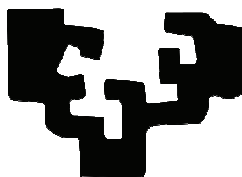


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

---

**Diseño, Síntesis, Caracterización y Evaluación  
Biológica y Conformacional de Peptidomiméticos y  
Depsipeptidomiméticos  $\beta$ -Lactámicos: Una Nueva  
Generación de Inhibidores de la Integrina  $\alpha_v\beta_3$**

---

**TESIS DOCTORAL**

**NEREA ZABALA UNCILLA**

**DONOSTIA, 2016**



La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica 1 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU) bajo la dirección de los Profesores José Ignacio Ganboa Landa y Claudio Palomo Nicolau (ambos Catedráticos de dicha universidad).

La financiación para realizar la investigación se consiguió mediante el proyecto INTEK (IPT-010000-2010-11) del Gobierno Vasco y los proyectos INNPACTO del Ministerio de Industria y energía del Gobierno de España (IG-2012/0000908 y IG-2012/0000310). Entidades a las que se agradece dicha financiación.



## Agradecimientos

En primer lugar quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis Iñaki Ganboa y Claudio Palomo por haberme dado la oportunidad de entrar en su grupo de investigación, por haber confiado en mí y por su dedicación y esfuerzo en mi formación. Así mismo quiero mostrar mi gratitud a todo el personal del Departamento de Orgánica por la ayuda proporcionada durante estos años, en innumerables ocasiones incluso, sin haber sido solicitada.

Labokideei, lankideak baino gehiago lagunak izan direlako eta laborategian nahiz laborategitik kanpo sortutako giroagatik. Erraza izatea lortu dutelako egunero lanera joatea. Familia handi bat sortu dugula iruditzen zait eta gurasoak zein neba-arreba nagusiak izan ditudala, aholkuak eta laguntza eskaintzen eta akatsak zuzentzen, oso handiak izan diren neba-arreba txikiak, eta denbora laburrean egon diren gertuko senideak ere. Mila esker momentu onetan ondoan egoteagatik, baina batez ere, momentu txarretan oraindik gehiago hurbiltzeagatik.

Bilboko lagunei, interesa jartzeagatik, eta nire denbora falta ulertzen saiatzeagatik. Nahiz eta urruti egon hurbil egon direlako.

A mi familia por su apoyo incondicional, y por creer que soy capaz de todo y más; incluso por haber conseguido en alguna ocasión que hasta yo me lo crea.

Y por último a Arnau, por enseñarme que cuando algo te gusta no cuesta trabajo realizarlo. Por darme el empujoncito y las alas necesarias para atreverme con todos mis sueños y por estar a mi lado se cumplan o no.

Mila esker bihotzez, zuen babesak posible bihurtu du lan hau.



## Abreviaturas y acrónimos

En esta Tesis Doctoral se han empleado las abreviaturas y acrónimos recomendados en “*Guidelines for Authors*” (*J. Org. Chem.*, August **2013**).

AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
β-Ala	β-alanina
Arg (R)	arginina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Asp (D)	ácido aspártico
BAIB	bisacetoxyodobenceno
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -butilo
Cbz (Z)	benciloxicarbonilo
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CGH	hibridación genómica comparada
conv.	conversión
COSY	espectroscopía de correlación
DAST	trifluoro de dietilaminoazufre
DIPEA	diisopropil etil amina
DMAP	4-dimetilamino piridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida

EDC·HCl	clorohidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimina
Ent.	entrada
Equiv.	equivalentes
Fmoc	fluorenilmetoxicarbonilo
GFOGER	glicina-fenilalanina-hidroxiprolina-glicina-glutamato-arginina
Gly (G)	glicina
h	hora
HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N'</i> -tetrametiluronio
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxi-1H-benzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HRMS	espectroscopía de masas de alta resolución
HUVEC	células endoteliales de la vena del cordón umbilical
IR	espectroscopía de infrarrojos
LDV	leucina-aspártico-valina
LDT	leucina-aspártico-treonina
MS	masas
Pág.	página
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pd/C	paladio sobre carbono activo
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa



RD	arginina-aspártico
RGD	arginina-glicina-aspártico
RGE	arginina-glicina-glutamato
RMN	resonancia magnética nuclear
Rto.	rendimiento
T	temperatura
t	tiempo
t. a.	temperatura ambiente
TAEA	tris(2-amino-etil)amina
TBDMS	<i>terc</i> -butil dimetil silano
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiridin-1-oxilo
TEA	trietyl amina
TfOH	ácido tríflico
THF	tetrahidrofurano
THHF	hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio
TLC	cromatografía de capa fina
TOF	detector de tiempo de vuelo
TQD	detector de triple cuadrupolo
OBn	benciloxilo
O <sup>t</sup> Bu	<i>terc</i> -butoxilo
UPLC	cromatografía líquida ultrarápida
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial

## Numeración y nomenclatura empleada

Las moléculas presentes en los antecedentes están numeradas empleando números romanos en orden de aparición.

Las moléculas objetivo sintetizadas durante la presente Tesis Doctoral se han numerado empleando números arábigos en orden de aparición. Las moléculas intermedias de las diferentes etapas de síntesis están numeradas mediante dos números separados por un punto: la primera cifra corresponde a la molécula objetivo y la segunda cifra al número de la etapa.

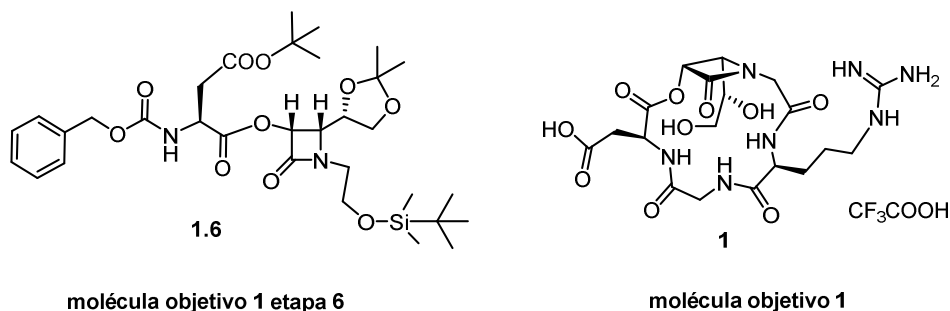
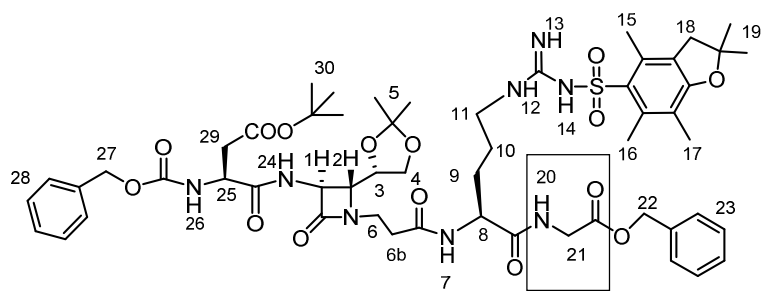


Figura 1. Ejemplo de numeración.

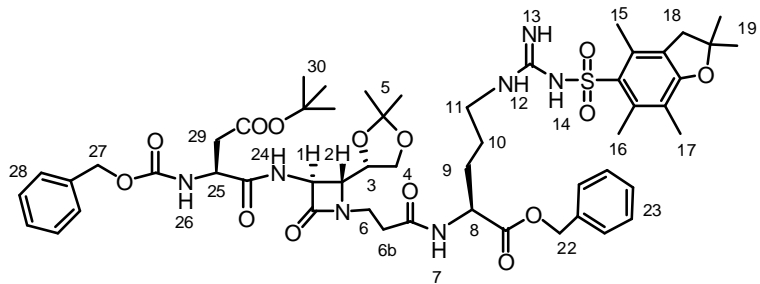
Las moléculas están nombradas según las recomendaciones de las reglas IUPAC, empleando los usos habituales en la nomenclatura de péptidos.

La asignación numérica de los hidrógenos de las diferentes moléculas para su caracterización por  $^1\text{H}$ -RMN sigue un orden arbitrario; comenzando, si la hubiera, por la  $\beta$ -lactama. Con el fin de identificar y comparar mejor las moléculas entre sí, se prescinde de los números que sean precisos, manteniendo la asignación del resto (Figura 2).

Las figuras, tablas, esquemas y citas bibliográficas de la presente memoria siguen una numeración correlativa.



8.11



12.11

**Figura 2.** Ejemplo de la asignación de los hidrógenos. En la molécula **12.11**, al carecer del aminoácido glicina, se ha prescindido de los números 20 y 21 a la hora de asignar los hidrógenos; así la numeración de ambas moléculas es comparable.



# Índice

<b>1. Resumen de la Tesis Doctoral .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>15</b>
2.1. Péptidos y proteínas.....	15
2.2. Los peptidomiméticos .....	17
2.3. La angiogénesis .....	20
2.4. Las integrinas .....	25
2.5. Diseño de inhibidores selectivos de la integrina $\alpha_V\beta_3$ .....	33
2.5.1. Antecedentes en la síntesis de peptidomiméticos RGD .....	35
2.5.1.1. Miméticos abiertos .....	35
2.5.1.2. Miméticos cíclicos .....	36
2.5.2. Antecedentes en la síntesis de ciclopeptidos RGD lactámicos .....	44
2.5.2.1. Separación del grupo de reconocimiento del ciclo que genera la restricción conformacional .....	46
2.5.2.2. Síntesis de ciclopeptidos RGD lactámicos empleando el diseño $\beta$ -LSAD .....	49
<b>3. Objetivos generales .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Capítulo 1: Miméticos cíclicos .....</b>	<b>63</b>
4.1. Objetivos .....	63
4.1.1. Síntesis de miméticos cíclicos de los ligando naturales de la integrina $\alpha_V\beta_3$ .....	63
4.1.1.1. Depsipeptido <b>1</b> .....	63
4.1.1.2. Tetrapeptidomiméticos <b>2</b> y <b>3</b> .....	63
4.1.1.3. Miméticos a partir de <i>trans</i> -lactamas <b>4</b> , <b>5</b> y <b>6</b> .....	64
4.1.1.4. Incremento en la flexibilidad de los ciclos <b>7–14</b> .....	65
4.1.2. Evaluación biológica .....	68
4.1.3. Estudio conformacional .....	68
4.2. Resultados y discusión del capítulo <b>1</b> .....	71

4.2.1. Plan de síntesis .....	71
4.2.1.1. Retrosíntesis .....	71
4.2.1.2. Grupos protectores, reactivos y condiciones .....	74
4.2.1.3. Inductores quirales .....	77
4.2.2. Síntesis de miméticos cíclicos de los ligandos naturales de la integrina $\alpha_v\beta_3$ .....	82
4.2.2.1. Depsipentapéptido <b>1</b> .....	82
4.2.2.1.1. Síntesis de la <i>cis</i> -3-hidroxi- $\beta$ -lactama <b>1.5</b> .....	83
4.2.2.1.2. Acoplamiento de la $\beta$ -lactama <b>1.5</b> con el ácido aspártico .....	87
4.2.2.1.3. Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol .....	91
4.2.2.1.4. Acoplamiento del compuesto <b>1.8</b> con el dipéptido arginina- glicina .....	94
4.2.2.1.5. Desprotección y ciclación .....	99
4.2.2.1.6. Desprotección exhaustiva del compuesto <b>1.13</b> .....	109
4.2.2.2. Síntesis de los tetrapeptidomiméticos <b>2</b> y <b>3</b> .....	112
4.2.2.2.1. Tetrapéptido <b>2</b> .....	112
4.2.2.2.1.1. Síntesis de la <i>cis</i> -3-amino- $\beta$ -lactama <b>2.5</b> .....	112
4.2.2.2.1.2. Acoplamiento de la $\beta$ -lactama <b>2.5</b> con el ácido aspártico .....	115
4.2.2.2.1.3. Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol .....	117
4.2.2.2.1.4. Acoplamiento del compuesto <b>2.8</b> con la arginina .....	118
4.2.2.2.1.5. Desprotección e intentos de ciclación .....	121
4.2.2.2.2. Tetradepsipéptido <b>3</b> .....	122
4.2.2.2.2.1. Acoplamiento del compuesto <b>1.8</b> con la arginina .....	122
4.2.2.2.2.2. Desprotección e intentos de ciclación .....	124
4.2.2.3. Síntesis de los miméticos <i>trans</i> <b>4</b> , <b>5</b> y <b>6</b> .....	125
4.2.2.3.1. Tetrapéptido <b>4</b> .....	126
4.2.2.3.1.1. Síntesis de la <i>trans</i> -3-amino- $\beta$ -lactama <b>4.5</b> .....	126

4.2.2.3.1.2.	Síntesis del tetrapéptido <b>4.11</b> e intentos de ciclación .....	130
4.2.2.3.2.	Depsipéptidos <b>5</b> y <b>6</b> .....	133
4.2.2.3.2.1.	Síntesis de la <i>trans</i> -3-hidroxi- $\beta$ -lactama <b>5.5</b> .....	133
4.2.2.4.	Miméticos de mayor flexibilidad <b>7–14</b> .....	136
4.2.2.4.1.	Estudios teóricos sobre la flexibilidad .....	138
4.2.2.4.2.	Péptidos <i>cis</i> <b>7</b> y <b>11</b> .....	141
4.2.2.4.2.1.	Síntesis de la <i>cis</i> -3-amino- $\beta$ -lactama <b>7.5</b> .....	141
4.2.2.4.2.2.	Síntesis total del pentapéptido <b>7</b> .....	143
4.2.2.4.2.3.	Síntesis del tetrapéptido <b>11.11</b> e intentos de ciclación .....	148
4.2.2.4.3.	Depsipeptidos <i>cis</i> <b>9</b> y <b>13</b> .....	150
4.2.2.4.3.1.	Síntesis de la <i>cis</i> -3-hidroxi- $\beta$ -lactama <b>9.5</b> .....	150
4.2.2.4.3.2.	Síntesis total del pentadepsipéptido <b>9</b> .....	153
4.2.2.4.3.3.	Síntesis del tetradepsipéptido <b>13.11</b> e intentos de ciclación .....	158
4.2.2.4.4.	Péptidos <i>trans</i> <b>8</b> y <b>12</b> .....	160
4.2.2.4.4.1.	Síntesis de la <i>trans</i> -3-amino- $\beta$ -lactama <b>8.5</b> .....	160
4.2.2.4.4.2.	Síntesis del pentapéptido <b>8.11</b> e intentos de ciclación.....	163
4.2.2.4.4.3.	Síntesis del tetrapéptido <b>12.11</b> e intentos de ciclación.....	166
4.2.3.	Análisis de los resultados sintéticos alcanzados y planteamiento de objetivos secundarios .....	169
4.2.3.1.	Pentapéptido cíclico <b>8</b> .....	170
4.2.3.2.	Tetrapéptidos y tetradepsipéptidos .....	172
4.2.3.2.1.	Síntesis de tetrapéptidos con dos sustituyentes metilo <b>15</b> .....	173
4.2.3.2.1.1.	Síntesis de la $\beta$ -lactama <b>15.5</b> .....	173
4.2.3.2.1.2.	Síntesis del tetradepsipéptido <b>15.11</b> e intentos de ciclación .....	177

