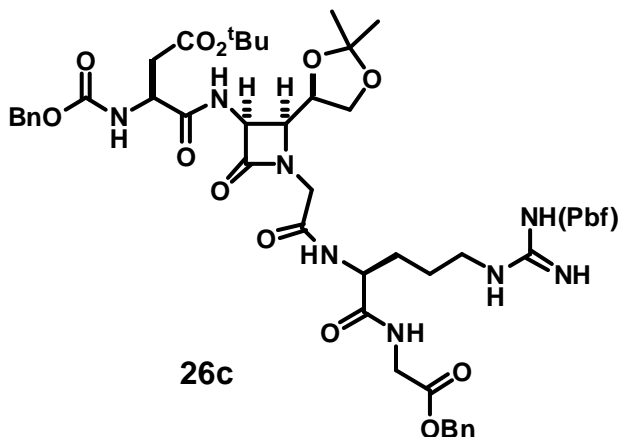
**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.84; H, 6.50; N, 11.72.

**Encontrado:** C, 55.84; H, 5.82; N, 11.02.



**4.14.3. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-Obn**



Fórmula empírica: C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S

Peso Molecular: 1105.26

Rendimiento: 71% (1.24 g).

$[\alpha]_D^{25} = +6.1$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**26c**

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3332.8, 2977.8, 2934.2, 1756.7, 1727.9, 1669.1, 1541.8.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.68** (1H, m, NH[Asp]); **7.60** (1H, m, NH[ $\beta$ -lac], NH[Gli<sub>1</sub>]); **7.29** (10H, m, arom.); **6.20** (2H (b.s.), NH[Guani]); **6.10** (1H, m, NH[Arg]); **6.00** (1H (b.s.), NH[Guani]); **5.10** (5H, m, 2xCH<sub>2</sub>-Ph, H <sup>$\alpha$</sup> S[ $\beta$ -lac]); **4.54** (1H, m, H $\alpha$ [Arg]); **4.51** (1H, m, H $\alpha$ [Asp]); **4.28** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.00** (5H, m, 2xH $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, 2xH $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.90** (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> S[ $\beta$ -lac]); **3.66** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.20** (2H, m, H<sub>1</sub> $\delta$ [Arg]); **2.91** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.77** (1H, m, H $\beta$ [Asp]); **2.63** (1H, m, H $\beta$ [Asp]); **2.54** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.47** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.06** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.93** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.74** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.60** (2H, m, H $\gamma$ [Arg]); **1.43** (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>-Pbf); **1.37** ((9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.31** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.24** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 172.5, 171.7, 171.0, 170.1, 167.9, 167.5, 158.9, 156.5, 138.5, 136.1, 135.4, 133.0, 132.4, 128.7, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 125.0, 117.7, 110.1, 86.5, 82.1, 74.8, 67.4, 67.3, 66.5, 61.5, 57.7, 53.0, 51.6, 45.5, 43.4, 41.5, 40.5, 37.1, 29.5, 28.7, 28.2, 26.8, 25.4, 25.0, 19.4, 18.1, 12.6.

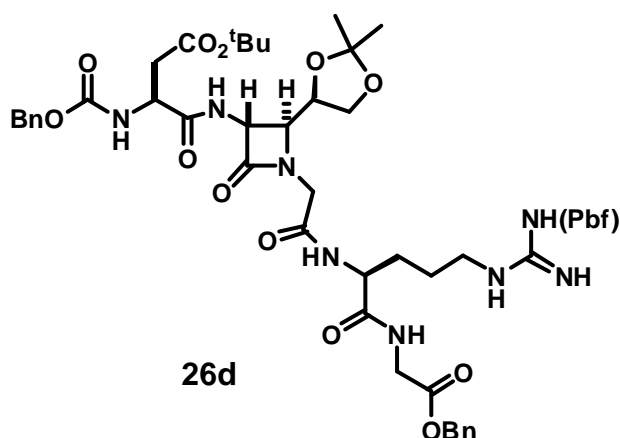
**Punto de fusión:** 120-122°C c.d. (triturado en éter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.84; H, 6.50; N, 11.72.

**Encontrado:** C, 57.05; H, 6.23; N, 10.27.

**4.14.4. Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli-OBn**



Fórmula empírica: C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S

Peso Molecular: 1105.26

Rendimiento: 73% (1.27 g).

$[\alpha]_D^{25} = +25.7$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3329.8, 2977.5, 2934.6, 1758.7, 1726.8, 1665.9, 1547.7

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): **7.87** (1H, m, NH[Asp]); **7.78** (1H, m, NH[β-lac]); **7.29** (10H, m, arom.); **7.20** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **6.26** (1H, m, NH [Arg]); **6.17** (2H (b.s.), NH[Guani]); **5.86** (1H (b.s.), NH[Guani]); **5.05** (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>-Ph); **4.54** (2H, m, Hα[Asp], Hα[Arg]); **4.32** (1H, m, H<sup>α</sup>R[β-lac]);; **4.28** (1H, d, Hα Gli<sub>2</sub>, J=17.4Hz); **4.13** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.00** (3H, m, 2xHα Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.92** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac]); **3.87** (1H, d, Hα Gli<sub>2</sub>, J=17.3Hz); **3.75** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.20** (1H, m, H<sub>1</sub>δ[Arg]); **3.14** (1H, m, H<sub>2</sub>δ[Arg]); **2.90** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.74** (2H, m, Hβ[Asp]); **2.54** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.47** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.05** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.92** (1H, m, Hβ[Arg]); **1.75** (1H, m, Hβ[Arg]); **1.60** (2H, m, Hγ[Arg]); **1.43** (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>-Pbf); **1.38** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.33** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 172.5, 172.3, 170.7, 170.1, 168.0, 166.5, 158.9, 156.6, 138.5, 136.2, 135.4, 133.1, 132.4, 128.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 124.7, 117.6, 110.5, 86.5, 82.2, 76.2, 67.4, 67.2, 66.3, 61.9, 59.2, 53.4, 51.4, 45.1, 43.4, 41.4, 40.7, 37.5, 29.2, 28.7, 28.1, 26.7, 25.7, 25.1, 19.4, 18.1, 12.6.

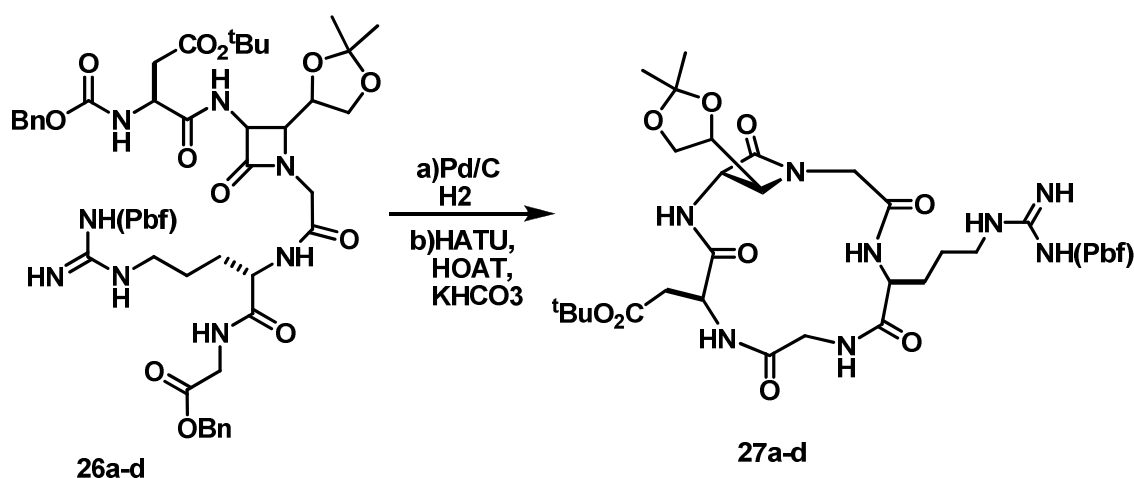
**Punto de fusión:** 111-113°C c.d. (triturado en éter)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 58.84; H, 6.50; N, 11.72.

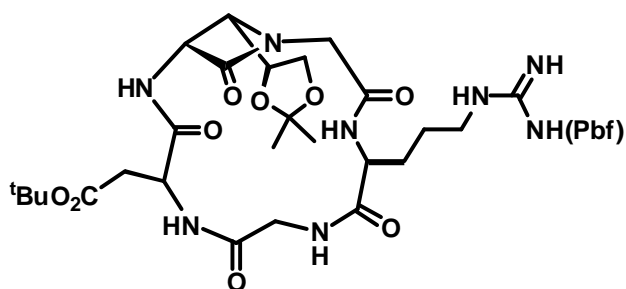
**Encontrado:** C, 57.98; H, 6.17; N, 10.77.

**4.15. Procedimiento general para la desprotección y ciclación de los compuestos 26a-d**



Sobre una disolución del precursor  $\beta$ -lactámico lineal protegido (0.21 mmol, 240 mg) en metanol (7 mL) se añadió Pd/C al 20% (40 mg) y la mezcla se agitó bajo presión atmosférica de  $\text{H}_2$  durante 16h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo así obtenido (20 mmol, 160 mg) con un rendimiento del 97% se disolvió en DMF (120 mL) y se bajó la temperatura a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez alcanzada la temperatura deseada se adicionaron consecutivamente el carbonato potásico (2 mmol, 200 mg) el HATU (0.26 mmol, 104 mg) y el HOAT (0.32 mmol, 50 mg). La reacción se agitó a esa misma temperatura durante toda la noche y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se disolvió en EtOAc (20 mL) y se lavó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . El crudo así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna ácida, eluyendo con ( $\text{MeOH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 / 1 : 15$ )

**4.15.1. Ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



**27a**

Fórmula empírica: C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S

Peso Molecular: 878.99

Rendimiento: 65% (117mg).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -20.02 (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3323.3,

2990.3, 2929.0, 1761.4, 1684.2, 1652.6, 1539.2.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, DMSO): **9.45** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **9.00** (1H, d, NH[Asp], J=7.5Hz); **8.06** (1H, d, NH[β-lac], J=8.3Hz); **7.00** (1H, d, NH[Arg], J=7.9Hz); **5.00** (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac], J=4,2Hz J=8,2Hz); **4.41** (1H, m, H<sub>α</sub>[Asp]); **4.38** (1H, d, H<sub>α</sub> Gli<sub>2</sub>, J=15.5Hz); **4.25** (1H, m, H<sub>α</sub>[Arg]); **3.95** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.78** (1H, dd, H<sub>α</sub> Gli<sub>1</sub>, J=4.0Hz, J=13.73Hz); **3.72** (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lac], J= 4.3Hz, J=9.9Hz); **3.50** (2H, m, H<sub>α</sub> Gli<sub>1</sub>, H<sub>S</sub>dioxo); **3.28** (1H, d, H<sub>α</sub> Gli<sub>2</sub>, J=15.5Hz); **3.20** (1H, m, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.06** (2H, m, H<sub>2</sub>δ[Arg]); **2.97** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.73** (1H, dd, H<sub>H</sub>β[Asp], J=3.8Hz, J=16.7Hz); **2.65** (1H, dd, H<sub>H</sub>β[Asp], J=9.5Hz, J=16.7Hz); **2.49** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.02** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.60** (1H, m, H<sub>β</sub>[Arg]); **1.51** (3H, m, H<sub>β</sub>[Arg], H<sub>2</sub>γ[Arg]); **1.43** (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.41** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.31**(3H,s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.19**(3H,s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 174.9, 171.2, 170.9, 170.5, 170.1, 167.1, 159.1, 156.5, 138.3, 132.7, 132.3, 125.0, 117.8, 109.8, 86.7, 82.2, 74.5, 67.1, 63.3, 58.1, 53.1, 51.8, 47.7, 45.8, 43.4, 40.1, 36.3, 31.3, 28.8, 28.3, 26.9, 26.0, 24.7, 19.5, 18.1, 12.6

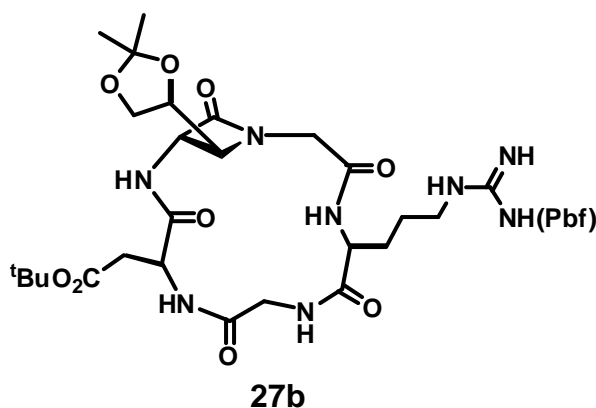
**Punto de fusión:** 173-177°C c.d. (triturado en THF)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 52.52; H, 6.78; N, 16.49.

**Encontrado:** C, 52.15; H, 6.84; N, 14.36.

**4.15.2. Ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



Fórmula empírica: C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S

Peso Molecular: 878.99

Rendimiento: 72% (131mg).

$[\alpha]_D^{25} = -16.2$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3323.7, 2978.4, 2933.9, 1760.2, 1652.2, 1649.1, 1549.1.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, DMSO): **8.75** (1H, t, NH[Gli<sub>1</sub>], J=5.3 Hz); **8.70** (1H, d, NH[Asp], J=8.4Hz); **7.75** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=8.4Hz); **7.65** (1H, d, NH[Arg], J=7.0Hz); **4.56** (1H, d, H $\alpha$ [Asp], J=7.91Hz); **4.52** (1H, d, H $\alpha$ <sub>s</sub>[ $\beta$ -lac], J=8.9Hz); **4.28** (1H, m, H<sub>S</sub>dioxo); **4.18** (1H, m, H $\alpha$ [Arg]); **4.02** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=6.9Hz, J=9.0Hz); **3.92** (3H, m, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.64** (1H, m, H $\beta$ <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac]); **3.51** (1H, d, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, J=13.9Hz); **3.32** (m, 1H, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>); **3.05** (2H, m, H<sub>2</sub> $\delta$ [Arg]); **2.95** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.77** (1H, dd, H $\beta$ [Asp], J=7.4Hz, J=16.4Hz); **2.47** (4H, m, CH<sub>3</sub>-Pbf, H $\beta$ [Asp]); **2.40** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.60** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.46** (3H, m, H $\beta$ [Arg], H<sub>2</sub> $\gamma$ [Arg]); **1.41** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.40** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.36** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.28** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 175.5, 173.0, 172.4, 171.5, 170.0, 169.4, 160.0, 158.2, 139.5, 134.5, 133.6, 126.1, 118.5, 111.5, 88.0, 82.5, 77.7, 67.4, 63.7, 60.6, 56.0, 51.4, 45.1, 44.2, 41.4, 36.8, 36.6, 29.4, 28.8, 28.4, 27.0, 25.7, 19.7, 18.5, 12.6.

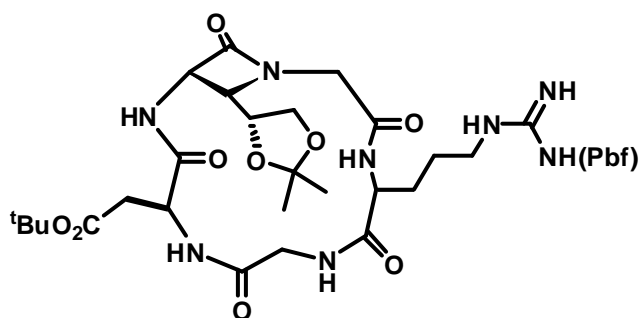
**Punto de fusión:** 163-168°C c.d. (triturado en THF)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 52.52; H, 6.78; N, 16.49.

**Encontrado:** C, 52.15; H, 6.93; N, 14.03.

**4.15.3. Ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



27c

Fórmula empírica:

$C_{39}H_{58}N_8O_{13}S$

Peso Molecular: 878.99

Rendimiento: 63% (113mg).

$[\alpha]_D^{25} = +36.5$  (c= 0.5  $CH_2Cl_2$ ).

IR( $cm^{-1}$ , KBr): 3328.6, 2977.2, 2930.5, 1767.0, 1683.8, 1640.5, 1548.8.

$^1H$ -NMR( $\delta$ , ppm, DMSO): **9.03** (1H, d, NH[Asp], J=7.5Hz); **8.90** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **7.85** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=7.1Hz); **7.29** (1H, d, NH[Arg], J=8.6Hz); **4.70** (1H, dd, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lac], J=4.1Hz, J=7.2Hz); **4.40** (1H, m, H $\alpha$ [Asp]); **4.34** (1H, m, H $\alpha$ [Arg]); **4.19** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.00** (1H, dd, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, J=7.8Hz, J=14.1Hz); **3.93** (1H, dd; CH<sub>2</sub>-dioxo, J=6.6Hz, J=8.7Hz); **3.80** (1H, d, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, J=14.7Hz); **3.77** (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lac], J=4.1Hz, J=10.2Hz); **3.67** (1H, d, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, J=14.7Hz); **3.51** (1H, m; CH<sub>2</sub>-dioxo); **3.37** (1H, dd, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, J=3.8Hz, J=13.9Hz); **3.03** (2H, m, H<sub>2</sub> $\delta$ [Arg]); **2.96** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.82** (1H, dd, HH $\beta$ [Asp], J=6.8Hz, J=16.7Hz); **2.60** (1H, dd, HH $\beta$ [Asp], J=6.8Hz, J=16.7Hz); **2.48** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.42** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.00** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.63** (2H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.42** (8H, m, H<sub>2</sub> $\gamma$ [Arg], 2 CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.40** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.38** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.36** (3H, s, CH<sub>3</sub>-dioxo).

$^{13}C$ -NMR: 173.4, 171.5, 171.2, 170.6, 169.5, 165.4, 159.0, 156.8, 138.4, 133.0, 132.4, 124.8, 117.6, 110.6, 86.6, 81.7, 74.0, 68.0, 62.1, 58.3, 53.5, 50.3, 48.4, 45.6, 43.4, 40.5, 35.1, 30.0, 28.8, 28.4, 27.0, 25.8, 25.0, 19.4, 18.1, 12.7.

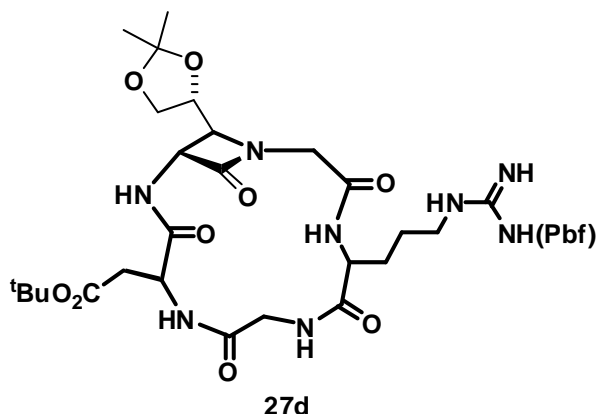
**Punto de fusión:** 185-190°C c.d. (triturado en THF)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 52.52; H, 6.78; N, 16.49.

**Encontrado:** C, 53.23; H, 6.59; N, 14.84.

**4.15.4. Ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gi-Arg(Pbf)-Gli}**



Fórmula empírica: C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S

Peso Molecular: 878.99

Rendimiento: 68% (123mg).

$[\alpha]_D^{25} = +25.2$  (c= 0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3322.7, 2978.4, 2934.2, 1760.8, 1660.1, 1652.9, 1549.1.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, DMSO): **9.03** (1H, m, NH[Gli<sub>1</sub>]); **8.85** (1H, d, NH[Asp], J=6.9Hz); **8.02** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=8.8Hz); **7.30** (1H, d, NH[Arg], J=9.1Hz); **4.60** (1H, d, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac], J=8.6Hz); **4.36** (1H, d, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, J=13.8Hz); **4.33** (2H, m, H $\alpha$ [Asp], H $\alpha$ [Arg]); **4.24** (1H, m, H<sub>R</sub>dioxo); **4.02** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=6.9Hz, J=8.9Hz); **3.84** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-dioxo, J=3.98Hz, J=8.9Hz); **3.72** (1H, dd, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, J=3.9 Hz, J=13.9 Hz); **3.44** (1H, dd, H $\alpha$  Gli<sub>1</sub>, J=6.3 Hz, J=13.9 Hz); **3.28** (1H, d, H $\alpha$  Gli<sub>2</sub>, J=13.8 Hz); **3.04** (m, 2H, H<sub>2</sub> $\delta$ [Arg]); **2.97** (2H, s, CH<sub>2</sub>-Pbf); **2.88** (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>s</sub>[ $\beta$ -lac]); **2.69** (1H, dd, H $\beta$ [Asp], J=3.9Hz, J=16.4Hz); **2.57** (1H, dd, H $\beta$ [Asp], J=9.7 Hz, J=16.4 Hz); **2.49** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.43** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **2.01** (3H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.61** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.47** (3H, m, H $\beta$ [Arg], H<sub>2</sub> $\gamma$ [Arg]); **1.41** (6H, s, CH<sub>3</sub>-Pbf); **1.40** (9H, s, <sup>t</sup>Bu); **1.33** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo); **1.26** (3H, CH<sub>3</sub>-dioxo).

<sup>13</sup>C-NMR: 174.7, 171.3, 170.3, 170.1, 168.4, 168.0, 159.0, 156.8, 138.3, 132.7, 132.2, 125.0, 117.9, 110.4, 86.7, 82.4, 75.9, 66.4, 64.0, 59.1, 53.0, 51.9, 47.1, 45.2, 43.4, 40.2, 36.3, 29.6, 28.8, 28.2, 26.7, 25.8, 25.1, 19.4, 18.0, 12.6.

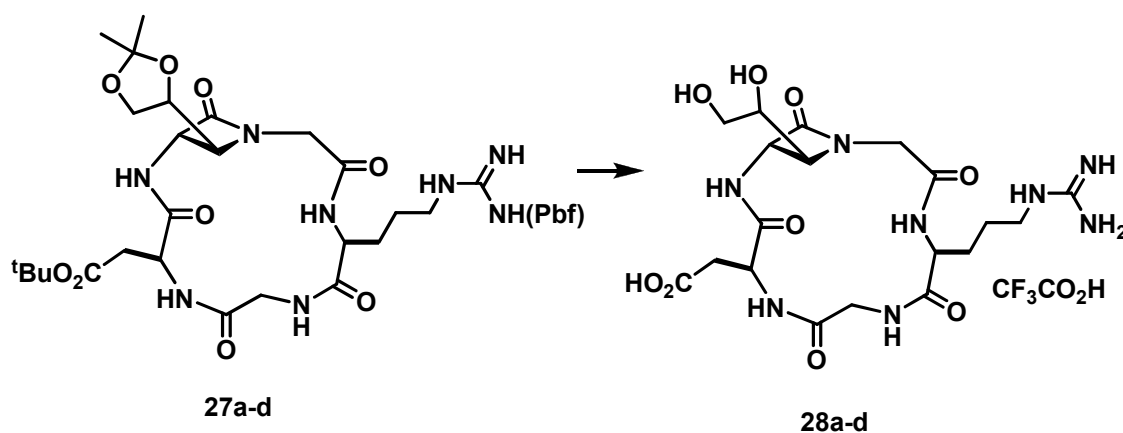
**Punto de fusión:** 166-170°C c.d. (triturado en THF)

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 52.52; H, 6.78; N, 16.49.

**Encontrado:** C, 53.30; H, 6.65; N, 14.34.

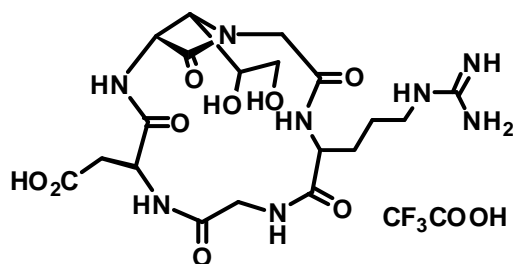
#### 4.16. Procedimiento general para la desprotección del ciclo{Asp-β-lactam-Gli-Arg-Gli} 27a-d



Se agitó una disolución del ciclo (0.05 mmol, 40 mg) en ácido trifluoroacético (3 mL) a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Pasado ese tiempo, se adicionó diisopropiléter para hacer precipitar el producto final y la suspensión resultante se centrifugó. El residuo se lavó con más diisopropiléter y finalmente se lavó con metanol. El producto se secó a presión reducida obteniendo la sal con un rendimiento calculado para la presencia de un equivalente de ácido trifluoroacético.



**4.16.1. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



28a

Fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>

Peso Molecular: 628.51

Rendimiento: 81% (25 mg).

$[\alpha]_D^{25} = -34.0$  (c= 0.5 H<sub>2</sub>O).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3339, 3067, 2946, 1747, 1660.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O): **8.86** (1H, s, NH[Gli<sub>1</sub>]); **8.76** (1H, d, NH[Asp], J=7.5Hz); **8.28** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=7.5Hz); **7.56** (1H, d, NH[Arg], J=8.0Hz); **7.11** (1H, s, NH $\delta$ [Gua]); **4.95** (1H, m, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac]); **4.62** (1H, m, H $\alpha$ [Asp]); **4.30** (1H, m, H $\alpha$ [Arg]); **3.98** (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lac]); **3.94** (1H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli); **3.57** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>, J=5.9Hz, J=15Hz); **3.50** (1H, m, CH<sub>5</sub>OH); **3.47** (2H, m, CH<sub>2</sub>Gli<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH); **3.39** (2H, m, CH<sub>2</sub>Gli<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-OH ); **3.16** (2H, m, H<sub>2</sub> $\delta$ [Arg]); **2.87** (2H, m, H $\beta$ [Asp]); **1.75** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.65** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.56** (2H, m, H<sub>2</sub> $\gamma$ [Arg]).

<sup>13</sup>C-NMR: 174.5, 174.4, 173.5, 173.2, 172.6, 168.5, 157.4, 69.4, 63.3, 60.6, 58.6, 53.9, 51.5, 49.3, 47.0, 44.6, 41.2, 34.9, 29.1, 24.6.

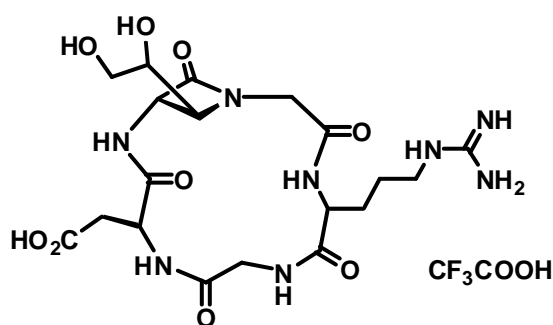
**Punto de fusión:** 260-262°C c.d.

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 40.13; H, 4.97; N, 17.83.

**Encontrado:** C, 34.53; H, 5.54; N, 15.52.

**4.16.2. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



28b

Fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>

Peso Molecular: 628.51

Rendimiento: 80% (25 mg).

$[\alpha]_D^{25} = -24.5$  (c= 0.5 H<sub>2</sub>O).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3343, 3070, 2940, 1756, 1751, 1652.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O): **8.75** (1H, m, NH[Asp], NH[Gli<sub>1</sub>]); **8.34** (1H, d, NH[Arg], J=7.1 Hz); **8.08** (1H, d, NH[β-lac], J=6.9 Hz); **7.10** (1H, b.s, NH<sub>δ</sub>[Gua]); **4.70** (2H, no signal, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lac], H<sup>α</sup>[Asp]); **4.22** (1H, m, H<sup>α</sup>[Arg]); **4.11** (1H, d, CH<sub>2</sub> Gli<sub>2</sub> J=15.5 Hz); **3.91** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>-β-lac); **3.86** (1H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>); **3.79** (1H, m, CH<sub>S</sub>OH); **3.74** (1H, d, CH<sub>2</sub> Gli<sub>2</sub> J=15.5 Hz); **3.63** (1H, m, CH<sub>2</sub>-OH,); **3.58** (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>-OH ); **3.13** (2H,m, H<sub>2</sub>δ[Arg]); **2.86** (2H, dd, HHβ[Asp], J=4.1Hz J=16.9 Hz); **2.77** (2H, dd, HHβ[Asp], J=7.1Hz J=16.9 Hz); **1.72** (2H, m, Hβ[Arg]); **1.60** (2H, m, H<sub>2</sub>γ[Arg]).

<sup>13</sup>C-NMR: 175.1, 175.2, 173.0, 172.3, 169.5, 169.4, 157.5, 72.8, 63.4, 61.4, 59.4, 54.6, 51.1, 48.6, 44.84, 41.1, 35.1, 27.9, 25.1.

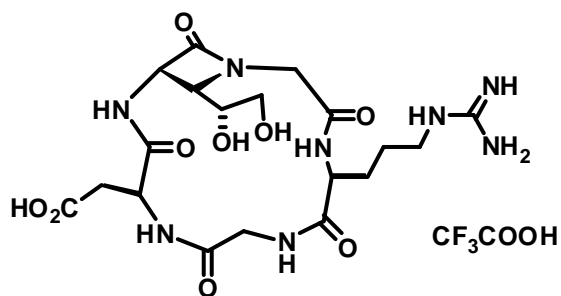
**Punto de fusión:** 263-266°C c.d.

**Análisis elemental:**

**Calculado:** C, 40.13; H, 4.97; N, 17.83.

**Encontrado:** C, 34.83; H, 5.85; N, 15.72.

**4.16.3. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



28c

Fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>

Peso Molecular: 628.51

Rendimiento: 75% (23 mg);

$[\alpha]_D^{25} = +5.9$  (c= 0.5 H<sub>2</sub>O);

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3343, 3050, 2973, 1751, 1734, 1654.

<sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , ppm, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O): **8.91** (1H, d, NH[Asp], J=3.2Hz); **8.84** (1H, d, NH[Arg], J=7.9Hz); **8.42** (1H, s, NH[Gli<sub>1</sub>]); **7.90** (1H, d, NH[ $\beta$ -lac], J=9.7Hz); **7.12** (1H, s, NH $\delta$ [Gua]); **5.12** (1H, m, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>s</sub>[ $\beta$ -lac]); **4.68** (2H, m, H $\alpha$ [Asp], H $\alpha$ [Arg]); **4.30** (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>s</sub>[ $\beta$ -lac]); **4.24** (1H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>); **4.12** (1H, d, CH<sub>2</sub> Gli<sub>2</sub>, J=16.6Hz); **4.06** (1H, m, CH<sub>R</sub>OH); **3.90** (1H, d, CH<sub>2</sub> Gli<sub>2</sub>, J=16.6Hz); **3.70** (1H, dd; CH<sub>2</sub>-OH, J=4.2Hz, J=11.9Hz); **3.60** (1H, dd; CHH-OH, J=4.27Hz, J=11.96Hz); **3.55** (1H, d, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>, J=16.0 Hz); **3.16** (2H, m, H<sub>2 $\delta$</sub> [Arg]) **2.89** (2H, m, HH $\beta$ [Asp]); **1.78** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.73** (1H, m, H $\beta$ [Arg]); **1.56** (2H, m, H<sub>2 $\gamma$</sub> [Arg]).

<sup>13</sup>C-NMR: 174.5, 173.4, 173.0, 171.7, 171.6, 168.7, 157.5, 69.58, 64.1, 60.9, 58.9, 54.5, 52.8, 47.8, 44.1, 41.2, 35.0, 28.3, 24.8.

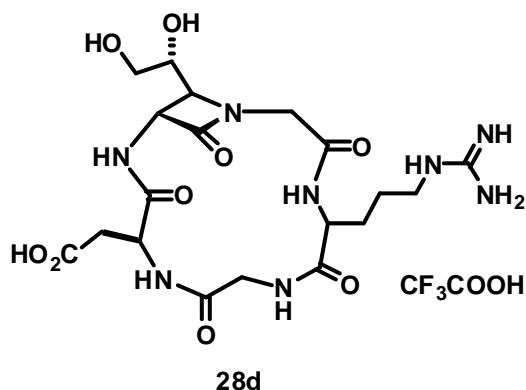
Punto de fusión: 263-266°C c.d.

Análisis elemental:

Calculado: C, 40.13; H, 4.97; N, 17.83.

Encontrado: C, 36.12; H, 4.91; N, 15.52.

**4.16.4. Trifluoroacetato de ciclo{Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4S)-3-amino-4-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-on-1-il]-Gli-Arg(Pbf)-Gli}**



Fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>

Peso Molecular: 628.51

Rendimiento: 78% (24 mg).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +1.8 (c= 0.5 H<sub>2</sub>O).

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 3346, 3076, 2945, 1761,1730, 1653.

<sup>1</sup>H-NMR(δ, ppm, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O): **8.90** (1H, d, NH[Asp],J=6.4 Hz); **8.82** (1H, s, NH[Gli<sub>1</sub>]); **8.36** (1H, d, NH[β-lac], J=7.2 Hz); **8.02** (1H, d, NH[Arg], J=8.7 Hz); **7.18** (1H, b.s, NH<sub>δ</sub>[Gua]); **4.70** (2H, no signal, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lac], H<sup>α</sup>[Asp]); **4.40** (1H, m, H<sup>α</sup>[Arg]); **3.90** (1H, m, CH<sub>R</sub>OH); **3.83** (1H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>); **3.68** (1H, dd, CH<sub>2</sub>-OH, J=3.6Hz, J=12Hz); **3.63** (1H, m, CH<sub>2</sub>-NH Gli<sub>1</sub>); **3.56** (3H, m, 2H Gli<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-OH ); **3.22** (1H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lac]); **3.16** (2H,m, H<sub>2</sub>δ[Arg]) **2.86** (2H, m, 1Hβ[Asp]); **1.78** (1H, m, Hβ[Arg]); **1.63** (3H, m, Hβ[Arg], H<sub>2</sub>γ[Arg]).

<sup>13</sup>C-NMR: 175.5, 175.2, 173.0, 172.4, 169.6, 169.4, 157.5, 72.8, 63.4, 61.4, 59.5, 54.7, 51.2, 48.6, 44.8, 41.1, 35.1, 27.9, 25.1.

**Punto de fusión:** 266-270°C c.d

**Análisis elemental:**

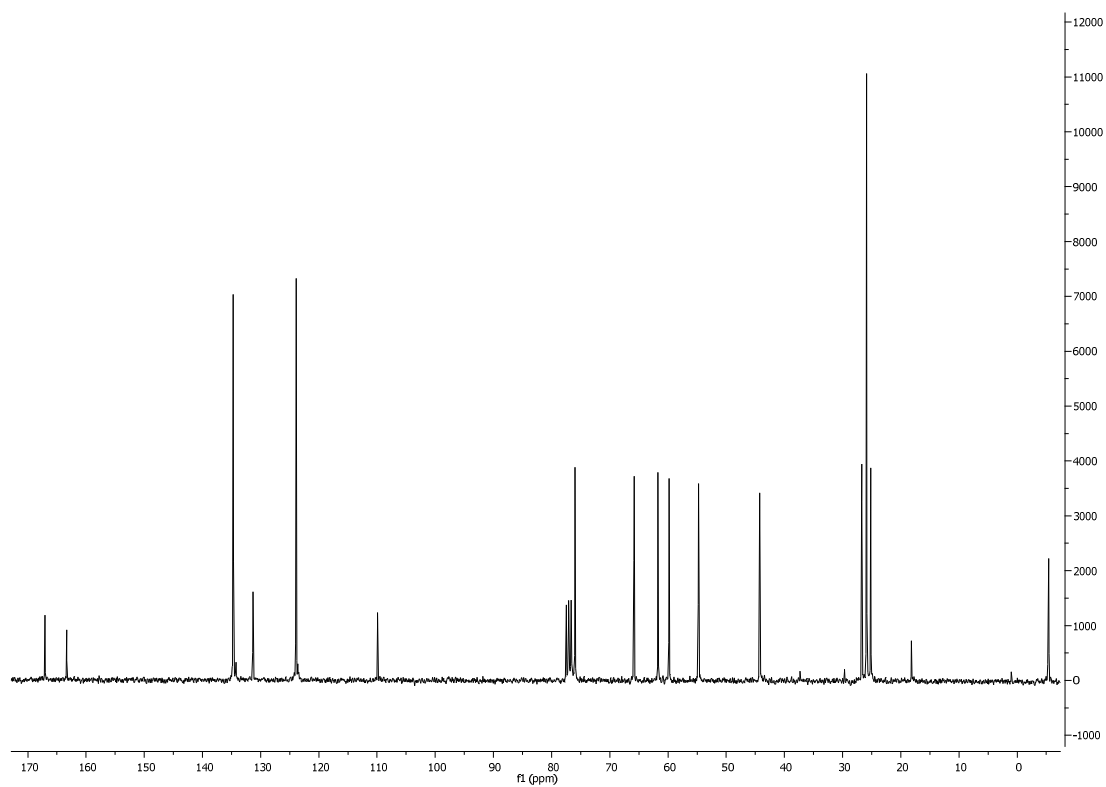
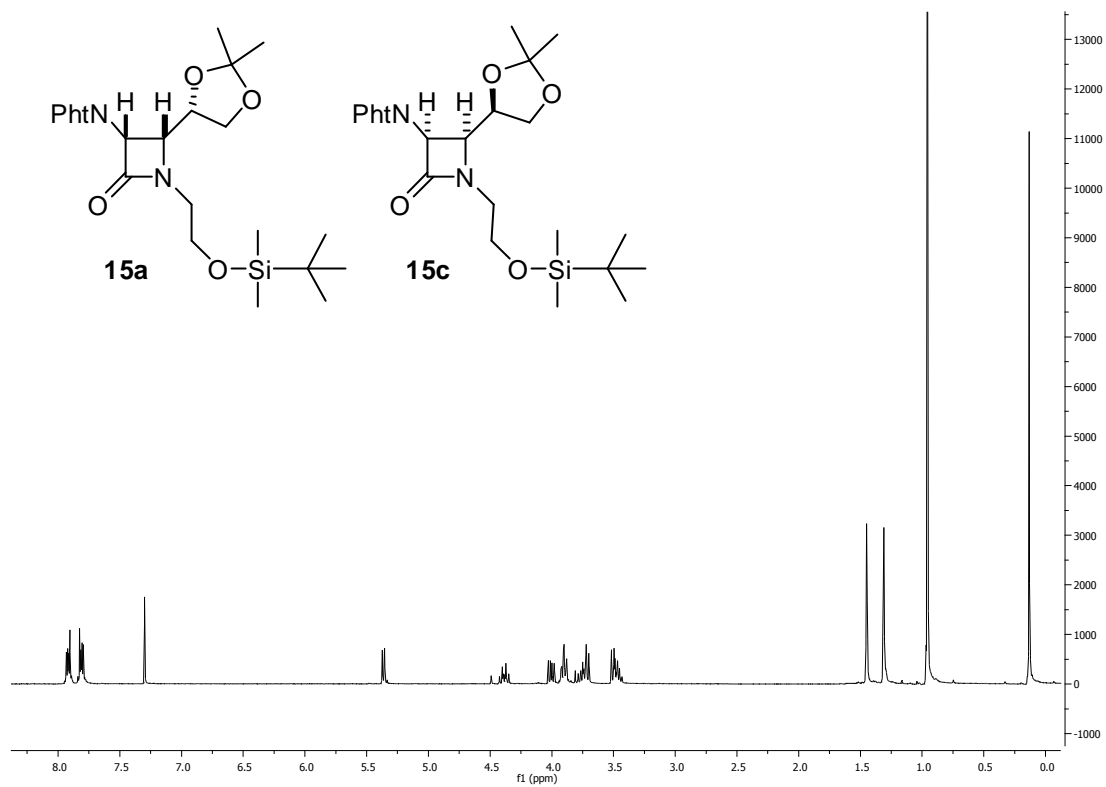
**Calculado:** C, 40.13; H, 4.97; N, 17.83.

**Encontrado:** C, 36.32; H, 4.72; N, 15.61.

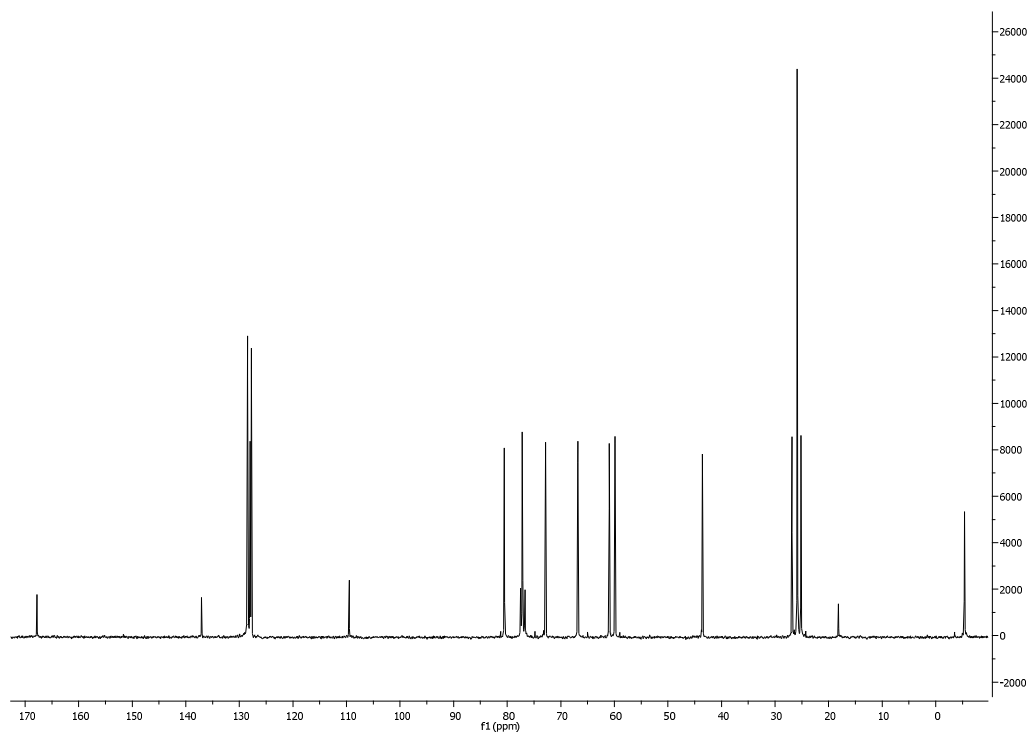
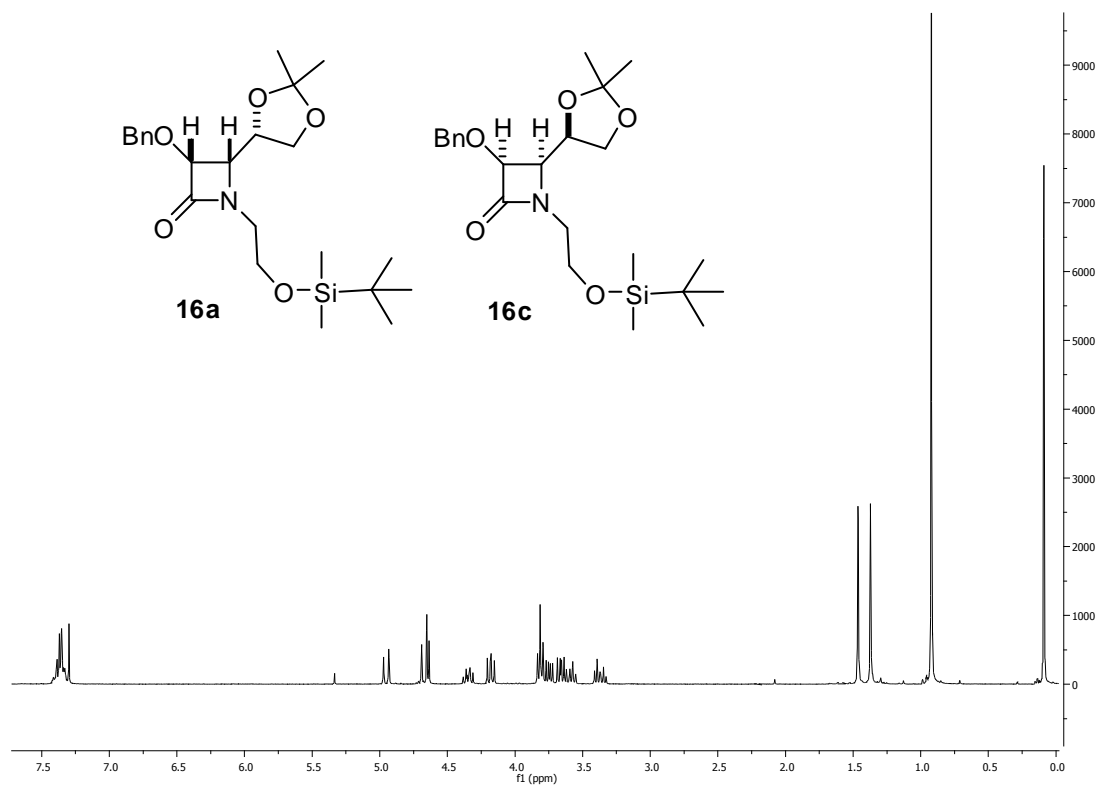


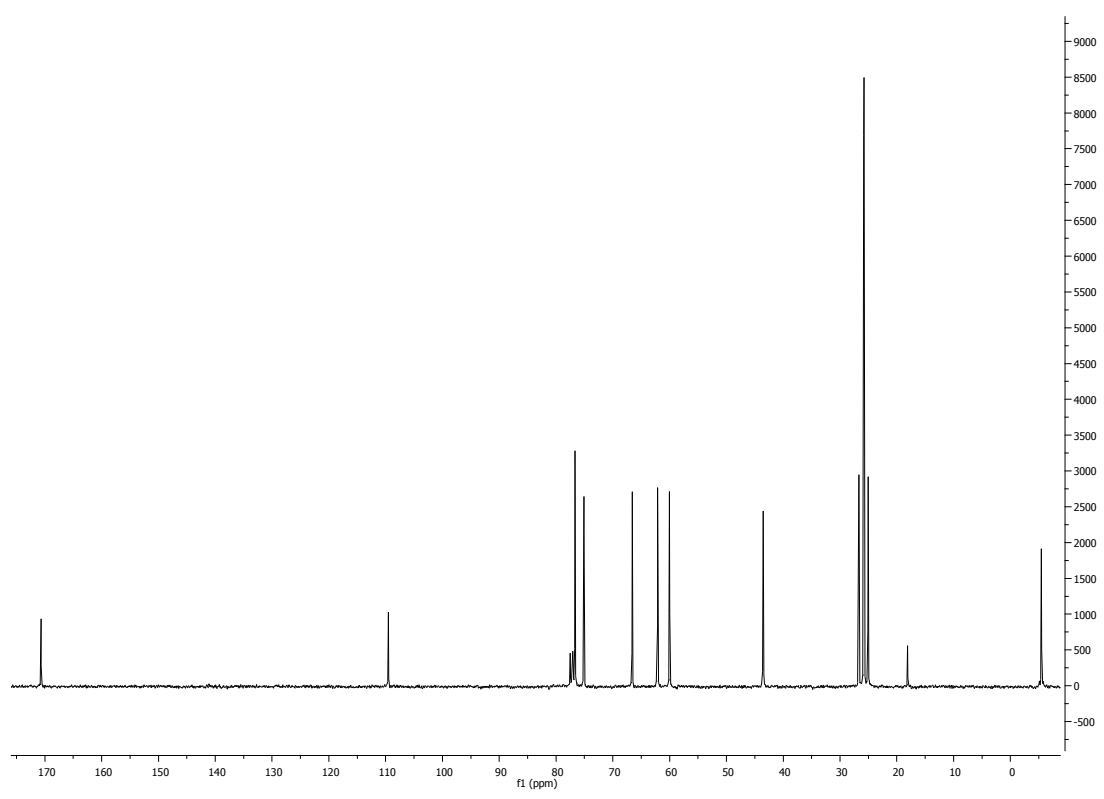
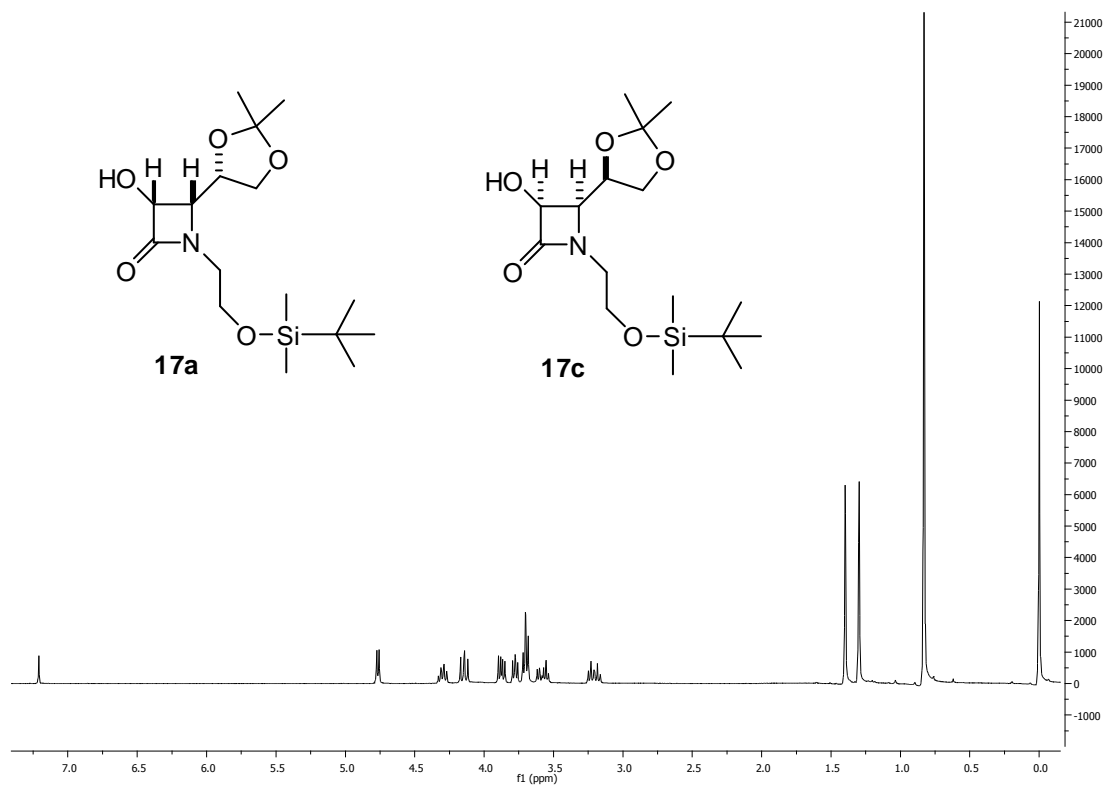
**Espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$**

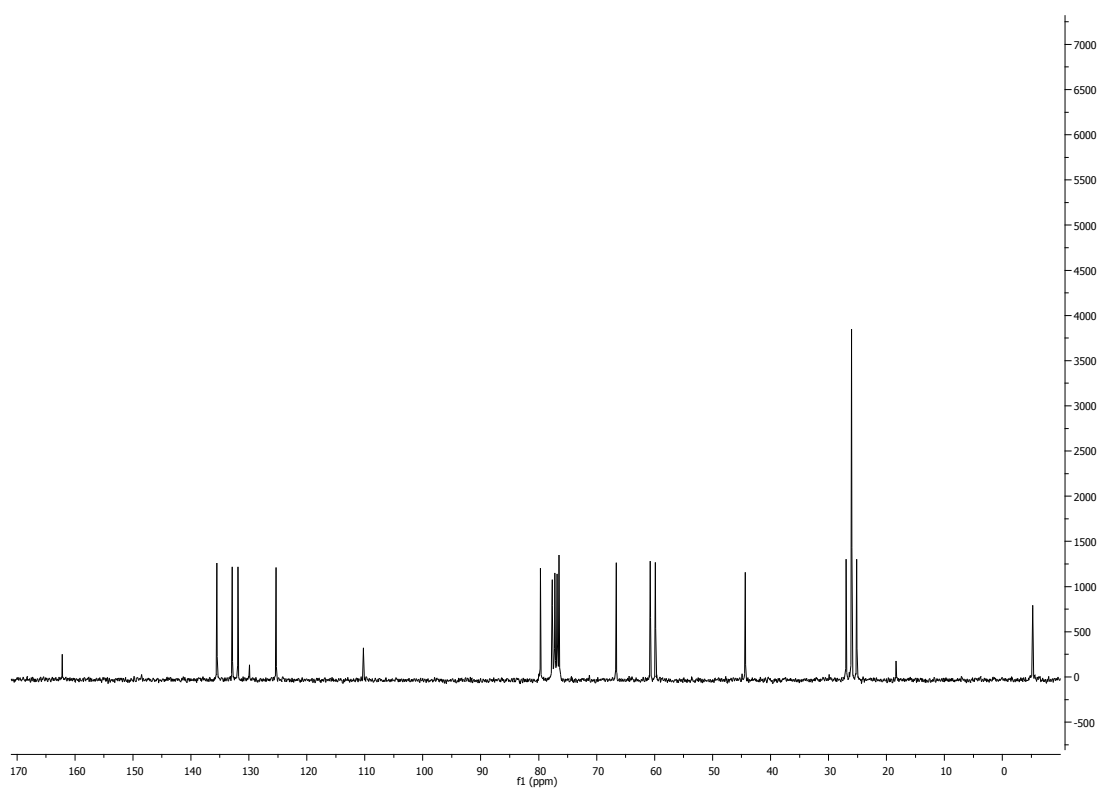
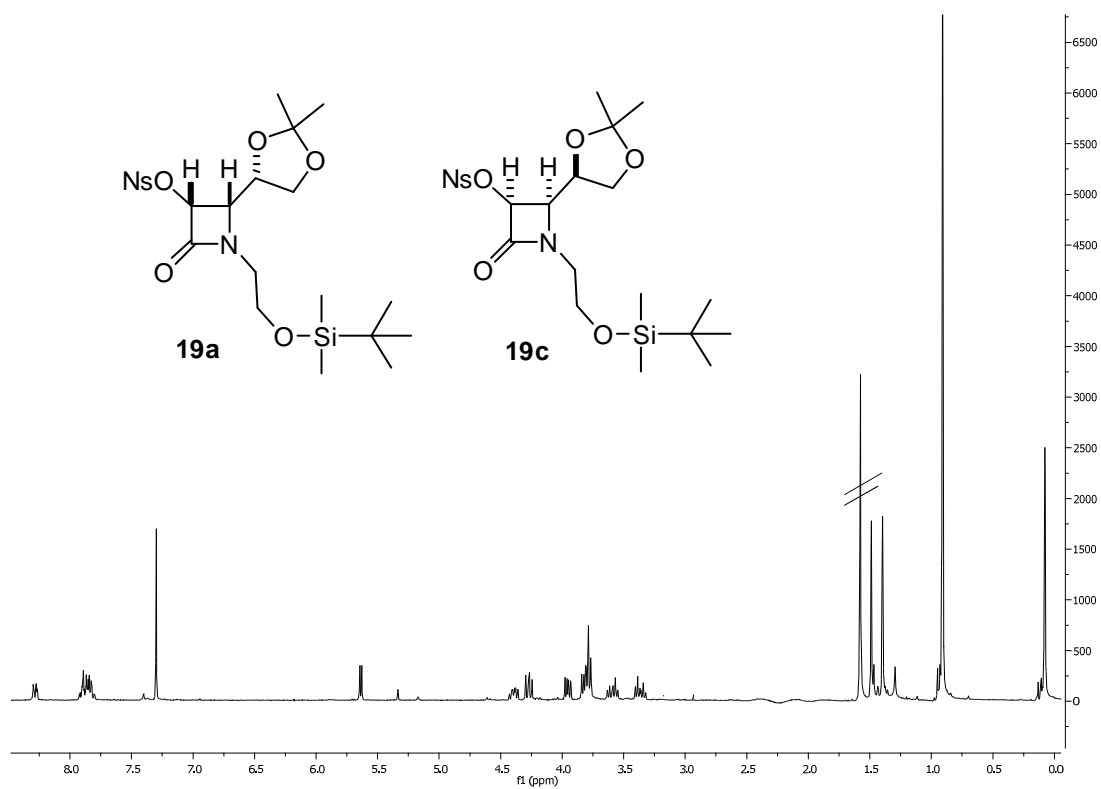


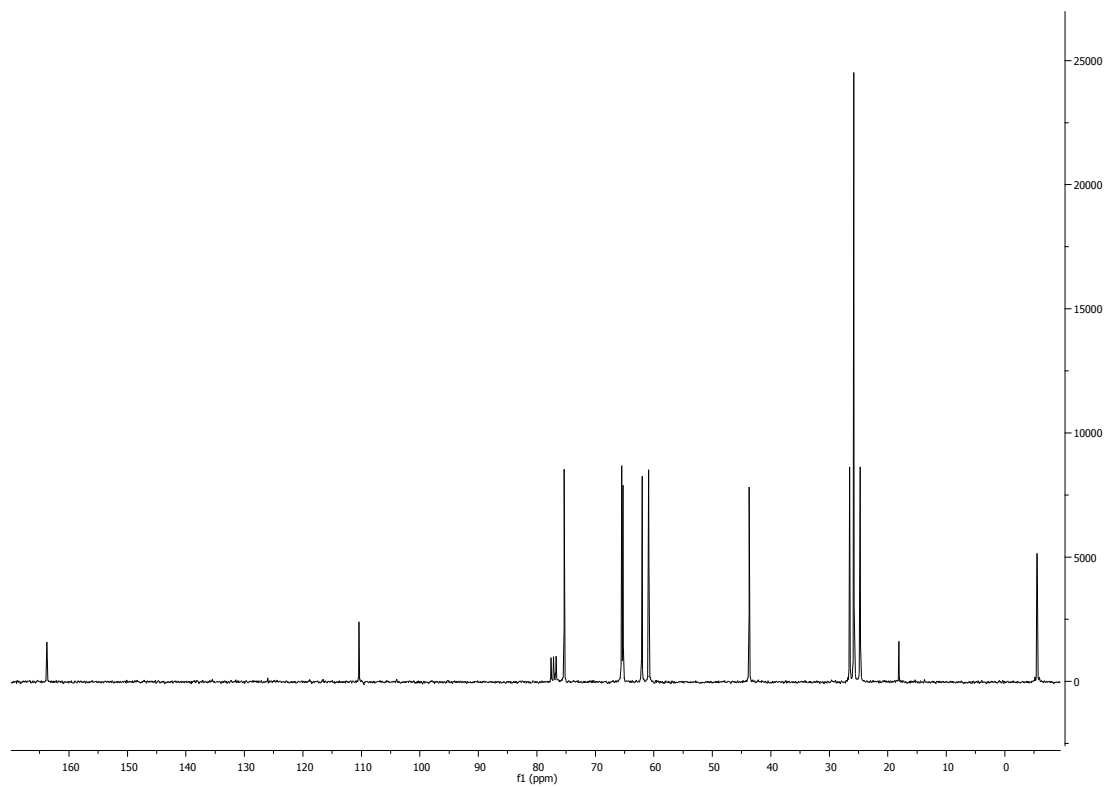
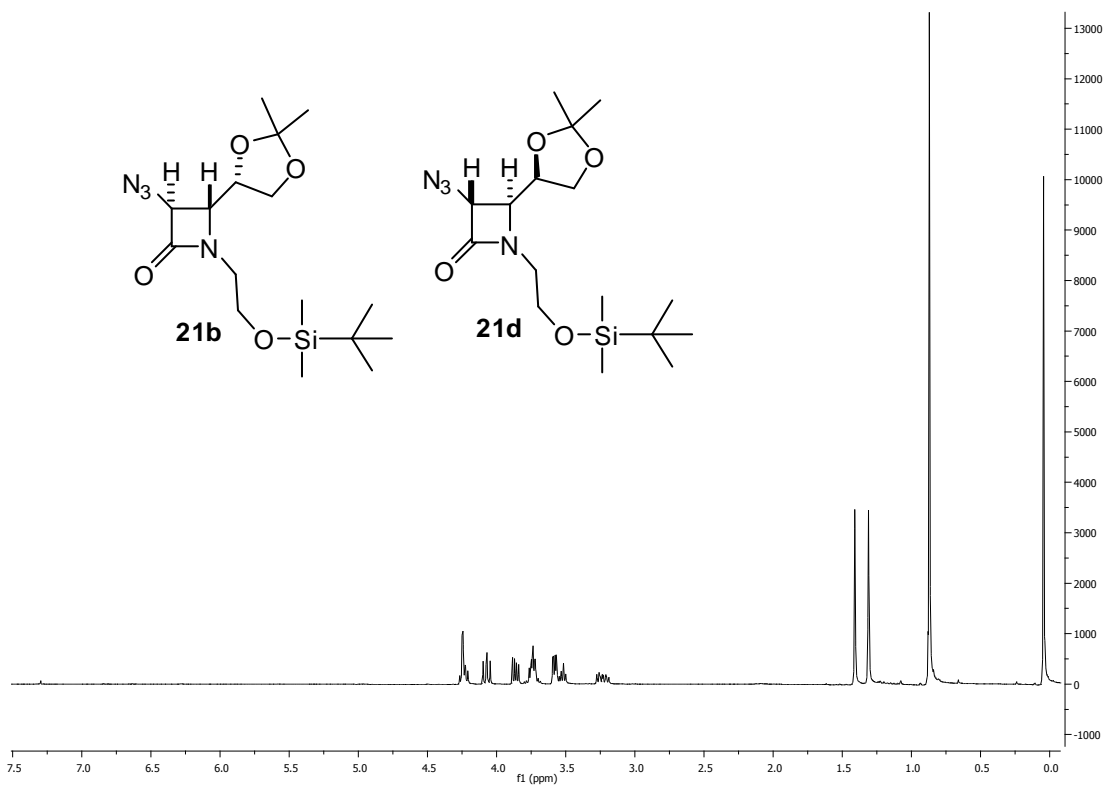
**5. ESPECTROS DE  $^1\text{H}$  Y  $^{13}\text{C}$** 

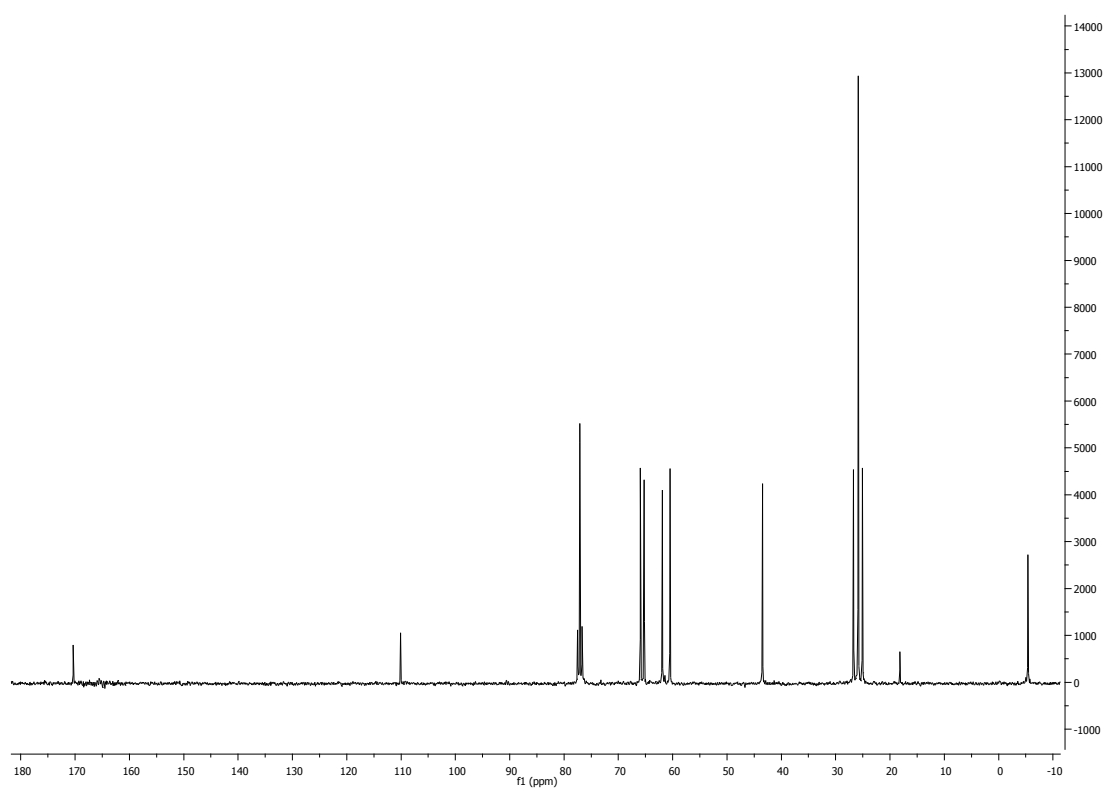
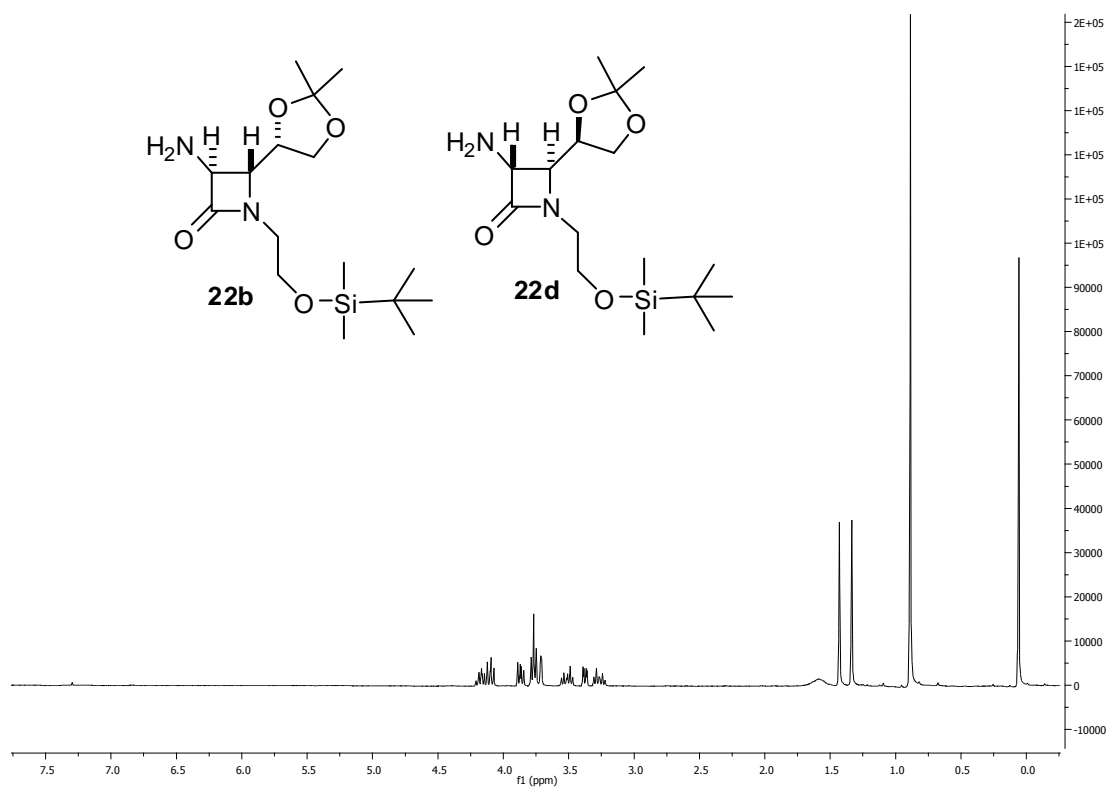


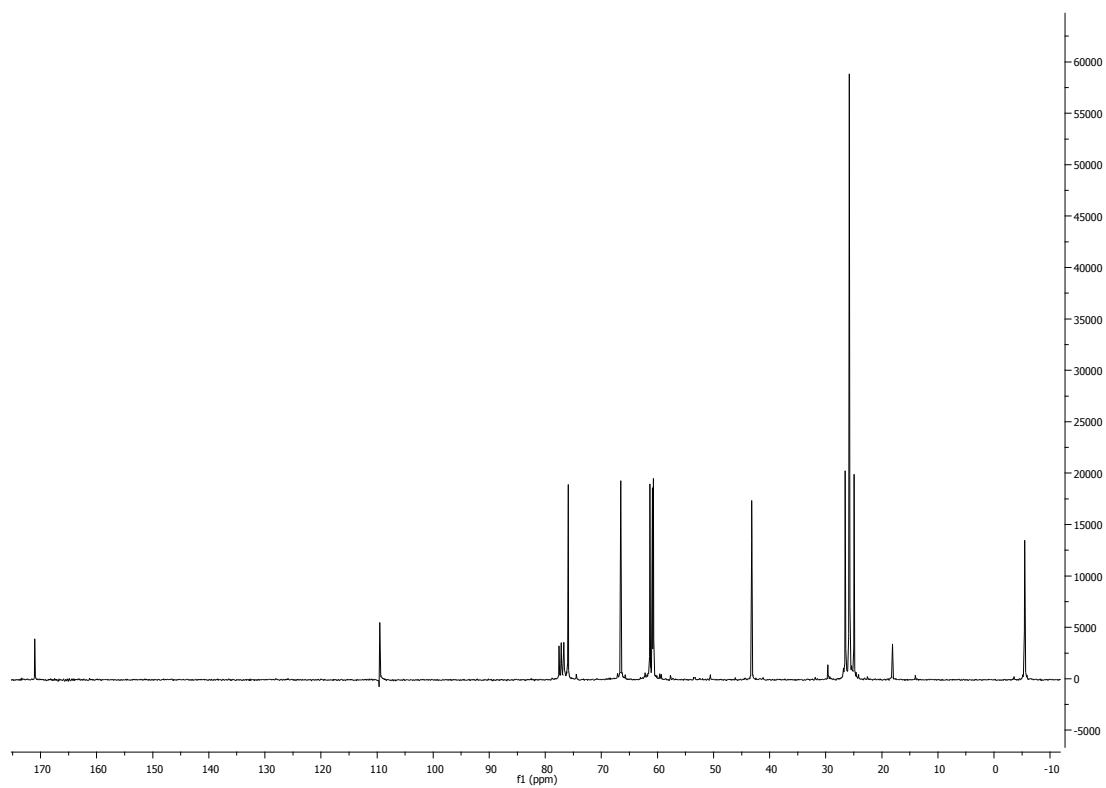
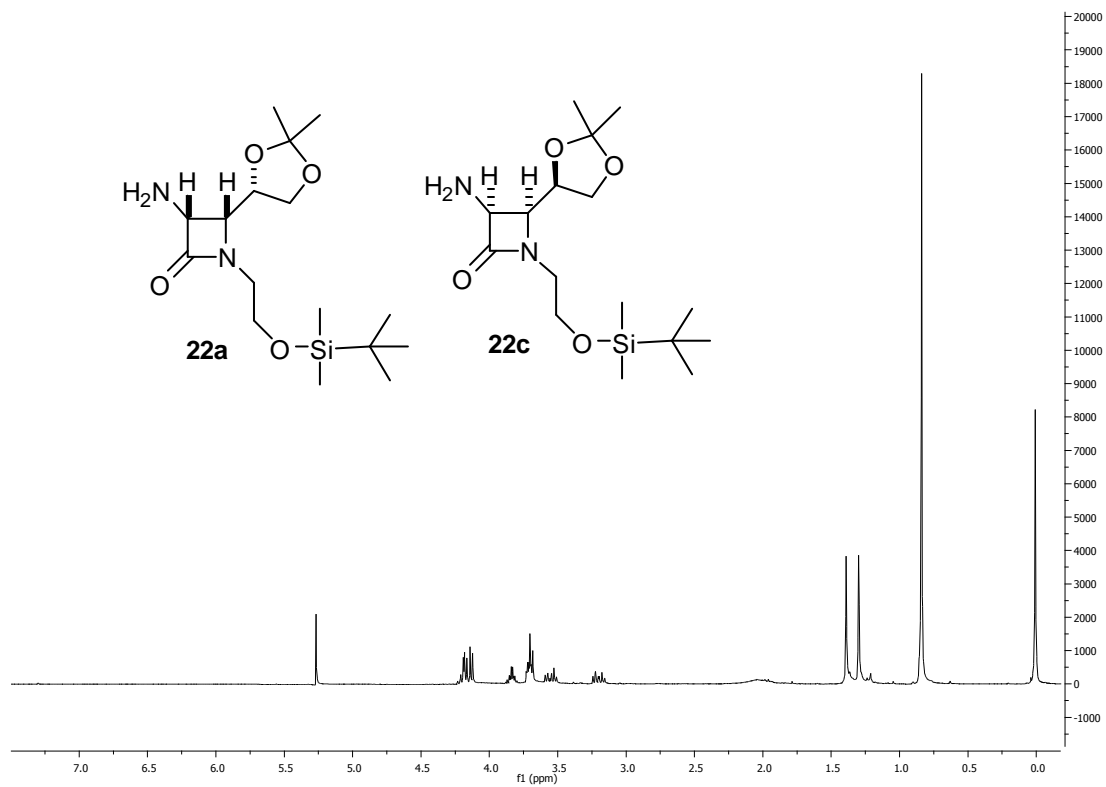


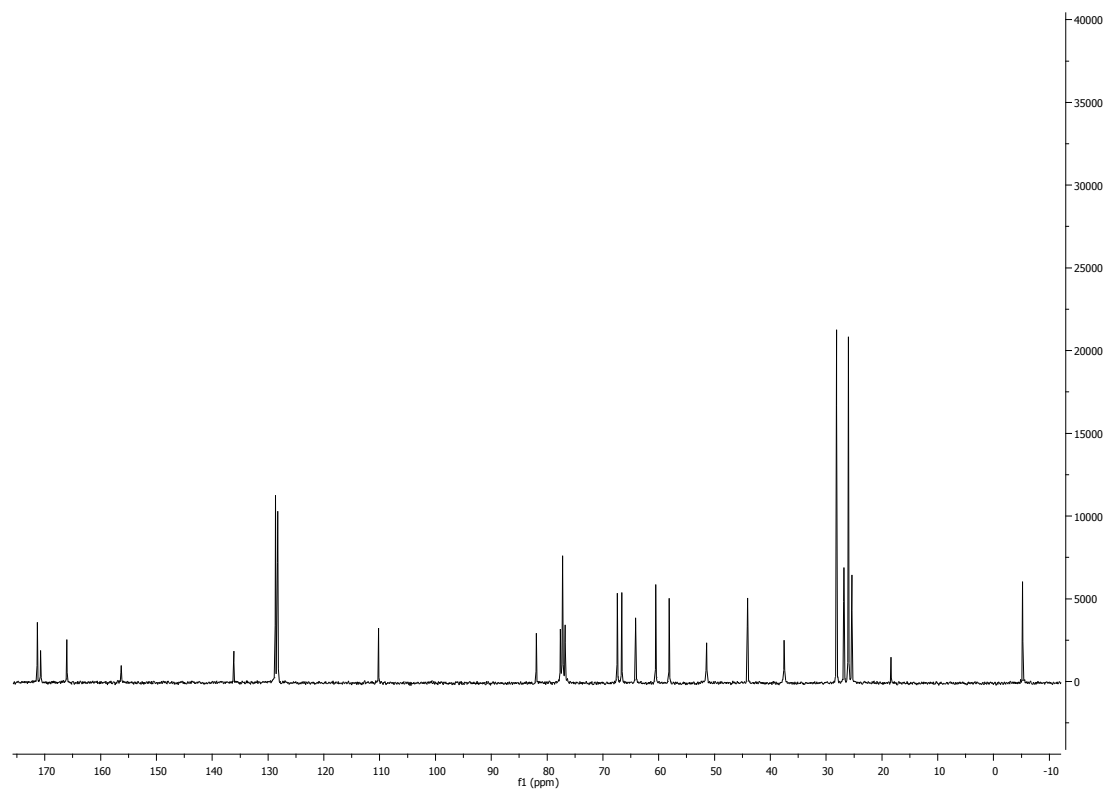
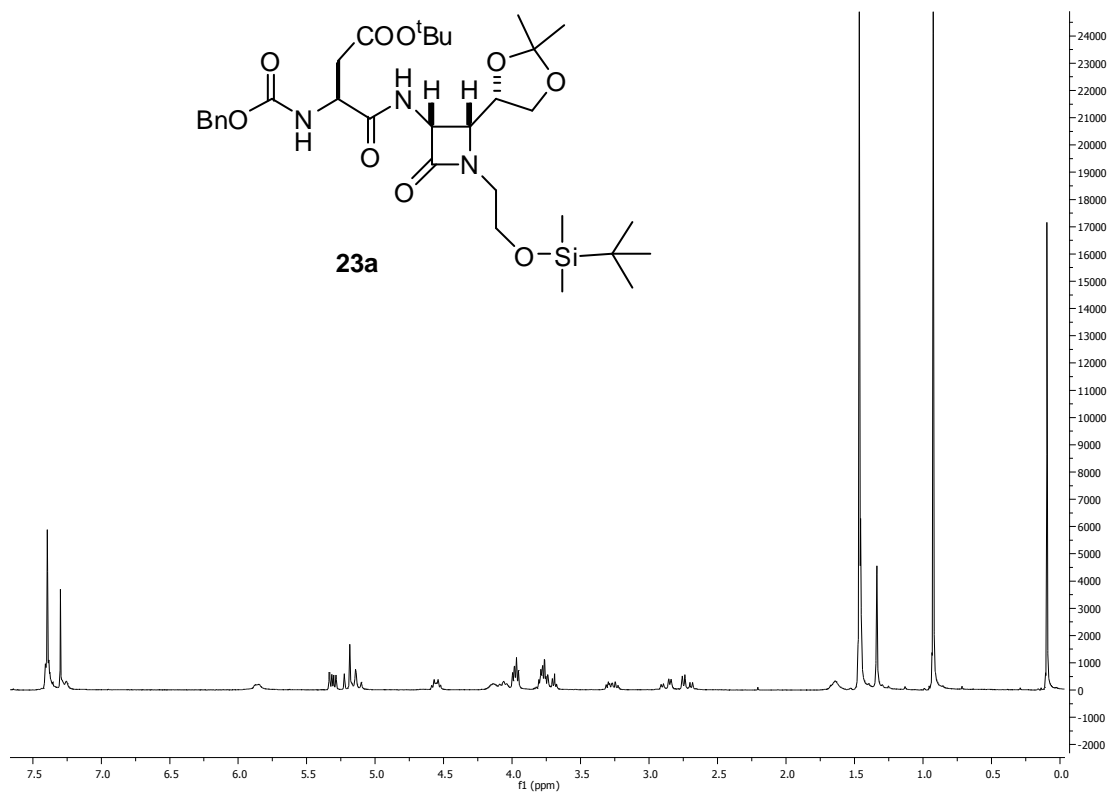