4.2.3.3.	Objetivos secundarios surgidos durante la realización del proyecto.....	179
4.2.3.3.1.	Depsipéptido <b>16</b> .....	179
4.2.3.3.1.1.	Retrosíntesis.....	179
4.2.3.3.1.2.	Síntesis del pentadepsipéptido <b>16.11</b> e intentos de ciclación .....	181
4.2.3.3.2.	Control negativo .....	187
4.2.3.3.2.1.	Síntesis de las moléculas utilizadas como control negativo .....	189
4.2.4.	Evaluación de la actividad biológica .....	192
4.2.4.1.	Evaluación del nivel de adhesión, determinación de la afinidad .....	192
4.2.4.1.1.	Evaluación del nivel de adhesión de los ciclos <b>1, 7 y 9</b> .....	193
4.2.4.2.	Evaluación de la expresión génica, determinación de la eficacia .....	197
4.2.4.2.1.	Evaluación de la expresión génica de los ciclos <b>1, 7 y 9</b> y moléculas de control negativo <b>17 y 18</b> .....	204
4.2.4.2.2.	Comprobación de los resultados mediante qRT-PCR .....	207
4.2.4.2.3.	Supervivencia de las células .....	208
4.2.5.	Análisis conformacional de las moléculas conseguidas .....	209
4.2.5.1.	Deriva térmica, enlaces de hidrógeno.....	209
4.2.5.2.	Modelización de las estructuras .....	211
4.2.5.3.	Modelización de la interacción RGD/Integrina $\alpha_v\beta_3$ ( <i>Docking</i> ) ....	214
4.2.6.	Comparación entre los análisis biológicos teóricos y experimentales ...	221
4.2.7.	Nuevos Objetivos .....	222
<b>5.</b>	<b>Capítulo 2: miméticos de cadena abierta .....</b>	<b>227</b>
5.1.	Introducción .....	227
5.2.	Objetivos del capítulo 2 .....	231
5.2.1.	Síntesis de miméticos de cadena abierta de los ligandos naturales de la integrina $\alpha_v\beta_3$ .....	231



5.2.2. Evaluación biológica .....	231
5.2.3. Estudio conformacional .....	231
5.3. Resultados y discusión .....	237
5.3.1. Plan de síntesis .....	237
5.3.2. Síntesis de los miméticos de cadena abierta .....	238
5.3.2.1. Síntesis de los precursores lineales <b>22.11</b> y <b>23.11</b> .....	238
5.3.2.2. Obtención de los péptidos de cadena abierta <b>20</b> , <b>22</b> , <b>23</b> y <b>25</b> .....	241
5.3.2.3. Obtención de los depsipéptidos de cadena abierta <b>19</b> , <b>21</b> , <b>24</b> y <b>26</b> .....	247
5.3.2.3.1. Cambio de ruta sintética del depsipéptido <b>24</b> .....	247
5.3.2.3.2. Grupos protectores Fmoc y <i>terc</i> -butilo .....	248
5.3.2.3.3. Grupos protectores Boc y <i>terc</i> -butilo.....	254
5.3.2.3.4. Obtención de los depsipéptidos de cadena abierta <b>19</b> , <b>21</b> y <b>26</b> .....	259
5.3.3. Evaluación de la actividad biológica .....	268
5.3.3.1. Evaluación del nivel de adhesión .....	268
5.3.3.2. Evaluación de la expresión génica de los compuestos de cadena abierta .....	273
5.3.3.3. Comprobación de los resultados mediante qRT-PCR .....	275
5.3.3.4. Supervivencia de las células .....	277
5.3.4. Análisis conformacional de las moléculas de cadena abierta .....	237
5.3.4.1. Deriva térmica, enlaces de hidrógeno y modelización de las estructuras .....	277
5.3.4.2. Modelización de la interacción ligando/Integrina $\alpha_v\beta_3$ ( <i>Docking</i> ) .....	278
5.3.5. Comparación entre los análisis biológicos teóricos y experimentales ...	280
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>285</b>
<b>7. Procedimiento experimental .....</b>	<b>289</b>
7.1. Materiales, métodos generales y técnicas empleadas .....	289
7.1.1. Materiales .....	289

7.1.2.	Métodos generales .....	290
7.1.2.1.	Condiciones de reacción .....	290
7.1.2.2.	Seguimiento de las reacciones .....	290
7.1.2.3.	Purificación de los productos .....	290
7.1.3.	Técnicas empleadas .....	291
7.1.3.1.	Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	291
7.1.4.	Polarimetría, puntos de fusión, IR y pesada .....	292
7.1.4.1.	Masa y pureza de los compuestos .....	292
7.2.	Síntesis experimental .....	293
7.2.1.	Síntesis de las estructuras de partida ( <i>building blocks</i> ) .....	293
7.2.1.1.	Síntesis de las $\beta$ -lactamas <b>2.4</b> , <b>7.4</b> , <b>1.4</b> , <b>9.4</b> , <b>15.4</b> mediante la reacción de Staudinger .....	293
7.2.1.2.	Desprotección del grupo ftaloilo en las $\beta$ -lactamas <b>2.4</b> y <b>7.4</b> .....	298
7.2.1.3.	Desprotección del grupo benciloxilo en las $\beta$ -lactamas <b>1.4</b> , <b>9.4</b> y <b>15.4</b> .....	299
7.2.1.4.	Inversión de la configuración de las $\beta$ -lactamas <b>1.5</b> y <b>9.5</b> .....	301
7.2.1.4.1.	Nosilación de las $\beta$ -lactamas <b>1.5</b> y <b>9.5</b> .....	301
7.2.1.4.2.	Introducción del grupo azida e inversión de configuración en las $\beta$ -lactamas <b>4.5.Int1</b> y <b>8.5.Int1</b> .....	303
7.2.1.4.3.	Reducción del grupo azida a amina en las $\beta$ -lactamas <b>4.5</b> y <b>8.5</b> .....	304
7.2.1.5.	Acoplamiento peptídico para la preparación de los dímeros arginina-glicina <b>1.10</b> y <b>24.10</b> .....	306
7.2.1.6.	Preparación del éster bencílico de la arginina <b>2.10</b> .....	308
7.2.1.7.	Preparación del hidroxiaácido derivado del ácido aspártico .....	309
7.2.2.	Acoplamiento entre las HO- y NH <sub>2</sub> - $\beta$ -lactamas y el aspártico .....	310
7.2.2.1.	Acoplamiento entre las 3-amino- $\beta$ -lactamas <b>2.5</b> , <b>4.5</b> , <b>7.5</b> y <b>8.5</b> y el ácido aspártico .....	310
7.2.2.2.	Acoplamiento entre la $\beta$ -lactama <b>4.5</b> y el hidroxiaácido de ácido aspártico .....	313

7.2.2.3.	Acoplamiento entre las 3-hidroxi- $\beta$ -lactamas <b>1.5</b> , <b>9.5</b> y <b>15.5</b> y los derivados del ácido aspártico .....	314
7.2.3.	Acoplamiento entre la glicina y el HO-Asp-NH <sub>2</sub> - $\beta$ -lactama <b>16.6.int2</b> .....	318
7.2.4.	Preparación de las carboxi $\beta$ -lactamas <b>2.7</b> , <b>4.7</b> , <b>7.7</b> , <b>8.7</b> , <b>1.7</b> , <b>9.7</b> , <b>15.7</b> , <b>19.7a</b> , <b>19.7b</b> , <b>21.7</b> y <b>16.7</b> .....	319
7.2.4.1.	Desprotección del grupo sililo y obtención del alcohol l.....	319
7.2.4.1.1.	Desprotección del grupo sililo de las Cbz-Asp(tBu)-NH- $\beta$ -lactamas <b>2.6</b> , <b>4.6</b> , <b>7.6</b> y <b>8.6</b> .....	319
7.2.4.1.2.	Desprotección del grupo sililo de las GP-Asp(tBu)-O- $\beta$ -lactamas <b>1.6</b> , <b>9.6</b> , <b>15.6</b> , <b>24.6a</b> , <b>24.6b</b> y <b>21.6</b> .....	322
7.2.4.1.3.	Desprotección del grupo sililo de la Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH- $\beta$ -lactama <b>16.6</b> .....	326
7.2.4.2.	Oxidación y obtención del ácido carboxílico .....	327
7.2.4.2.1.	Oxidación de las Cbz-Asp(tBu)-NH- $\beta$ -lactamas-OH <b>2.7</b> , <b>4.7</b> , <b>7.7</b> y <b>8.7</b> .....	327
7.2.4.2.2.	Oxidación de las GP-Asp(tBu)-O- $\beta$ -lactamas-OH <b>1.7</b> , <b>9.7</b> , <b>24.7a</b> , <b>24.7b</b> y <b>21.7</b> .....	329
7.2.4.2.3.	Oxidación de la Cbz-Asp(tBu)-NH- $\beta$ -lactama-OH <b>15.7</b> .....	332
7.2.4.2.4.	Oxidación de la Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH- $\beta$ -lactama-OH <b>16.7</b> .....	333
7.2.5.	Preparación de los precursores lineales .....	334
7.2.5.1.	Preparación de los tetrapéptidos <b>2.11</b> , <b>4.11</b> , <b>11.11</b> y <b>12.11</b> .....	334
7.2.5.2.	Preparación de los tetradepsipéptidos <b>3.11</b> , <b>13.11</b> , <b>19.11</b> y <b>21.11</b> .....	338
7.2.5.3.	Preparación del tetradepsipéptido <b>15.11</b> .....	341
7.2.5.4.	Preparación de los pentapéptidos <b>22.11</b> , <b>23.11</b> , <b>7.11</b> y <b>8.11</b> .....	343
7.2.5.5.	Preparación de los pentadesipéptidos <b>1.11</b> , <b>9.11</b> , <b>24.11a</b> , <b>24.11b</b> y <b>26.11</b> .....	346
7.2.5.6.	Preparación del pentadesipéptido <b>16.11</b> .....	351
7.2.6.	Ciclación de los precursores lineales <b>7.11</b> , <b>1.11</b> y <b>9.11</b> .....	352

7.2.7.	Desprotección completa de los ciclos y de los compuestos de cadena abierta .....	355
7.2.7.1.	Desprotección de los ciclos <b>7.13</b> , <b>1.13</b> y <b>9.13</b> .....	355
7.2.7.2.	Desprotección de los péptidos de cadena abierta .....	358
7.2.7.2.1.	Desprotección de los tetrapéptidos de cadena abierta <b>2.11</b> , <b>4.11</b> y <b>11.11</b> .....	358
7.2.7.2.2.	Desprotección de los pentapéptidos de cadena abierta <b>22.11</b> , <b>23.11</b> , <b>7.11</b> .....	361
7.2.7.3.	Desprotección de los depsi péptidos de cadena abierta .....	363
7.2.7.3.1.	Desprotección de los tetradepsi péptidos de cadena abierta <b>19.11</b> y <b>21.11</b> .....	363
7.2.7.3.2.	Desprotección de los pentadepsi péptidos de cadena abierta <b>24.11</b> y <b>26.11</b> .....	365
<b>8.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>369</b>
8.1.	Espectros de <sup>1</sup> H-RMN, <sup>13</sup> C-RMN, COSY y HSQC de los compuestos sintetizados .....	369
8.2.	Efectos de la concentración de los compuestos en los espectros de <sup>1</sup> H-RMN .....	495
8.3.	UPLC-MS.....	497
8.3.1.	UPLC-MS del producto <b>1.13b</b> .....	497
8.3.2.	UPLC-MS de la hidrogenación del compuesto <b>1.11</b> .....	498
8.3.3.	UPLC-MS de los productos finales .....	503
8.4.	Datos de los resultados génicos .....	508
8.5.	Datos de los resultados conformacionales .....	509
8.5.1.	Derivas térmicas de los compuestos cíclicos .....	509
8.5.2.	Derivas térmicas de los compuestos de cadena abierta más activos .....	512
8.5.3.	Distribución de <i>clusters</i> del <i>docking</i> en compuestos de cadena abierta .....	517

## ***RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL***

---



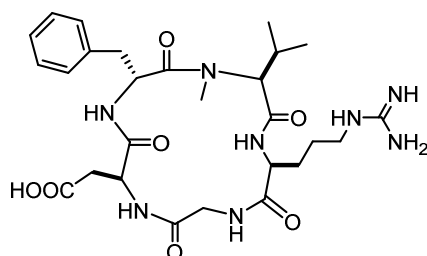
## 1. Resumen de la Tesis Doctoral

En la presente Tesis Doctoral se describe el diseño, la síntesis, la caracterización y la evaluación biológica de peptidomiméticos antiangiogénicos inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

La angiogénesis, que consiste en la generación de nuevos capilares sanguíneos a partir de preexistentes, es uno de los mecanismos bioquímicos que los tumores utilizan para aumentar su flujo de nutrientes e introducirse en el torrente sanguíneo. La integrina  $\alpha_v\beta_3$  es una proteína que participa en este proceso desencadenando la cascada de señales que activa el mecanismo bioquímico.

Bloqueando la interacción del ligando natural (vitronectina) con el receptor de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  se podría controlar el proceso de angiogénesis inhibiendo de esa manera el crecimiento de los tumores y evitando la metástasis.