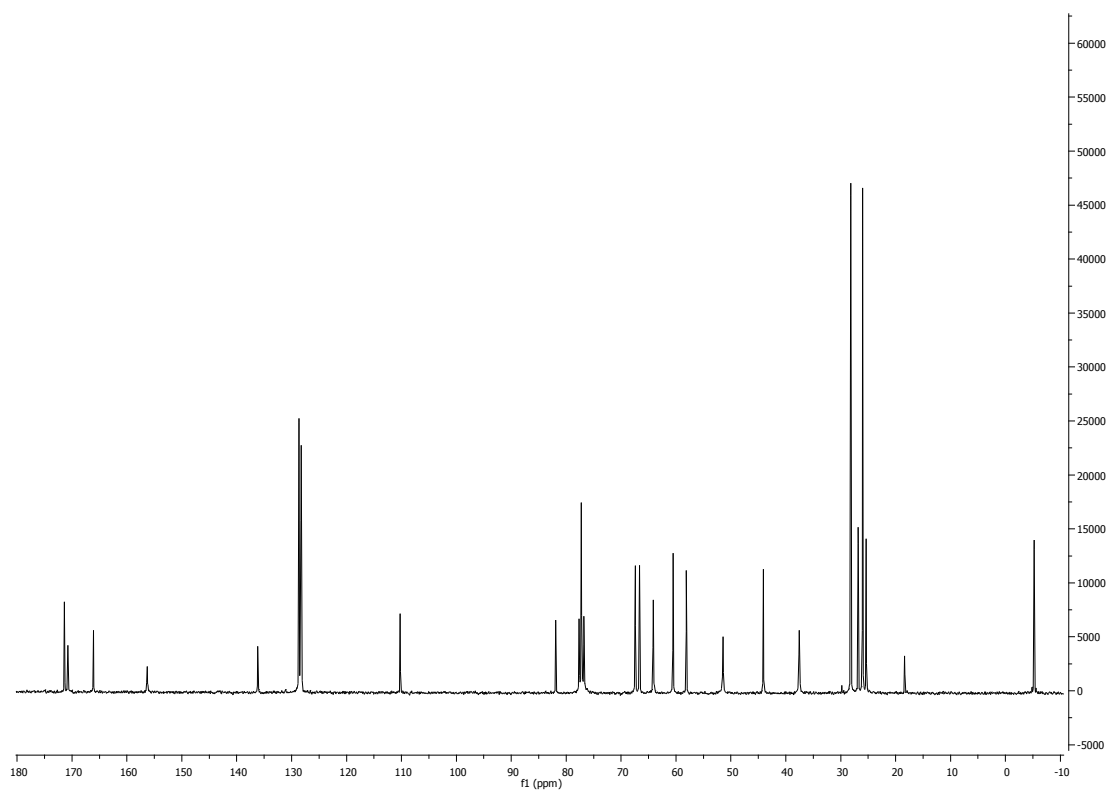
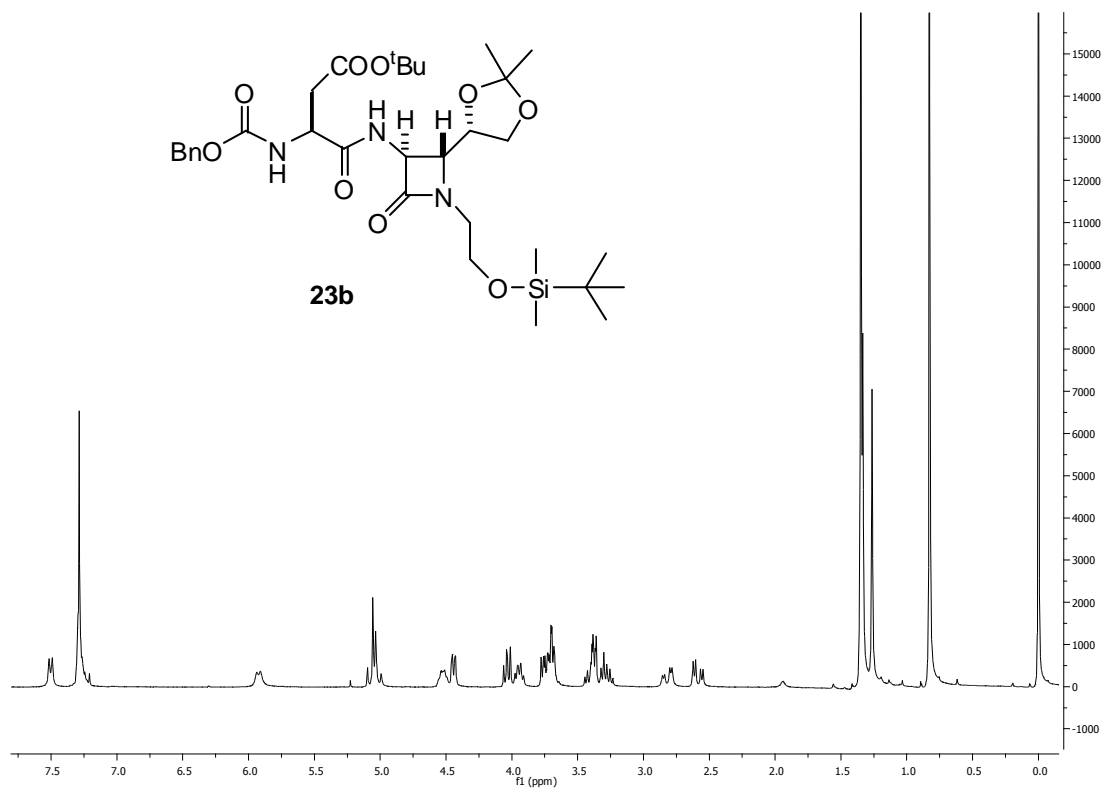




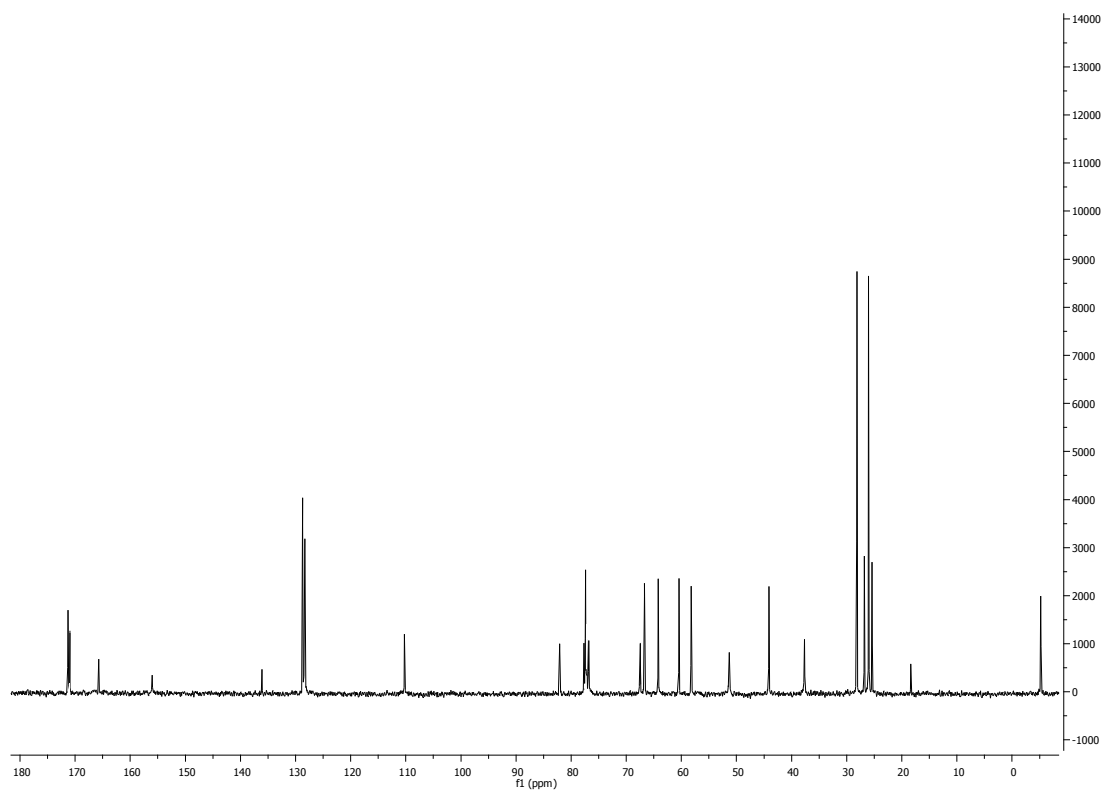
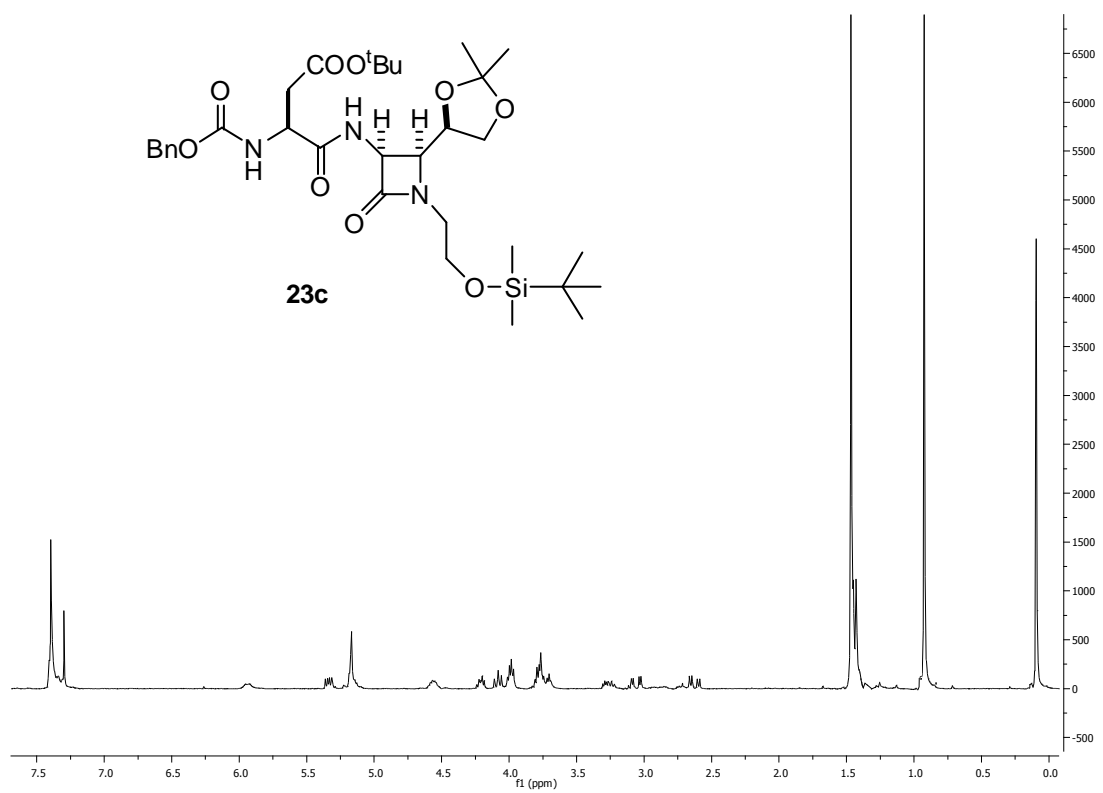


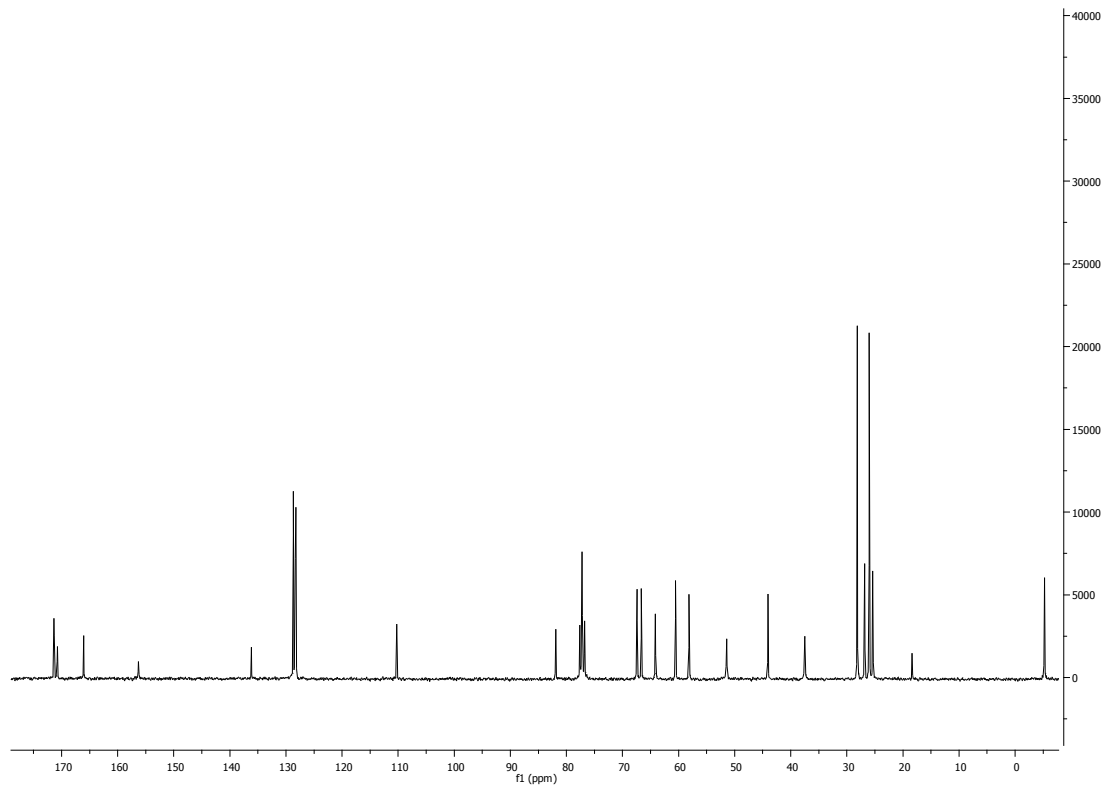
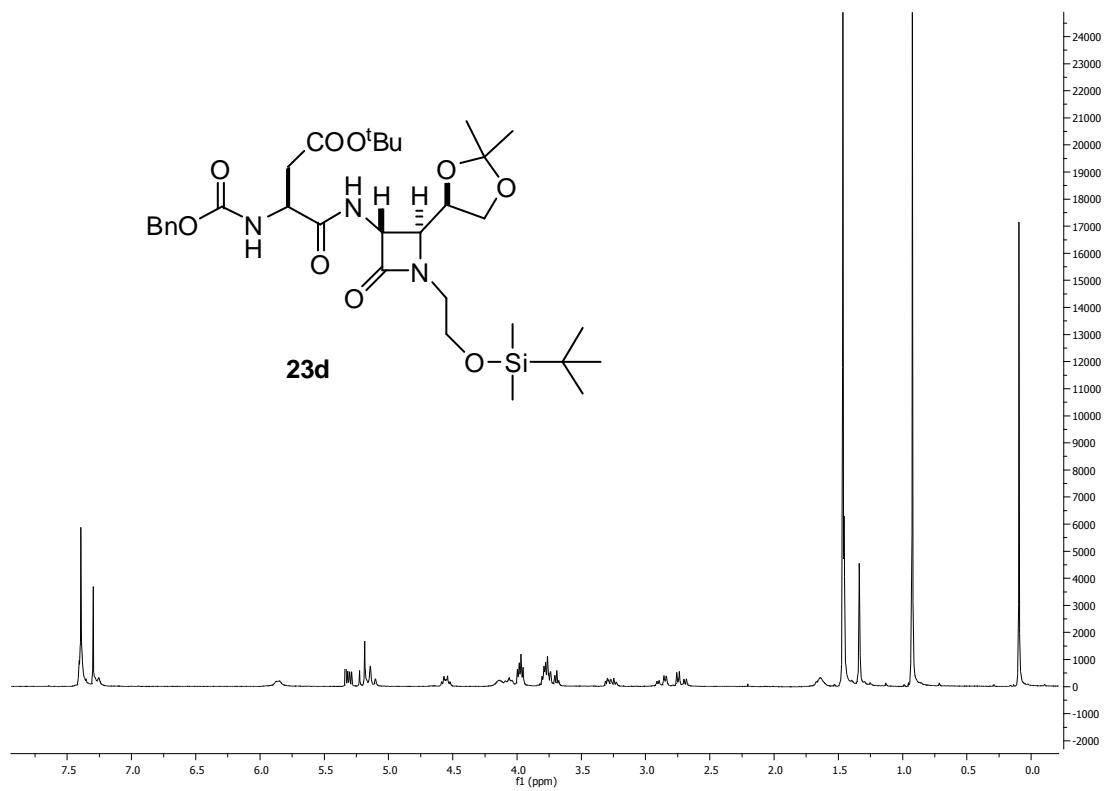


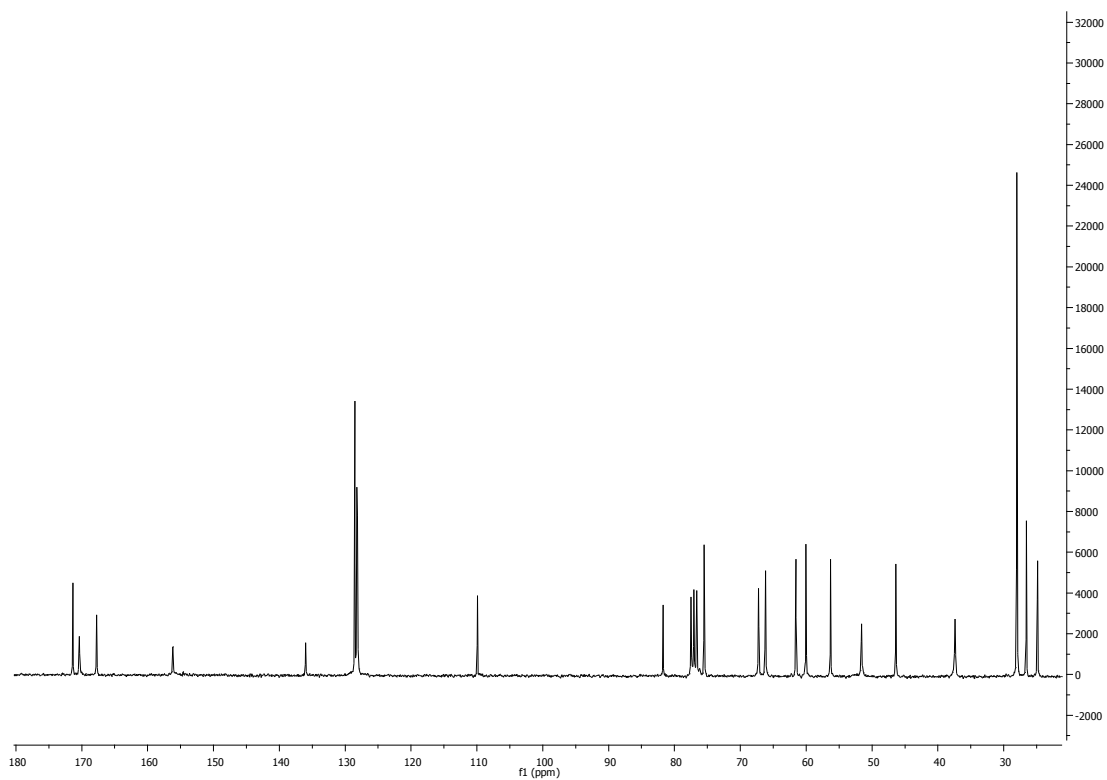
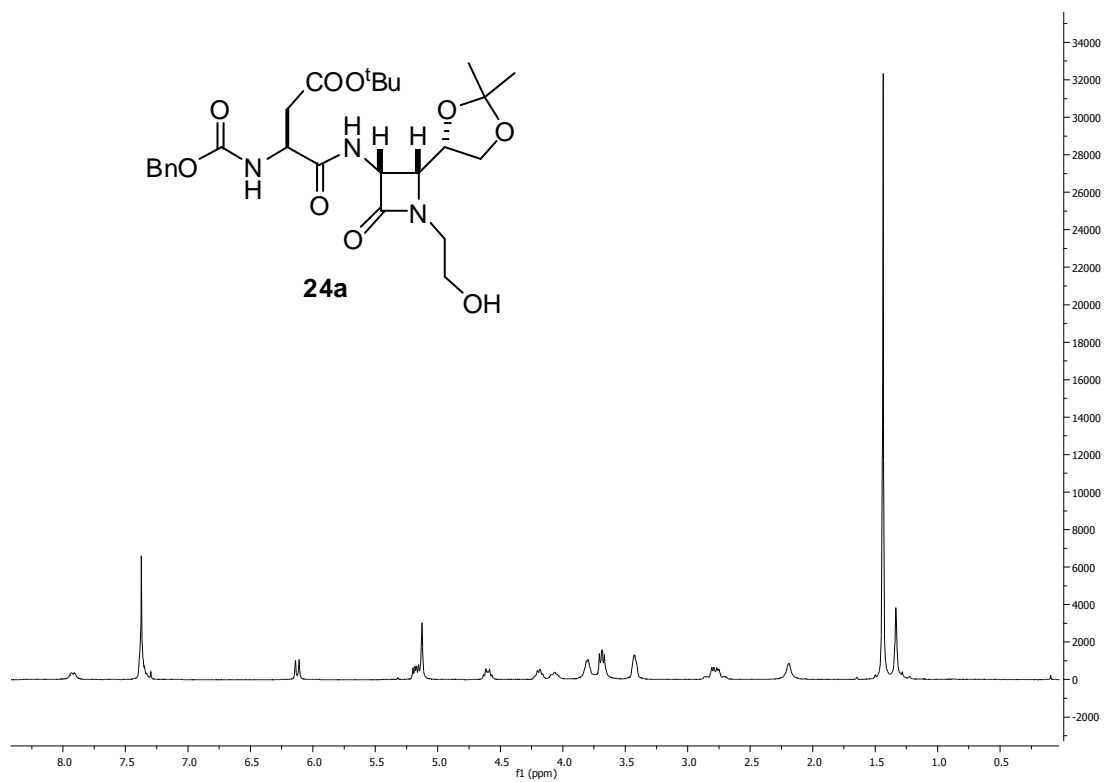


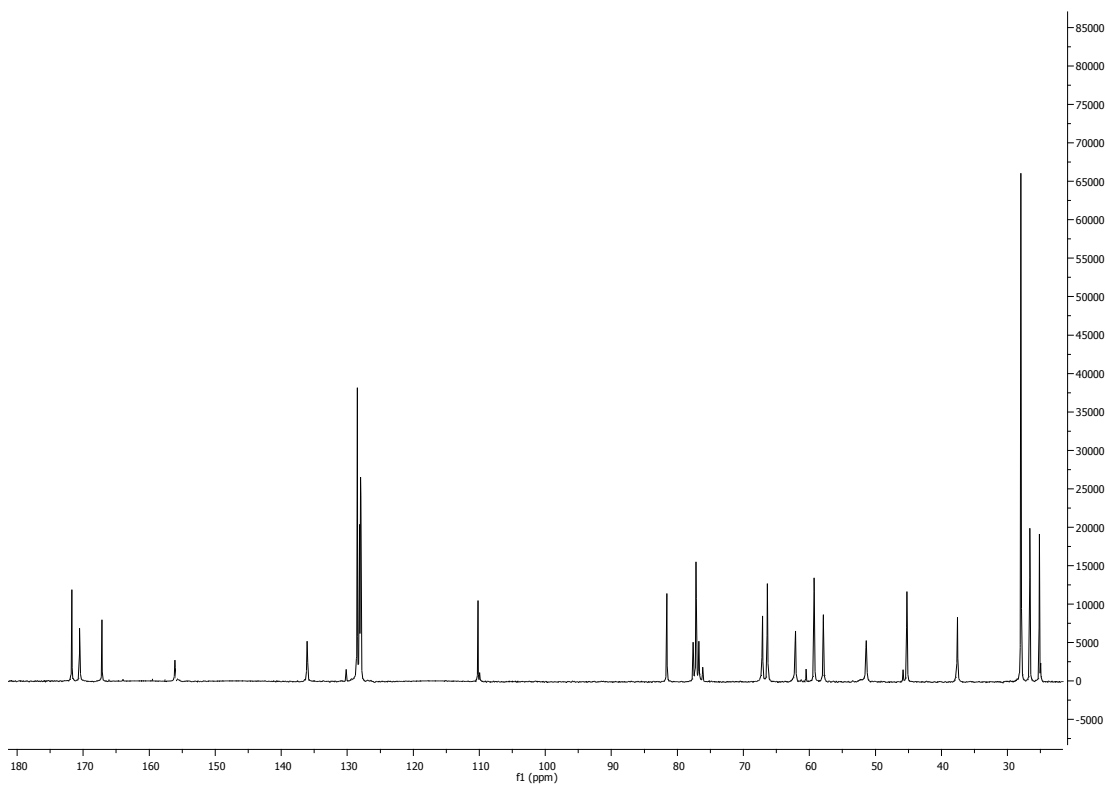
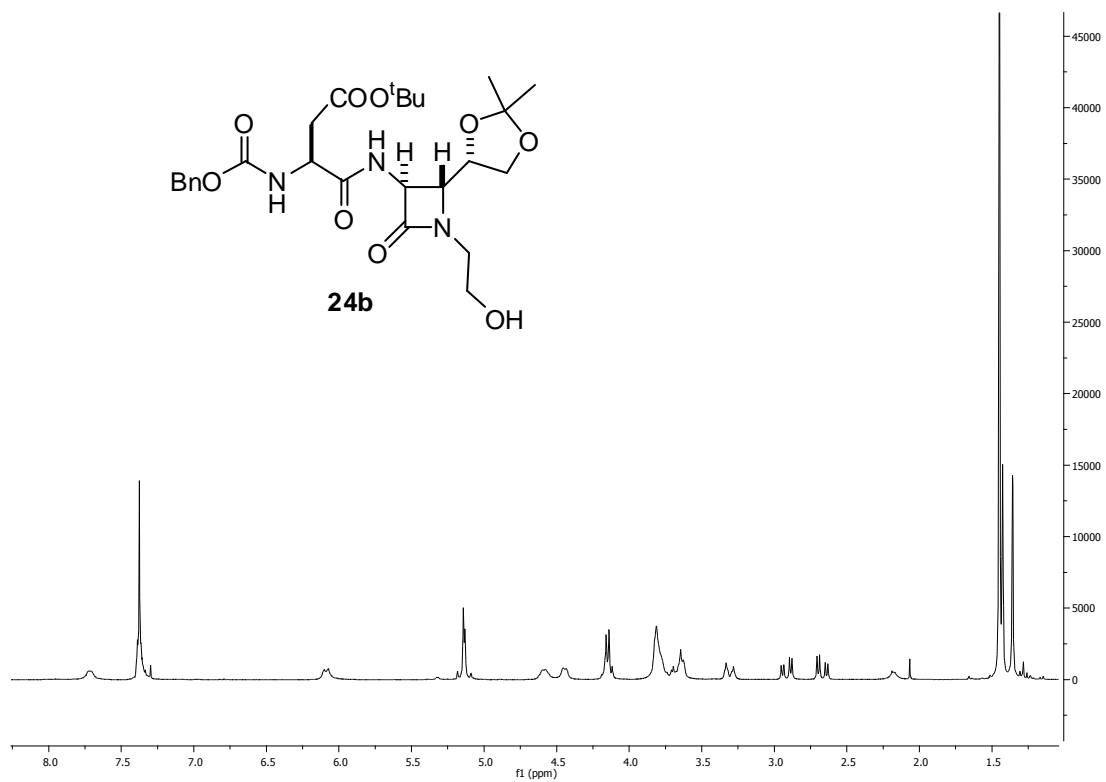


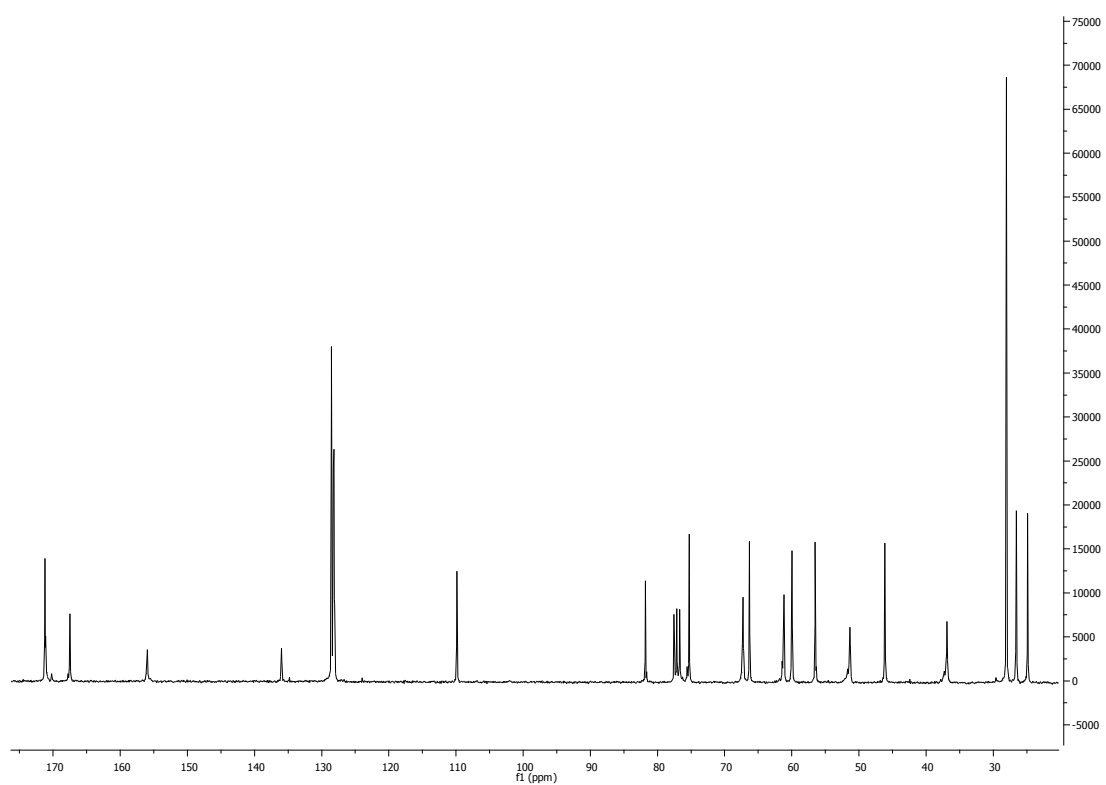
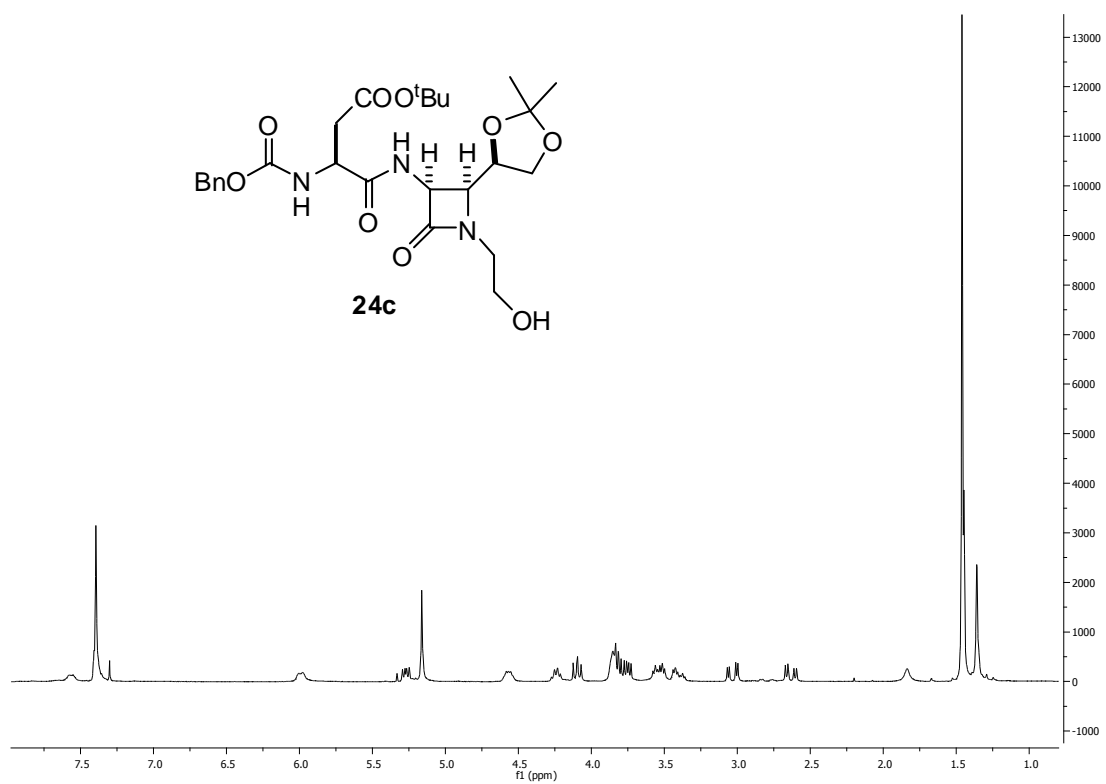


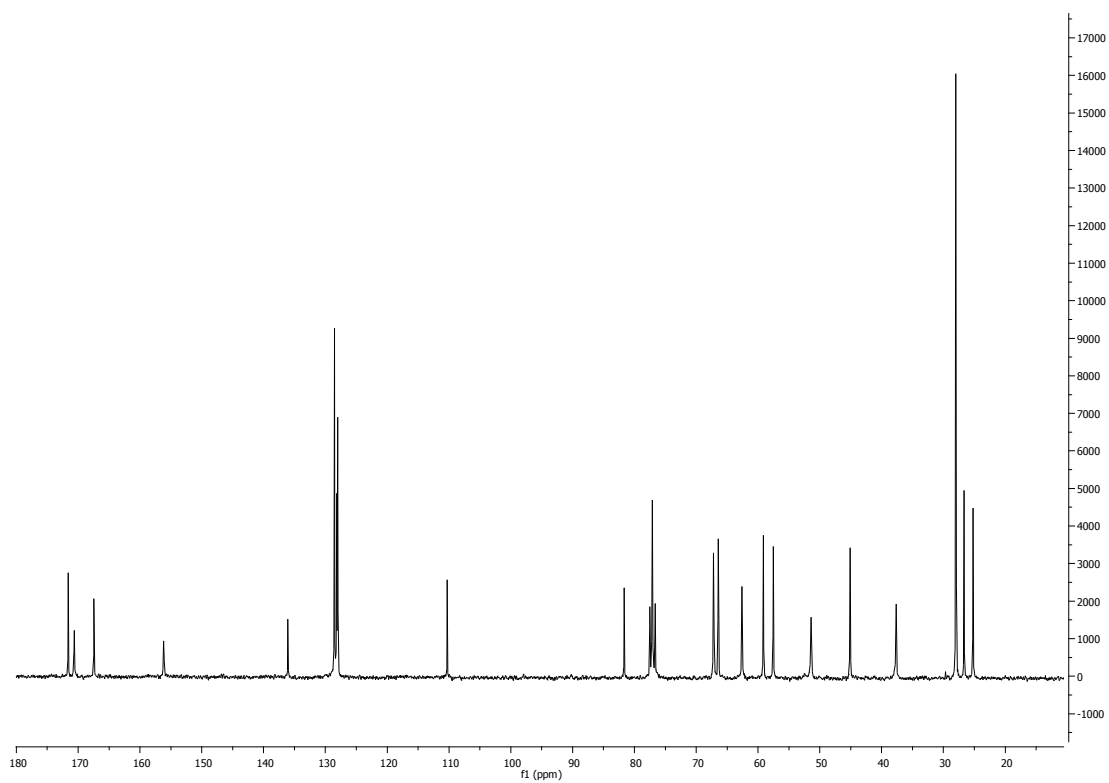
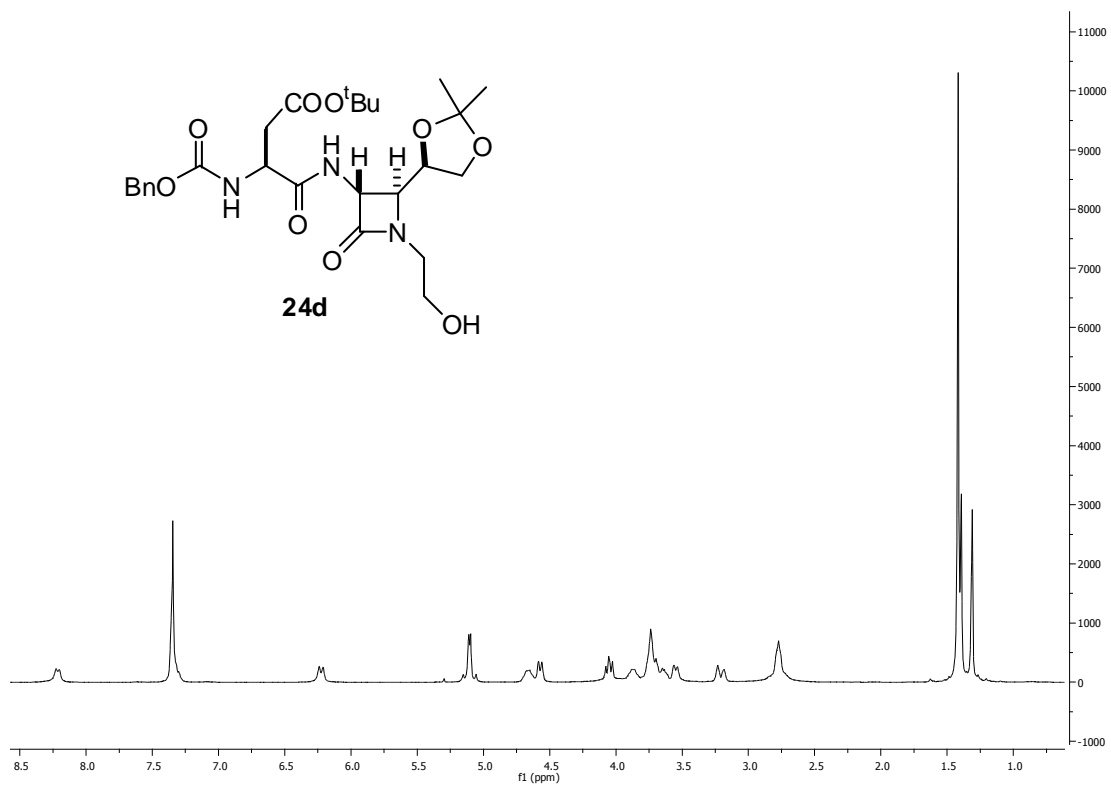