En este campo, se han preparado múltiples inhibidores de integrina, la mayor parte conteniendo la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) en su estructura; una unidad de reconocimiento común a la mayoría de receptores de integrinas. De los péptidos sintetizados uno de los más selectivos y activos es el EMD 121974, un ciclopentapeptidomimético patentado por Merck:

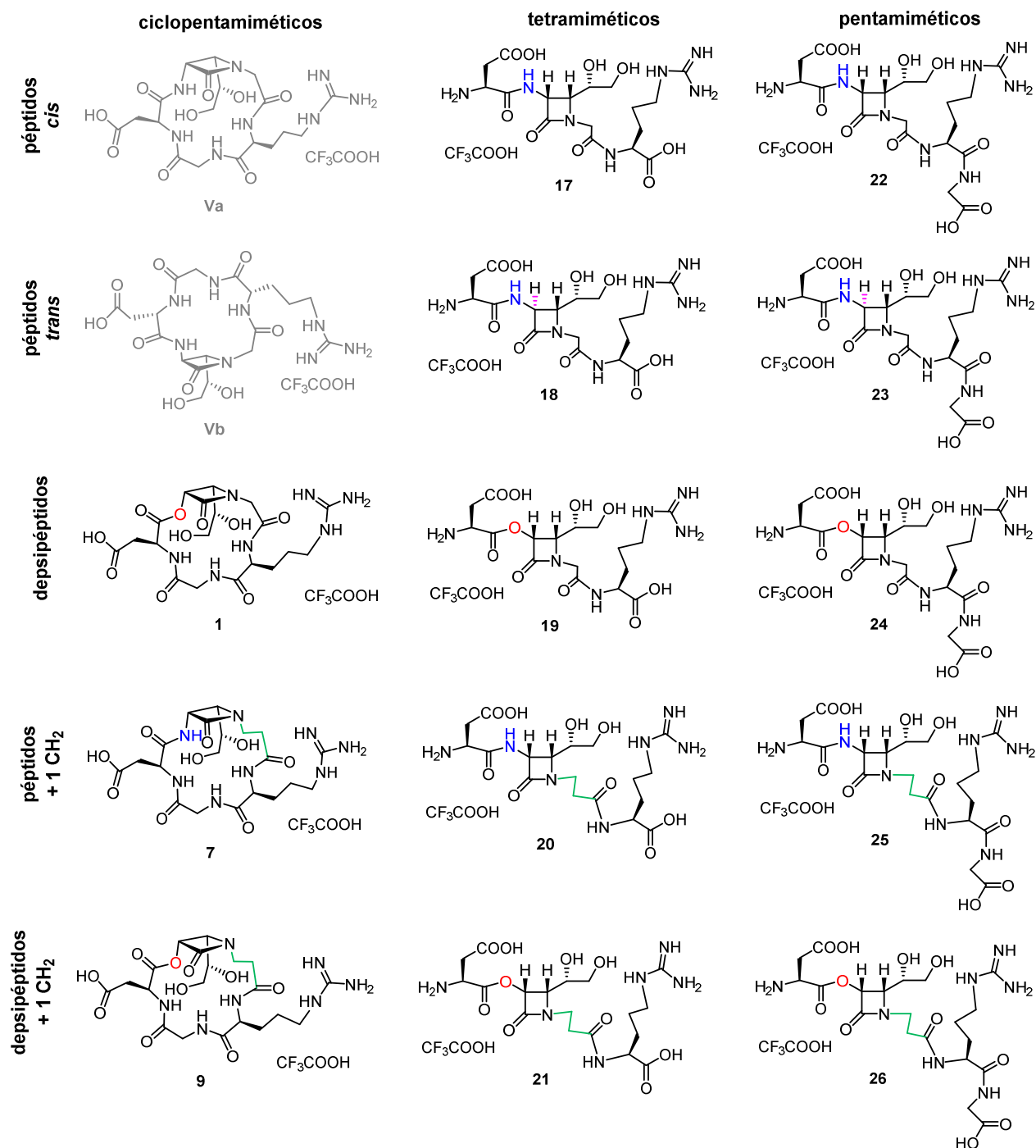


**Figura 3.** EMD 121974 (Cilengitide®).

Por ello, nos hemos basado en este tipo de estructuras a la hora de diseñar nuevos inhibidores, concluyendo el trabajo experimental con la síntesis de peptidomiméticos y depsipeptidomiméticos tanto cíclicos como acíclicos (*Tabla 1*).

La evaluación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante un experimento de array de CGH, un procedimiento que a diferencia del clásico test de adhesión nos permite evaluar la expresión génica, y así, el efecto de los compuestos en el interior del núcleo de las células.

**Tabla 1.** Resumen de los peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos sintetizados.





## ***INTRODUCCIÓN***

---



## 2. Introducción

### 2.1. Péptidos y proteínas

Los péptidos y proteínas<sup>1</sup> están formados por cadenas de aminoácidos unidos mediante enlaces amida denominados enlaces peptídicos. Estas moléculas son de vital importancia en los organismos vivos ya que cumplen múltiples funciones biológicas. Una cadena formada por un elevado número de aminoácidos (más de cien unidades) da lugar a una proteína y las funciones biológicas que desempeñan son: transporte y almacenamiento de moléculas pequeñas, organización estructural de células y tejidos, catálisis enzimática, respuesta inmunitaria...

Los péptidos, en cambio, son cadenas de menos de cien unidades de aminoácidos, y actúan en su mayoría como neuromoduladores, hormonas y neurotransmisores; siendo el principal medio de comunicación intercelular en numerosos sistemas biológicos.<sup>2</sup>

En un organismo complejo, como es el nuestro, las células necesitan comunicarse con su entorno y con otras células; en ese proceso están implicados ambos tipos de cadenas ya que numerosas respuestas orgánicas comienzan por una **interacción péptido-proteína**, o proteína-proteína. La interacción de los péptidos con **receptores**<sup>3</sup> proteicos, relacionada con diferentes patologías y funciones vitales, convierte a estas macromoléculas en un objetivo interesante para la investigación farmacéutica.<sup>4</sup> En los últimos años se han realizado avances notables y se ha dado a conocer que esta comunicación, y por lo tanto, la regulación de infinidad de procesos, funciona a nivel molecular. Por ello, para conocer los procesos biológicos, es

---

<sup>1</sup> Más información básica sobre la estructura, funciones e importancia de los péptidos y las proteínas: a) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular*; Paramericana, **2006**. b) Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Principios de la Bioquímica*; Lehninger, **2005**. c) Mathews, C. K.; Van Hole, K. E.; *Bioquímica*; McGraw-Hill, **1998**.

<sup>2</sup> a) Swanson, H. H.; Baskys, A.; Remington, G.; *Brain Mechanisms Phychotropic Drugs*; CRC Press, Boca Raton, **1996**, 131–150. b) Dicou, E.; *FEBS J.* **2008**, 275, 1960–1975.

<sup>3</sup> Repaso histórico sobre el concepto “receptor”: Maehle, A. H.; *Endeavour* **2006**, 33, 135–140.

<sup>4</sup> a) Gubernator, K.; Böhm, H. J.; *Structure-Based Ligand Design*; Wiley-VCH: Weinheim, **1998**. b) Veerapandian, P.; *Structure-Based Drug Design*; Marcel Dekker: New York, **1997**. c) Wermuth, C. G.; *The Practice of Medical Chemistry*; Academic Press: London, **1996**. d) Bedell, C. R.; *The Design of Drugs to Macromolecular Targets*, Wiley-VCH, Chichester, **1992**. e) Babine, R. E.; Bender, S. L.; *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359–1472.

imprescindible entender la estructura y el modo de interaccionar de las moléculas que toman parte en ellos.

La estructura primaria de los péptidos, es decir, la secuencia lineal de aminoácidos que la compone, es la que determina las propiedades biológicas. Pero, en contraste con el reconocimiento de ADN, son las cadenas laterales de los diferentes péptidos las responsables del **reconocimiento** con los receptores. Esto no se produce de cualquier manera, la interacción entre el receptor y el ligando depende de las estructuras secundaria y terciaria, que determinan la disposición espacial tridimensional que adoptan el péptido y la proteína, es decir, su **conformación**. La estructura primaria determinará la forma en la que se plegará la cadena peptídica; las interacciones repulsivas y atractivas de las cadenas laterales y del entorno en el que este se encuentra juegan un papel importante, siendo decisivos los posibles **enlaces de hidrógeno** (inter- e intramoleculares).

El enlace peptídico es planar, pero gracias a la rotación libre alrededor de los enlaces, los péptidos pueden adoptar un gran número de conformaciones; sin embargo, adoptarán la termodinámicamente más estable según el postulado de Anfinsen, “Hipótesis Termodinámica”,<sup>5</sup> minimizando el impedimento estérico de las cadenas laterales de los residuos.

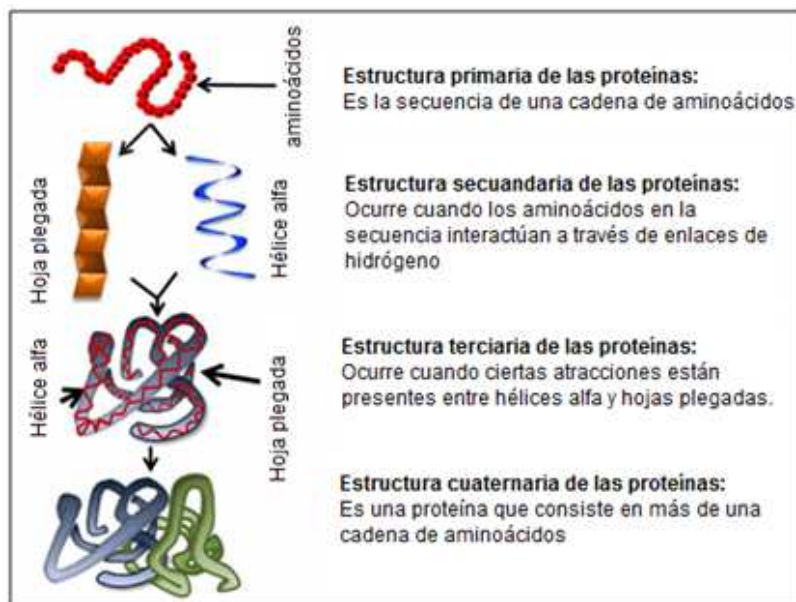


Figura 4. Estructura de las proteínas.

<sup>5</sup> Para conocer la “Hipótesis Termodinámica” véase: Anfinsen, C. B.; *Science* **1973**, *181*, 223–230.

Cabe mencionar que el orden en el que están dispuestos los aminoácidos es tan importante como el orden de las letras para formar palabras, y que cada combinación codifica un mensaje único. Así, con tan solo tres aminoácidos diferentes se podrían formar 6 cadenas con 6 mensajes distintos. Hay que añadir también, que existen 20 aminoácidos distintos que el organismo emplea para crear cadenas peptídicas de hasta varios miles de aminoácidos, siendo infinita la cantidad de estructuras disponibles.

A decir verdad, en muchas ocasiones, únicamente uno o varios segmentos de residuos de una estructura secundaria son los responsables de la actividad biológica; ya que son ellos los que proporcionan la disposición espacial idónea para interactuar con el receptor. Estas unidades se conocen como **farmacóforos**.

Gracias a los grandes avances tecnológicos de las últimas décadas, tanto en el área de la medicina y de la biología, como en el de la química sintética y analítica (RMN, rayos X...); hoy por hoy, se conoce la secuencia y conformación bioactiva de cientos de péptidos naturales. Sin embargo, desde la década de 1960 el empleo de productos naturales como agentes terapéuticos ha sufrido un gran declive ya que su obtención es lenta, cara e ineficiente. Hay que tener en cuenta que estos péptidos naturales se encuentran en pequeñas cantidades y hay que aislarlos, purificarlos y elucidar sus estructuras. Además su uso está muy restringido ya que los péptidos naturales presentan los siguientes problemas: baja estabilidad metabólica, consecuencia de la rápida degradación por las peptidasas; escasa biodisponibilidad oral, debido al alto peso molecular que presentan frecuentemente; y una excesiva flexibilidad conformacional, que disminuye su selectividad frente a un solo receptor. Con el fin de subsanar estos problemas descritos nace el concepto de “**peptidomimético**”.<sup>6</sup>

## 2.2. Los peptidomiméticos

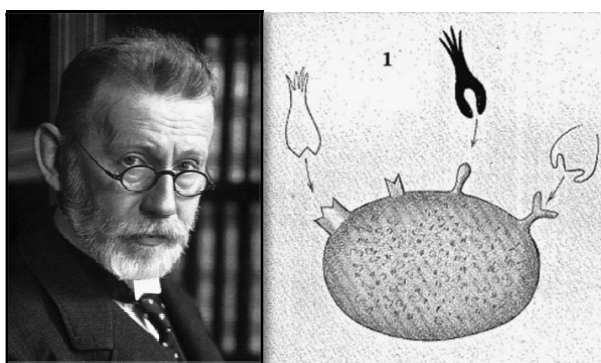
Los peptidomiméticos son sustancias que presentan sustituyentes de naturaleza y disposición espacial análogas al farmacóforo del péptido natural al que imitan, lo cual les permite interactuar con el centro activo del receptor diana (o enzima) desplazando al ligando natural o a las moléculas de disolvente del medio. Para que este complejo ligando/receptor se cree y su efecto sea eficaz, la energía de

---

<sup>6</sup> a) Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C.; *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*; Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*; Workbench Edition: New York, **2004**. b) Giannis, A.; Kolter T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244–1267.

interacción entre ellos tiene que ser elevada y superior a la del ligando natural; siendo las interacciones ligando/receptor más comunes: las atracciones hidrofóbicas, las atracciones de transferencia de carga entre grupos electrodonadores y aceptores, y sobre todo, los enlaces de hidrógeno; aunque en menor medida también pueden aparecer interacciones por enlaces iónicos (en compuestos ionizables) y enlaces covalentes.

Como ya se ha explicado estas interacciones ocurren en tres dimensiones, habiendo una muy estrecha relación entre la estructura del mimético y su actividad. Una metáfora muy visual que puede ayudar a entender esta relación es la interacción entre una cerradura (receptor) y la llave (ligando), propuesta por Ehrlich ya en 1913,<sup>7</sup> en donde solo la llave con una estructura tridimensional concreta pone en marcha un mecanismo.



**Figura 5.** Paul Ehrlich (1854-1915). Teoría de la cadena lateral, interacción llave/cerradura.

Como resultado de esta capacidad de unión, es decir de esta **afinidad**, y explicado muy brevemente, los efectos del ligando natural pueden ser reducidos o anulados (**antagonista**/inhibidor), si el ligando sintético interacciona con el receptor pero no desencadena el proceso en cuestión o lo hace en menor medida; o por el contrario igualados o multiplicados (**agonista**), si el ligando sintético demuestra el mismo comportamiento que el ligando natural o sus efectos son más potentes. A esta propiedad se le denomina **eficacia**.<sup>8</sup>

Los peptidomiméticos se preparan generalmente manteniendo las características químicas de la secuencia activa del péptido natural, es decir, el farmacóforo, y alterando su entorno a través de aminoácidos o enlaces amídicos modificados (pseudopéptidos) o introduciendo otro tipo de enlaces no amídicos, como

---

<sup>7</sup> Ehrlich, P.; *Lancet* **1913**, *ii*, 445–451.