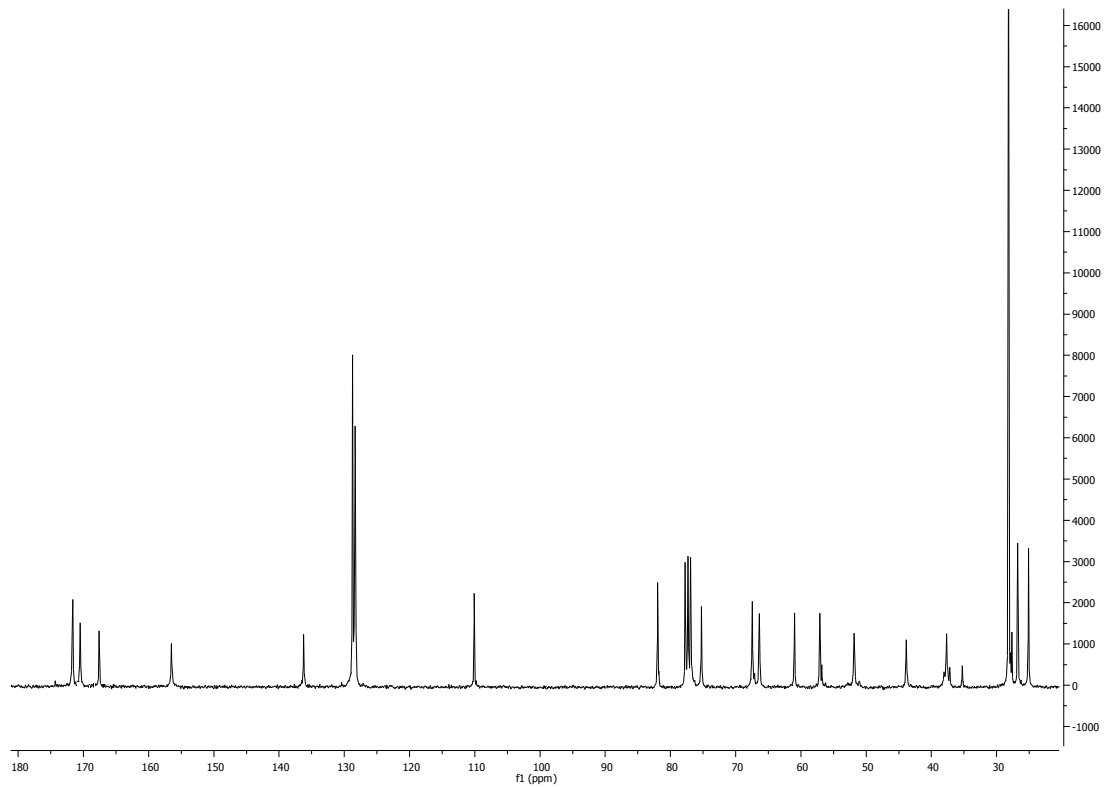
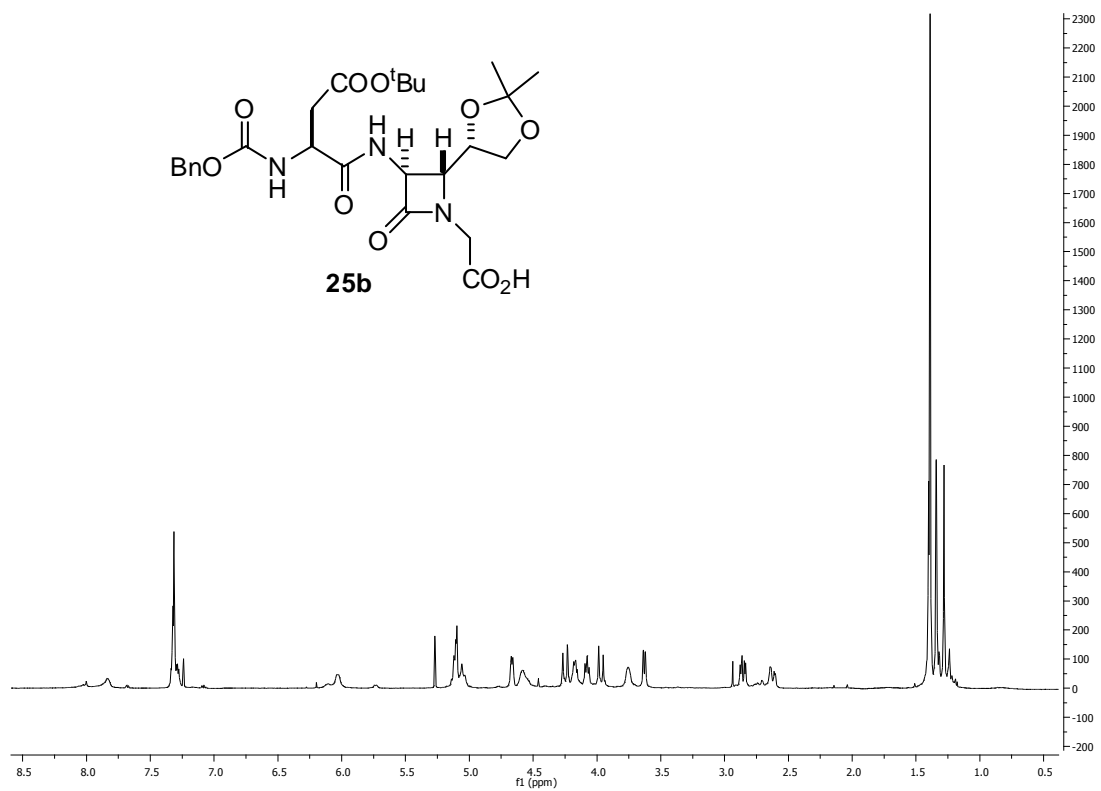




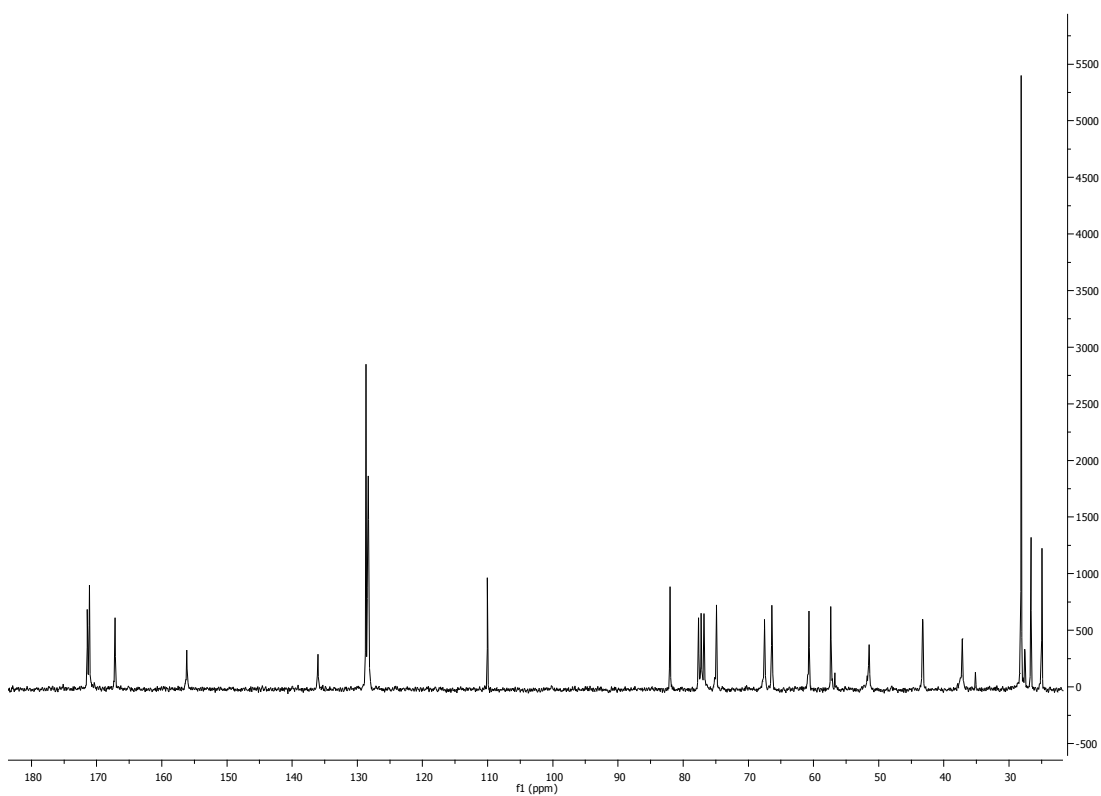
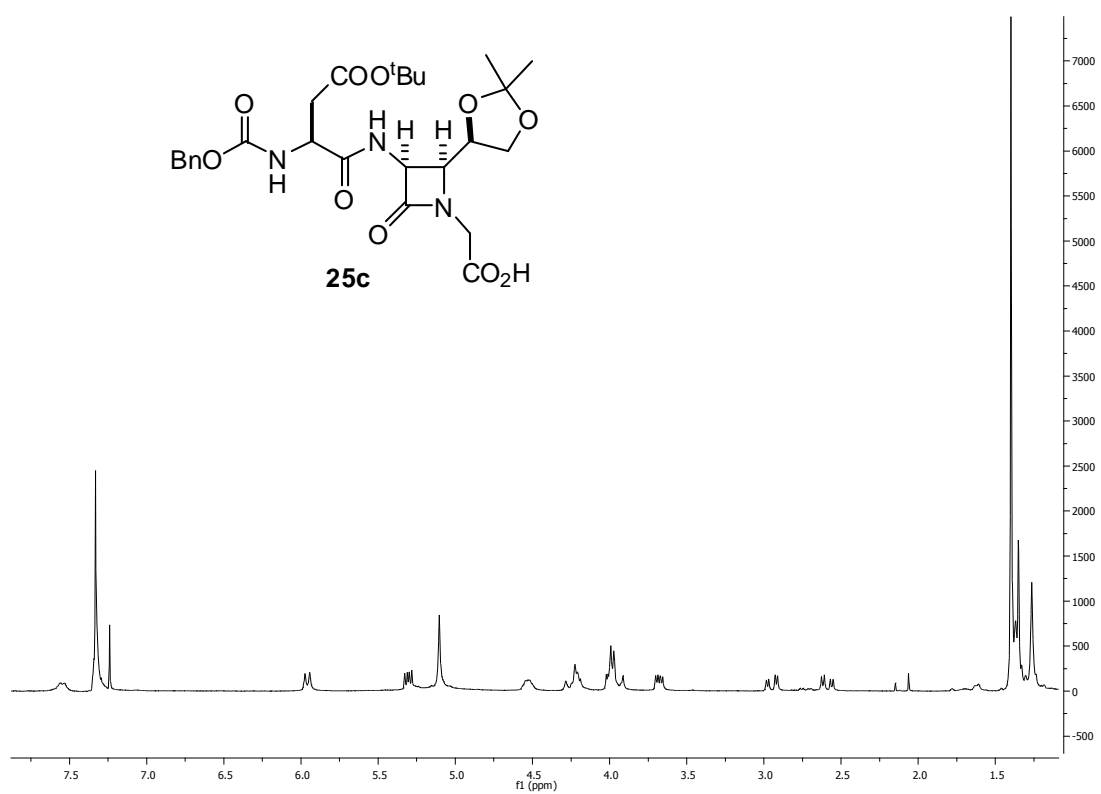


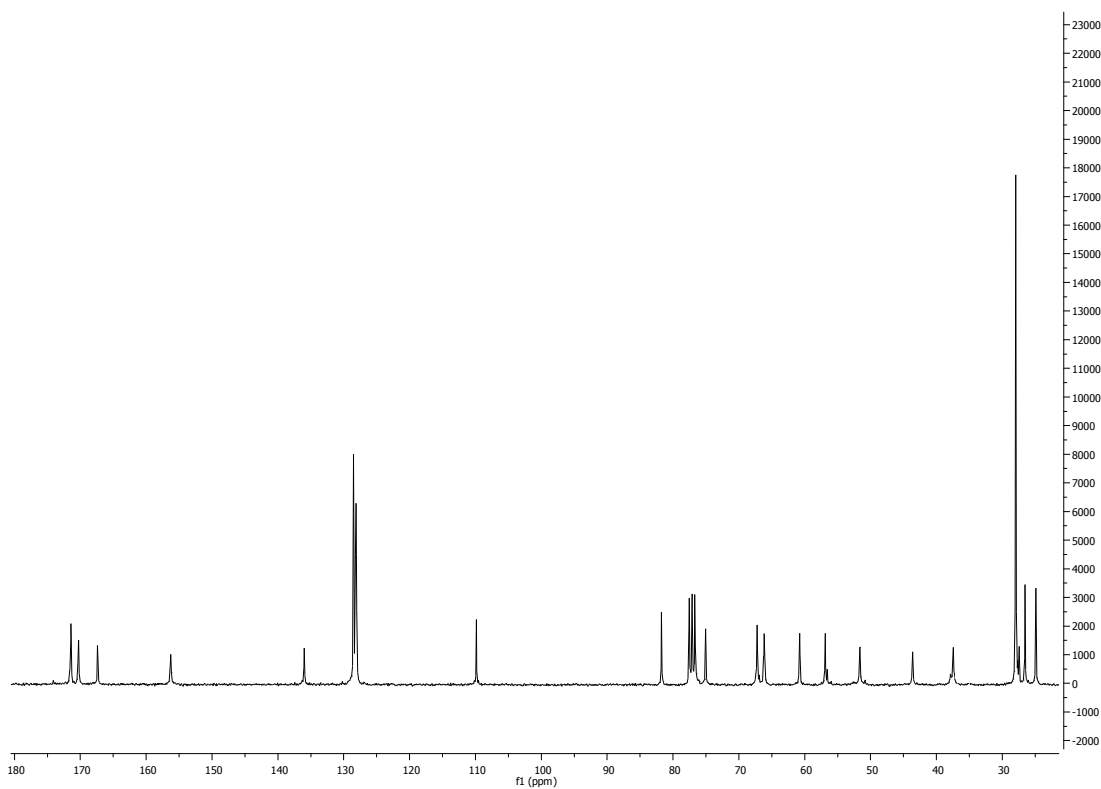
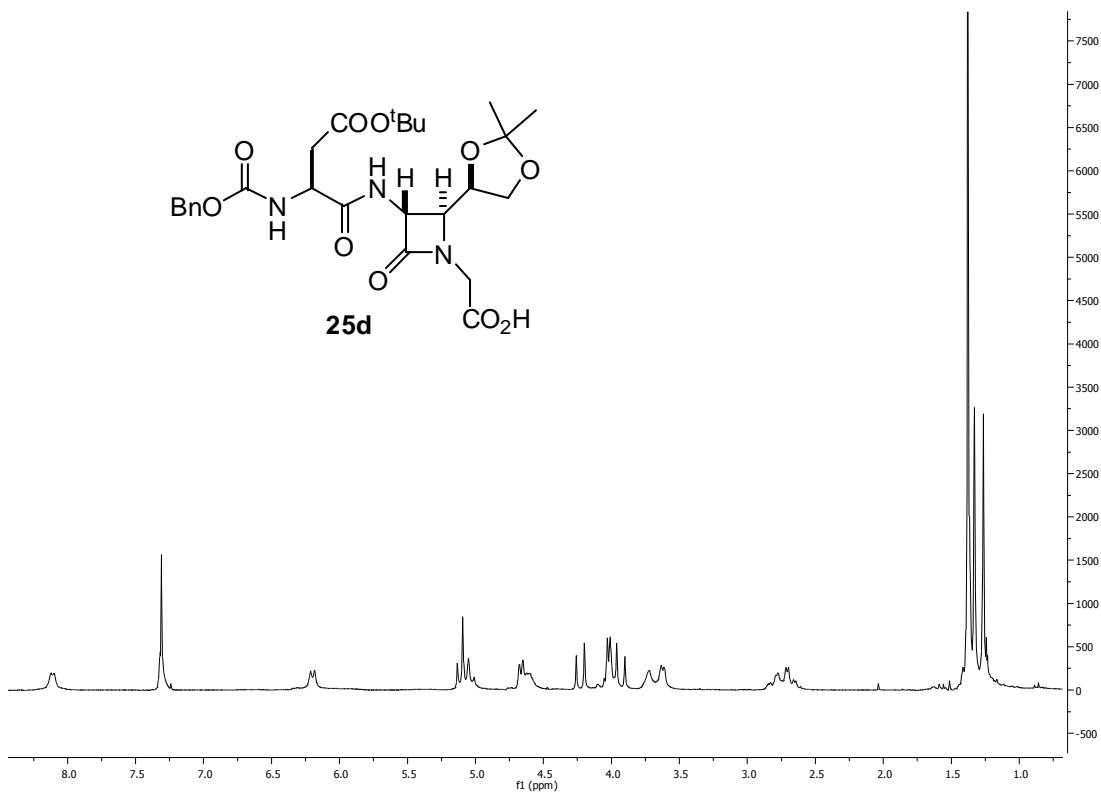
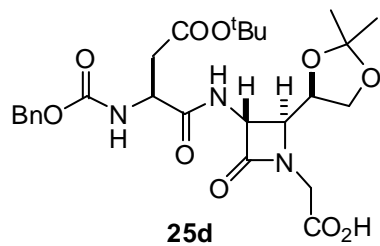


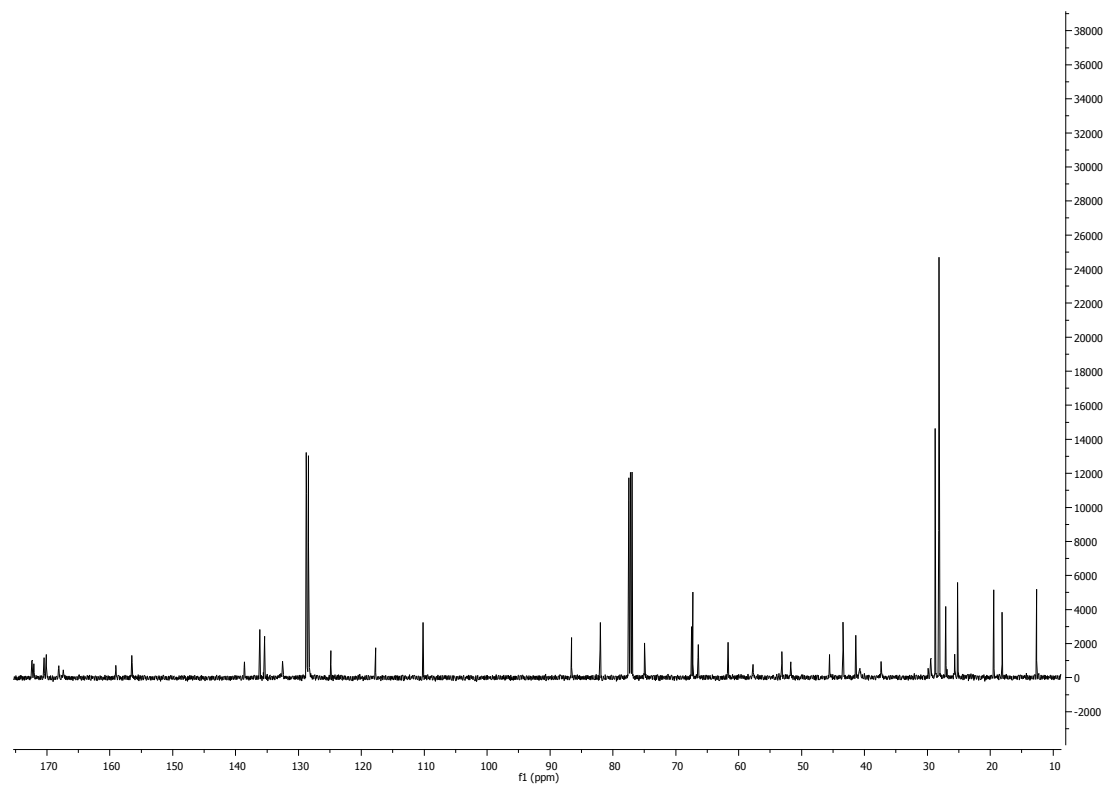
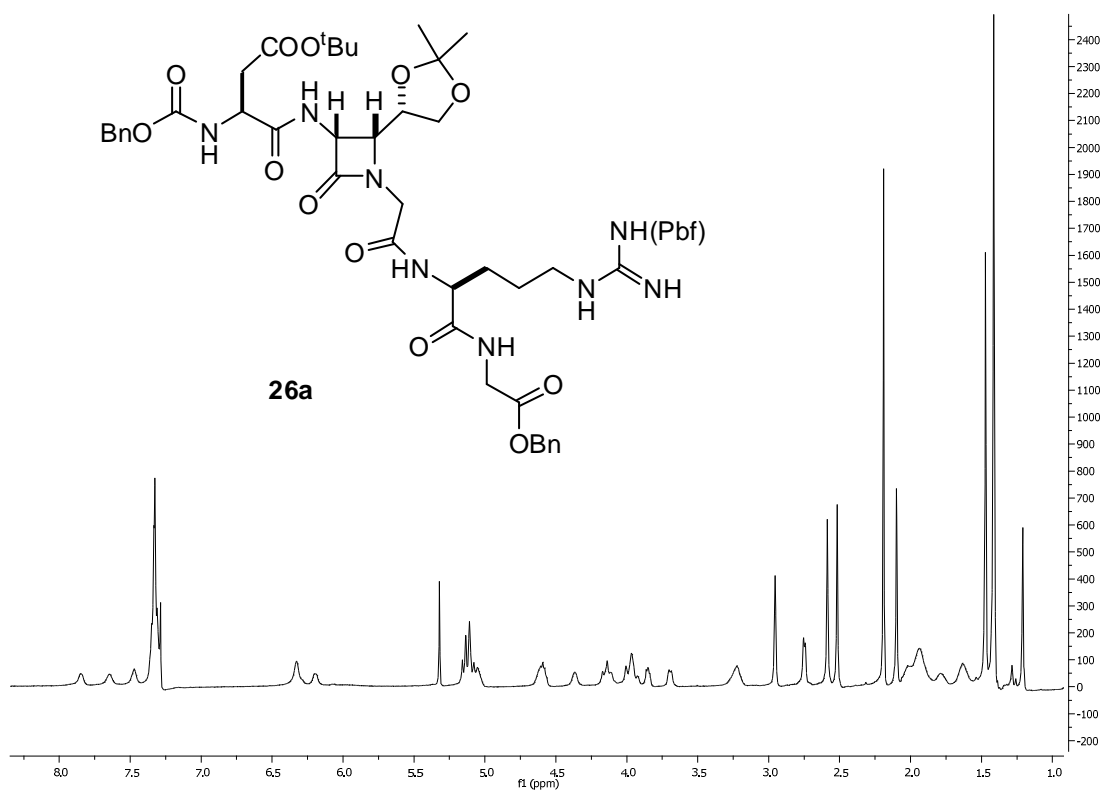


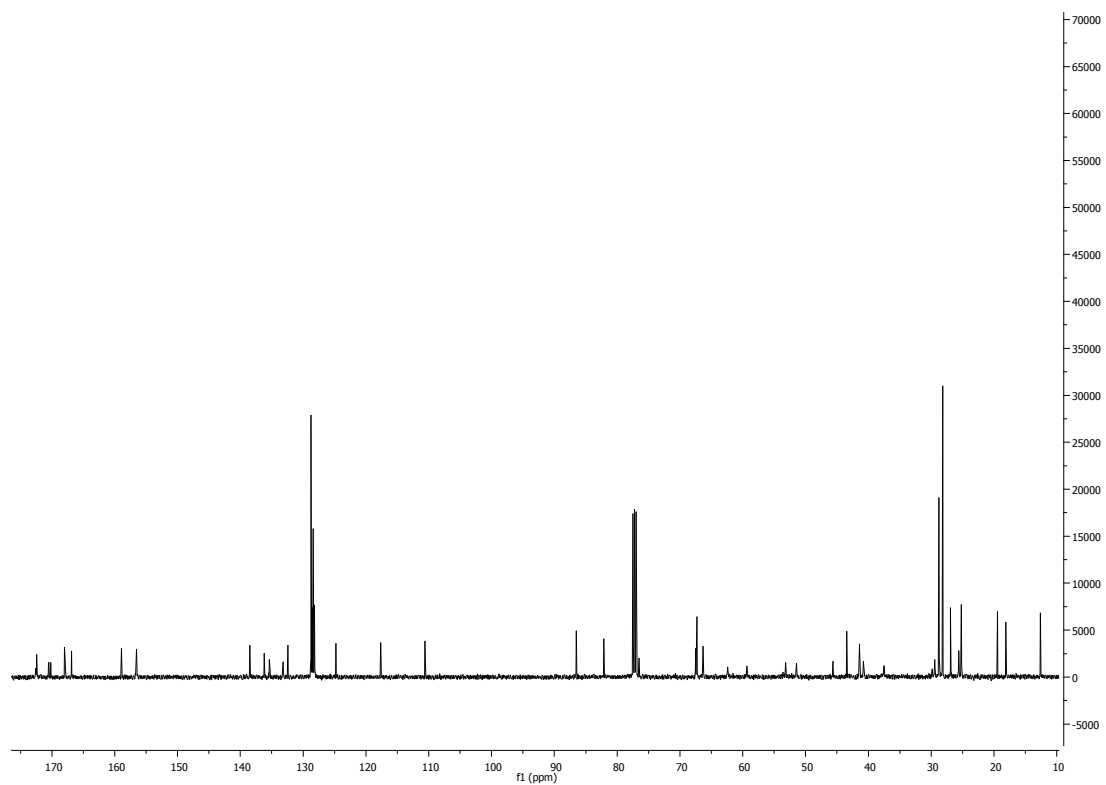
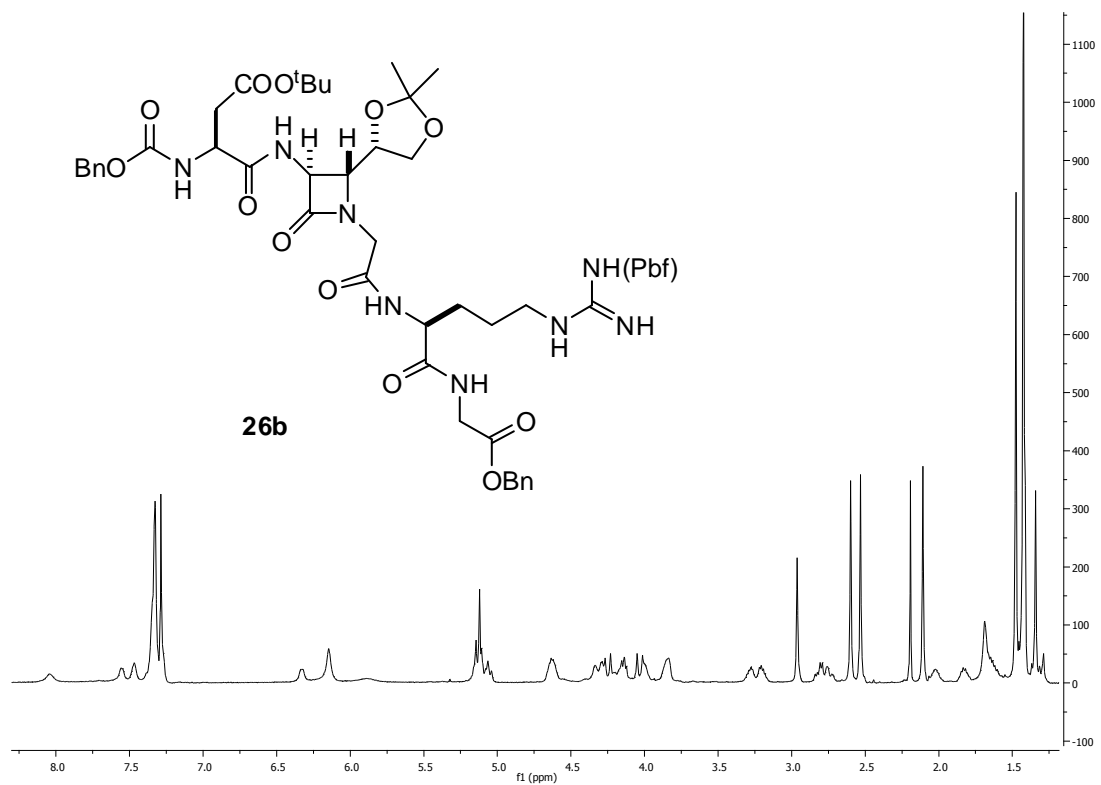


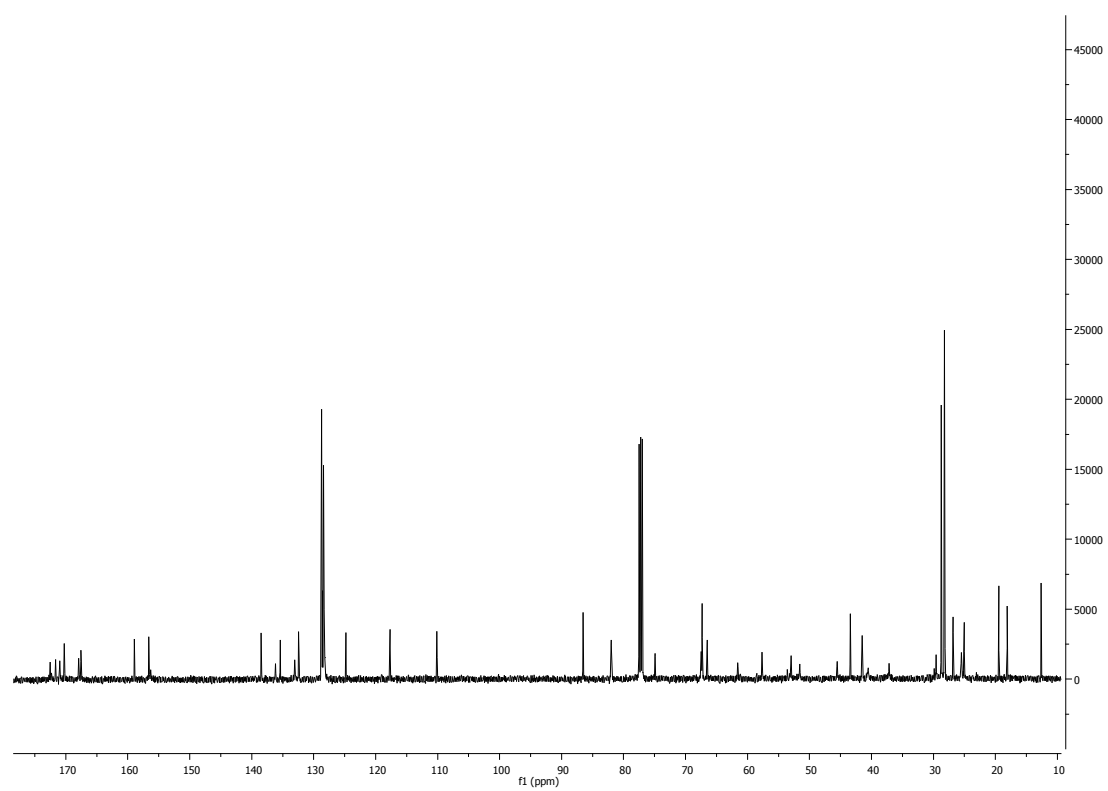
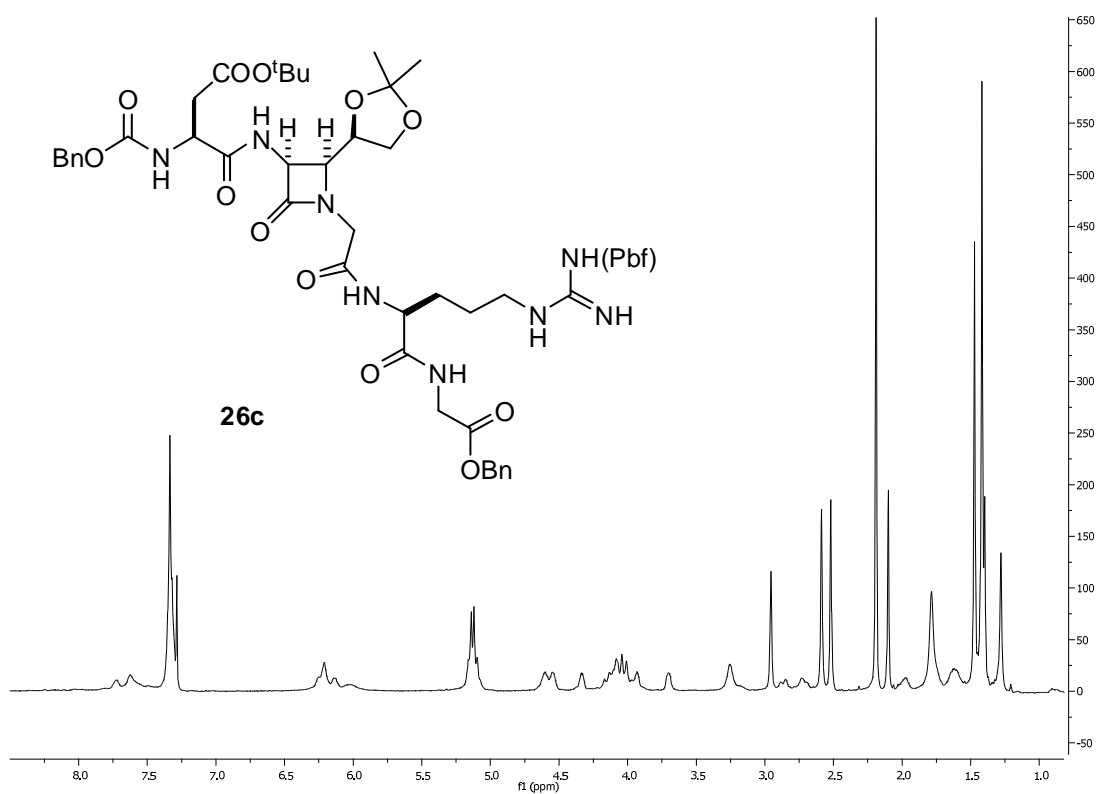


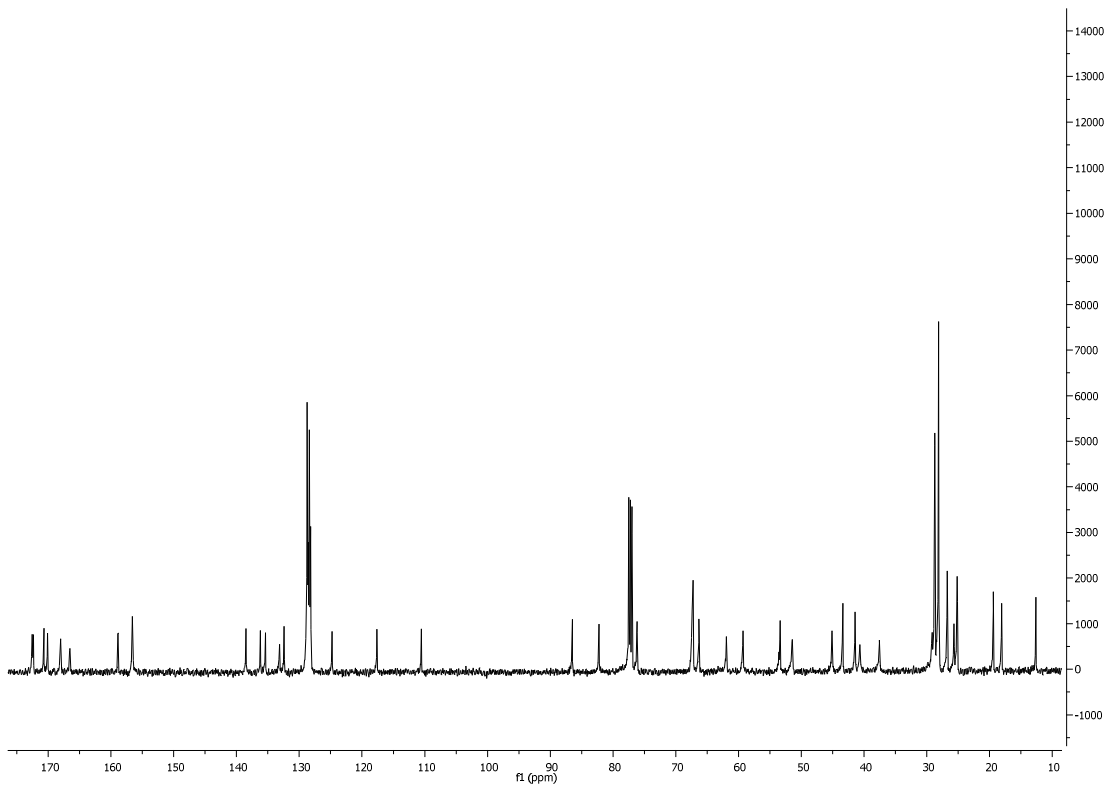
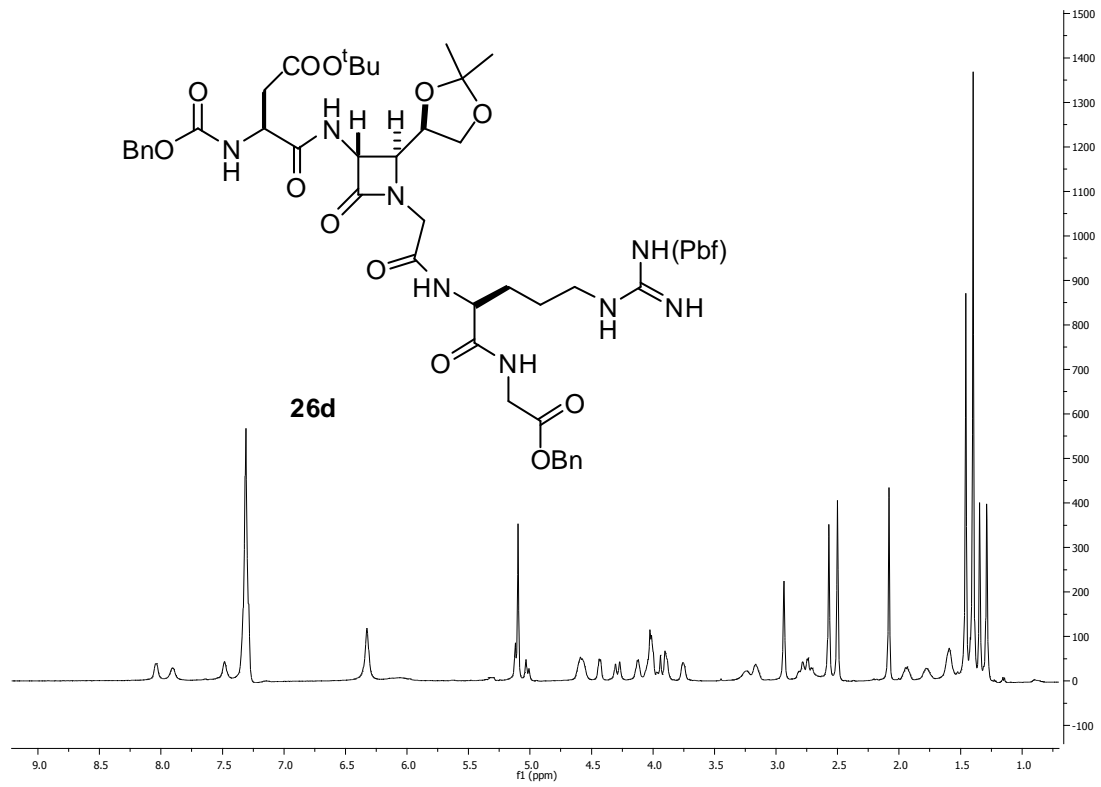


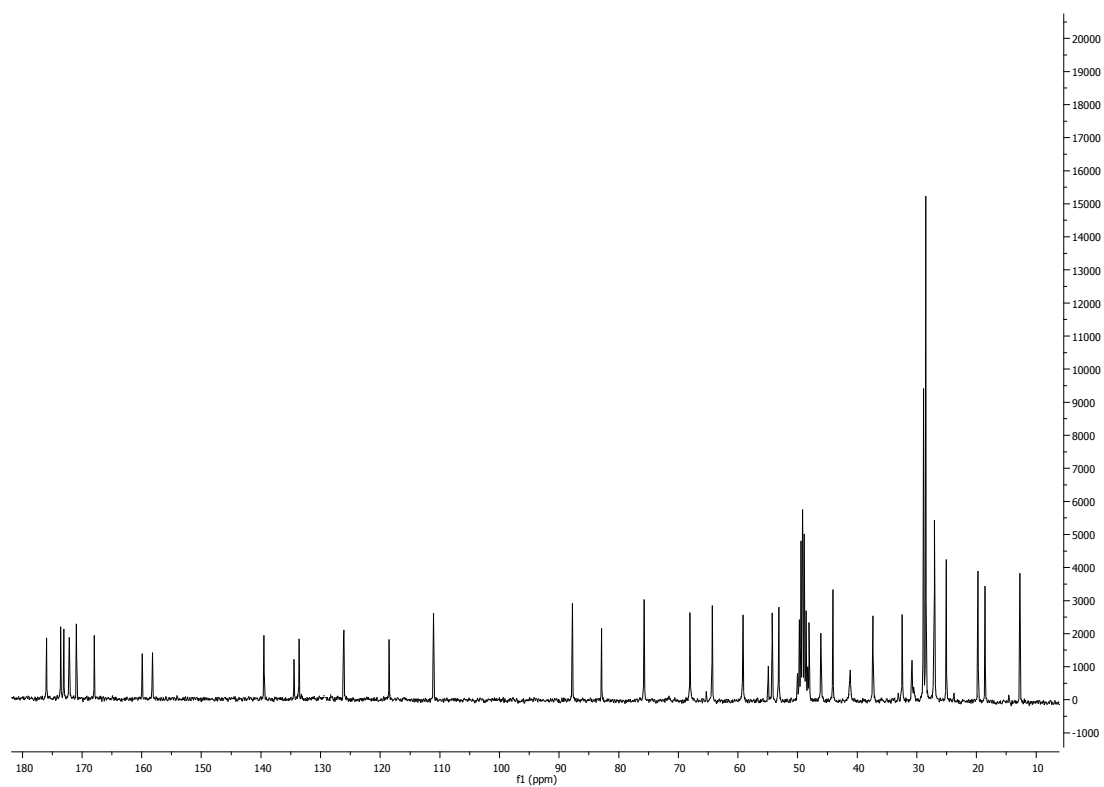
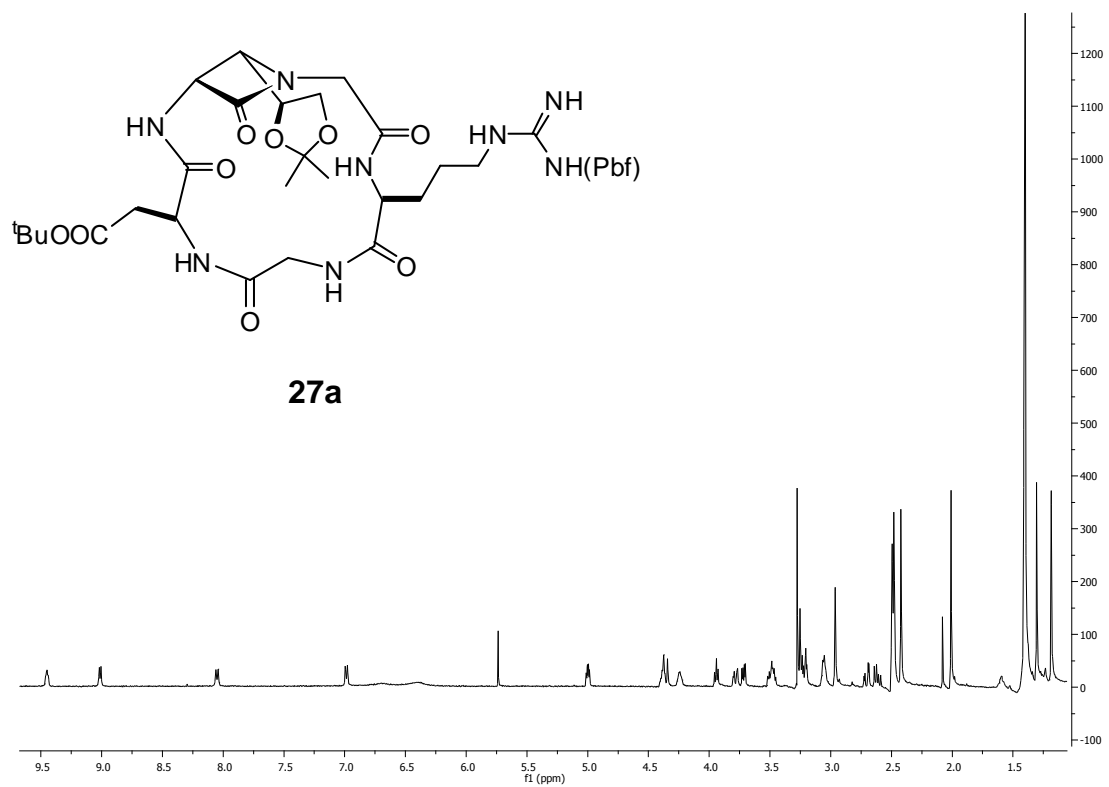


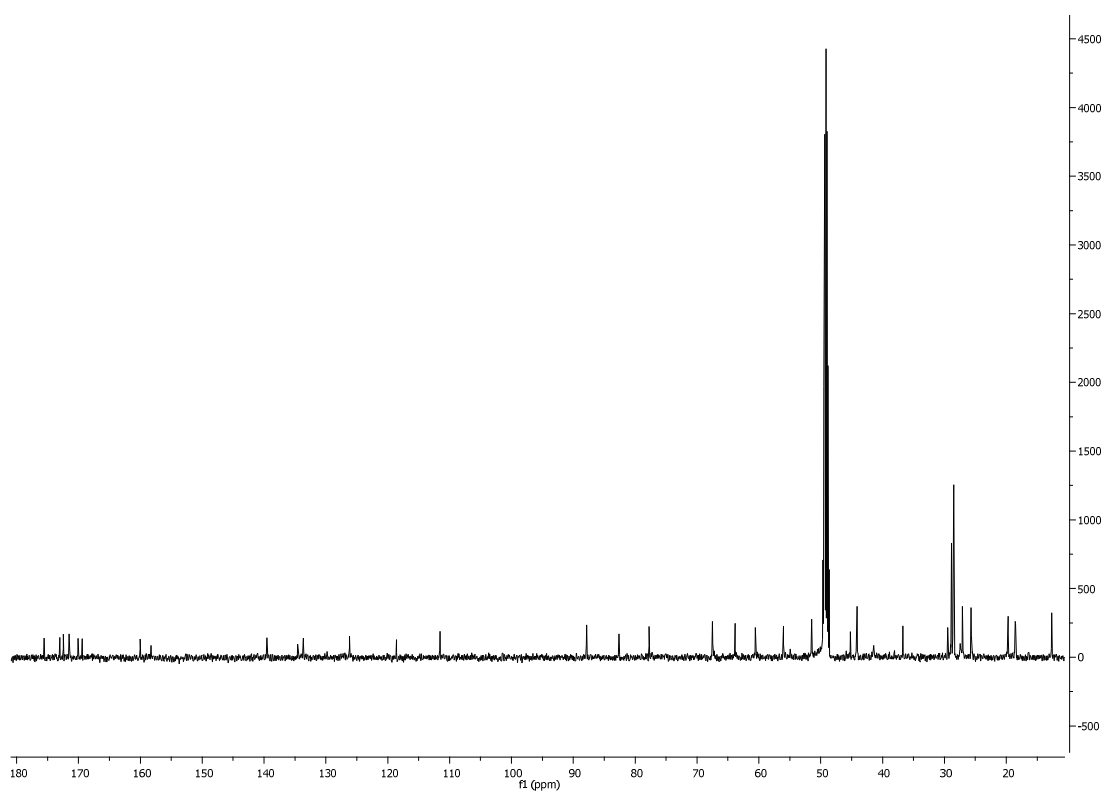
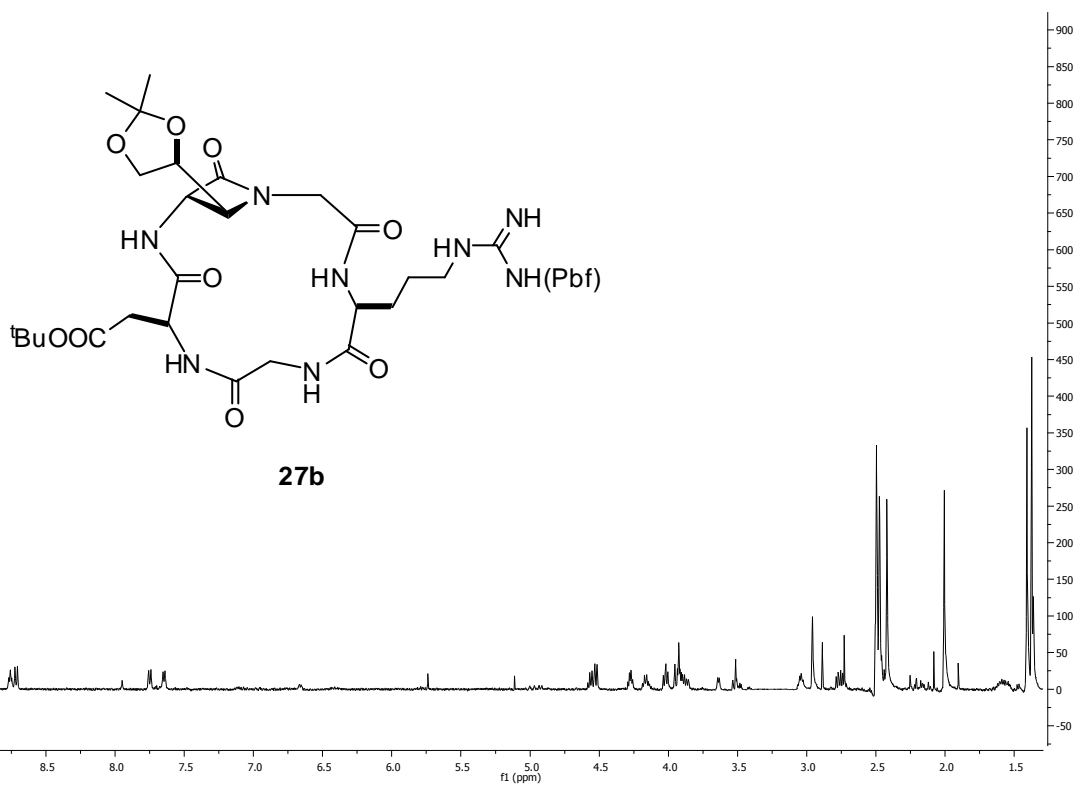




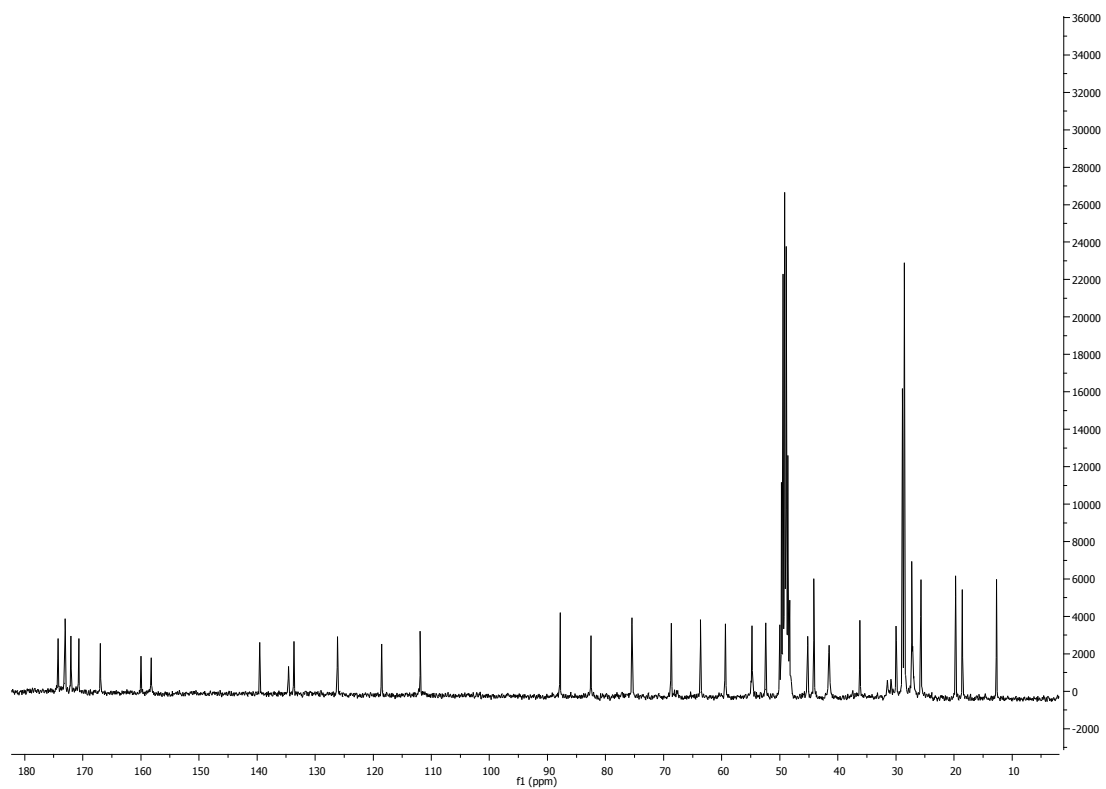
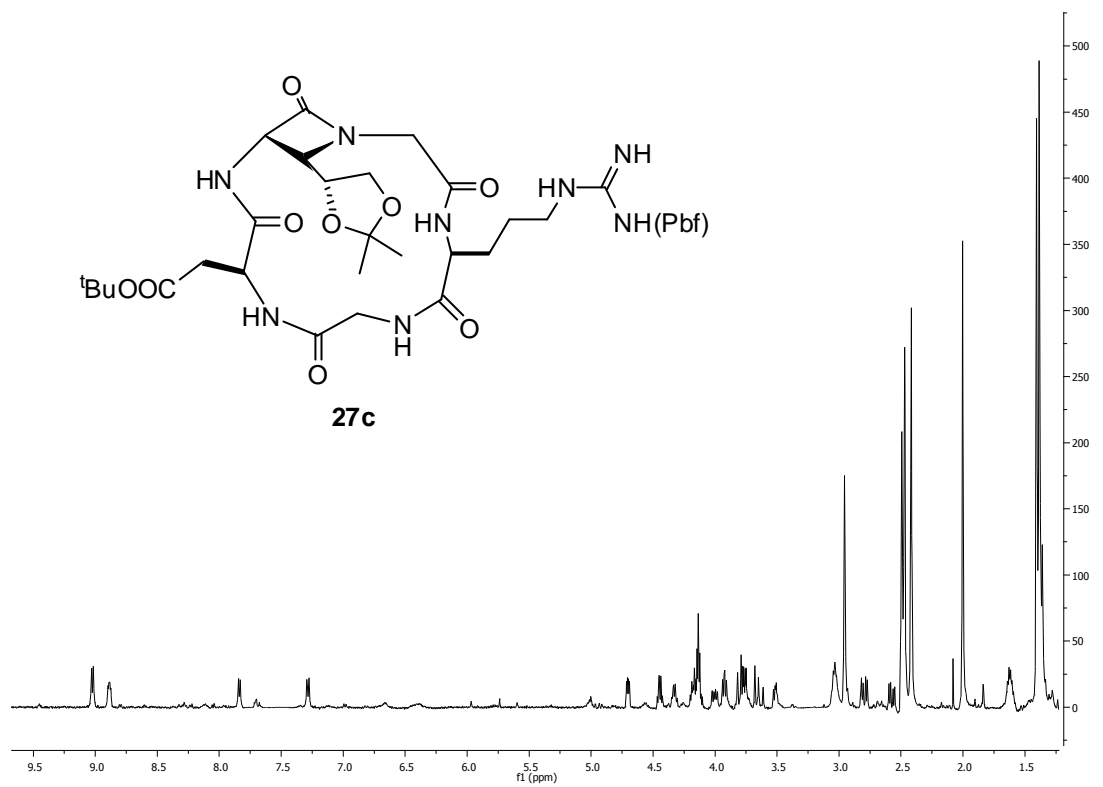


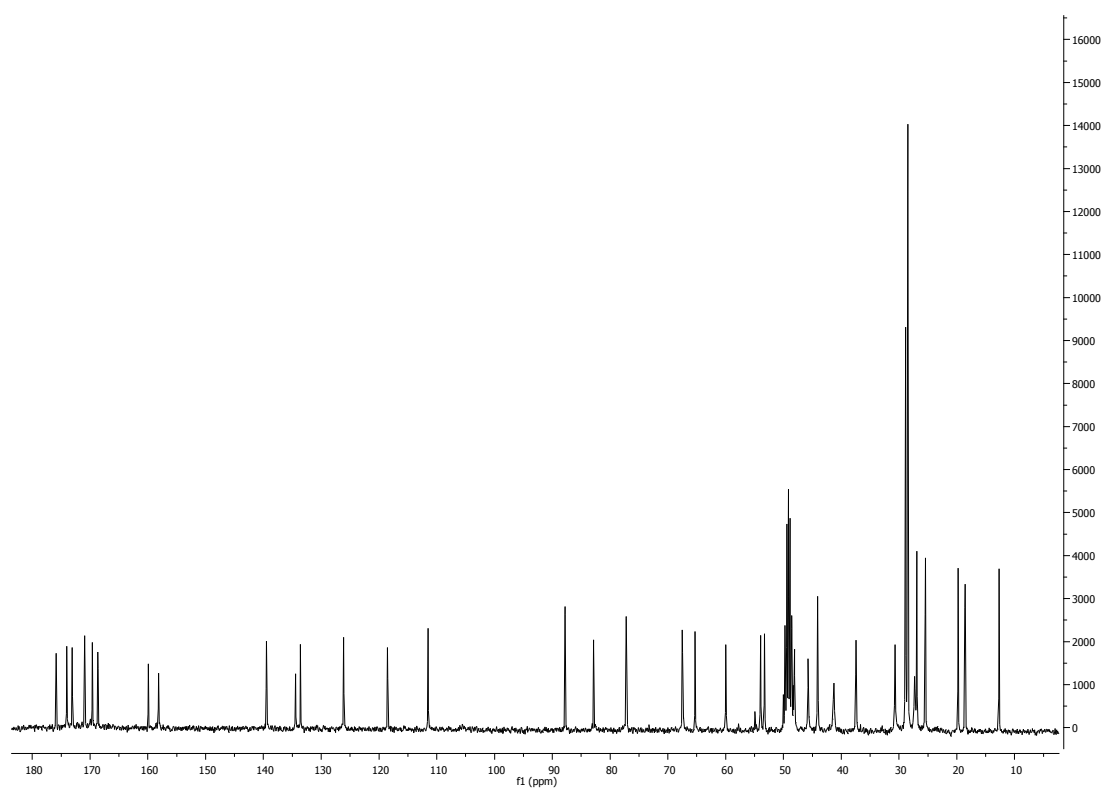
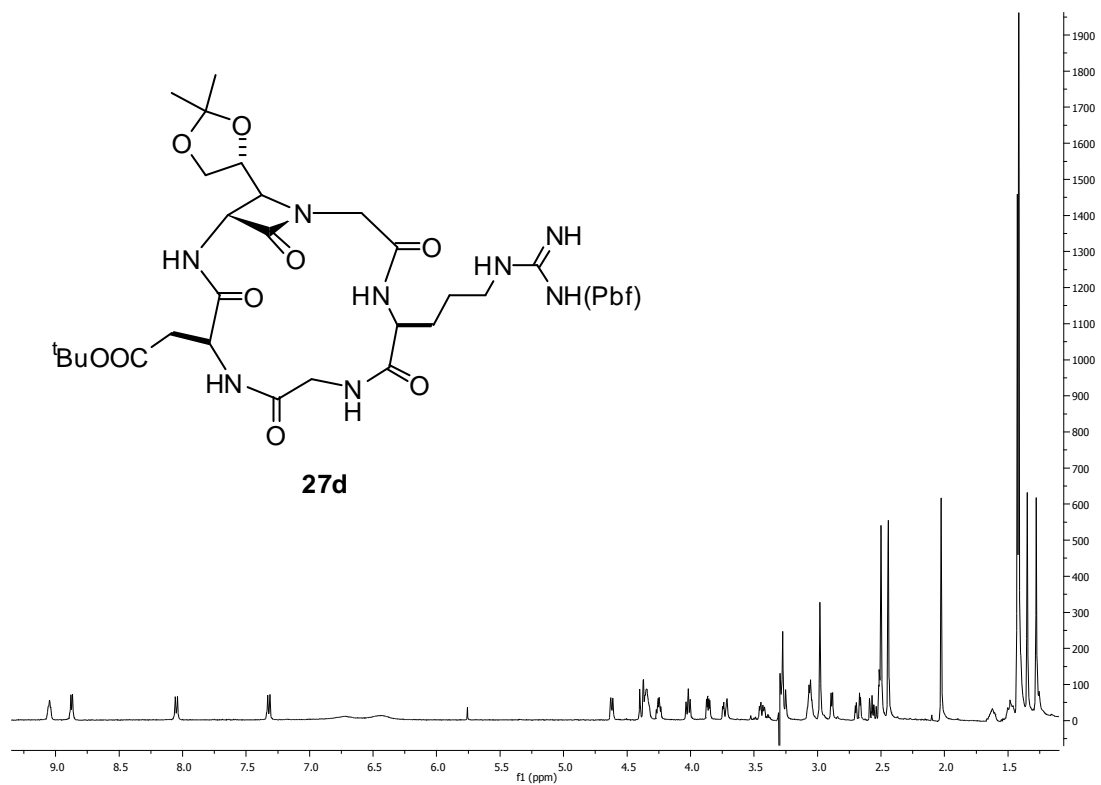


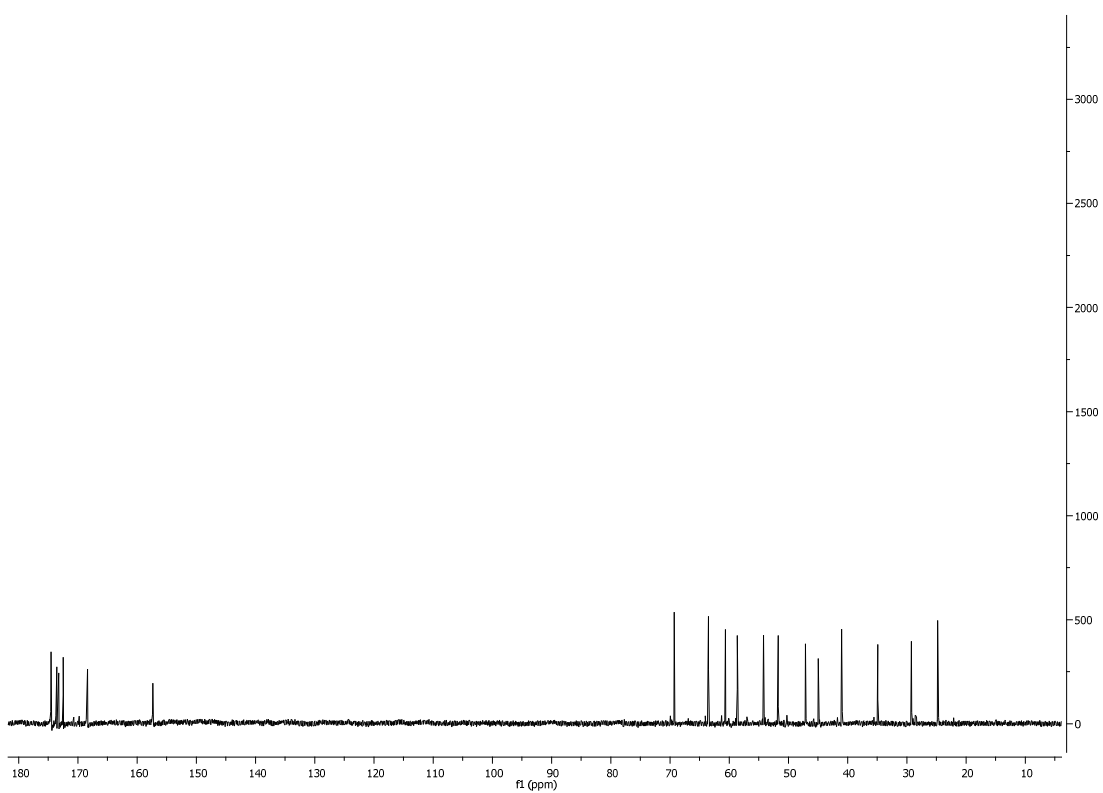
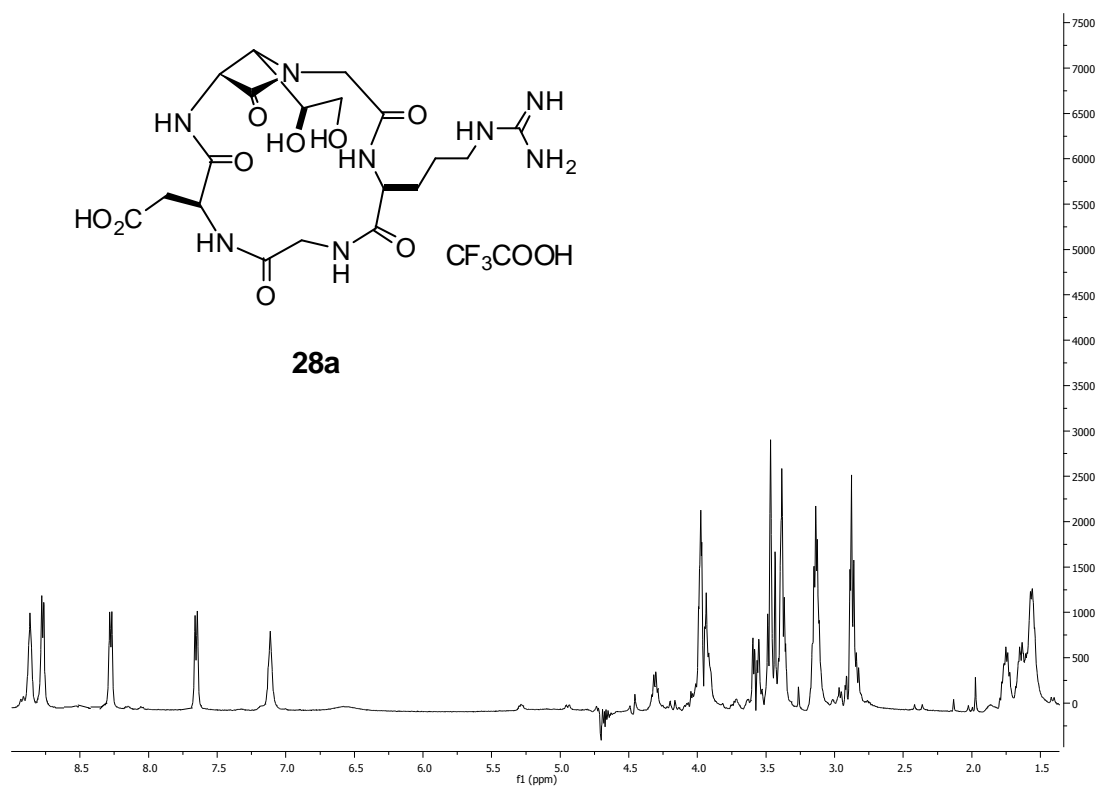


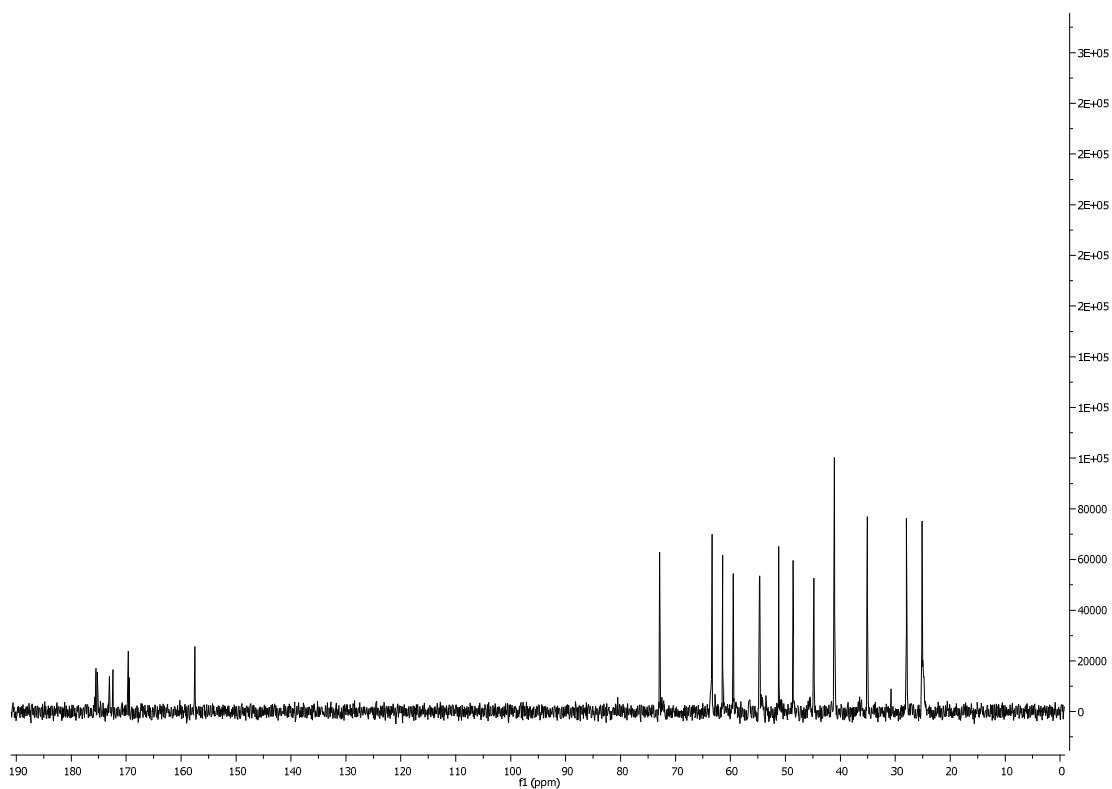
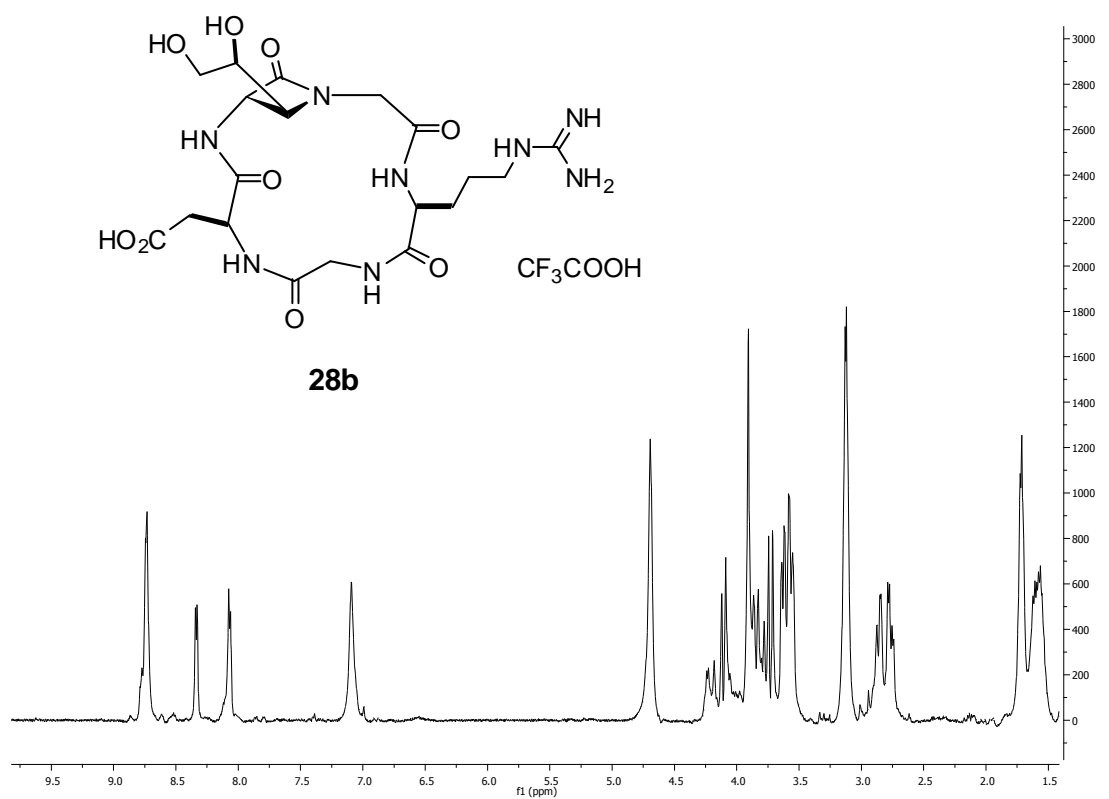




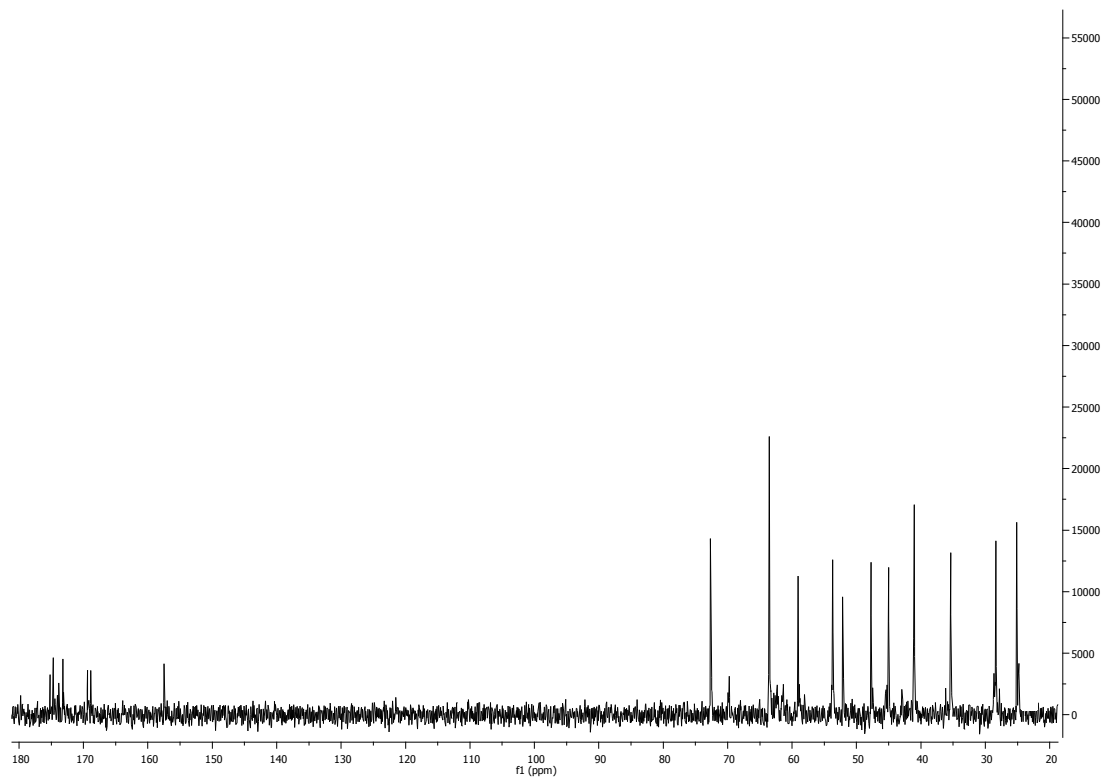
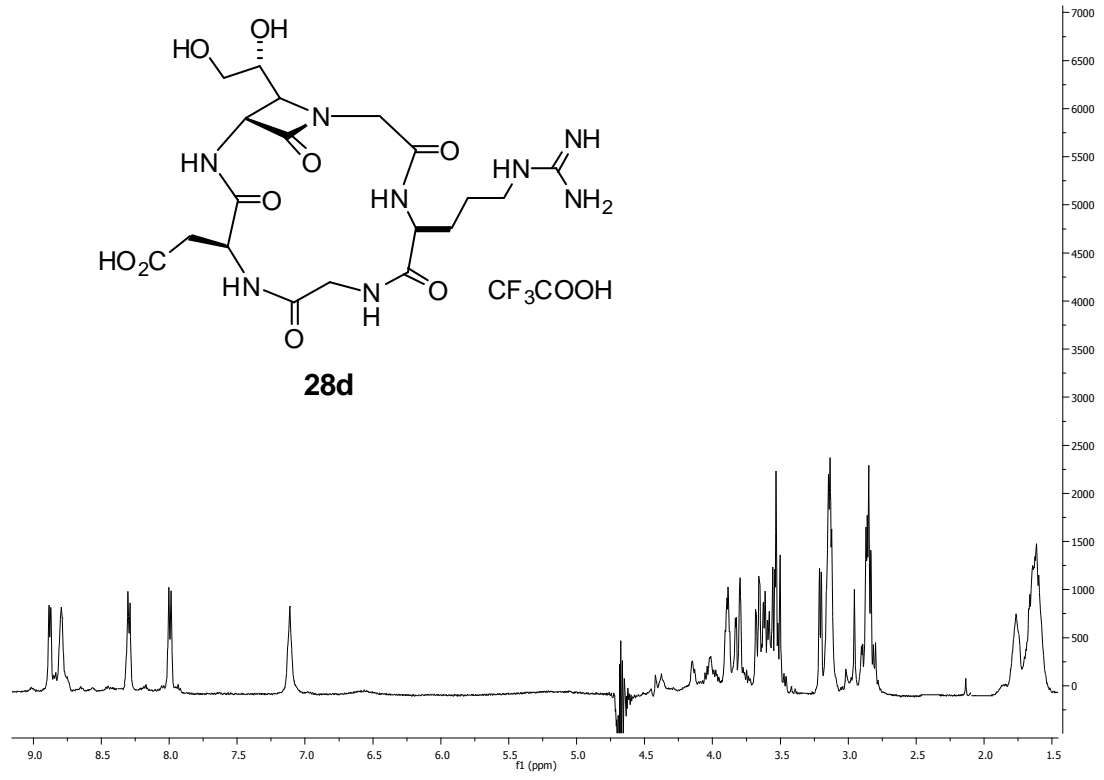














**ANEXOS**





## 6. ANEXOS

### 6.1. Espectros de $^1\text{H}$ y COSY de los compuestos 25a-d

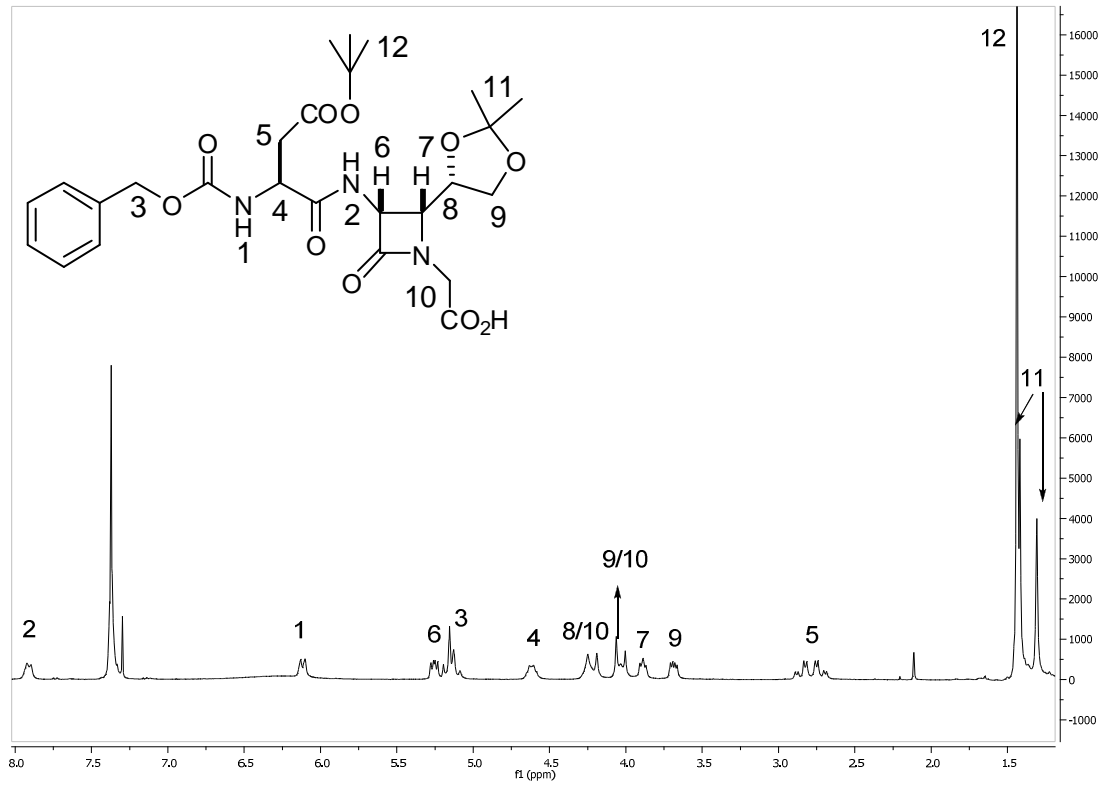


Figura 6.1.  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 25a en  $\text{CDCl}_3$