<sup>8</sup> Para saber más sobre las propiedades y funciones biológicas de los fármacos o compuestos véase: Kenakin, T.; Williams, M.; *Biochem. Pharm.* **2014**, *87*, 40–63.

por ejemplo, un enlace éster (depsipéptidos), o heterociclos como lactamas o espirolactamas de diversos tamaños. Incluso pueden llegar a carecer de cualquier estructura peptídica.

Una de las estrategias más eficaces para conocer cuál es la estructura bioactiva del farmacóforo es sintetizar pequeñas secuencias peptídicas que aparezcan en los ligandos naturales y comparar su afinidad con el receptor en cuestión.<sup>9</sup> A continuación se suelen realizar dos tipos de estudios diferentes; el primero de ellos es el llamado “*Ala scan*”; en donde se intercambian los aminoácidos de la secuencia seleccionada por el aminoácido alanina y se estudia el efecto que produce en la actividad, dándonos información sobre la importancia de la existencia del aminoácido sustituido.<sup>10</sup> El segundo estudio se conoce como “*D-scan*” y consiste en el intercambio sucesivo de los diferentes aminoácidos por sus enantiómeros *D*, este experimento ayuda a identificar los giros posibles y proporciona información sobre la conformación bioactiva.

Como se comentará más adelante, estas alteraciones, pueden otorgar a los nuevos péptidos propiedades adecuadas para su uso farmacológico. Variando el entorno del farmacóforo se podrían lograr, por ejemplo, moléculas con mayor estabilidad, solubilidad y simpleza estructural. Además también se pueden optimizar las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y aumentar la selectividad y especificidad péptido/receptor gracias a la reducción de la libertad conformacional respecto del péptido natural del que derivan; minimizando las interacciones con otros receptores y evitando así efectos secundarios no deseados y disminuyendo la toxicidad. Se podría llegar incluso a conseguir un peptidomimético selectivo no solo para un tipo de receptor, si no que también sea selectivo frente a los diferentes subgrupos de un mismo tipo de receptor.<sup>11</sup>

Por estas razones no es de extrañar que durante las dos últimas décadas, los peptidomiméticos hayan ido adquiriendo mayor protagonismo en el diseño de fármacos ya que permiten solucionar los problemas mencionados que muestran los

---

<sup>9</sup> a) Li, R. H.; Hoess, R. H.; Bennett J. S.; DeGrado, W. F.; *Protein Eng.* **2003**, *16*, 65–72. b) Dubree N. J. P.; Artis, D. R.; Castanedo, G.; Marsters, J.; Sutherlin, D.; Caris, L.; Clark, K.; Keating, S. M.; Beresini, M. H.; Chiu, H.; Fong, S.; Lowman, H. B.; Skelton, N. J.; Jackson, D. Y.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3451–3457.

<sup>10</sup> a) Bier, C.; Knauer, S. K.; Klapthor, A.; Schweitzer, A.; Reikik, A.; Krämer, O. H.; Marschalek, R.; Stauber, R. H.; *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3007–3017. b) DuVigneud, V.; Denning, G. S. Jr.; Drabarek, S.; Chan, W. Y.; *J. Biol. Chem.* **1964**, *238*, 472–478.

<sup>11</sup>a) Guerrini, R.; Salvadori, S.; Rizzi, A.; Regoli, D.; Calo, G.; *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 751–777. b) Rothmund, S.; Beyermann, M.; Krause, E.; Krause G.; Bienert, M.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D.; Sonnichsen, F. D.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 12954–12962.

péptidos naturales. Cabe mencionar que hoy en día se pueden encontrar numerosas librerías de peptidomiméticos compuestas por más 10.000.000 de miméticos.<sup>12</sup>

Por otro lado, estos compuestos son también interesantes porque proporcionan información acerca de la conformación bioactiva tanto del péptido natural (ligando) como de su receptor.<sup>13</sup>

La presente Tesis Doctoral se centra en crear peptidomiméticos activos que actúen bloqueando la angiogénesis en tumores cancerosos desplazando al ligando natural que inicia el proceso.

Para realizar un diseño lógico de estos miméticos en primer lugar hay que entender y conocer el proceso que se pretende bloquear y estudiar el entorno donde ocurre. En los próximos apartados se describe el proceso de angiogénesis y los mecanismos que lo activan.

### 2.3. La angiogénesis

El **cáncer** es una de las enfermedades más temidas hoy en día; según la Organización Mundial de la Salud afecta a 1 de cada 3 personas y causó una cuarta parte de las muertes en el primer mundo en el año 2000.

El cáncer surge cuando las células sanas pierden el control en la regulación del crecimiento y multiplicación. Hay más de 200 variantes de cánceres producto de los diferentes defectos de las distintas células y por ello los tratamientos contra esta enfermedad no actúan igual en todos los casos. Las estructuras y funciones de los diferentes tumores varían incluso de una localización a otra dentro de un mismo cuerpo y lo que es aún más destacable es que evolucionan con el tiempo. Aunque sí que hay un elemento común en todos ellos, las células de todo tipo de cáncer necesitan alimentarse.

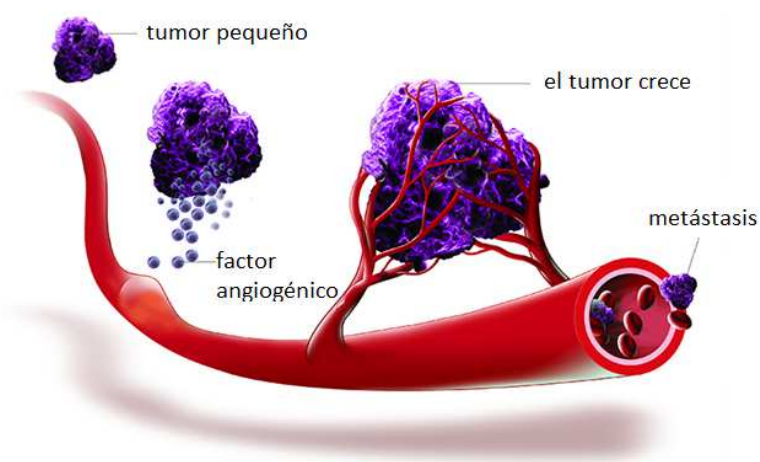
---

<sup>12</sup> Algunos ejemplos de librerías de peptidomiméticos: a) Houghten, R. A.; Dooley, C. T.; Appel, J. R.; *AAPS J.* **2006**, *8*, 371–382. b) Gilleron, P.; Millet, R.; Houssin, R.; Wlodarczyk, N.; Farce, A.; Lemoine, A.; Goossens, J. F.; Chavatte, P.; Pommery, N.; Hénichart, J. P.; *Eur. J. Med. chem.* **2006**, *41*, 745–755. c) Lam, K.S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, Y. J.; Kazmierski, W. M.; Knopp, R. J.; *Nature* **1991**, *354*, 82–84. d) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Dooley, C. T.; Appel, J. R.; Cuervo, J. H.; *Nature* **1991**, *354*, 84–86.

<sup>13</sup> a) Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R.; Achilefu, S.; *Chem. Biol. & Drug Des.* **2007**, *69*, 163–169. b) Marshall, G. R.; *Biopolymers* **2001**, *60*, 246–277.



Cuando un tumor crece, sus células requieren un incremento de aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, oxígeno y factores de crecimiento para seguir multiplicándose. Esto significa que el tumor necesita un **incremento de riego sanguíneo**. Cuando un tumor aumenta en tamaño, las células más alejadas del torrente sanguíneo no pueden hacerse con estos recursos y comienza el estado de hipoxia; entonces, las células cancerígenas liberan **factores de crecimiento endoteliales (VEGF)** (entre otros factores) que interactúan con los receptores de las células endoteliales de las arterias cercanas, aumentando la permeabilidad y estimulando la división celular, de esta manera; se crean nuevos capilares y ramificaciones. A este proceso se le denomina **angiogénesis**.<sup>14</sup>



**Figura 6.** Representación de la angiogénesis.

Resumido brevemente, la angiogénesis<sup>15</sup> consiste en la creación natural de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes; remodelándose y creando redes complejas partiendo de las originales.

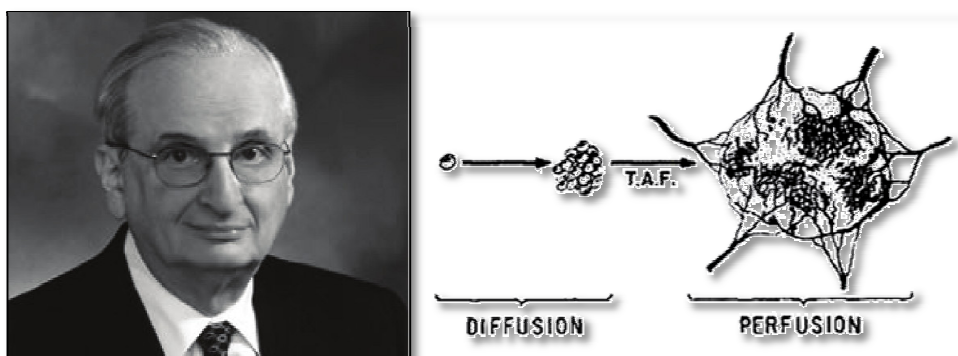
Aunque este mecanismo por un lado es crucial para la vida y la supervivencia (cicatrización de heridas, desarrollo embrionario, menstruación, procesos antiinflamatorios...), por otro lado ayuda a nutrir tumores y facilita su proliferación dando acceso a las células cancerígenas al torrente sanguíneo provocando el fenómeno de **metástasis**.<sup>16</sup>

<sup>14</sup> Graham, L. P.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford: New York, **2009**.

<sup>15</sup> Selección de revisiones sobre la angiogénesis: a) Nussenbaum, F.; Herman, I. M.; *J. Oncol.* **2010**, *2010*, 132641. b) Carmeliet, P.; *Nature* **2005**, *438*, 932–936. c) Risau, W.; *Nature* **1997**, *386*, 671–674.

<sup>16</sup> Takayama, S.; Ishii, S.; Ikeda, T.; Masamura, S.; Doi, M.; Kitajima, M.; *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 79–83.

En el año 1971, Judah Folkman<sup>17</sup> publicó una investigación donde se detalla 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. Por lo tanto, **si se logra controlar el proceso se logrará también controlar el crecimiento de los tumores**, y se podrá hacer sin alterar otros casos de generación de capilares que son esenciales para el organismo.



**Figura 7.** Judah Folkman y su dibujo original de 1971.

Aunque, hay que mencionar, que en los últimos años se ha descubierto que el tumor puede emplear mecanismos adicionales para crear nuevos capilares, como: (A) iniciación del proceso angiogénico; (B) invaginación; (C) captura de células endoteliales circulantes; (D) cooptación; (E) estructura en retícula de vasos sanguíneos; (F) mimetismo vascular (*Figura 8*).<sup>18</sup>

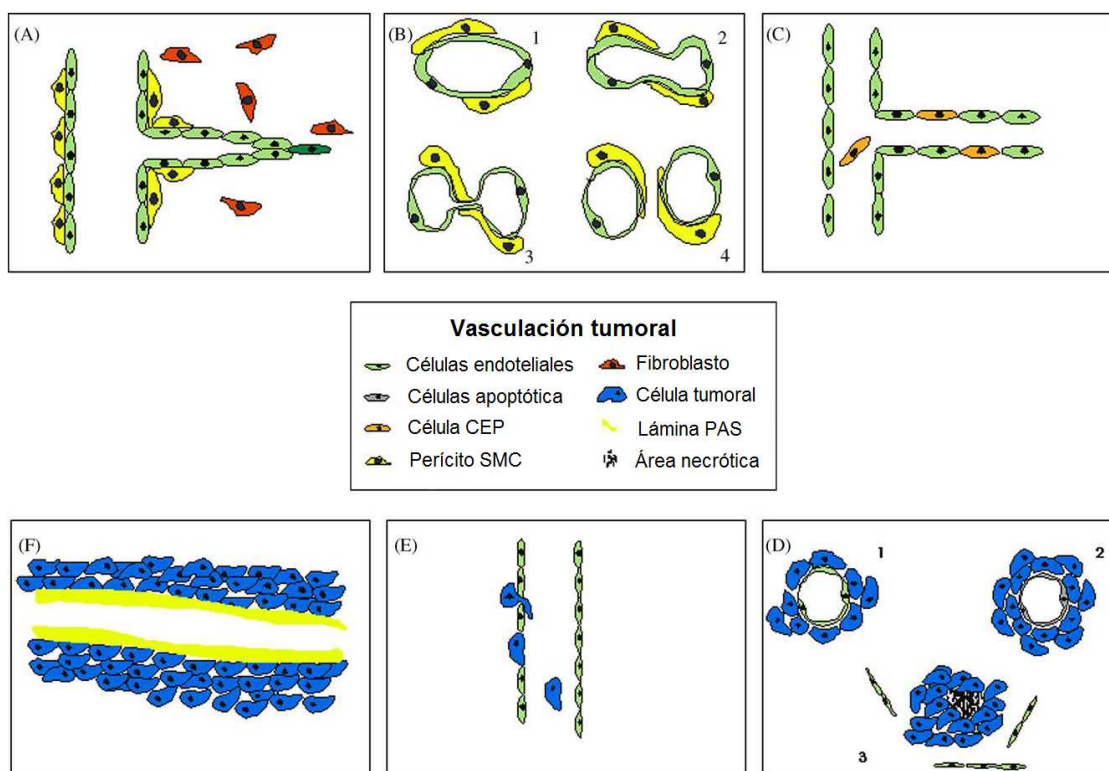
El mecanismo alternativo más importante es la ruta de señalización de Notch, mediante la cual el tumor es capaz, gracias a las células madre presentes en la masa de células tumorales, de crear tejido endotelial formando nuevos capilares desde el tumor hacia el torrente sanguíneo.<sup>19</sup>

<sup>17</sup> Folkman, J.; *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186.

<sup>18</sup> a) Welti, J.; Loges, S.; Dimmeler, S.; Carmeliet, P.; *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3109–3200. b) Bautch, V. L.; *Nature* **2010**, *468*, 770–771. c) Auguste, P.; Lemiére, S.; Larriéu-Lahargue F.; Bikfalvi A.; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *54*, 53–61.

<sup>19</sup> Para más información sobre la ruta de señalización de Notch: a) Estructura y propiedades: Hambleton, S.; Valeyev, N. V.; Mauranyi, A.; Knott, V.; Werner, J. M.; McMichael, A. J.; Handford, P. A.; Downing, A. K.; *Structure* **2004**, *12*, 2173–2183. b) Papel que desempeña y su inhibición: Takabe, N.; Nguyen, D.; Yang, S. X.; *Pharmacology & therapeutics* **2014**, *141*, 140–149. c) Olsauskas-Kuprys, R.; Zlobin, A.; Osipo, C.; *Onco. Targets and Therapy* **2013**, *6*, 943–955. d) Gracia, A.; Kaldel, J. J.; *Hostol. Histopathol.* **2012**, *27*, 151–156. e) Wang, R.; Chadalavada, K.; Wilshire, J.; Kowalik, U.; Hovinga, K. E.; Geber, A.; Fligelman, B.; Leversha, M.; Brennan, C.; Tabar, V.; *Nature* **2010**, *468*, 829–833. e) Ricci-Vitiani, L.; Pallini, R.; Biffoni,

Para detener el crecimiento de los tumores y evitar la metástasis hay que imposibilitar todas las rutas disponibles mencionadas. En la presente memoria nos hemos centrado únicamente en la inhibición del mecanismo de angiogénesis que actúa sobre los vasos preexistentes.



**Figura 8.** Mecanismos de los tumores para alimentarse.

La angiogénesis es un proceso de muchos pasos, que son regulados por un balance entre **factores angiogénicos** (factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibrolástico, factor de crecimiento endotérmico...) y otros **antiangiogénicos** (angiostatina, endostatina, trombospondina...).<sup>15a,20</sup> Como otros muchos procesos tales como la migración de células, organización de células para formar tejidos, expresión génica... el proceso de angiogénesis ocurre en la matriz extracelular (una inmensa red de proteínas y carbohidratos, entre otras moléculas secretadas por las propias células, que forma un espacio intercelular adecuado para

M.; Todaro, M.; Invercini, G.; Cenci, T.; Maira, G.; Parati, E. A.; Stassi, G.; Larocca, L. M.; De Maria, R.; *Nature* **2010**, *468*, 824–828. f) Shih, I. M.; Wang, T. L.; *Cancer Res.* **2007**, *65*, 1879–1882.

<sup>20</sup> a) Ellis, L. M.; Liu, W.; Fan, F.; Jung, Y. D.; Reinmuth, N.; Stoeltzing, O.; *Oncology* **2002**, *16*, 14–22. b) Ferrara, N.; *Nature Rev. Cancer* **2002**, *2*, 795–803. c) Carmeliet, P.; Jain, R. K.; *Nature* **2000**, *407*, 249–257. d) Carmeliet, P.; *Nature Medicine* **2000**, *6*, 389–395.

dar lugar a infinidad de procesos biológicos) y está controlado mediante **integrinas de membrana**.<sup>21</sup>

Uno de los problemas más relevantes en el tratamiento contra el cáncer es encontrar un agente terapéutico que llegue a todas las regiones tumorales en cantidades terapéuticas eficaces sin que llegue a causar **toxicidad** en las demás regiones. Como las células cancerígenas derivan de células sanas, es casi imposible encontrar una **diana terapéutica que sea específica de las células cancerígenas** y lo normal es que la diana se encuentre en los dos tipos de células; pero hay que añadir que las integrinas se encuentran **sobreexpresadas** en mayor cantidad en las células cancerígenas y sus alrededores estando relacionada la sobreexpresión con la agresividad del tumor.<sup>22</sup> Por lo que si se eligen las integrinas como diana terapéutica podría disminuir la toxicidad del tratamiento ya que no quedarían afectadas las células sanas. Esta sobreexpresión es clave en el diagnóstico y seguimiento del cáncer mediante el empleo de radiomarcadores.<sup>23</sup>

Se conocen cuatro grandes familias de receptores de membrana: integrinas, cadherinas, selectinas e inmunoglobulinas; pero las integrinas, son la familia más importante en lo que a interacción célula-matriz extracelular se refiere.<sup>24</sup>

---

<sup>21</sup> Para más información sobre el papel de las integrinas: a) Avraamides, C. J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J. A.; *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 604–617. b) Cai, W.; Chen, X.; *Anticancer Agents Med. Chem.* **2006**, 6, 407–428. c) Hwang, R.; Varner, J.; *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* **2004**, 18, 991–1006.

<sup>22</sup> Para más información sobre la importancia de la sobreexpresión de las integrinas en las células cancerígenas véase la siguiente selección de artículos y revisiones: a) Chen, X.; Plasencia, C.; Hou, Y.; Neamati, N; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1098–1106. (corrigendum, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5874. b) Gasparini, G.; Brooks, P. C.; Biganzoli, E.; Vermeulen, P. B.; Bonoldi, E.; Dirix, L. Y.; Ranieri, G.; Miceli, R.; Cheresch, D. A.; *Clin. Cancer Res.* **1998**, 4, 2625–2634. c) Brooks, P. C.; Clark, R. A. F.; Cheresch, D. A.; *Science* **1994**, 264, 569–571. d) Felding-Habermann, B.; Mueller, B. M.; Romerdahl, C. A.; Cheresch, D. A.; *J. Clin. Invest.* **1992**, 89, 2018–2022. e) Albelda, S. M.; Mette, S. A.; Elder, D. E.; Stewart, R.; Damjanovich, L.; Herlyn, M.; Buck, C. A.; *Cancer Res.* **1990**, 50, 6757–6764.

<sup>23</sup> Selección bibliográfica relacionada con radiomarcadores peptídicos con estructura RGD: a) Gaertner, F. C.; Kessler H.; Wester, H. J.; Schwaiger, M.; Beer, A. J.; *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, 39, S126–138. b) Oxboel, J.; Schjoeth-Eskesen, C.; El-Ali, H. H.; Madsen, J.; Kjaer, A.; *International Journal of Molecular Imaging* **2012**, 379807 (11 pp) c) Liu, S.; *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2199–2213. d) Liu, S.; *Mol. pharmaceutics* **2006**, 3, 472–487.

<sup>24</sup> Albelda, S. M.; Buck, C. A.; *FASEB J.* **1990**, 4, 2868–2880.

## 2.4. Las integrinas

Las integrinas<sup>25</sup> (Figura 9) son una gran familia de **glicoproteínas de adhesión transmembrana** importantes en procesos como inflamación, protección de la célula, respuesta inmunológica y coagulación.

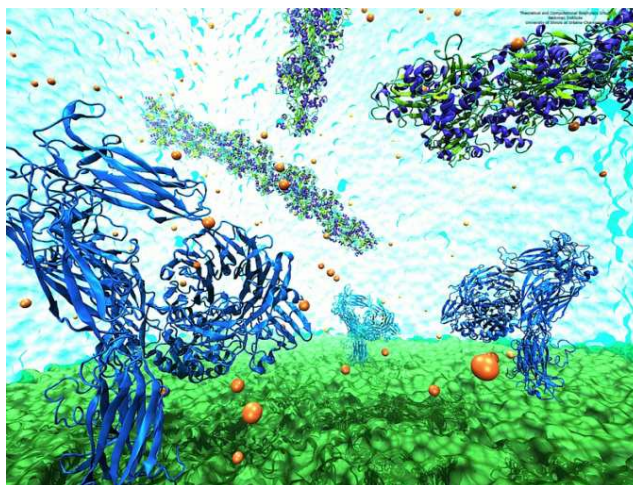


Figura 9. Dibujo de integrinas.

La terminología “integrina” fue aplicada por primera vez en el año 1987 por Richard O. Hynes para describir a una familia de receptores que *integran* la matriz extracelular con el citoesqueleto.<sup>26</sup> En esta década se hizo evidente que las integrinas son un grupo multifacético de receptores que se encuentran en casi todas las células del organismo y se expresan por todos los animales multicelulares, pero su diversidad varía ampliamente entre especies.

Las integrinas median en la adhesión celular a la matriz extracelular o a las células adyacentes (en particular, en las respuestas inflamatorias) y pueden regular la supervivencia de la célula y su proliferación o migración modulando las señales intracelulares e inhibiendo la apoptosis; jugando así, un papel importante en el proceso de angiogénesis. Por esta razón, en las últimas décadas están ganando

---

<sup>25</sup> Selección de revisiones generales sobre las integrinas y sus funciones: a) Barczk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D.; *Cell Tissue Res.* **2010**, 339, 269–280. b) Stupack, D. G.; Cheresch, D. A.; *Curr. Top. Dev. Biol.* **2004**, 64, 207–238. c) Hynes, R. O.; *Cell* **2002**, 110, 673–687. d) Van der Flier, A.; Sonnenberg, A.; *Cell Tissue Res.* **2001**, 305, 285–298.

<sup>26</sup> Hynes, R. O.; *Cell* **1987**, 48, 549–550.

importancia como diana en las terapias contra el cáncer,<sup>27</sup> adquiriendo gran protagonismo en los artículos publicados (*Tabla 2*).

**Tabla 2.** Publicaciones con el tópico “integrinas” o “RGD” en las bases de datos más utilizadas.<sup>28</sup>

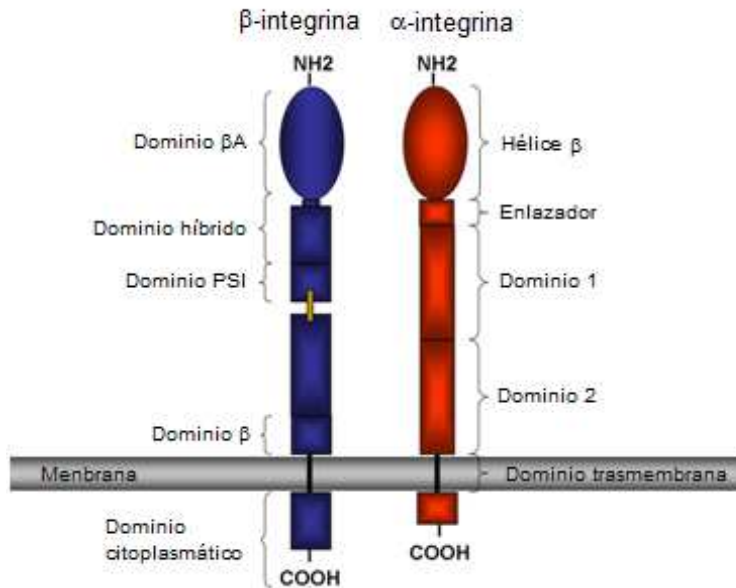
Base de datos	Periodo de publicación	Integrina		RGD	
Pubmed	total	50.003		5253	
	2001–2011	28.252	(57%)	3008	(57%)
	2006–2011	14.210	(28%)	1647	(31%)
Web of Science	total	39.195		6737	
	2001–2011	25.214	(64%)	4203	(62%)
	2006–2011	13.687	(35%)	2501	(37%)
SciFinder	total	94.099		12.902	
	2001–2011	62.744	(67%)	8093	(63%)
	2006–2011	36.928	(39%)	4897	(38%)

En cuanto a su estructura,<sup>29</sup> (*Figura 10*) están formadas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por un enlace no covalente. La subunidad  $\alpha$  es la más larga formada por unos 1100 aminoácidos y está dividida en dos cadenas unidas por un enlace disulfuro; la unidad  $\beta$  en cambio está normalmente formada por unos 800 aminoácidos. Solo los dominios  $\alpha A$  y  $\beta A$ , correspondientes a los extremos más externos, interaccionan con el ligando y por tanto, son ellos los que desencadenan la transducción de la señal al interior de la célula. Además de estos dominios las subunidades contienen una región transmembrana (20–30 residuos) y otra citoplasmática (20–50 residuos).

<sup>27</sup> a) Goswami, S.; *ABC* **2013**, 3, 224–252. b) Rathinam, R.; Alahari, S. K.; *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, 29, 223–237. c) Shimaoka, M.; Springer, T. A.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 703–716.

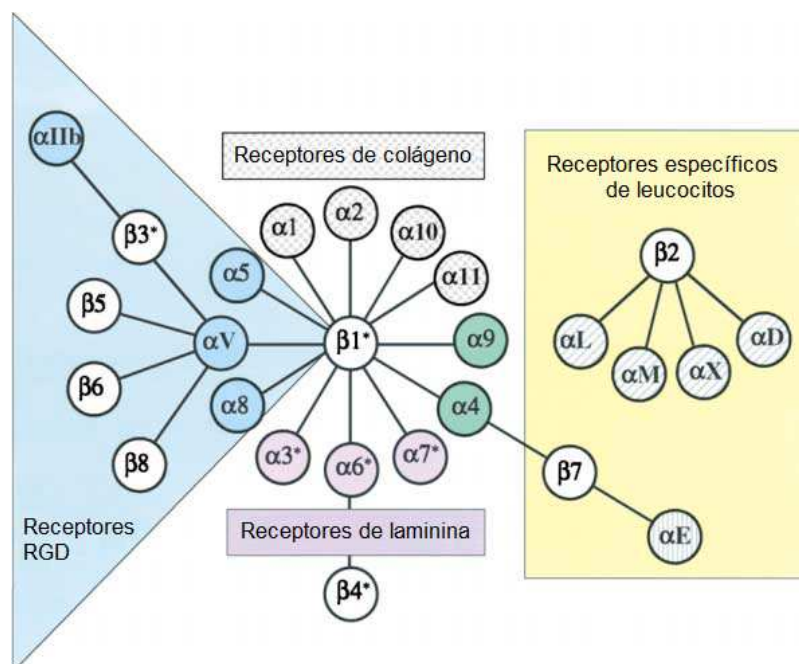
<sup>28</sup> Siemon, I. Z.; Kluczyk, A.; Cebrat, M.; *Handbook of Biologically Active Peptides* **2013**, (2<sup>nd</sup> edition), 705–7013.

<sup>29</sup> Humphries, M. J.; *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311–340.