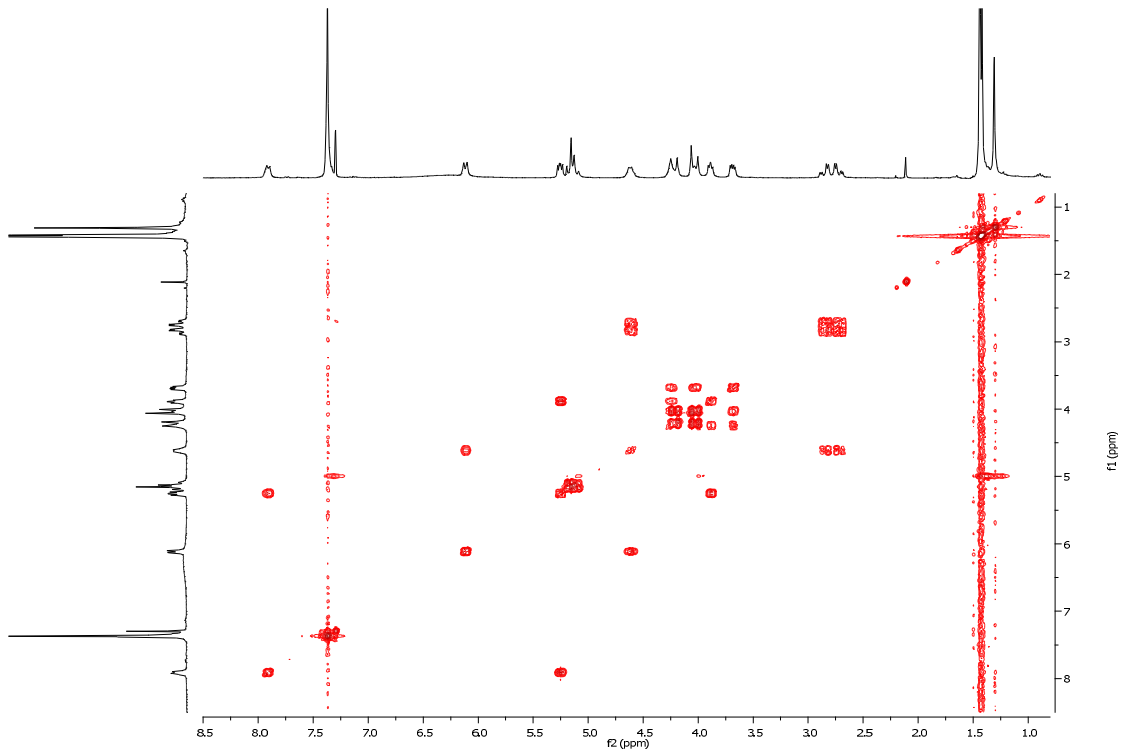


Figura 6.2. Espectro COSY (500MHz) del compuesto 25a en  $\text{CDCl}_3$

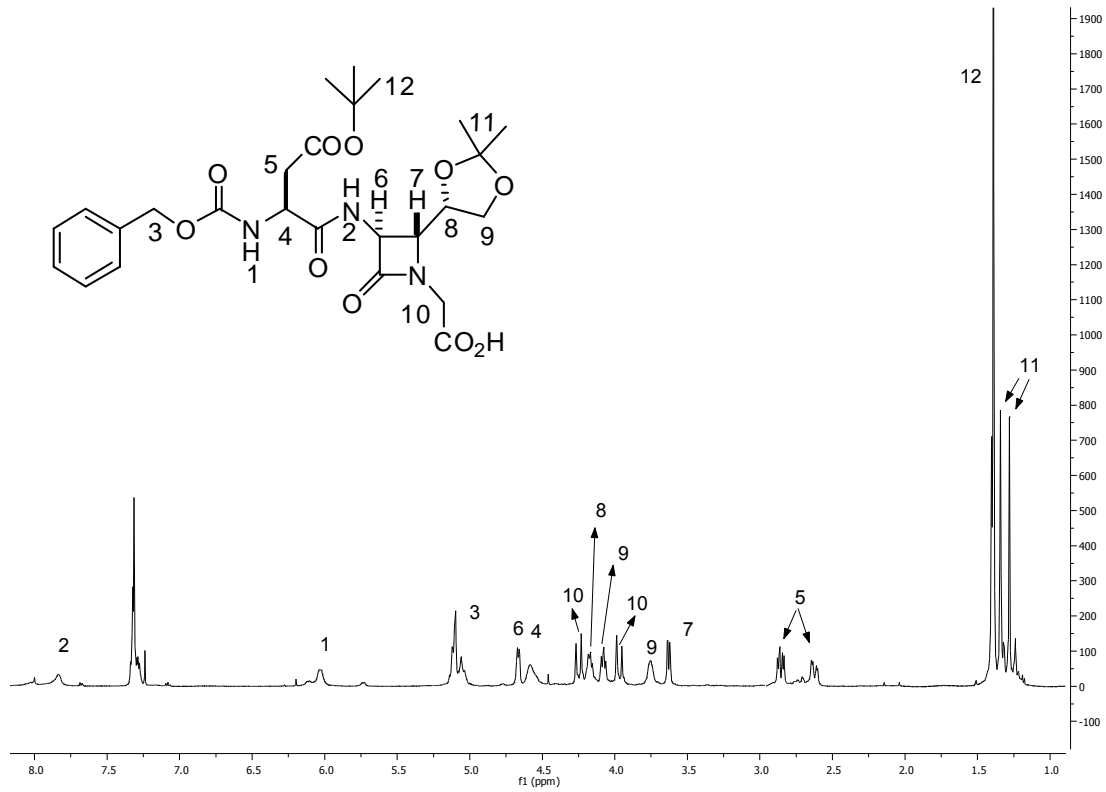


Figura 6.3. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 25b en  $\text{CDCl}_3$

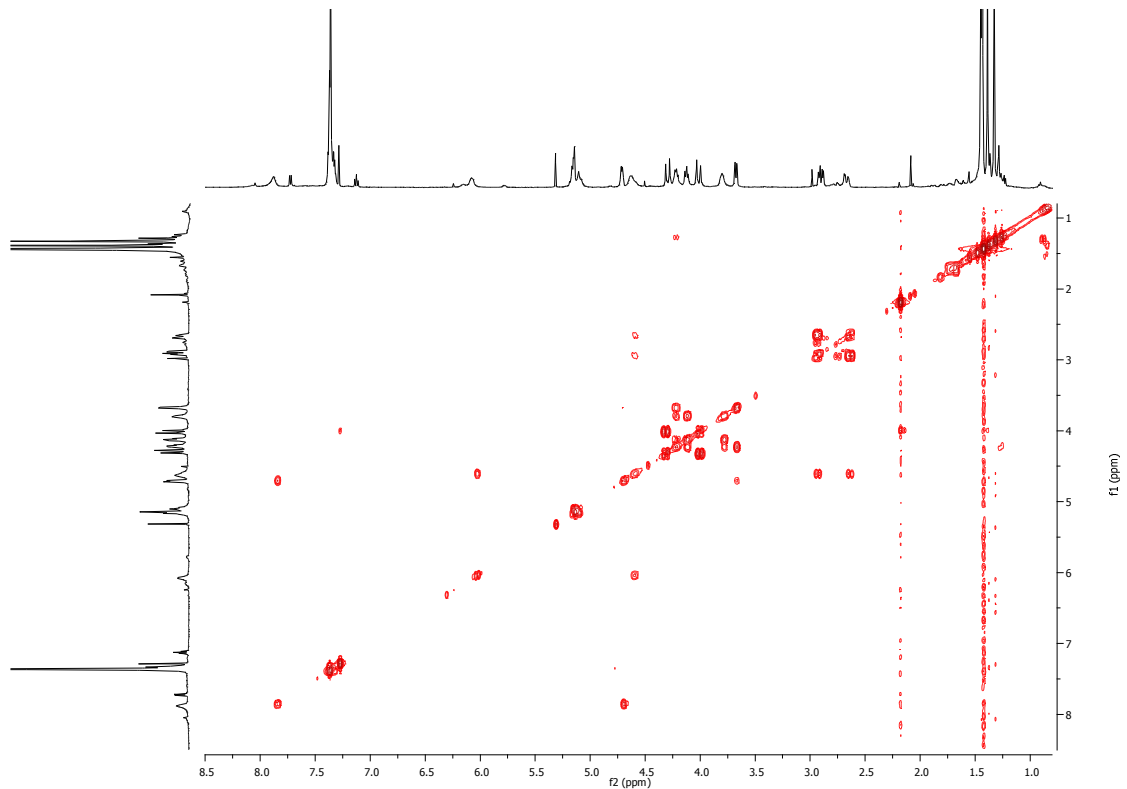


Figura 6.4. Espectro COSY (500MHz) del compuesto 25b en  $\text{CDCl}_3$

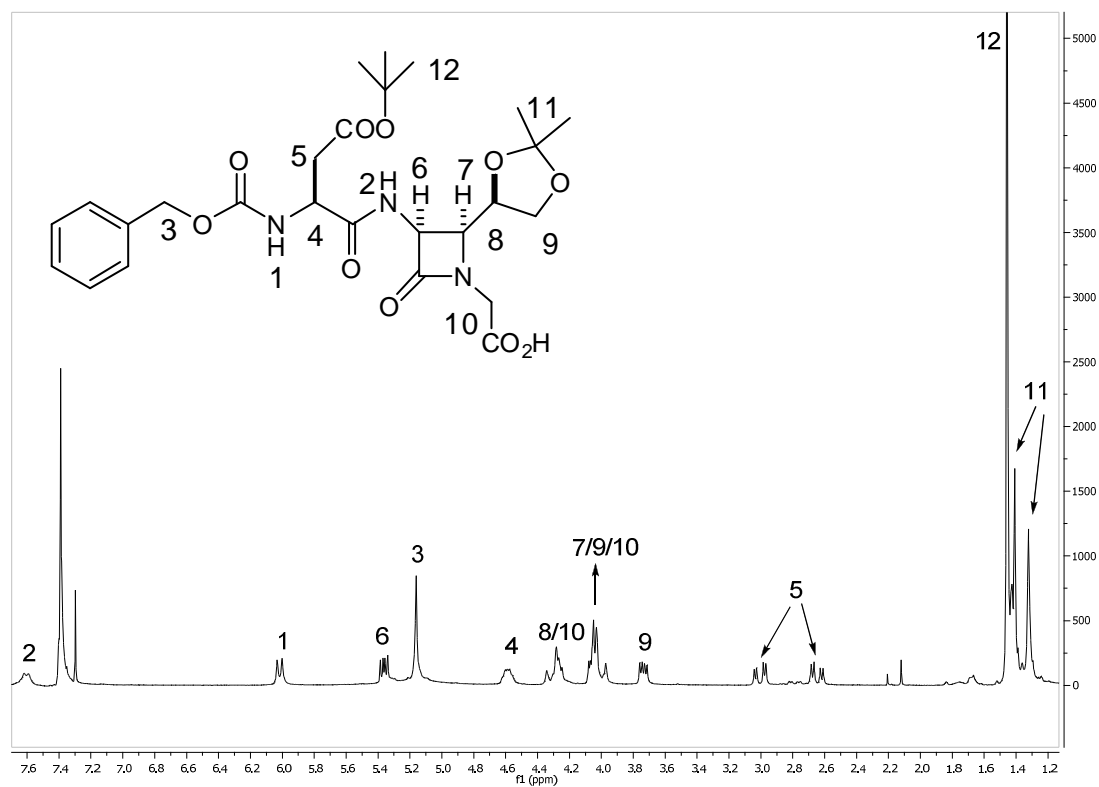


Figura 6.5. <sup>1</sup>H-RMN (500MHz) del compuesto 25c en CDCl<sub>3</sub>

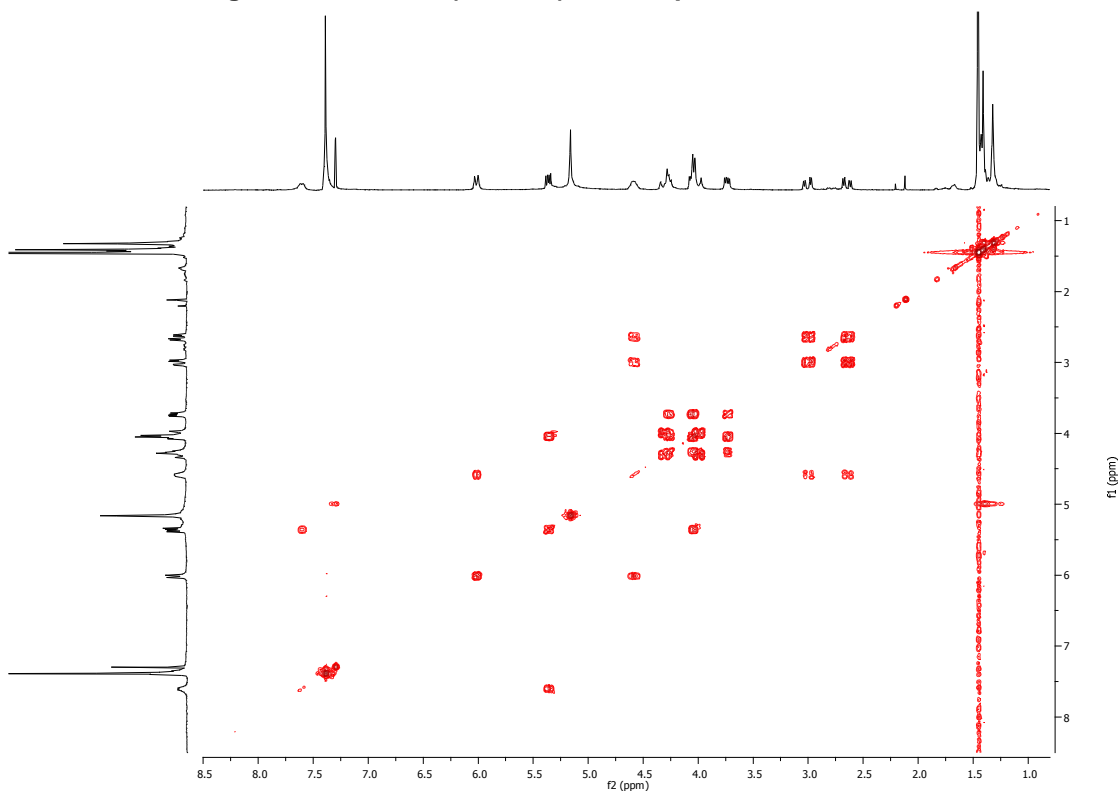


Figura 6.6. Espectro COSY (500MHz) del compuesto 25c en CDCl<sub>3</sub>

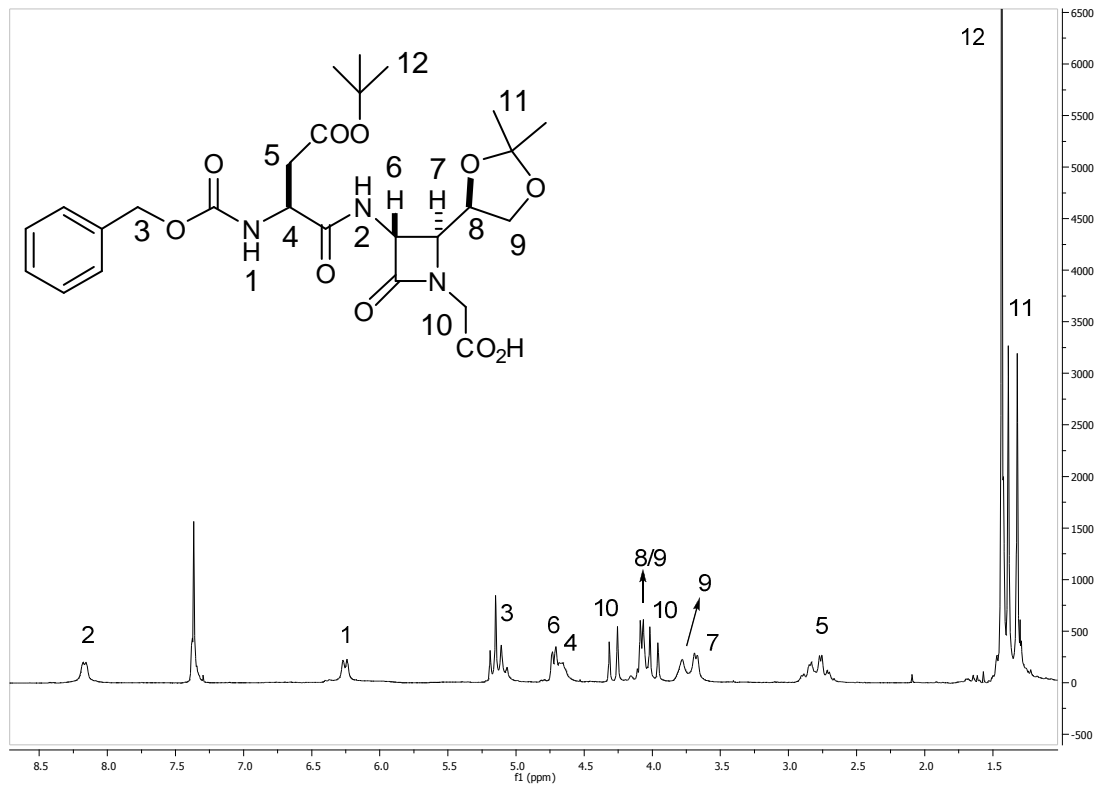


Figura 6.7.  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto 25d en  $\text{CDCl}_3$

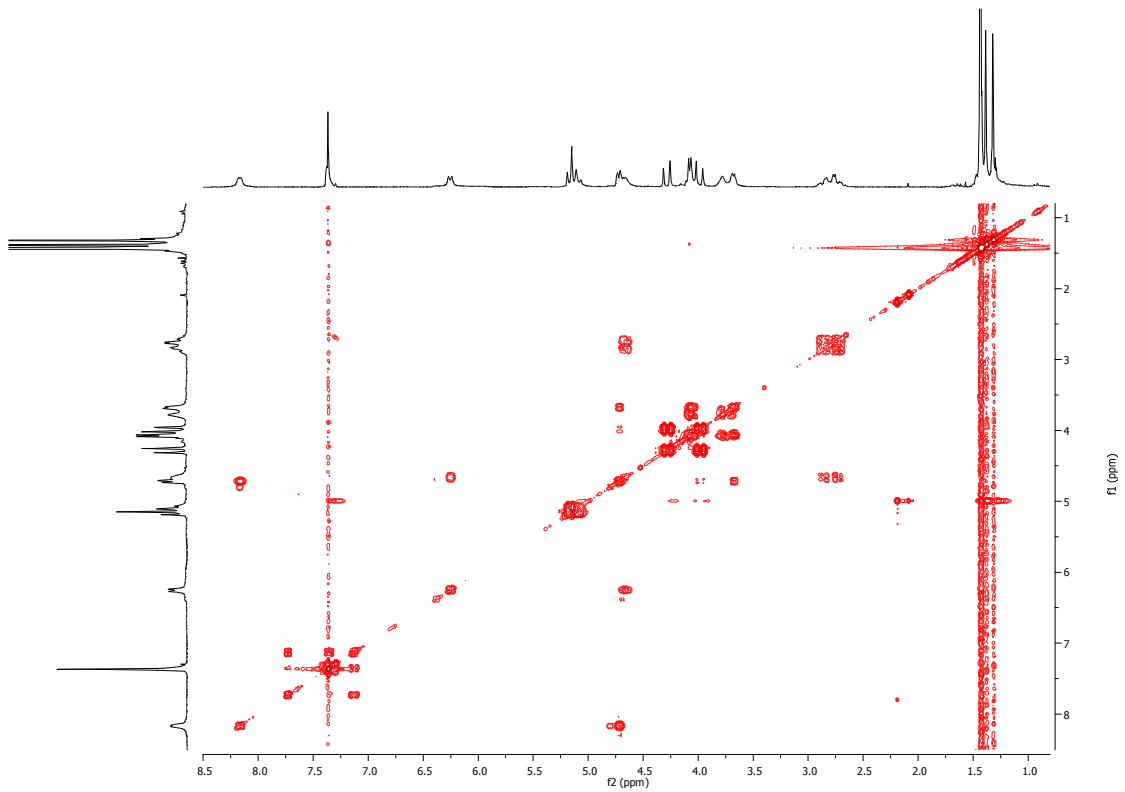


Figura 6.8. Espectro COSY (500MHz) del compuesto 25d en  $\text{CDCl}_3$

## 6.2. Espectros realizados en $D_2O/H_2O$ (10:90) para el estudio conformacional de los compuestos 28a-d

### 6.2.1. Compuesto 28a

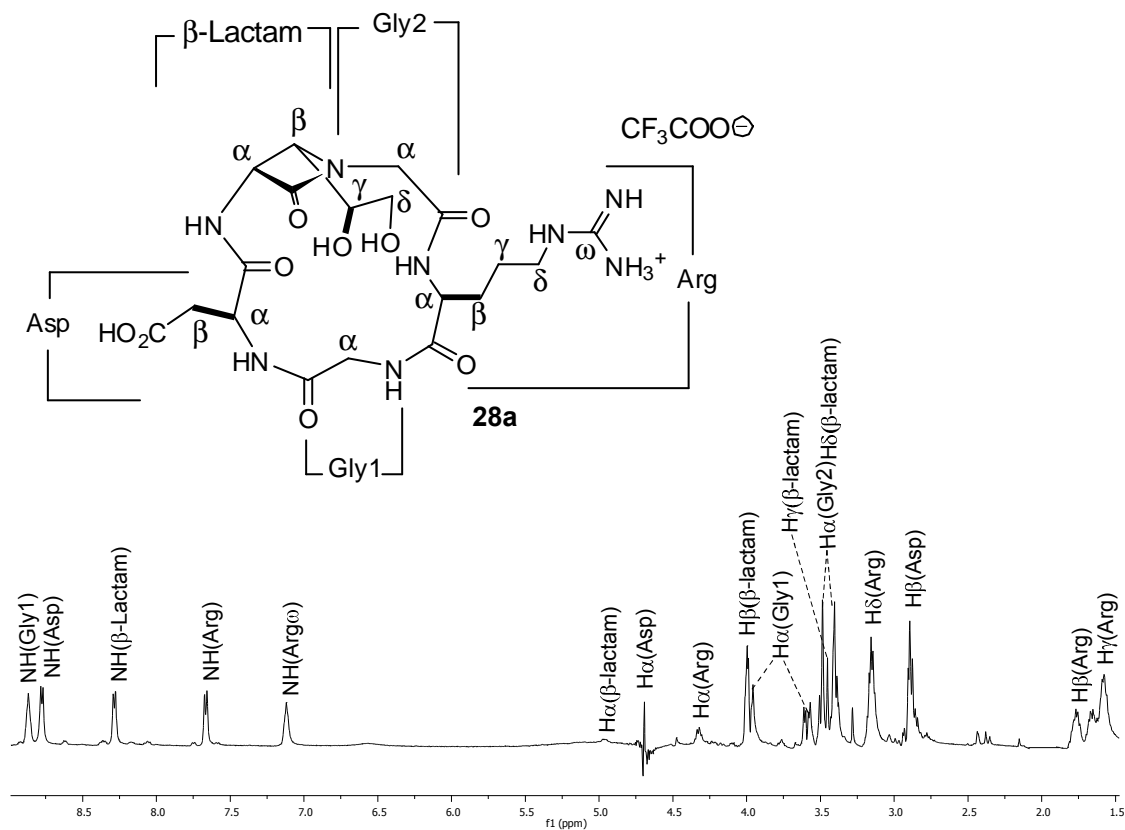


Figura 6.9.  $^1H$  RMN (500MHz) del CPP 28a en  $H_2O/D_2O$  (9/1) a 300K

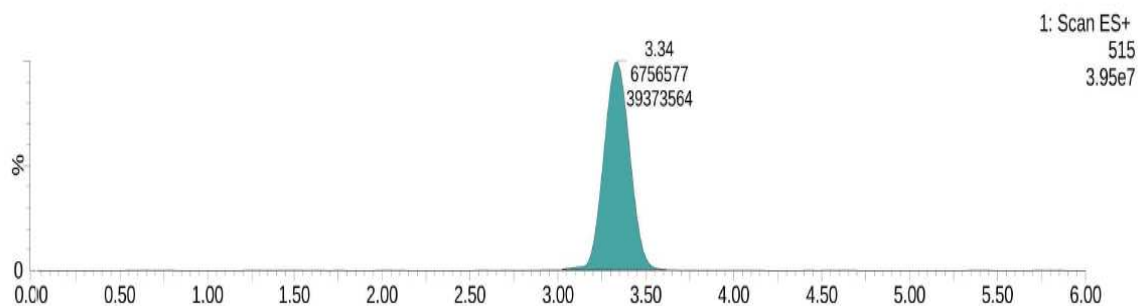


Figura 6.10. Cromatograma del compuesto 28a

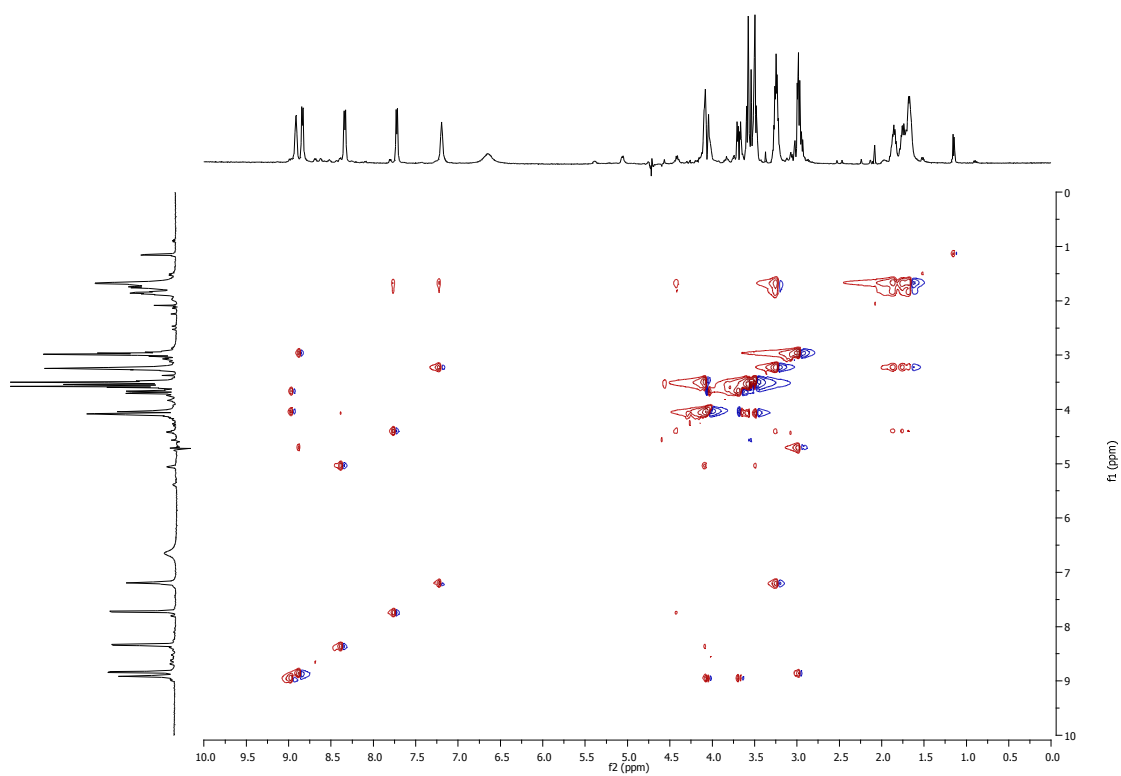


Figura 6.11. TOCSY (500MHz) del CPP 28a en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

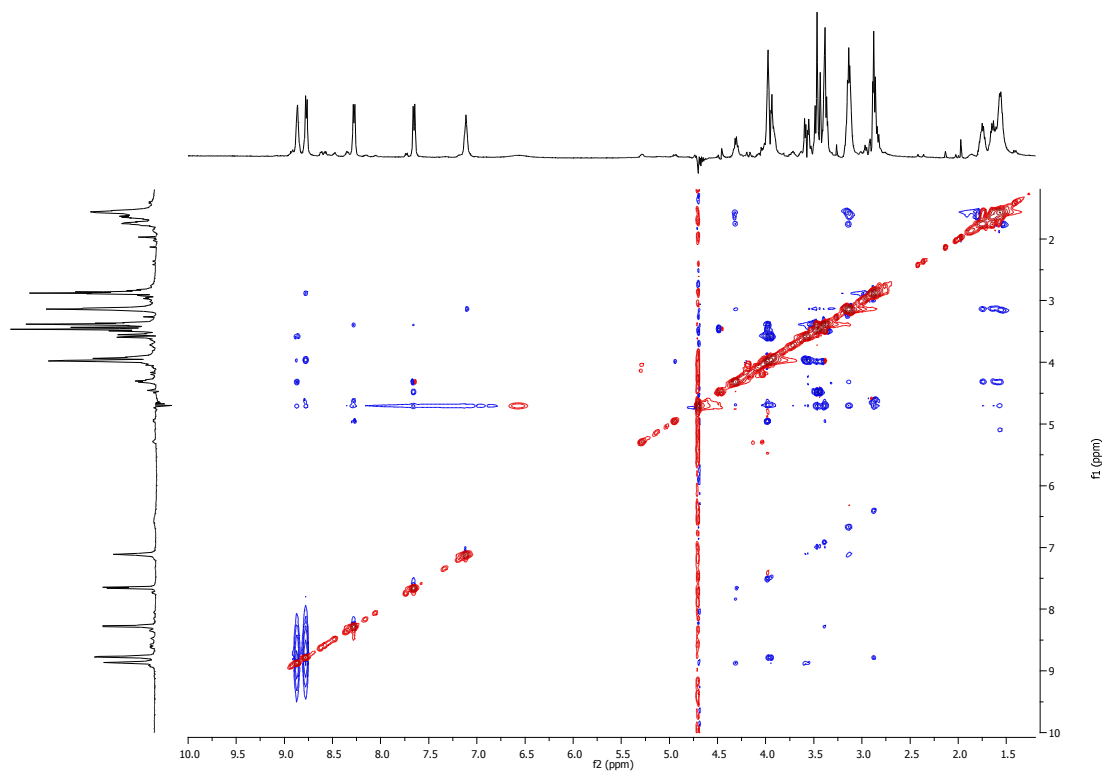


Figura 6.12. ROESY (500MHz) del CPP 28a en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

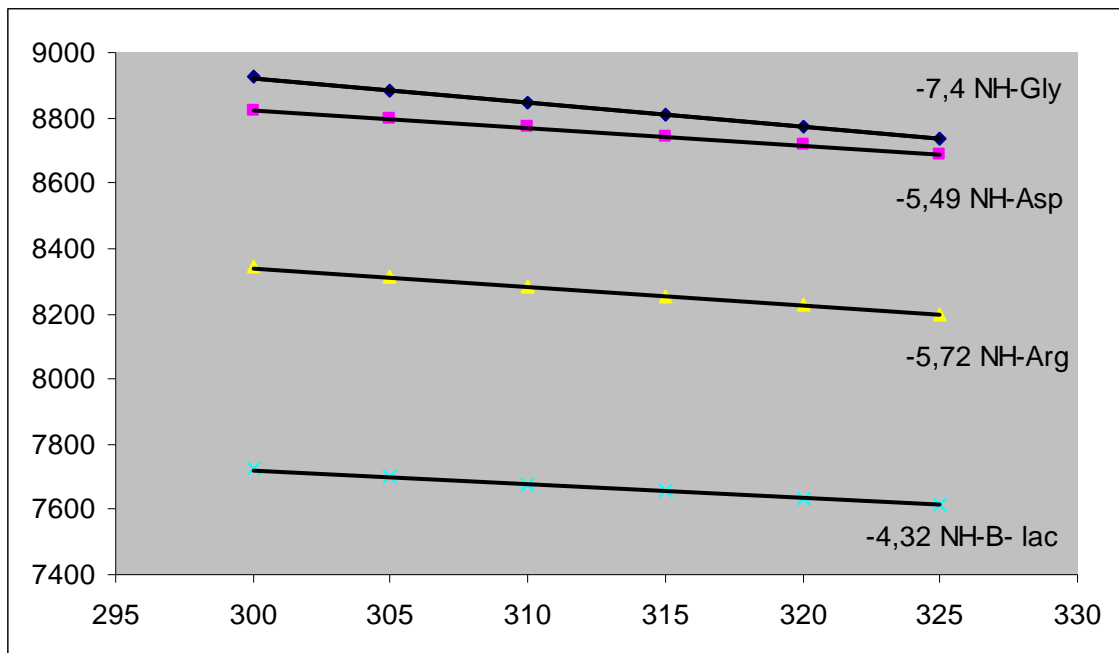
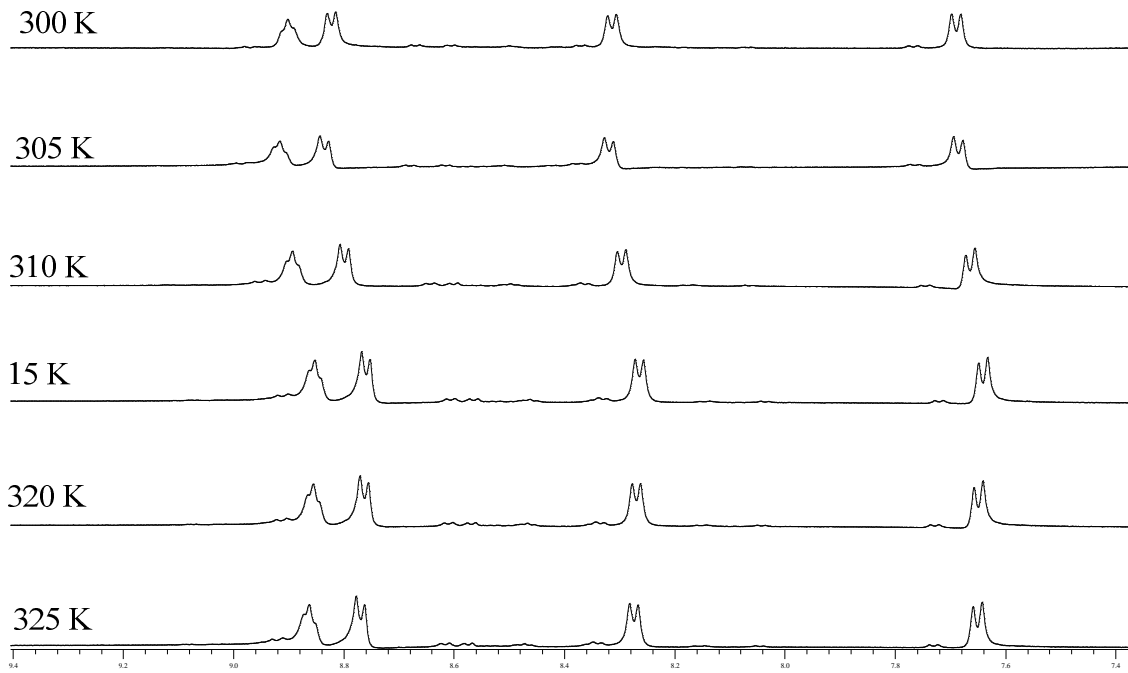


Figura 6.13. Gráfica de la deriva térmica para el compuesto 28a



### 6.2.2. Compuesto 28b

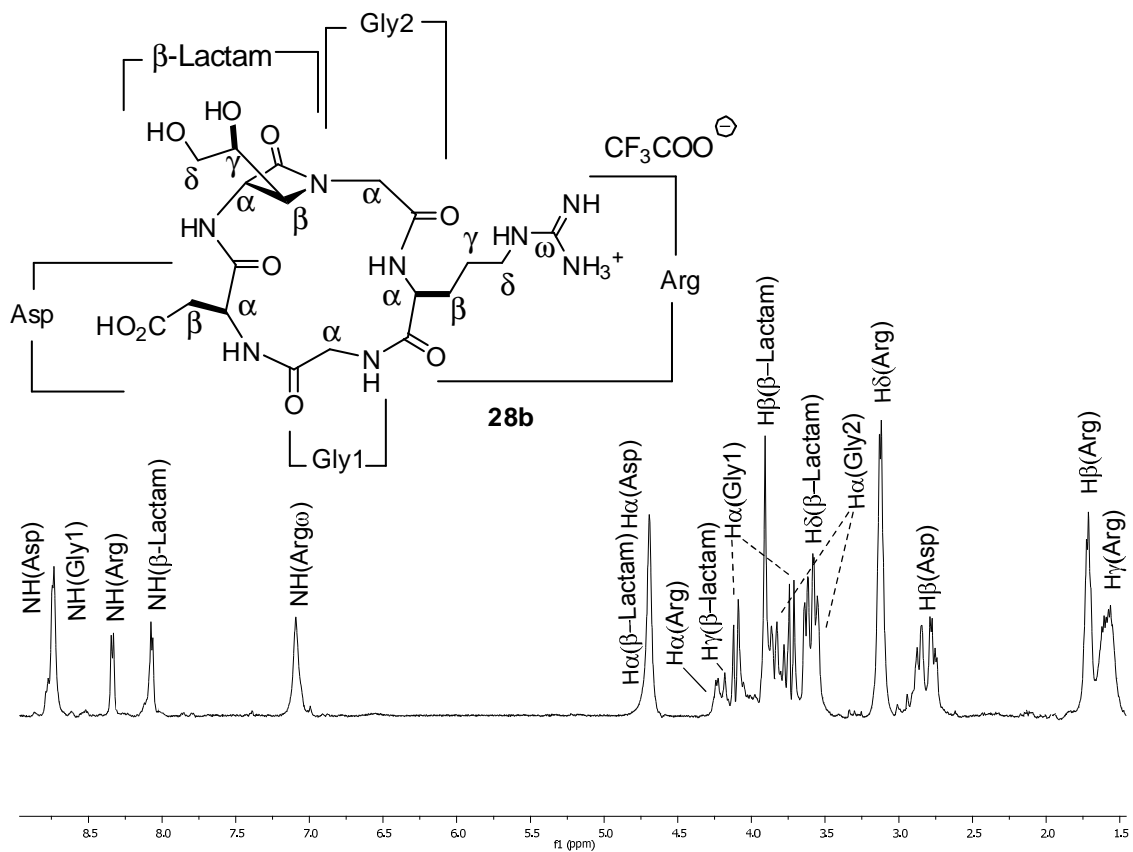


Figura 6.14.  $^1\text{H}$  RMN (500MHz) del CPP 28b en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) a 300K