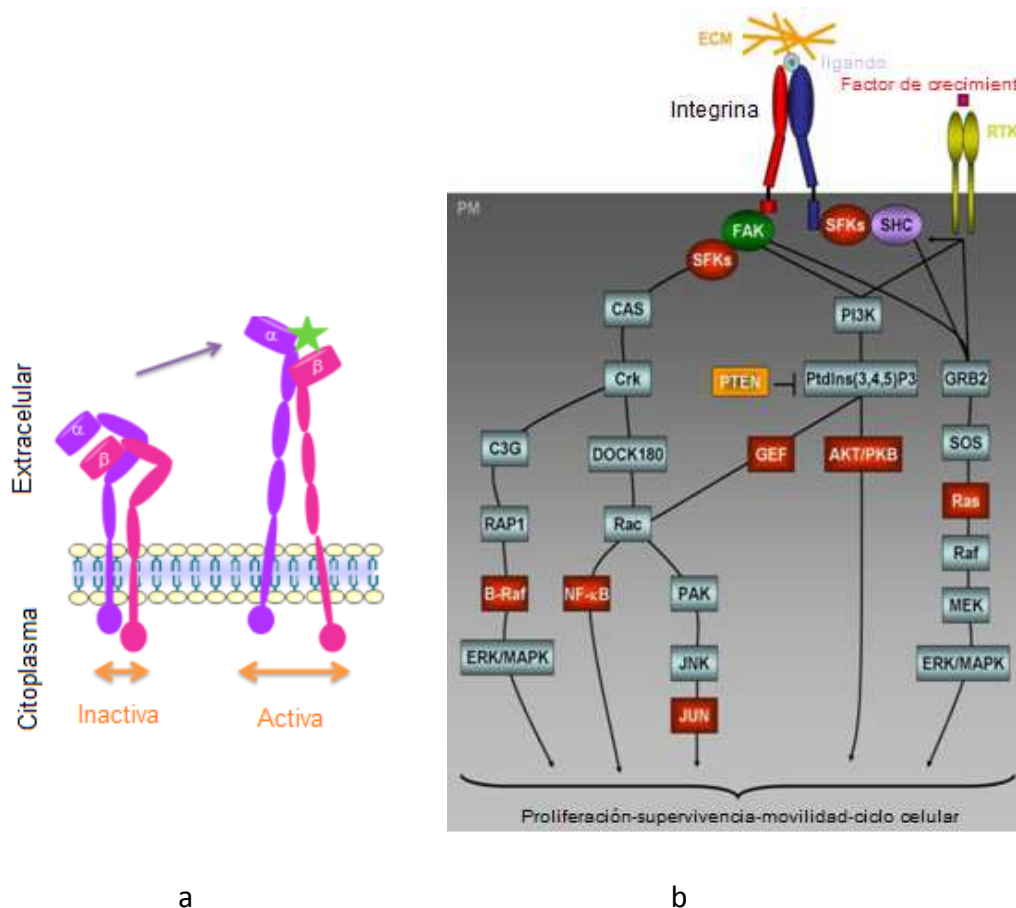
**Figura 10.** Estructura general de una integrina.

En un principio se describieron tan solo tres subunidades  $\beta$  distintas ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) pero hoy en día se conocen por lo menos 8 subunidades  $\beta$  y 18 subunidades  $\alpha$ , las cuales se combinan para formar más de 24 tipos de integrinas presentes en las células de los mamíferos. Éstas se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con la estructura de las ramas  $\alpha$  y  $\beta$ ; y son receptores de colágeno, de leucocitos, RGD y laminares (*Esquema 1*).



**Esquema 1.** Esquema de las diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las diversas integrinas.

Las integrinas permanecen en estado quiescente sobre la membrana celular esperando la señal bioquímica que las active, transformando el centro activo y desatando una cascada de respuestas al interior de la célula. Esta respuesta ocurre a diferentes niveles de complejidad y organización.



**Esquema 2.** a) Representación de la activación una integrina. b) Cascada de respuestas posibles ante la activación de una integrina.

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>30</sup> y su inhibición se usa como tratamiento antitrombótico.<sup>31</sup> La segunda (junto con la  $\alpha_v\beta_5$ ) regula la angiogénesis<sup>32</sup> o la migración celular en músculo blando vascular y está

<sup>30</sup> a) Bennet, J. S.; *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 3363–3369. b) Andrews, R. K.; Gardiner, E. E.; Shen, Y.; Berndt, M.C.; *IUBMB Life* **2004**, *56*, 13–18.

<sup>31</sup> Scarborough, r. M.; Gretler, D. D.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3453–3473.

<sup>32</sup> a) Weis, S. M.; Cheresh, D. A.; *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**, *1*, 1–15. b) Wilder, R. L.; *Ann. Rheum. Dis.* **2002**, *61*, ii96–ii99. c) Marugán, J. J.; Manthey, C.; Anaclerio, B.; Lafrance, L.; Lu, T.; Markotan, T.; Leonard, K. A.; Crysler, C.; Eisennagel, S.; Dasgupta, M.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926–934.



relacionada con los procesos de metástasis. Las dos últimas están implicadas en la adhesión de osteoclastos en la matriz ósea.<sup>33</sup>

Por ello, no es de extrañar que diferentes ligandos capaces de interferir selectivamente en estos procesos de adhesión sean considerados como principios activos en el tratamiento de patologías tales como la trombosis, la metástasis de tumores sólidos cancerosos, o la osteoporosis.

Un sello distintivo de las integrinas es la capacidad de los miembros individuales de la familia de **reconocer múltiples ligandos**.<sup>34</sup> En la matriz extracelular se encuentran diversas proteínas naturales que actúan como ligandos selectivos de las integrinas (*Tabla 3*). La preferencia por el ligando se determina por **la afinidad relativa**, la disponibilidad dentro de un ambiente específico y el estado conformacional del ligando; y como ya se ha comentado en el *apartado 2.1*, la conformación del ligando será fijada por la secuencia de aminoácidos.

**Tabla 3.** Ejemplo de diferentes tipos de integrinas y sus ligandos naturales.

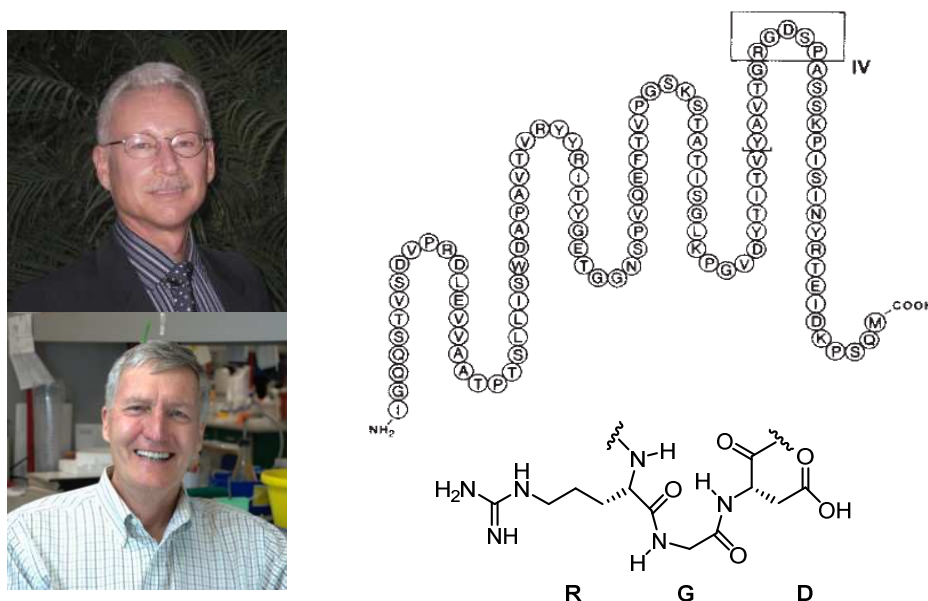
Integrina	Ligando (proteína)
$\alpha_2\beta_1$	Colágeno, laminina
$\alpha_3\beta_1$	Laminina, colágeno I, epiligrina, fibronectina
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina, vitronectina
$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha_{IIb}\beta_3$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

d) Eliceiri, B. P.; Cheresch, D. A.; *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227–1230. e) Strömblad, S.; Cheresch, D. A.; *Cell Survival Chem. Biol.* **1996**, *3*, 881–885. f) Matsuno, H.; Stassen, J. M.; Vermylen, J.; Deckmyn, H.; *Circulation* **1994**, *90*, 2203–2206. g) Choi, E. T.; Engel, L.; Callow, A. D.; Sun, S.; Trachtenberg, J.; Santoro, S.; Ryan, U. S.; *J. Vasc. Surg.* **1994**, *19*, 125–134. h) Liaw, L.; Almeida, M.; Hart, C. E.; Schwartz, S. M.; Giachelli, C. M.; *Circ. Res.* **1994**, *74*, 214–224.

<sup>33</sup> a) Duong, L T.; Rodan, G. A.; *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2001**, *2*, 95–104. b) Engleman, V. W.; Nickols, G. A.; Ross, F. P.; Horton M. A.; Griggs, D. W.; Settle, S. L.; Ruminski, P. G.; Teitelbaum, S. L.; *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2284–2292. c) Robey, P. G.; *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 227–246. d) Ross, F. P.; Chappel, J.; Alvarez J. I.; Sander, D.; Butler, W. T.; Farach-Carson M. C.; Mintz, K. A.; Gehron Robey, P.; Teitelbaum, S. L.; Cheresch, D. A.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9901–9907.

<sup>34</sup> Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith J. W.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.

En aras de simplificar el complejo de reconocimiento, se han hechos grandes esfuerzos para reducir los ligandos macromoleculares a **secuencias de reconocimiento universales** más pequeñas, consiguiendo pequeños péptidos con actividad biológica. Uno de los casos más importantes es la **tríada Arg-Gly-Asp** (RGD en nomenclatura abreviada),<sup>35,36</sup> una secuencia peptídica mínima común, que aparece en varios de estos ligandos y está implicada en el reconocimiento de integrinas tales como  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$  y  $\alpha_8\beta_1$  (Esquema 1, pág. 27).<sup>37</sup>



**Figura 11.** Michael D. Pierschbacher y Erkki Ruoslahti y la imagen original del artículo de 1987 donde mencionan la secuencia RGD.

<sup>35</sup> Los primeros en mencionar esta secuencia fueron: Michael D. Pierschbacher y Erkki Ruoslahti ya en 1984: Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; *Nature* **1984**, *309*, 30–33.

<sup>36</sup> Más información sobre la secuencia RGD: a) Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D.; *Science* **1987**, *238*, 491–498. b) Ruoslahti, E.; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715. c) Danhier, F.; Le Breton, A.; Pr at, V.; *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2961–2973. d) Craig, D.; Gao, M.; Schulten, K.; Vogel, V.; *Structure* **2004**, *12*, 2049–2058. e) Wang, F.; Li, Y.; Shen, Y.; Wang, A.; Wang, S.; Xie, T.; *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 13447–13462. f) Temming, K.; Schiffelers, R. M.; Molema, G.; Kok, R. J.; *Drug Res. Updates* **2005**, *8*, 381–402.

<sup>37</sup> También se han descubierto otras secuencias de reconocimiento que interaccionan con otro tipo de integrinas, como por ejemplo, la secuencia **LDV** o **LDT** que es reconocida por las integrinas con funciones inmunológicas ( $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_E\beta_7$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ ,  $\alpha_D\beta_2$ ); o la secuencia **GFOGER** que es reconocida por las integrinas que actúan como receptoras de colágeno ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$ ). a) Weide, T.; Modlinger, A.; Kessler, H.; *Top. Curr. Chem.* **2007**, *272*, 1–50. b) Humphries, J. D.; Byron, A.; Humphries, M. J.; *J. Cell Science* **2006**, *119*, 3901–3903.

Diferentes estudio de RMN, rayos X, mutagénesis... han revelado que el lugar de reconocimiento de la estructura RGD y de otras secuencias relacionadas está situado en la unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Este reconocimiento se basa principalmente en la interacción electrostática entre el grupo carboxilato del ácido aspártico del ligando y la carga positiva del ion metálico de la subunidad  $\beta$ ; y en la atracción entre el grupo guanidino de la arginina del ligando con diferentes restos ácidos de la subunidad  $\alpha$  (Figura 12).<sup>38</sup>

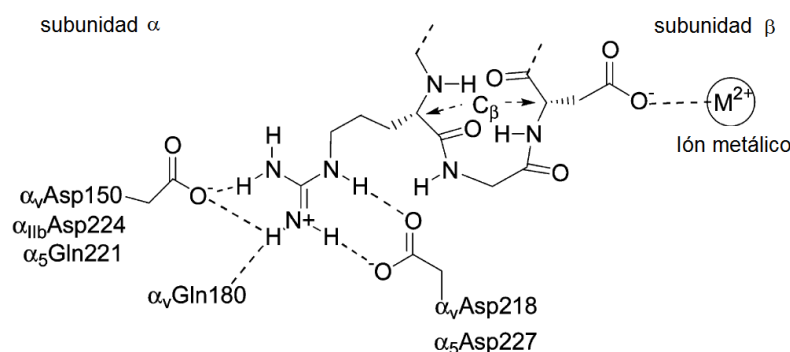


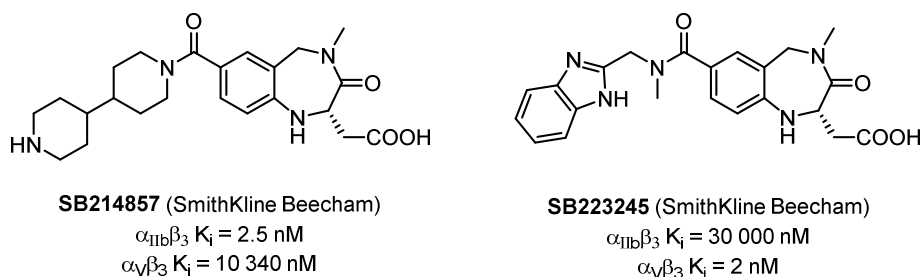
Figura 12. Características clave del lugar de reconocimiento.

Cabe mencionar que las diferentes integrinas son capaces de diferenciar y discriminar entre distintos ligandos que contienen la secuencia RGD en su estructura, entre otras características, por la distancia concreta a la que se encuentra los dos puntos de anclaje mencionados; dicho de otra manera, las integrinas son capaces de **reconocer y diferenciar las diferentes conformaciones** de la estructura RGD. Permittiéndonos, de este modo, crear ligandos específicos para cada integrina.<sup>39</sup>

Buen ejemplo de ello son los peptidomiméticos SB214857 y SB223245 (Figura 13); ambos compuestos contienen una estructura similar, no obstante, en el primero de ellos el mimético del grupo guanidino se encuentra más alejado del ácido carboxílico, cambiando su selectividad frente a las distintas integrinas.

<sup>38</sup> a) Nagae, M.; Re, S.; Mihara, E.; Nogi, T.; Sugita, Y.; Takagi, J.; *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140. b) Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B. S.; Wang, J. H.; Springer, T. A.; *Nature* **2004**, *432*, 59–67.

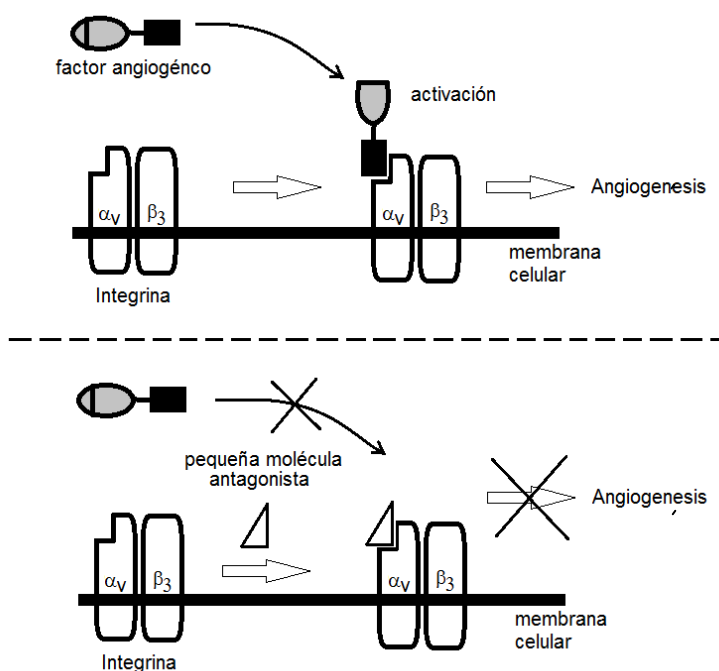
<sup>39</sup> Miller, W. H.; Keeman, R. M.; Willette, R. N.; Lark, M. W.; *DDT* **2000**, *5*, 397–408.



**Figura 13.** Peptidomiméticos selectivos de las integrinas  $\alpha_{11b}\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_3$ . La selectividad se da gracias a la diferencia en la distancia entre el mimético de guanidina y el ácido carboxílico.<sup>40</sup>

La capacidad de las integrinas por distinguir las alteraciones en las estructuras análogas a la secuencia RGD, ha llevado en los últimos años a la síntesis y estudio de diferentes miméticos de RGD; pseudopéptidos de bajo peso molecular, con la intención de desarrollar compuestos de alto interés farmacológico (Tabla 2, pág. 26).

Teniendo en cuenta todos estos datos, en la presente memoria nos hemos centrado en **crear peptidomiméticos RGD selectivos de la integrina  $\alpha_v\beta_3$** , para controlar el proceso de angiogénesis.<sup>32</sup>



**Esquema 3.** Representación del papel antagonista de inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

<sup>40</sup> La afinidad del ligando por la integrina está expresado en valores de  $K_i$ , la constante de disociación, que representa la concentración de inhibidor necesaria para desplazar la proteína natural adherida a la integrina a estudiar; cuanto menor sea este valor mayor será la afinidad del inhibidor.

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

Como ya se ha comentado, para que un peptidomimético sea aceptado como válido, debe actuar como un buen ligando (mostrar una preferencia por el centro activo mayor que su ligando natural) y además debe tener propiedades farmacodinámicas óptimas y una estabilidad superior a la del péptido natural. Pero además, para que sea un fármaco efectivo, hay que tener en cuenta esta selectividad mencionada; el peptidomimético debe ser específico de una sola integrina evitando así generar reacciones adversas, como hemorragias, accidentes cardiovasculares, trombos...

Para conseguir estas propiedades se intenta **la identificación y fijación de las diferentes conformaciones** de la tríada RGD, buscando la **conformación bioactiva**, mediante la estabilización de determinados enlaces de hidrógeno, con la imposición de restricciones a dicha secuencia o a sus miméticos equivalentes.<sup>37a,41</sup>

La importancia de fijar la conformación, puede ser reflejada con el siguiente ejemplo: un péptido lineal con tan solo tres aminoácidos y seis enlaces libres es capaz de adoptar unas 65.000 conformaciones<sup>42</sup> y sin restricciones de ningún tipo, pasaría de una conformación a otra perdiendo por completo la selectividad.

Cabe mencionar que algunos autores defienden la necesidad de una cierta **flexibilidad** en los ligandos sintéticos para una mejor adaptación con el receptor una vez son reconocidos.<sup>43</sup>

Como se ha mencionado anteriormente, la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , también conocida como receptor de **vitronectina**, es fundamental en la regulación de la angiogénesis y con ello el crecimiento de tumores, la invasión local y la metástasis potencial del

---

<sup>41</sup> a) Gilon, C.; MAng, C.; Lohof, E.; Friedler, A.; Kessler, H.; *Houber-Weyl Methods of Organic Chemistry, vol. E 22b, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, 461–542, Ed Thieme **2003**. b) Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389. c) Müller, G.; Gurrath, M.; Kessler, H.; Timpl, R.; Aumailley, M.; *Angew. Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921. d) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H.; *FEBS* **1991**, *291*, 50–54.

<sup>42</sup> El número de conformaciones dependerá de la definición de “conformación” que se emplee: en este caso se considera conformación la energía mínima caracterizada por estar entre barreras mayores que kT frente a la siguiente conformación: Payne, J. W.; Marshall, N. J.; Grail, B. M.; Gupta, S.; *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1221–1246.

<sup>43</sup> a) Perola, E.; Charifson, P. S.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2499–2510. b) Nikiforovich, G. V.; Kövér, K. E.; Marshall, G. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3262–3273. c) Nicklaus, M. C.; Wang, S.; Driscoll, J. S.; Milne, G. W. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 411–428.

tumor,<sup>32</sup> aunque cabe mencionar que no todos los autores están de acuerdo.<sup>44</sup> Por ello, en las últimas décadas, 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>45</sup>

De todas maneras, todavía no se han conseguido inhibidores suficientemente eficaces y selectivos; bien sea por problemas de toxicidad, estabilidad metabólica etc.

Aunque en la presente memoria se pretende desarrollar únicamente inhibidores peptidomiméticos con estructura RGD o similares, hay que mencionar que existen y se emplean otras estrategias terapéuticas;<sup>46</sup> entre las más importantes se encuentran: 1) anticuerpos monoclonales,<sup>47</sup> proteínas naturales sintéticas producidas por una sola célula madre, reconocen una sustancia específica como podría ser, por ejemplo, un factor de crecimiento endotelial, y lo bloquean; son muy específicas y estables pero poseen baja biodisponibilidad oral y baja permeabilidad celular; 2) desintegrinas,<sup>48</sup> proteínas de bajo peso molecular con la secuencia RGD y ricas en cisteína aisladas del veneno de serpiente; bloquean la interacción de los ligandos naturales con las integrinas obteniendo la conformación activa de la estructura RGD gracias a los numerosos enlaces disulfuro que poseen este tipo de moléculas.

---

<sup>44</sup> a) Pramanik, D.; Majeti, B. K.; Mondal, G.; Karmali, P. P.; Sistla, R.; Ramprasad, O. G.; Srinivas, G.; Pande, G.; Chaudhuri A.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7298–7302. b) Hynes, R. O.; *Nature Medicine* **2002**, *8*, 918–921.

<sup>45</sup> Brooks, P. C.; Stromblad, S.; Klemke, R.; Visscher, D.; Sarkar, F. H.; Cheresch, D. A.; *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1815–1822.

<sup>46</sup> Descripción y clasificación de las diferentes estrategias terapéuticas contra el cáncer: Reddy, L. H.; Couvreur, P.; *Macromolecular anticancer therapeutics*; Humana Press, Springer: New York, **2010**.

<sup>47</sup> a) Guillemainault, L.; Lemarié, E.; Heuzé-Vourc'h, N.; *J. Cancer Therapy*, **2013**, *3*, 1170–1190. b) Guo, F.; Das, S.; Mueller, B. M.; Barbas C. F. III; Lerner, R. A.; Sinha, S. C.; *PNAS* **2006**, *103*, 11009–11014. c) Arkin, M. R.; Wells, J. A.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317. d) Presta, L. G.; Chen, H.; O'Connor, S. J.; *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4593–4599. e) Friedlander, M.; Brooks, P. C.; Shaffer, R. W.; Kincaid, M. C.; Varner, J. A.; Cheresch, D. A.; *Science* **1995**, *270*, 1500–1502.

<sup>48</sup> a) Swenson, S.; Ramu, S.; Markland, S. F.; *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2860–2871. b) Swenson, S.; Costa, F.; Minea, R.; Sherwin, R. P.; Ernst, W.; Fujii, G.; Yang, D.; Markland, F. S.; *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 499–511.

### 2.5.1. Antecedentes en la síntesis de peptidomiméticos RGD

Existen dos estrategias distintas para el diseño de peptidomiméticos de RGD conformacionalmente restringidos: el diseño de “**miméticos abiertos**” y el diseño de **miméticos cíclicos** y se describen a continuación:

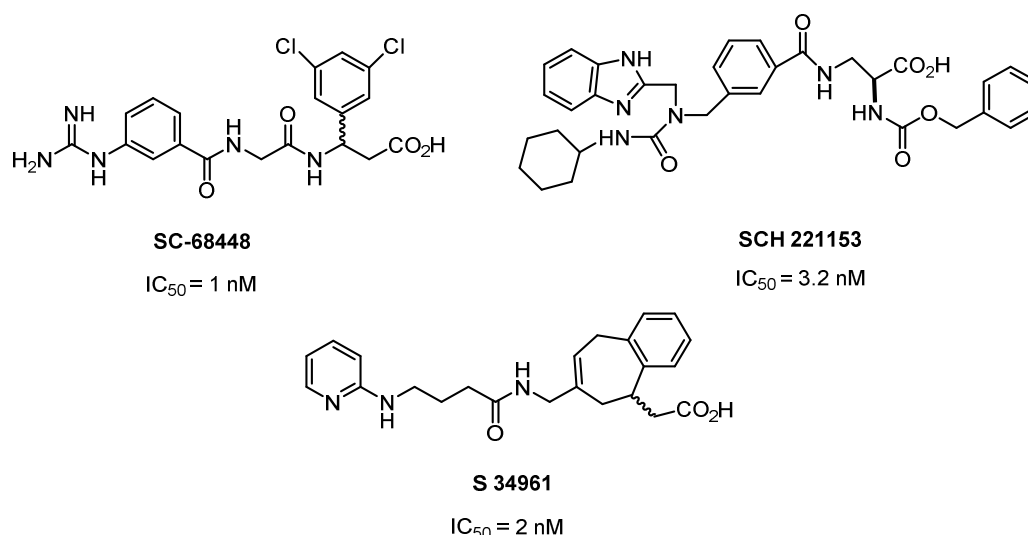
#### 2.5.1.1. Miméticos abiertos

Los “miméticos abiertos” son pseudopeptidos capaces de interactuar con el receptor diana ya que presentan **sustituyentes de naturaleza y disposición espacial análogos** a los sustituyentes responsables de la interacción del péptido natural al que imitan. Se puede decir que contienen la misma topografía química. Los miméticos abiertos RGD inhibidores de la integrina  $\alpha_V\beta_3$  contienen en su estructura por lo tanto, un grupo polar básico, guanidina y otro polar ácido, ácido carboxílico, o similares, debidamente orientados. Además, pueden presentar anillos aromáticos, ciclos u otros grupos de restricción que darán rigidez a la estructura.

Algunos ejemplos representativos<sup>49,50,51</sup> que han resultado ser útiles son los peptidomiméticos S 34961, SC-68448 y SCH 221153 que se muestran en la *Figura 14*.

<sup>49</sup> a) **SC-68448**: Carron, C. P.; Meyer, D. M.; Pegg, J. A.; Engleman, V. W.; Nickols, M. A.; Settle, S. L.; Westlin, W. F.; Ruminski, P. G.; Nickols, G. A.; *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1930–1935. b) **SCH 221153**: Reynolds, A. R.; Hart, I. R.; Watson, A. R.; Welti, J. C.; Silva, R. G.; Robinson, S. D.; Violante, G.; Gourlaouen, M.; Salih, M.; Jones, M.; Jones, D. T.; Saunders, G.; Kostourou, V.; Perron-Sierra, F.; Norman, J. C.; Turcker, G. C.; Hodivala-Dilke, K. M.; *Nat. Med.* **2009**, *15*, 392–400. c) Kumar, C. C.; Malkowski, M.; Yin, Z.; Tanghetti, E.; Yaremko, B.; Nechuta, T.; Varner, J.; Liu, M.; Smith, E. M.; Neustadt, B.; Presta, M.; Armstrong, L.; *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2232–2238. d) **S 34961**: Burdridge, m. F.; Venot, V.; Casara, P. J.; Person-Sierra, F.; Hickman, J. A.; Tucker, G. C.; *Mol Pharmacol.* **2003**, *63*, 1281–1288. e) Perron-Sierra, F.; Saint Dizier, D.; Bertrand, M.; Genton, A.; Tucker, G. C.; Casara, P.; *Bioorg. Med. Chem. Let.* **2002**, *12*, 3291–3296.

<sup>50</sup> Algunos ejemplos más de “miméticos abiertos” inhibidores de la integrina  $\alpha_V\beta_3$ : a) Perkins, J. J.; Duong, L. T. Fernandez-Mezler, C.; Hartman, G. D.; Kimmel, D. B.; Leu, C. T.; Lynch, J. J. Prueksaritanont, T.; Rodan, G. A.; Rodan, S. B.; Duggan, M. E.; Meissner, R. S.; *Bioorg. Med. Chem. Let.* **2003**, *13*, 4285–4288. b) Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045–1051. c) Gibson, C.; Sulyok, G. A. G.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Hölzeman, G.; Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 165–169. d) Moitessier, N.; Dufour, S.; Chrétien, F.; Thiery, J. P.; Maigret, B.; Chapleur, Y.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 551–523. e) Carron, C. P.; Meyer, D. M.; Engleman, V. W.; Rico, J. G.; Ruminski, P. G.; Ornberg, R. L.; Westlin, W. F.; Nickols, G. A.; *J. Endocrinol.* **2000**, *165*, 587–598. f) Pitts, W. J.; Wityak, J.; Samllheer, J. M.; Tobin, A. E.; Jetter, J. W.; Buynitsky, J. S.; Harlow, P. P.; Solomon, K. A.; Corjay, M. H.; Mousa, A. S.; Wexler, R. R.; Jadhav, P. K.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27–40.