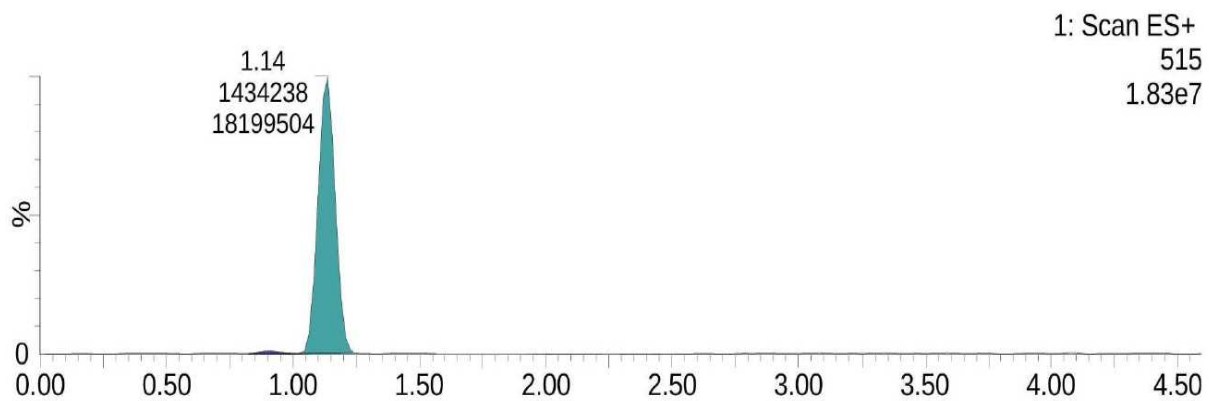


Figura 6.15. Cromatograma del compuesto 28b

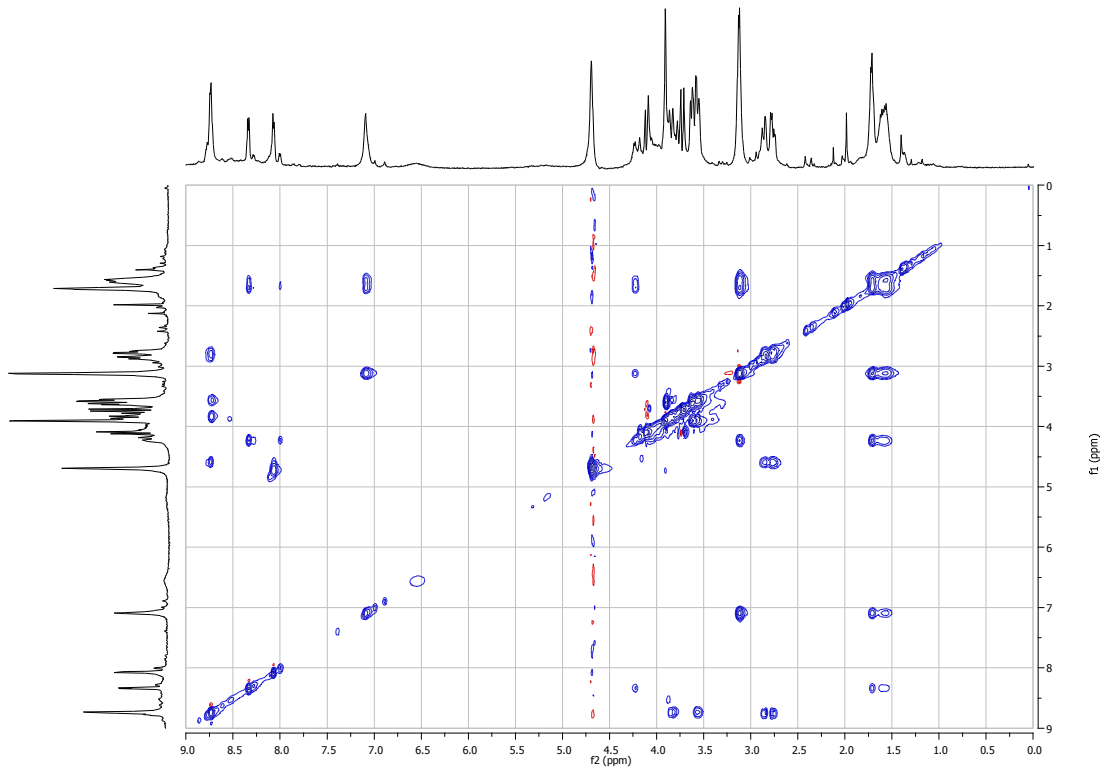


Figura 6.16. TOCSY (500MHz) del CPP 28b en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

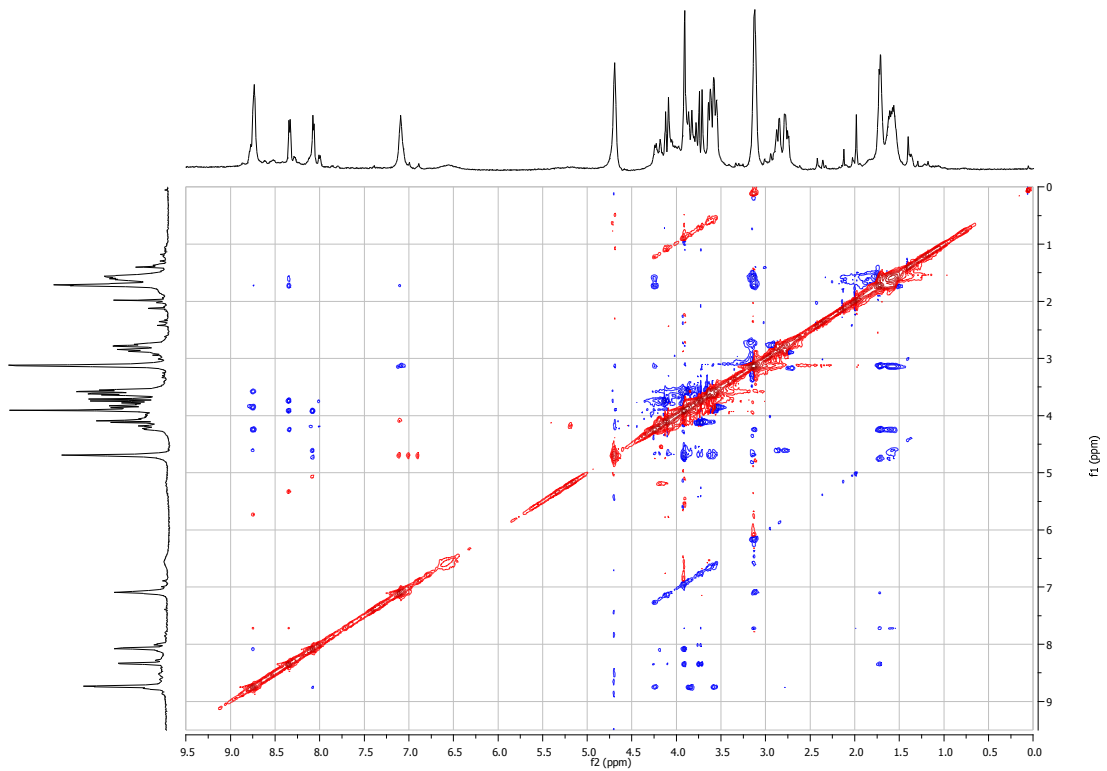


Figura 6.17. ROESY (500MHz) del CPP 28b en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

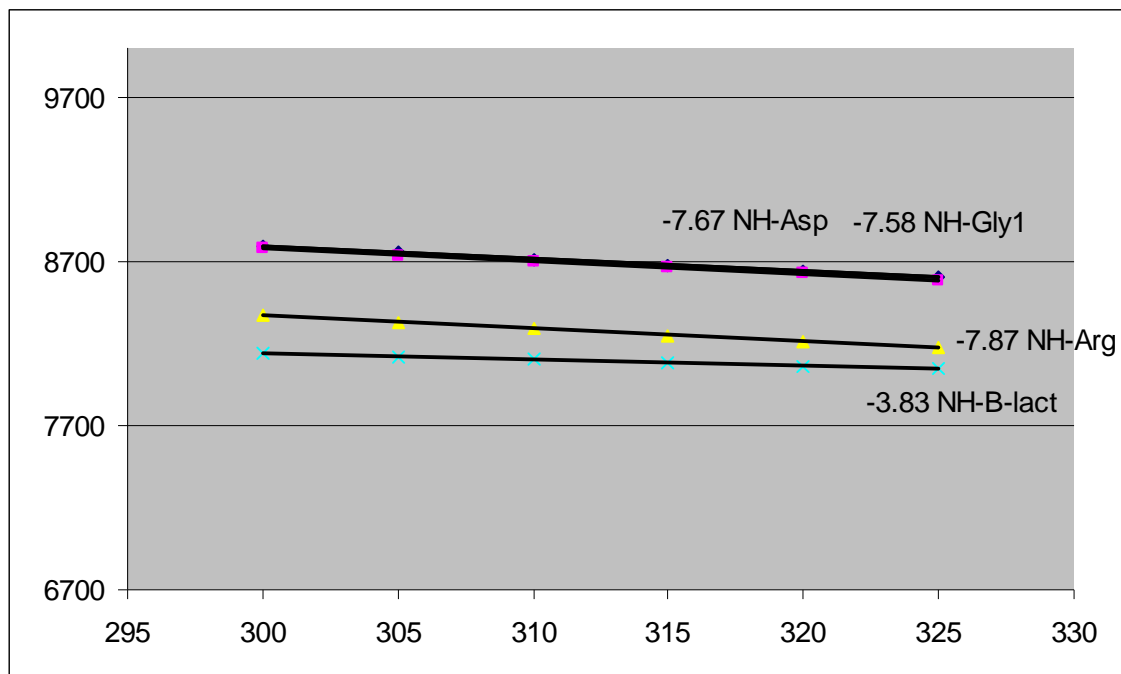
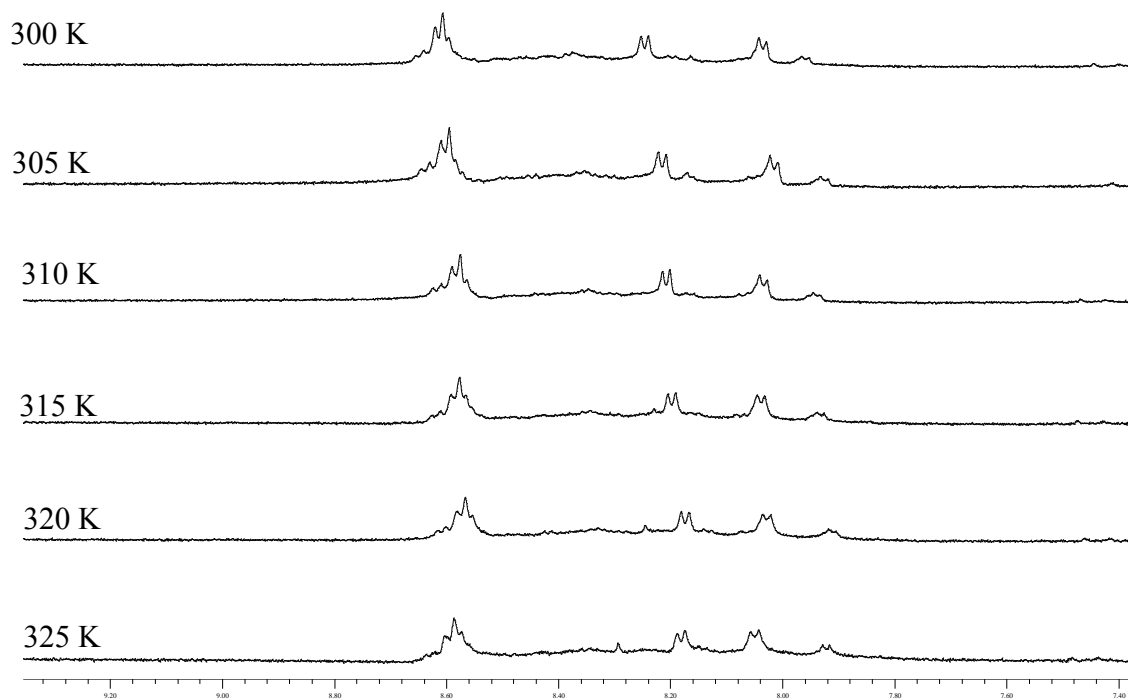


Figura 6.18. Gráfica de la deriva térmica para el compuesto 28b

## 6.2.3. Compuesto 28c

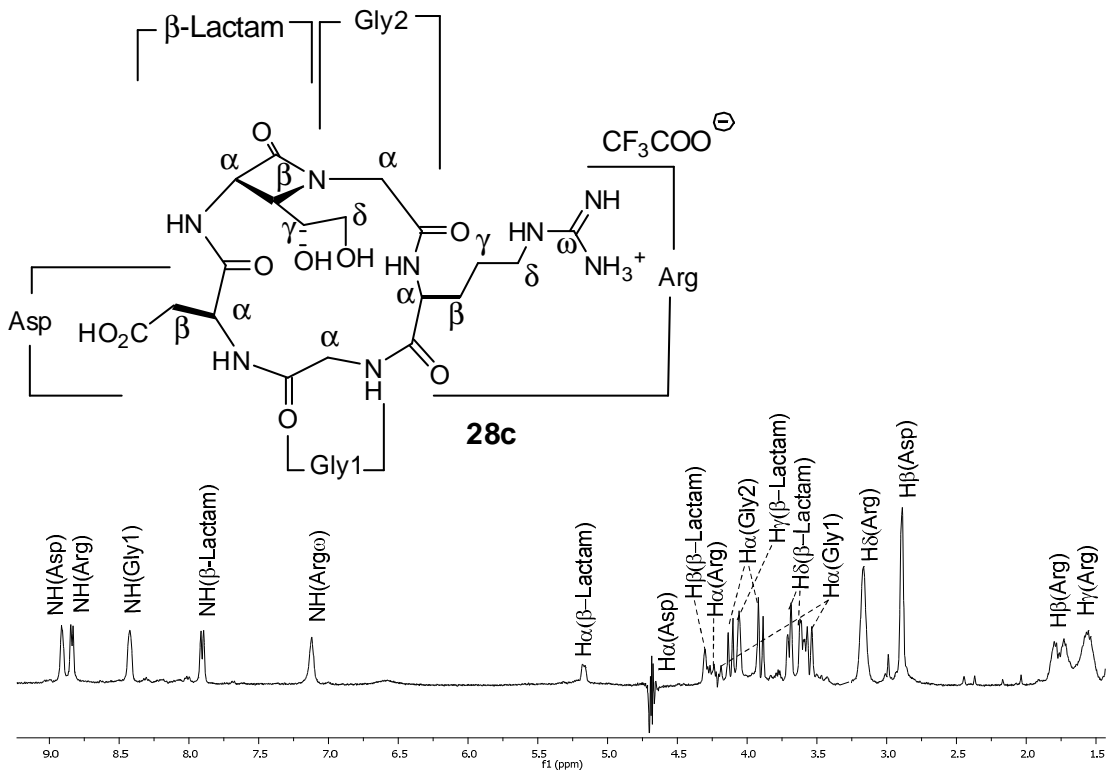
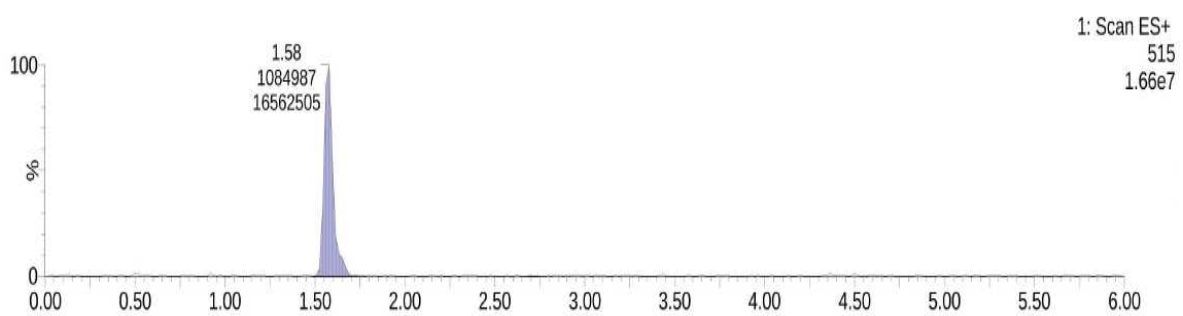
Figura 6.19.  $^1\text{H}$  RMN (500MHz) del CPP 28c en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) a 300K

Figura 6.20. Cromatograma del compuesto 28c

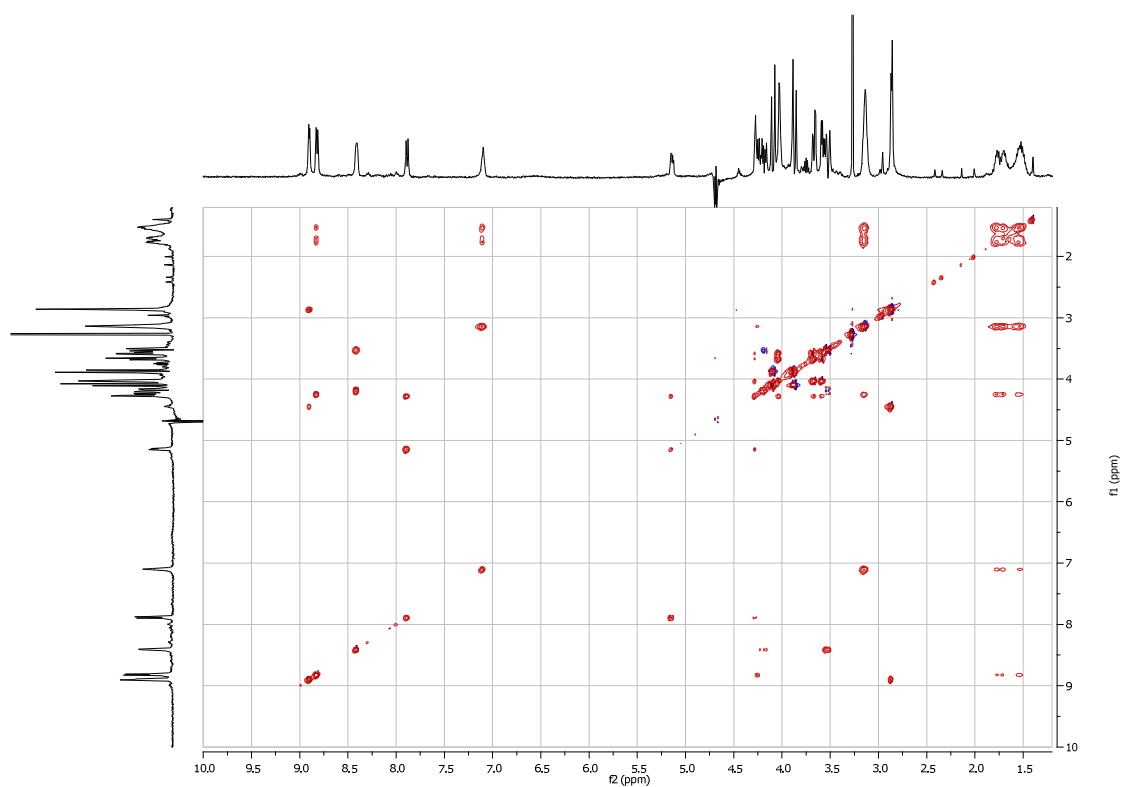


Figura 6.21. TOCSY (500MHz) del CPP 28c en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

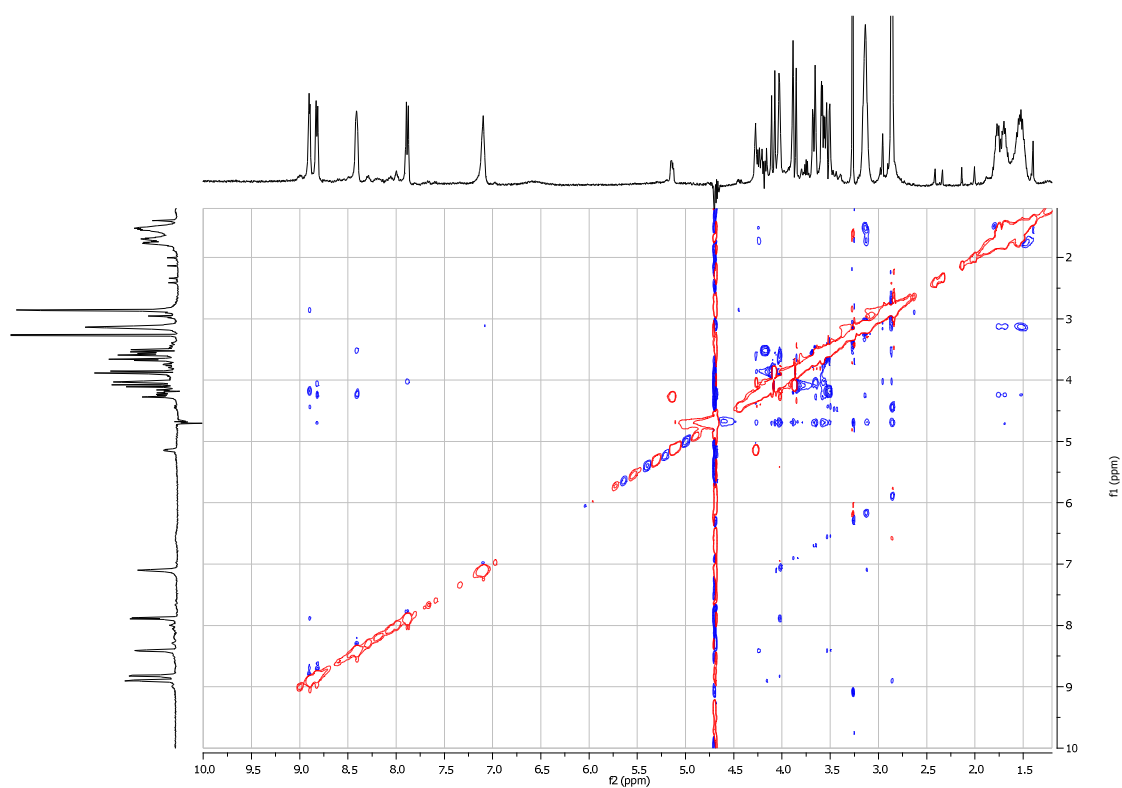


Figura 6.22. ROESY (500MHz) del CPP 28c en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

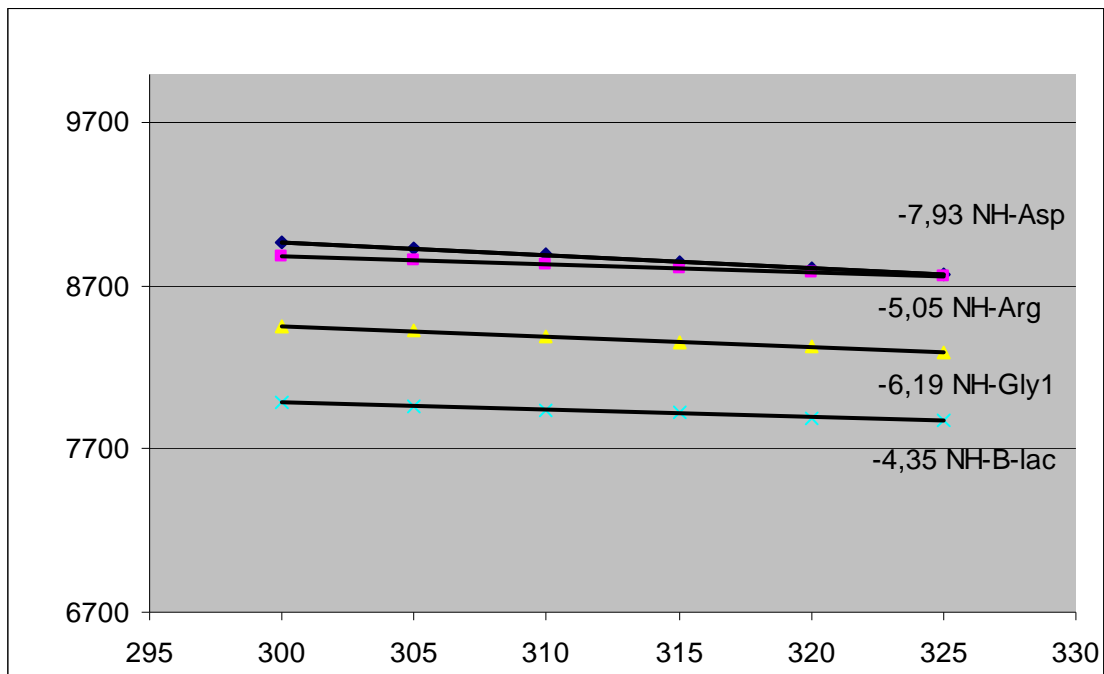
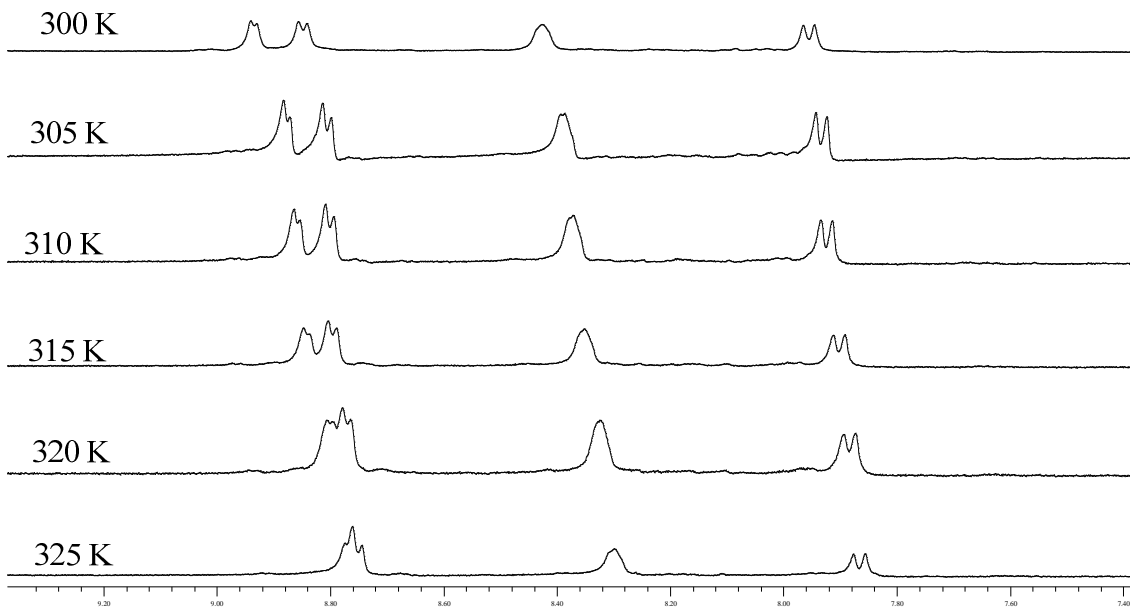


Figura 6.23. Gráfica de la deriva térmica para el compuesto 28c

## 6.2.4. Compuesto 28d

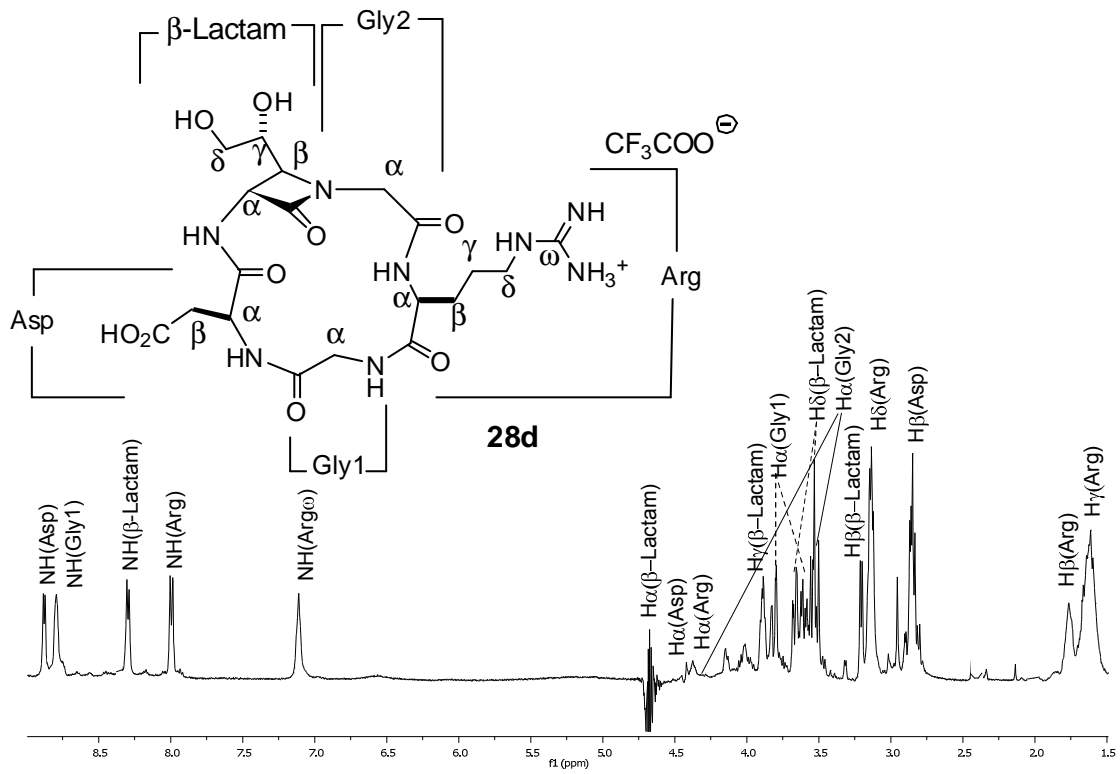


Figura 6.24. <sup>1</sup>H RMN (500MHz) del CPP 28d en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

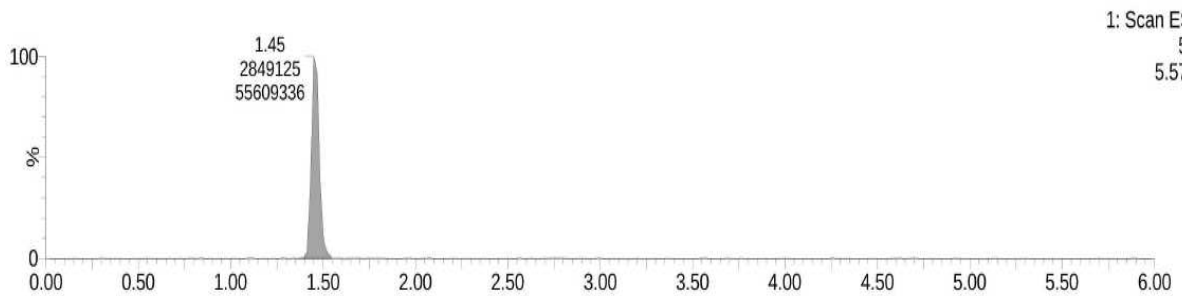


Figura 6.25. Cromatograma del compuesto 28d

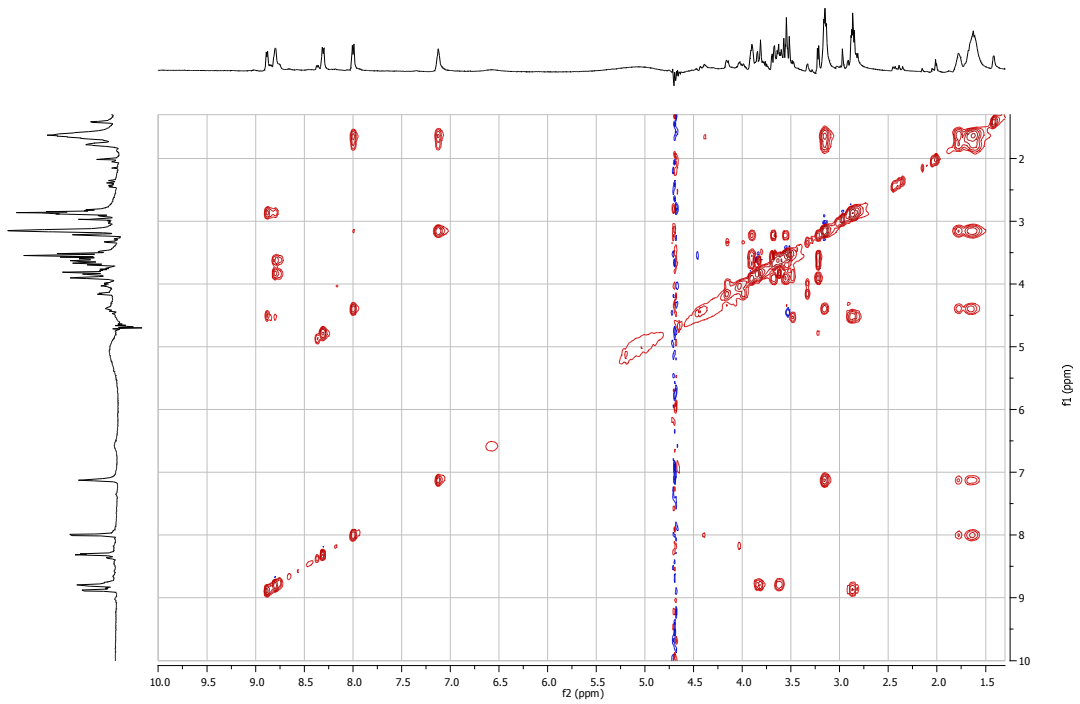


Figura 6.26. TOCSY del CPP 28d en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K

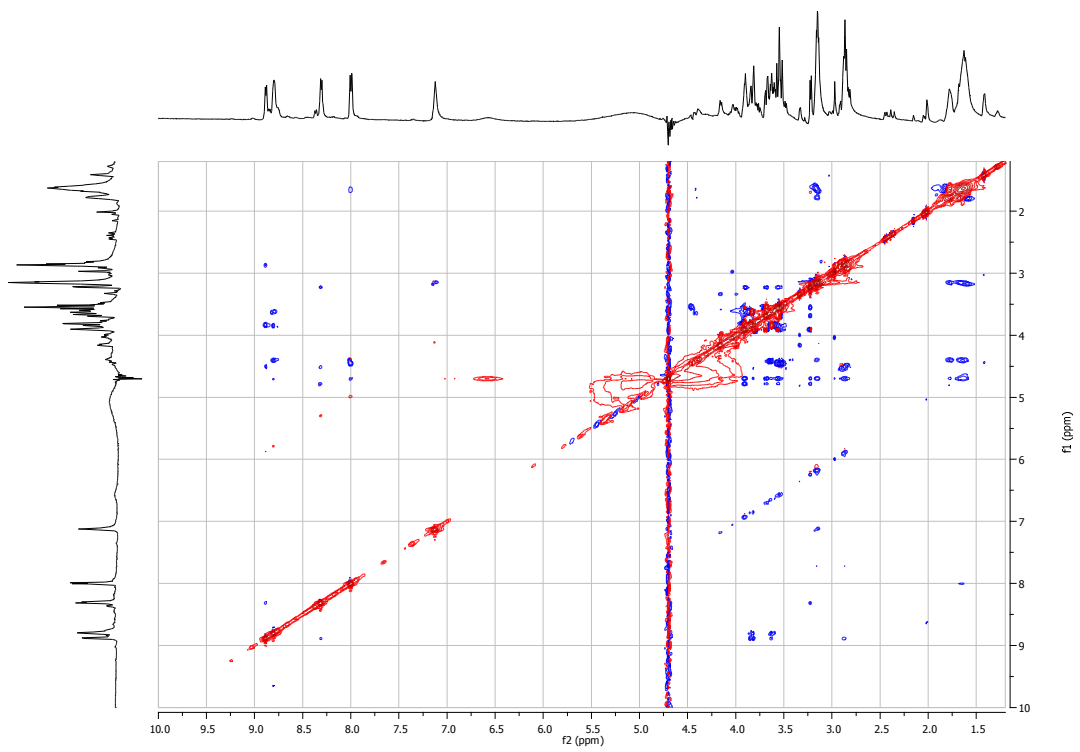


Figura 6.27. ROESY (500MHz) del CPP 28d en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) a 300K



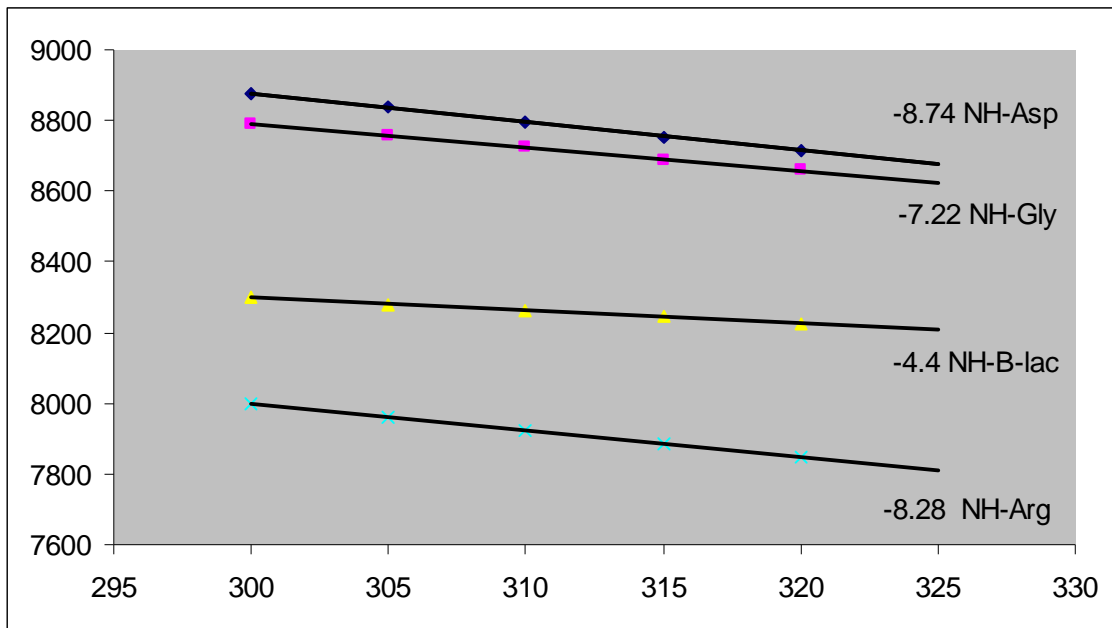
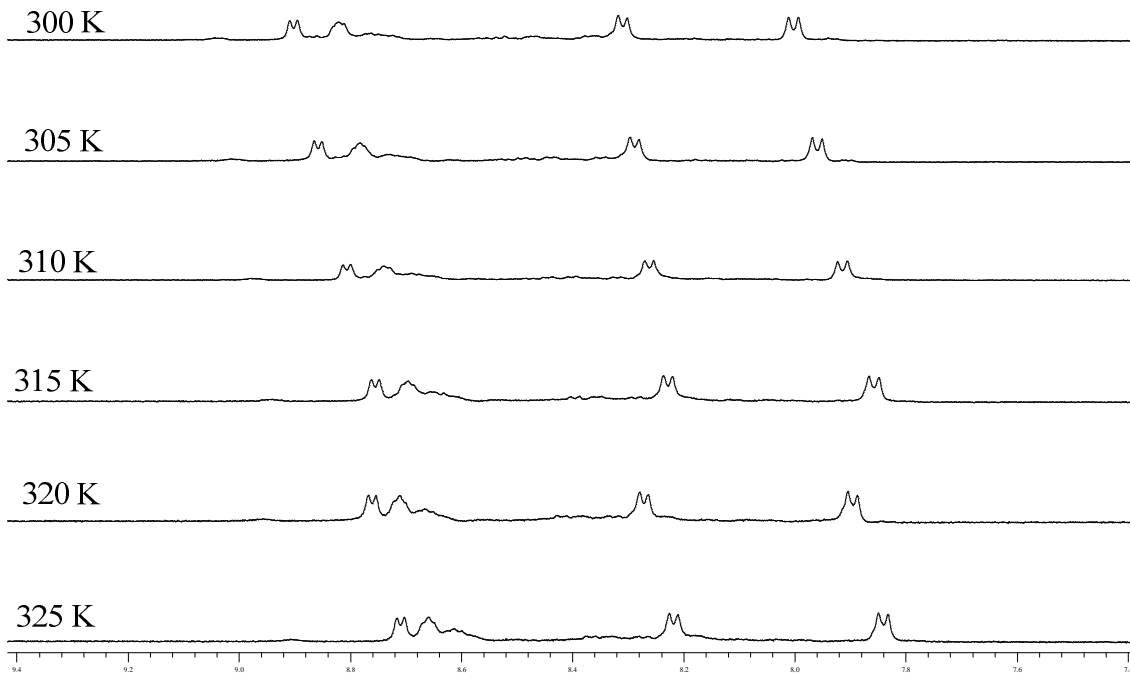
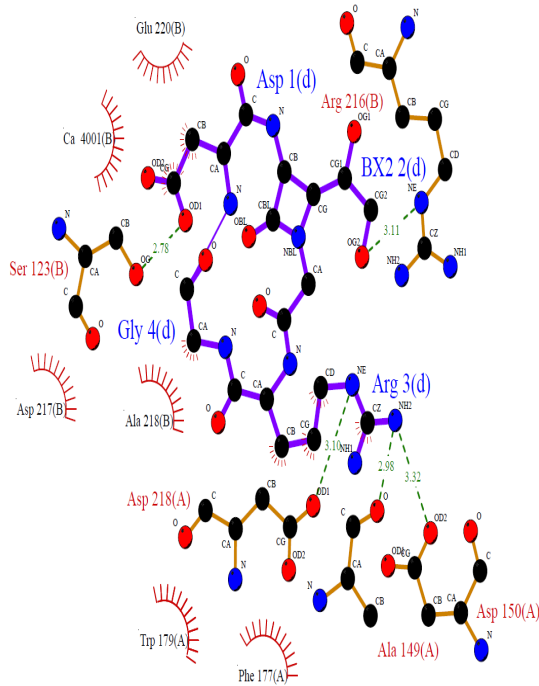
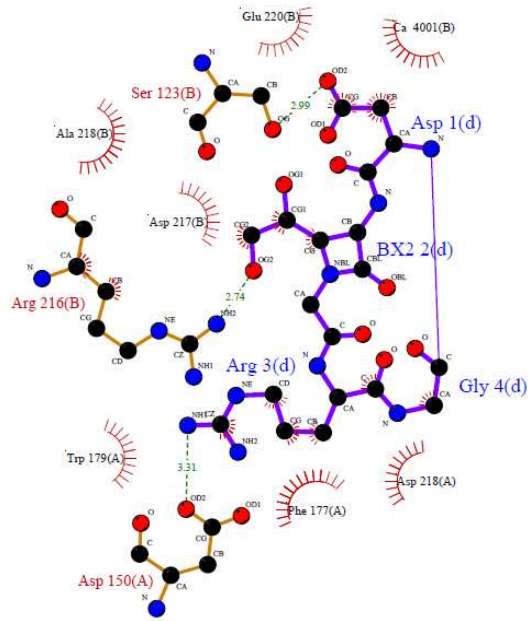