**Figura 14.** Ejemplos de miméticos abiertos y su potencia.<sup>52</sup>

El **SC-68448** ha demostrado reducir el crecimiento de un tumor en ratones en un 80% y bloquear completamente el desarrollo de hipercalcemia. El **SCH 221153** es un inhibidor dual tanto de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  como de la  $\alpha_v\beta_5$  y aunque tiene una vida media muy baja (12 min), es capaz de bloquear la adhesión de células endoteliales. Y por último **S 34961** ha demostrado ser un buen antagonista del ligando natural vitronectina deteniendo el crecimiento de las células de cáncer de colon.

Como se puede observar en la *Figura 14*, además de los dos puntos de anclaje comentados, las tres estructuras contienen un anillo aromático cercano al ácido carboxílico que interaccionaría con un bolsillo hidrofóbico del dominio  $\beta A$ .<sup>53</sup>

### 2.5.1.2. Miméticos cíclicos

La segunda estrategia para el desarrollo de miméticos inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  consiste en el diseño de ciclopeptidos que contengan la unidad RGD

<sup>51</sup> También se emplea esta estrategia en la inhibición de otras integrinas: Bourguet, E.; Banères J. L.; Parelo, J.; Lusinchi, X.; Girard, J. P.; Vidal, J. P.; *Bioorg. Med. Chem. Let.* **2003**, *13*, 1561–1564.

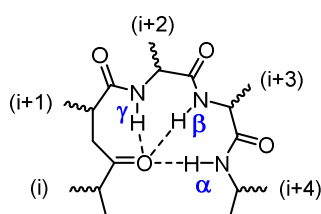
<sup>52</sup> La potencia de un ligando de integrinas se expresa en valores IC<sub>50</sub>, correspondientes a la concentración de ligando necesaria para desplazar el 50% de las proteínas naturales adheridas a la integrina estudiada. Por ejemplo, cuando se quiere medir la actividad inhibitoria de un ligando frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , se suele utilizar la vitronectina que es la proteína natural selectiva de esta integrina. Cuanto menor es este número más potente es el ligando.

<sup>53</sup> Hay que resaltar que algunos datos de la bibliografía podrían reflejar la existencia de un bolsillo hidrofílico próximo al bolsillo hidrofóbico: Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.



formando parte de una **estructura macrocíclica**.<sup>54</sup> El macrociclo disminuye las conformaciones posibles dando mayor rigidez al sistema, y la conformación mayoritaria se fija gracias a los enlaces de hidrógeno intramoleculares formados entre los grupos dadores de amida y los grupos aceptores carbonilo del ciclo.<sup>41</sup> Si la conformación que se fija es la conformación bioactiva, el péptido tendrá mayor potencia; en cambio, si la conformación mayoritaria que adopta el péptido cíclico se aleja de la conformación bioactiva, la actividad del mimético cíclico disminuirá drásticamente. Por esta razón no basta con dar rigidez al sistema, hay que hacerlo de un modo adecuado.

Hoy en día se sabe 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. La elección del tipo de giro depende de la naturaleza de los residuos que participan en él.<sup>55</sup>



**Figura 15.** Representación de los giro  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

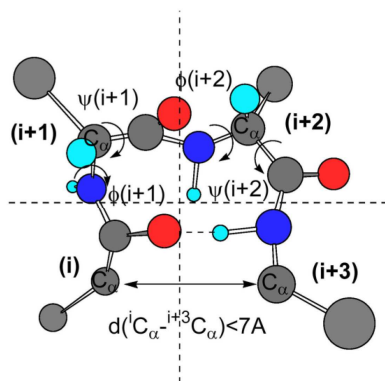
El **giro  $\beta$**  fue definido por primera vez en 1968 por Venkatachalam.<sup>56</sup> Las estructuras de giro  $\beta$  típicas (*Figura 16*) están constituidas por cuatro aminoácidos que forman un pseudociclo de 10 átomos en el que el grupo amida del residuo (i+3) actúa como dador de un enlace de hidrógeno al carbonilo del residuo (i). Existen varios tipos de giros  $\beta$  en función de los ángulos diedros que forman.<sup>57</sup>

<sup>54</sup> de Ressurreição, A. S. M.; Vidu, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Potenza, D.; Manzoni, L.; Ongeri, S.; Gennari, C.; Piarulli, U.; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12184–12188.

<sup>55</sup> a) Souers, A. J.; Ellman, J. A.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431–7448. b) Chou, K. C.; *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 1–16.

<sup>56</sup> Venkatachalam, C. M.; *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425–1436.

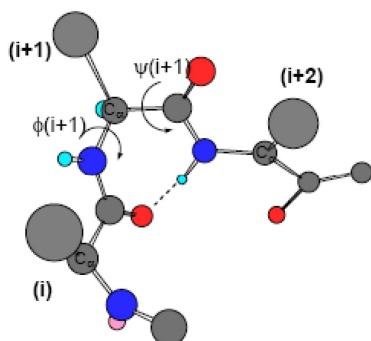
<sup>57</sup> a) Rotondi, K. S.; Gierash, L. M.; *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, *84*, 13–22. b) Ball, J. B.; Hughes, R. A.; Alewood, P. F.; Andrews, P. R.; *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3467–3478. c) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M.; *Protein Eng.* **1990**, *3*, 479–493. d) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A.; *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1–109.



Giro- $\beta$ tipo	$\Phi(i+1)$	$\Psi(i+1)$	$\Phi(i+2)$	$\Psi(i+2)$
I	-60	-30	-90	0
I'	+60	+30	+90	0
II	-60	+120	+80	0
II'	+60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	+60	+30	+60	+30
V	-80	+80	+80	-80
V'	+80	-80	-80	+80
VIa	-60	+120	-90	0
VIb	+120	+120	-60	+150
VIII	-60	-30	-120	+120

Figura 16. Representación de un giro  $\beta$  y su clasificación.

Los giros  $\gamma$  (Figura 17), en cambio, están formados por tres aminoácidos, generando un pseudociclo de 7 átomos.<sup>58</sup> 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). 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.



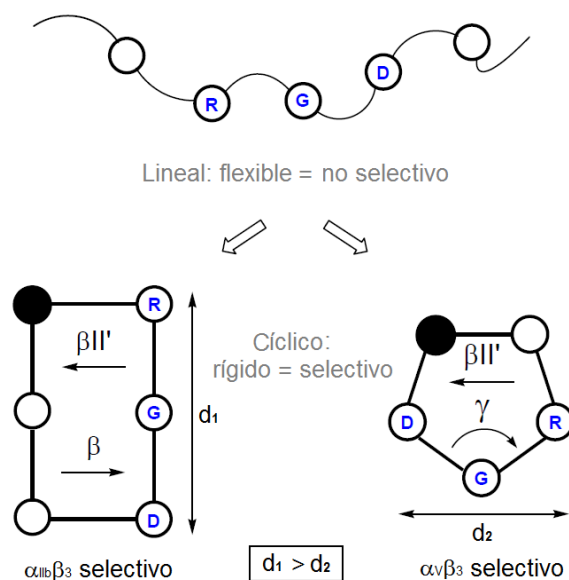
Giro- $\gamma$	$\Phi(i+1)$	$\Psi(i+1)$
Normal	+70... +85°	-60... -70°
Inverso	-70... -85°	+60... +70°

Figura 17. Representación de un giro  $\gamma$  y su clasificación.

Por lo tanto, conocer y fijar un tipo de giro u otro es muy importante porque dependiendo de los ángulos que se formen, el esqueleto peptídico macrocíclico se dispondrá de una manera determinada generando uno u otro tipo de confórmero.

<sup>58</sup> Rosenstroem, H.; Skoeld, C.; Plonffe, B.; Beandry, H.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Wolf, G.; Karlem, A.; Gallo-Payet, N.; Hallberg, A.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4009–4024.

Empezando por un péptido lineal no selectivo (*Esquema 4*), mediante la ciclación se pueden conseguir péptidos selectivos de las diferentes integrinas gracias a las conformaciones que adopta el péptido, y por lo tanto las distintas distancias que se encuentran los dos puntos de anclaje con el receptor más importantes: ácido aspártico y arginina.



**Esquema 4.** Ciclopéptidos selectivos de diferentes integrinas gracias al tipo de giro que adoptan.

Los ciclopéptidos tienen una serie de **ventajas** farmacológicas frente a los péptidos lineales, para empezar, como se acaba de comentar, si se consigue fijar la conformación bioactiva, al reducirse su flexibilidad conformacional incrementa su potencia y selectividad frente a los distintos subtipos de receptores.<sup>59</sup> Pero además, también se mejoran las propiedades ADME frente a los péptidos de cadena abierta; los ciclopéptidos al no tener extremos libres no son reconocidos por las enzimas encargadas de la metabolización inicial de las proteínas adquiriendo mayor estabilidad metabólica.<sup>60</sup> Hay que añadir que esta falta de extremos libres dota al mimético de

<sup>59</sup> Peishoff, C. E.; Ali, F. E.; Bean, J. W.; Calvo, R.; D'Ambrosio, C. A.; Eggleston, D. S.; Hwan, S. M.; Kline, T. P.; Koster, P. F.; Nichols, A.; Powers, D.; Romoff, T.; Samanen, J. M.; Stadel, J.; Vasko, J. A.; Kopple, K. D.; *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3962–3969.

<sup>60</sup> Hess, S.; Linde, Y.; Ovadia, O.; Safrai, E.; Shalev, D. E.; Swed, A.; Halbfinger, E.; Lapidot, T.; Winkler, I.; Gabinet, Y.; Faier, A.; Yarden, D.; Xiang, Z.; Portillo, F.; Haskell-Luevano, C.; Gilon, C.; Hoffman, A.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1026–1034.

mayor permeabilidad a las membranas celulares<sup>61</sup> y una mayor biodisponibilidad oral,<sup>62</sup> gracias a una menor polaridad en la superficie del péptido.

Aunque también presentan una **desventaja** sintética, en numerosas ocasiones la etapa de ciclación no es sencilla y el rendimiento del producto final disminuye drásticamente. En algunas ocasiones incluso, sea por el tamaño de la cadena peptídica o por la disposición que adopta en la etapa previa, la ciclación no es posible.<sup>63</sup>

Los ciclos de cuatro, cinco y seis residuos son los que presentan propiedades farmacológicas más interesantes. Este hecho es debido a que tienen el tamaño suficiente para contener los sustituyentes imprescindibles para ser reconocidos por el receptor pero son suficientemente pequeños como para crear una restricción apropiada para tener una buena selectividad. Los ciclos de cinco y seis aminoácidos además, provocan la restricción suficiente sin forzar la presencia de uniones peptídicas con disposición *cis*.

Entre los peptidomiméticos cíclicos inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  que contienen la triada Arg-Gly-Asp (RGD) en su estructura<sup>64</sup> cabe destacar el Eptifibatide,<sup>65</sup> RGD4C<sup>66</sup> y EMD 121974 entre otros (*Figura 18*).<sup>67</sup>

---

<sup>61</sup> Hess, S.; Ovadia, O.; Shalev, D. E.; Senderovich, H.; Qadri, B.; Yehezkel, T.; Salitra, Y.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6201–6211.

<sup>62</sup> Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.

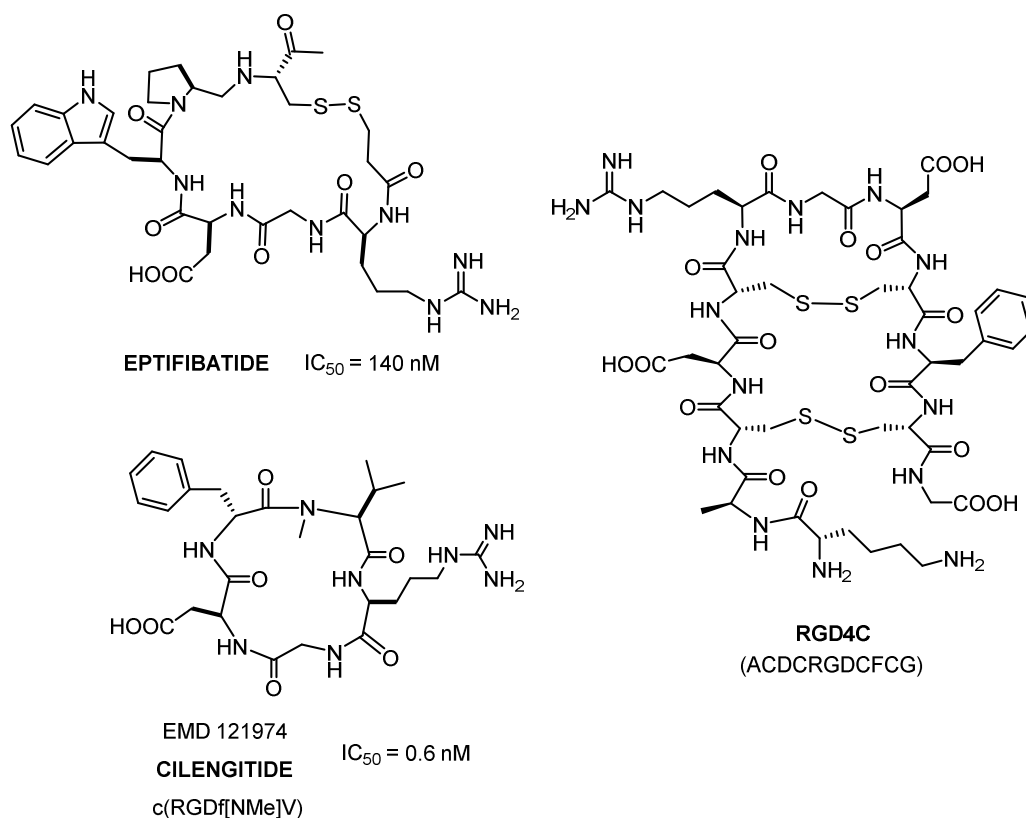
<sup>63</sup> a) Davies, J. S.; *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471–501. b) Davies, J. S.; *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471–501. c) Li, P.; Roller, P. P.; Xu, J.; *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411–440. d) Li, P.; Roller, P. P.; Xu, J.; *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411–440. e) Schmidt, R.; Neubert, K.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 502–507. f) Kessler, H.; *Trends in Drug Research*, Ed. Elsevier, Amsterdam **1990**, 73–84. g) Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.

<sup>64</sup> Ejemplos de miméticos cíclicos con estructura RGD inhibidores de otras integrinas: Scarborough, R. M.; Naughton, M. A.; Teng, W.; Rose, J. W.; Phillips, D. R.; Nannizzi, L.; Arfsten, A.; Campbell, A. M.; Charo, I. F.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1066–1073.

<sup>65</sup> Fisher, M. J.; Gunn, B.; Harms, C. S.; Kline, A. D