Figura 6.28. Gráfica de la deriva térmica para el compuesto 28d

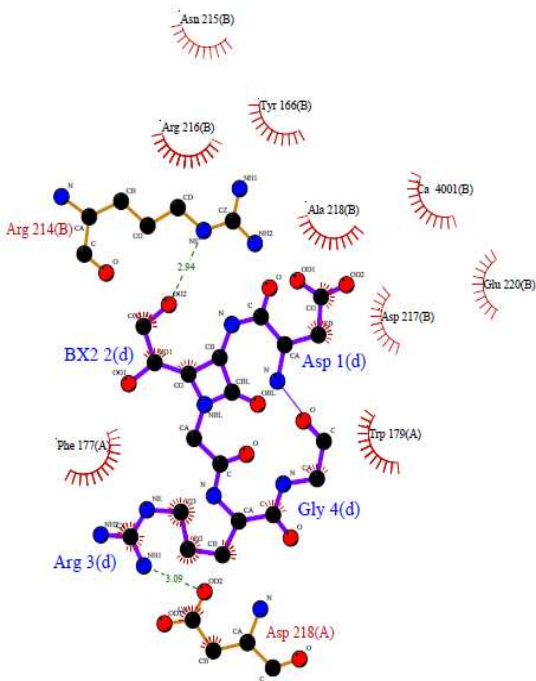
**6.3. Clusters de energía restantes de las familias 28a-d**



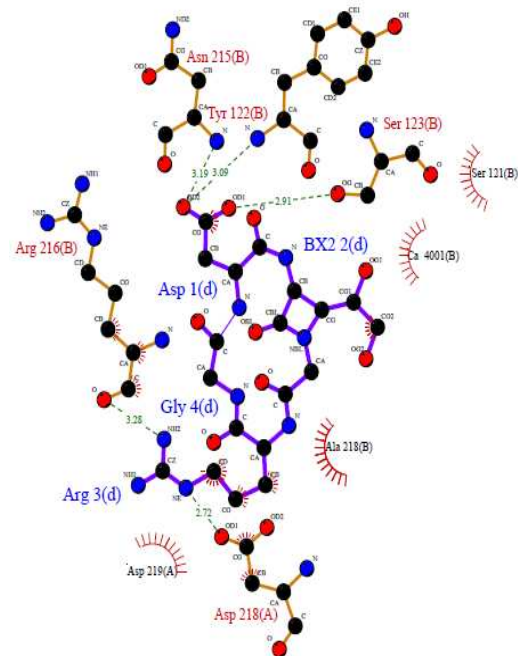
**28b "M<sub>1,1</sub>" / -14.8 Kcal**



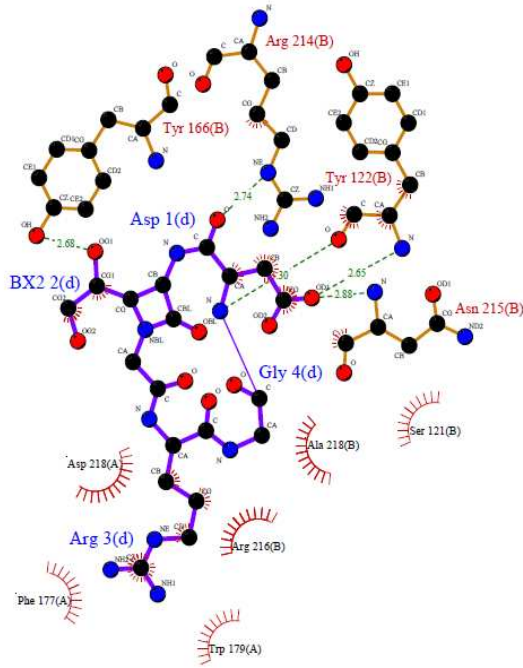
**28b "M<sub>1,2</sub>" / -13.8 Kcal**



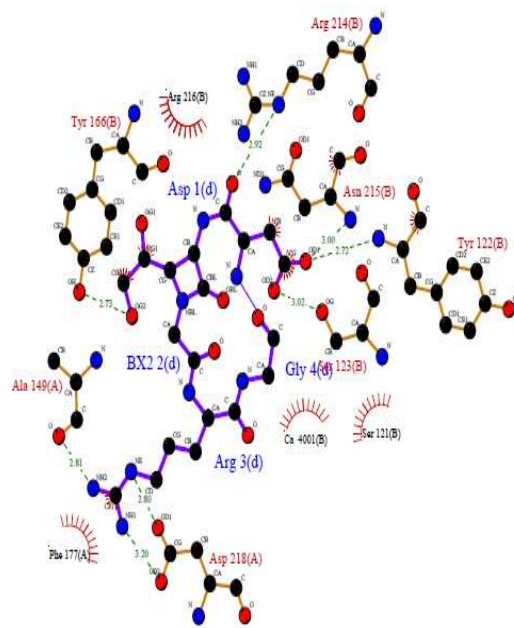
**28b "M<sub>1,3</sub>" / -14.1 Kcal**



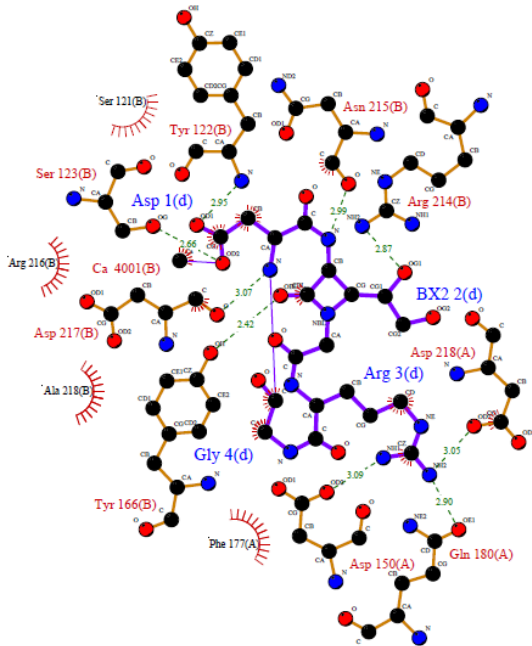
**28b "M<sub>1,4</sub>" / -12.2 Kcal**



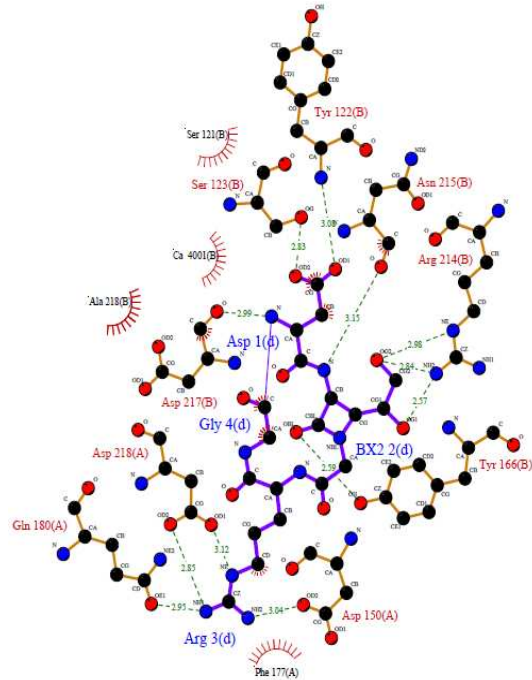
28a "M<sub>1,1</sub>" / -13.2 Kcal



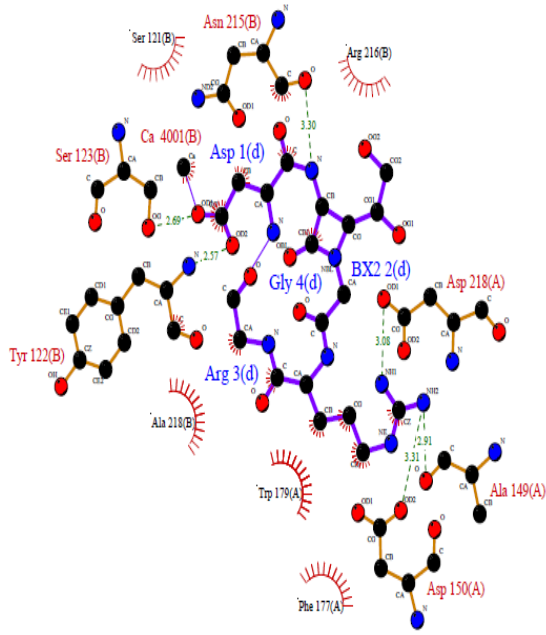
28a "M<sub>1,2</sub>" / -13.2 Kcal



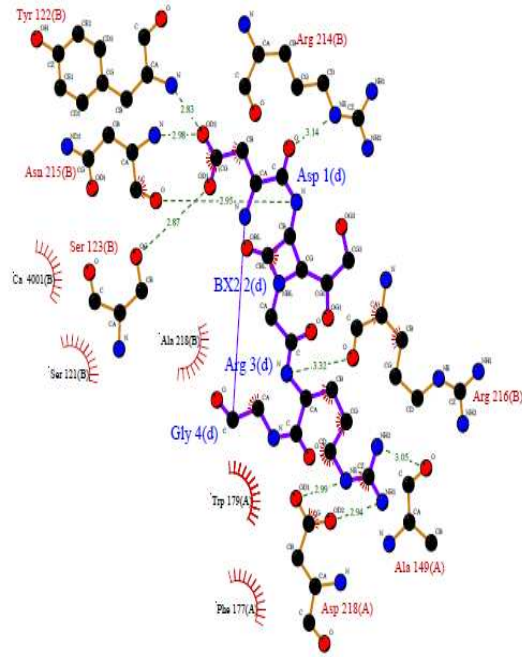
28d "M<sub>1,1</sub>" / -15.5 Kcal



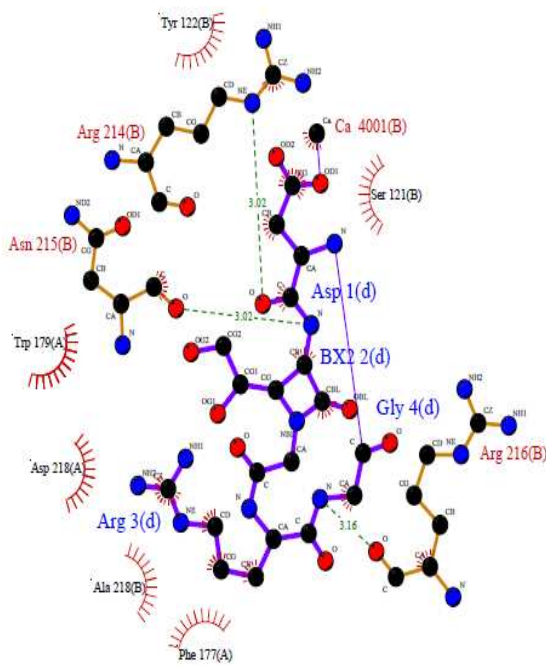
28d "M<sub>1,2</sub>" / -15.4 Kcal



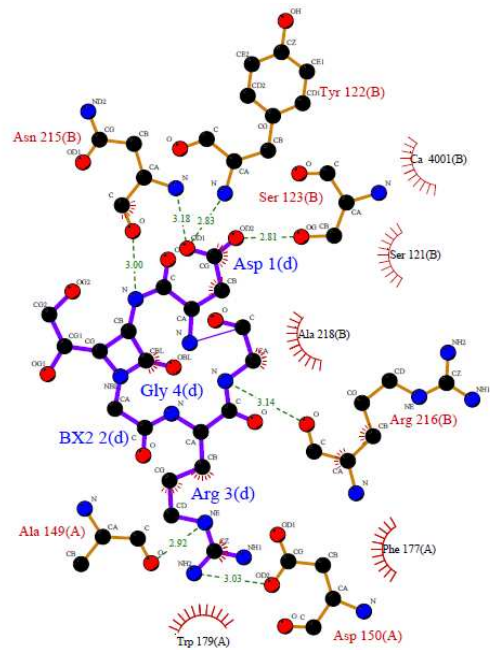
28c "M<sub>1,1</sub>" / -14.0 Kcal



28c "M<sub>1,2</sub>" / -14.3 Kcal



28c "M<sub>2,1</sub>" / -14.7 Kcal



28c "M<sub>2,2</sub>" / -13.7 Kcal



## **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

Se han sintetizado por primera vez ciclopeptidomiméticos de RGD incorporando una  $\beta$ -lactama 3,4-disustituida en su estructura.

Los cuatro compuestos sintetizados presentan un comportamiento conformacional homogéneo, es decir, ni la configuración del nuevo esterocentro ni la configuración cis, trans del sustituyente afectan de forma significativa a la conformación del ciclo. La ausencia de sustituyentes en el carbono  $\alpha$  de la glicina 2 y la monosustitución en el C<sub>3</sub> de la  $\beta$ -lactama provoca que los ciclos presenten una gran flexibilidad estructural y una ausencia de enlaces de hidrógeno.

Todos los ciclopeptidomiméticos sintetizados en esta tesis presentan una alta potencia inhibitoria de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en ensayos de adhesión sobre células HUVEC y confirman la validez general del diseño basado en la inclusión de  $\beta$ -lactamas en péptidos formados por nosotros (LSAD). Siendo el compuesto **28b** el que presenta la mejor actividad (cinco veces mayor que el compuesto de referencia Cilengitide).

Se ha localizado espacialmente la interacción hidrofílica dentro del centro activo de la integrina propuesta por Kessler.

Se ha realizado por primera vez en el laboratorio un ensayo de inhibición génica a los compuestos **28b**, **1** y **35**, constatando tanto la gran especificidad de la actividad celular “in vivo” como la necesidad de realizar conjuntamente los ensayos de adhesión celular e inhibición génica para conocer el verdadero comportamiento de un compuesto.





**PUBLICACIONES Y PATENTES**



8. **PUBLICACIONES Y PATENTES**

## COMMUNICATIONS

DOI: 10.1002/cbic.200((will be filled in by the editorial staff))

((Running Title))

### Cyclic RGD $\beta$ -Lactam Peptidomimetics Induce Differential Gene-Expression in Human Endothelial Cells

Jesus M. Aizpurua,<sup>[a]</sup> José Ignacio Ganboa,<sup>[a]</sup> Claudio Palomo,<sup>[a]</sup> Iraida Loinaz,<sup>[a]</sup> Joseba Oyarbide,<sup>[a]</sup> Xabier Fernandez,<sup>[a]</sup> Eva Balentová,<sup>[a]</sup> Raluca M. Fratila,<sup>[a]</sup> Azucena Jiménez,<sup>[a]</sup> José Ignacio Miranda,<sup>[a]</sup> Antonio Laso,<sup>[b]</sup> Silvia Ávila<sup>[b]</sup> and José Luis Castrillo<sup>[b]</sup>

Angiogenesis is a fundamental step in the transition of solid tumors from a dormant state to a malignant one. Many of the anti-angiogenic low molecular weight drug candidates mimic the short peptide epitope Arg-Gly-Asp (RGD),<sup>[1,2]</sup> disrupting the extracellular matrix/integrin adhesion and, ultimately, leading to tumor cell apoptosis. In contrast to the detailed structural information available for the extracellular adhesion inhibition of endothelial cells through the recognition of integrins (typically  $\alpha V\beta 3$ ) by RGD peptidomimetics,<sup>[2]</sup> most aspects of a possible intracellular angiogenic gene regulation caused by the epigenetic activity of peptidomimetics remain unexplored.<sup>[3]</sup> Importantly, dysfunction of this signaling system is suspected to be at the origin of the resistance phenomena developed in anti-angiogenic therapies.<sup>[4]</sup>

Inside the endothelial cell, dozens of proteins mediate or control the signaling pathways of angiogenesis after integrin activation, but only a couple of kinases (JNK, ERK) and transcription factors (NF $\kappa$ B, FoxO) are able to promote gene-regulation<sup>[5]</sup> (Figure 1). In addition, large environmental ligands, such as vascular endothelial growth factors VEGF<sup>[6]</sup> or peptide hormones,<sup>[7]</sup> are required to elicit proangiogenic gene regulation. Within this context, we set out to design alternative low-molecular weight RGD probes for interaction with  $\alpha V\beta 3$  integrin and gene-regulation in HUVEC cells. Ideally, these peptidomimetics should:

a) contain a minimal scaffold to prevent undesired scaffold/integrin interactions, b) have a uniform and predictable scaffold conformation, c) bear a maximum of recognition groups, including hydrophobic or hydrophilic ones, and d) permit the deletion of selected residues from the RGD triad without global shape change.

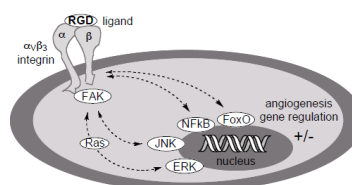


Figure 1. Signaling pathways initiated by integrins affecting the gene regulation of angiogenesis. ERK = extracellular-signal-regulated kinase, FAK = focal adhesion kinase, FoxO = forkhead box O, JNK = c-Jun N-terminal kinase, NF- $\kappa$ B = nuclear factor kappa of B-cells.

We selected five-membered and four-membered small cyclic peptides for development. The residual flexibility of these cyclopeptides can be further constrained by incorporating lactam bridges between neighboring amino acids to stabilize protein secondary structure motifs characterized by combinations of  $\beta$ -turn and/or  $\gamma$ -turns.<sup>[8]</sup> Several lactam pseudopeptides resulting from such an extension of the Freidinger's concept<sup>[9]</sup> (Figure 2; 1  $\rightarrow$  2) have been explored to mimic receptor-bound conformations of bioactive peptides and to provide pharmacophore information for nonpeptide drug design.<sup>[10]</sup> However, despite its apparent simplicity, this design is not always reliable for the precise positioning of a maximum number of recognition groups around the pseudopeptide cyclic core. Since the inter-residual lactam bridge created by modifying the side chain (R<sup>1</sup>) shares recognition and constraint functions, the design of mimetic libraries becomes difficult and non-general, when synthetically affordable. An alternative way to constrain cyclic peptides arises from the incorporation of a D-amino acid and an N-alkyl-amino acid to the macrocycle, as illustrated by the remarkable  $\alpha V\beta 3$  antagonist cilengitide **3** *cyclo*-[Arg-Gly-Asp-(D)Phe-N(Me)Val] developed by Kessler et al.<sup>[11]</sup>

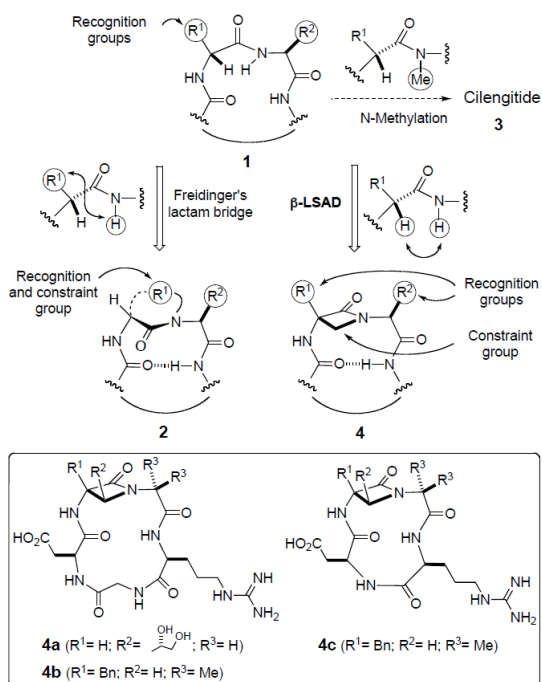
Herein we put forward an alternative more versatile solution to the aforementioned design problem by introducing  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactam scaffolds issued from the  $\alpha$ CH/NH proton mimicry (Figure 2; 1  $\rightarrow$  4). This " $\beta$ -lactam scaffold-assisted design" approach ( $\beta$ -LSAD) is based on the separation of recognition and constraint groups, and has been previously proven efficient to promote remarkably stable type-II (II')  $\beta$ -turn peptidomimetics from extended open native peptides.<sup>[12]</sup> Accordingly, the straight application of the  $\beta$ -LSAD principle to RGD cyclic mimetics led us to the  $\beta$ -lactam pseudopeptides **4a-c**, which fulfilled several structural requirements to trigger quite different signaling interactions with  $\alpha V\beta 3$  integrin. For instance, the hydrophobic benzyl group in residue (D)Phe of cilengitide **3** was replaced by the strongly hydrophilic 1,2-dihydroxyethyl moiety in mimetic **4a**. Conversely, the hydrophobic R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> substituents were preserved

[a] Prof. Dr. J. M. Aizpurua, Prof. Dr. J. I. Ganboa, Prof. Dr. C. Palomo, Dr. I. Loinaz, Dr. J. Oyarbide, X. Fernandez, Dr. E. Balentová, Dr. R. M. Fratila, Dr. A. Jiménez, Dr. J. I. Miranda  
Department of Química Orgánica-I  
University of the Basque Country UPV-EHU  
Centro Joxe Mari Korta. Avenida de Tolosa-72. 20018-San Sebastián (Spain)  
Fax: (+34) 943-015959  
E-mail: [jesusmaria.aizpurua@ehu.es](mailto:jesusmaria.aizpurua@ehu.es)

[b] Dr. A. Laso, Dr. S. Ávila, Dr. J. L. Castrillo  
Genetadi Biotech A.G.  
Edificio 502. Parque Tecnológico de Bizkaia. 48160-Derio (Spain)

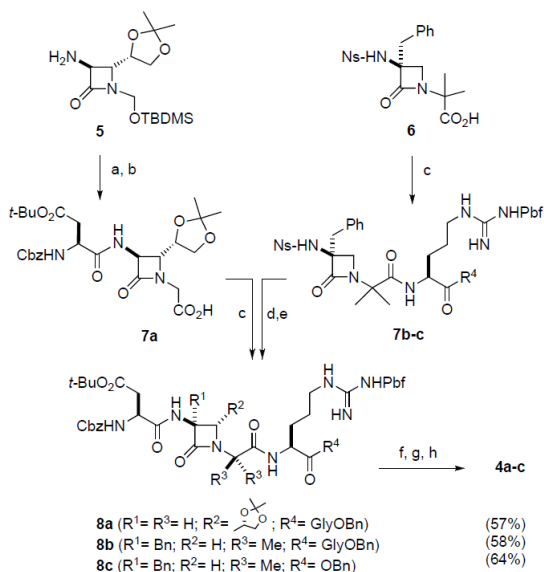
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

in compounds **4b-c**, but the central Gly residue was removed from RGD sequence in **4c**.



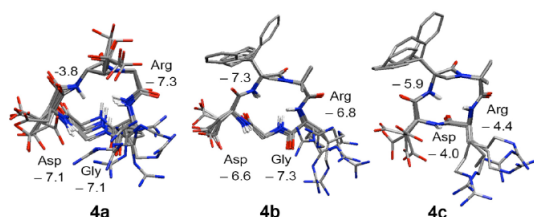
**Figure 2.** Lactam pseudopeptide design in cyclic peptides. Left, Freidinger's concept: R<sup>1</sup> group in **2** requires modification to fix a β-turn conformation and acts simultaneously as a recognition (functional) element. Right, β-lactam scaffold-assisted design (β-LSAD): formal insertion in **1** of a single carbon atom (C<sup>α</sup>-H + H-N → CH<sub>2</sub>) mimics two hydrogen atoms and constrains the cyclic pentapeptide **4** preserving the original R<sup>1</sup> group exclusively for molecular recognition. Bottom: some β-LSAD cyclic RGD mimetics **4a-c** prepared in this work.

Cyclic integrin probes **4a-c** could be prepared easily from known α-amino-β-1,3-dioxolanyl-β-lactam **5** and from α-amino-α-benzyl-β-lactam **6**<sup>[13]</sup> (Scheme 1). The former was coupled to Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH and then the *N*-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl moiety was submitted to desilylation and oxidation with the BAIB/TEMPO system to provide **7a** in 54% overall yield. Conversely, coupling of the carboxylic β-lactam **6** with protected arginines H-Arg(Pbf)GlyOBn and H-Arg(Pbf)OBn gave β-lactam pseudopeptides **7b** and **7c** in 78% and 70% yields, respectively. Next, peptide coupling at the carboxylic group of **7a** and the *N*-termini of **7b-c** afforded the β-lactam macrocyclic precursors **8a-c** in 70-84% overall yields. These compounds were deprotected upon catalytic hydrogenation, cyclized under high dilution conditions and the resulting β-lactam cyclic peptides were deprotected again with trifluoroacetic acid to provide the target compounds **4a-c**. Cyclization of **8c** to **4c** is noteworthy because tetrapeptides are very reluctant to afford 12-membered macrocycles.<sup>[14]</sup> A pre-arranged β-turned conformation of **8c** with the β-lactam ring at the (i+1) position would account for the easy cyclization observed in this case.<sup>[15]</sup>



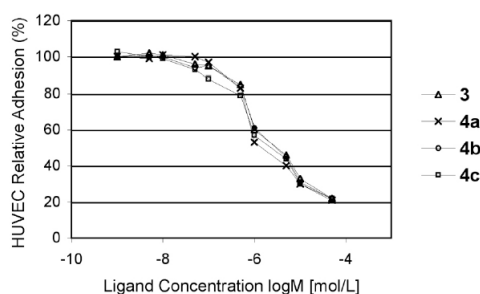
**Scheme 1.** Reagents and conditions: a) Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, EDC, HOBT, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. b) HF-Pyr, then BAIB, TEMPO, MeCN-H<sub>2</sub>O. c) H-Arg(Pbf)R<sup>4</sup>, EDC, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. d) PhSH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN, r.t., 2h. e) Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, HATU, KHCO<sub>3</sub>, DMF. f) H<sub>2</sub>/Pd-C, MeOH. g) HATU, HOAT, KHCO<sub>3</sub>, DMF. h) F<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H. BAIB = [bis(acetoxy)iodo]benzene, EDC = 3-[(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, HATU = O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate, HOAT = 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, HOBT = hydroxybenzotriazole, Ns = 2-nosyl, Pbf = 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl, TEMPO = 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy.

NMR/MD conformational analysis of RGD β-lactam cyclic peptides **4a-c** in water solution revealed the exclusive formation of highly populated single clusters lacking inner hydrogen-bonded β-turns or γ-turns. This was evident from the large thermal coefficients (|Δδ/ΔT| > 3ppb/K) recorded for all the amide NH protons and from the ROESY inter-proton distance data sets (Figure 3; see Supporting Information S15-S19 for details). These observations were in line with the reported conformation of cilengitide **3**, which also features a peptide backbone without stable hydrogen bonds (Δδ/ΔT = (D)Phe: -4.1; Asp: -6.1; Gly: -4.9; Arg: -9.3 ppb/K).<sup>[11]</sup> Surprisingly though, the strong betagenicity displayed by α-amino-β-lactams in open peptides vanished in the cyclic pentapeptide and tetrapeptide counterparts, as evidenced by the absence of (Asp)C=O...H-N(Arg) hydrogen bonds. In addition, the peptide backbone strain of β-lactam macrocycles varied with the azetidinone ring substitution position (β-substituted compound **4b** was more rigid than α-substituted **4a**) and also with the number of residues (tetrapeptide **4c** was extremely rigid). These observations confirmed the suitability of the β-LSAD design as a general scaffolding tool to place different recognition groups in pre-defined spatial dispositions.



**Figure 3.** Five-structures overlay for compounds **4a-c** calculated from NMR interproton distance restrictions (ROESY,  $t_{mix} = 200$  ms) determined in  $H_2O/D_2O$  (9:1). Amide thermal coefficient values are in ppb/K. All hydrogens except amide NH have been omitted for clarity.

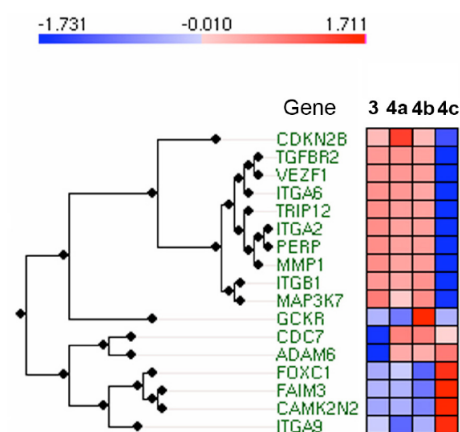
Next, we compared the antagonist affinity of RGD  $\beta$ -lactam mimetics **4a-c** and the highly active cilengitide **3** against  $\alpha V\beta 3$  integrin on human endothelial HUVEC cells by using an adhesion inhibition assay (Figure 4).<sup>[16]</sup> All the mimetics tested displayed  $IC_{50}$  values comparable to **3** ( $IC_{50} = 5$  mM under the test conditions), but the polyhydroxylic mimetic **4a** showed a slightly higher activity ( $IC_{50} = 1.5$  mM) (see Supporting Information S22, Table S5). This observation is in sharp contrast to the generally accepted RGD/ $\alpha V\beta 3$  integrin interaction model, which establishes that hydrophobic groups, as the Bn residue of (D)Phe in cilengitide, increase the affinity of the mimetic for the integrin receptor.<sup>[17]</sup> Hence, the structural information provided by compound **4a** might be useful for the exploration of a novel, yet unknown, hydrophilic pocket in  $\alpha V\beta 3$  integrin and its exploitation in nonpeptide mimetic design. Finally, tetrapeptide mimetic **4c** resulting after the formal deletion of the Gly residue from pentapeptide **4b**, also was a strong antagonist of  $\alpha V\beta 3$  integrin. This finding is in good agreement with the accepted model correlating the selectivity of RGD mimetics for  $\alpha V\beta 3$  integrin to a distance shorter than  $\approx 6.0$  Å between the C $\beta$  atoms of the Asp and Arg residues.<sup>[18]</sup>



**Figure 4.** Adhesion inhibition promoted by RGD  $\beta$ -lactam ligands **4a-c** and cilengitide **3** of HUVEC on vitronectin-coated cell-culture plates. Adherent cells were counted after 1h and their relative adhesion (%) is shown compared to non-treated control experiment. HUVEC= human umbilical vein endothelial cells.

In order to study the intracellular effect of all RGD-binding compounds, a cell-culture whole gene-expression assay was performed. HUVEC cells were treated separately with a  $10^{-5}$  M concentration of the cilengitide **3** and compounds **4a-c** during 48 hours. The simultaneous analysis of all human gene-expression by microarray let us identify which human gene(s) are activated, inhibited or un-affected after the RGD-compounds were bound to

the receptors of the cells. The expression of a specific set of 17 angiogenic and adhesion-related genes are shown (Figure 5). 10 of these genes are activated and 7 are blocked after treatment with the cilengitide **3**. The pattern of gene-expression is mainly conserved (15/17 genes) in compound **4a** and compound **4b** (14 of 17 genes). The lack of correlation in the expression of three genes (CDC7, ADAM6 and GCKR) shows us the highly specific "in-vivo" cell activity after ligand-receptor binding. Surprisingly, the pattern of gene-expression after cell-treatment with the cyclic tetrapeptide **4c** was almost opposite (activation vs inhibition) in 15 of 17 genes when compared with the cilengitide **3** (Figure 5). These data suggest an "in-vivo" pro-angiogenic prevalent effect of compound **4c**, which would act as an agonist ligand of the RGD-receptor despite its marked antiadhesive nature.



**Figure 5.** Angiogenesis-related gene regulation of DNA samples extracted from HUVEC cells after treatment with RGD  $\beta$ -lactam ligands **4a-c** and cilengitide **3**. Numbers refer to a logarithmic 10-fold activation (red) or inhibition (blue). For gene hierarchical clustering and gene function, see Supporting Information S24-S26.

In conclusion, the incorporation of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactams into cyclic pentapeptides and tetrapeptides prevents  $\beta$ -turn formation affording highly rigidified  $\beta$ -lactam cyclopeptides without stable intramolecular hydrogen bonds.<sup>[19]</sup> This design ( $\beta$ -LSAD) permits the precise spatial positioning of a variety of recognition groups, as illustrated in the preparation of cyclic RGD  $\beta$ -lactam mimetics **4a-c**. All these RGD compounds exhibit a cilengitide-like antagonist activity against  $\alpha V\beta 3$  integrin in an "in-vitro" cell-assay, but they induced a compound-specific pattern of intracellular angiogenesis-related gene-expression. Cilengitide **3** and cyclic RGD  $\beta$ -lactam pentapeptides **4a-b** show a very similar pattern of gene-expression, whereas the tetrapeptide mimetic **4c** (with a deleted Gly residue) has the opposite effect in intracellular gene regulation. This example suggests that a very specific epigenetic modification of intracellular angiogenesis pathways can be achieved by using properly designed low-molecular weight peptidomimetics. It also outlines the potential usefulness of automated genetic tests, in combination with current adhesion assays, to establish more accurately the anti- or pro-angiogenic profiles of novel integrin ligands. Further studies to establish the gene-regulation effects of other glycine-deleted RGD peptidomimetics are underway in our laboratory.

## Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, Spain) (Project: CTQ2006-13891/BQU), UPV/EHU and Gobierno Vasco (ETORTEK-inanoGUNE IE-08/225). We thank SGIker UPV/EHU for NMR facilities.

**Keywords:** ((Antitumor agents · Cell adhesion · Gene expression · Peptides))

- [1] a) R. Haubner, W. Schmitt, G. Holzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881-7891. b) L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001-1004. c) S. Urman, K. Gaus, Y. Yang, U. Strijowski, N. Sewald, S. De Pol, O. Reiser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3976-3978. d) A. S. M. da Ressurreicao, A. Vidu, M. Civera, L. Belvisi, D. Potenza, L. Manzoni, S. Ongerí, C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12184-12188.
- [2] a) J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science*, **2002**, *296*, 151-155. b) L. Marinelli, A. Lavechia, K. E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4393-4404. c) D. Craig, M. Gao, K. Schulten, V. Vogel, *Structure*, **2004**, *12*, 2049-2058.
- [3] For a genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signalling, see: K.R. Legate, S.A. Wickström, R. Fässler, *Genes. Dev.* **2009**, *23*, 397-418.
- [4] For a recent review on the resistance to anti-angiogenic therapies, see: Y. Crawford, N. Ferrara, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 624-630.
- [5] T. Kume, *Trends Cardiovasc. Med.* **2008**, *18*, 224-228.
- [6] S.P. Ivy, J.Y. Wick, B.M. Kaufman, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 569-579.
- [7] C. Clapp, S. Thebault, M.C. Jeziorski, G. Martinez De La Escalera, *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 1177-1215.
- [8] a) C. Gilon, C. Mang, E. Lohof, A. Friedler, H. Kessler in Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Vol. E 22 b, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, pp.461-542, Ed. Thieme. **2003**. b) M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.
- [9] a) R. M. Freidinger, D. F. Veber, D. S. Perlow, J. R. Brooks, R. Saperstein, *Science* **1980**, *210*, 656. b) R. M. Freidinger, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5553-5566.
- [10] G. V. Nikiforovich, K. E. Kóvér, W.-J. Zhang, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3262-3273.
- [11] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [12] C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Benito, J. I. Miranda, R. M. Fratila, C. Matute, M. Domercq, F. Gago, S. Martin-Santamaria, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243-16260.
- [13] C. Palomo, J. M. Aizpurua, E. Balentova, A. Jimenez, J. Oyarbide, R. M. Fratila, J.I. Miranda, *Org. Lett.* **2008**, *9*, 101-104.
- [14] J. M. Beierle, W. S. Horne, J. H. vanMaarseveen, B. Waser, J. C. Reubi, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725-4729.
- [15] For a review on conformation-directed macrocyclizations, see: J. Blanckstein, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949-1964.
- [16] M. Kawaguchi, R. Hosotani, S. Ohishi, N. Fujii, S. S. Tulachan, M. Koizumi, E. Toyoda, T. Masui, S. Nakajima, S. Tsuji, J. Ida, K. Fujimoto, M. Wada, R. Doi, M. Imamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 711-717.
- [17] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374-1389.
- [18] a) S. Kostidis, A. Stavrakoudis, N. Biris, D. Tsoukatos, C. Sakarellos, V. Tsikaris, *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 494-509. b) M. Salvati, F. M. Cordero, F. Pisaneschi, F. Melani, P. Gratteri, N. Cini, A. Bottoncetti, A. Brandi, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4262-4271.
- [19] Three additional diastereomers of compound **4a** were prepared and their conformation was studied in water. None of them formed stable intracyclic hydrogen bonds, as judged from the high absolute values of amide NH thermal coefficients; see Supporting Information S20-S21.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online: ((will be filled in by the editorial staff))



## Request for grant of a European patent

<i>For official use only</i>	
1 Application number:	<input type="text" value="MKEY"/>
2 Date of receipt (Rule 35(2) EPC):	<input type="text" value="DREC"/>
3 Date of receipt at EPO (Rule 35(4) EPC):	<input type="text" value="RENA"/>
4 Date of filing:	<input type="text"/>

- 5 Grant of European patent, and examination of the application under Article 94, are hereby requested.

Request for examination in an admissible non-EPO language:

Se solicita el examen de la solicitud según el artículo 94.

- 5.1 The applicant waives his right to be asked whether he wishes to proceed further with the application (Rule 70(2))

Procedural language:

en

Description and/or claims filed in:

en

- 6 Applicant's or representative's reference

P1650EP00

## Applicant 1

7-1 Name: GENETADI Biotech, S.L.

Registration No.: 1.8

8-1 Address: Parque Tecnológico de Bizkala. Edificio 502  
48160 DERIO  
Spain

10-1 State of residence or of principal place of business: Spain

## Representative 1

15-1 Name: ZBM Patents- Zea, Barlocchi & Markvarsdzen

16-1 Address of place of business: Pl. Catalunya, 1  
08002 Barcelona  
Spain

17-1 Telephone:

17-1 Fax:



## Designation of inventor

User reference: P1650EP00  
Application No:

Inventor	Name: FERNÁNDEZ OYÓN, Mr. XABIER Address: José M <sup>a</sup> Soroa, 8, 2 <sup>o</sup> dcha. 20013 DONOSTIA Spain
The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer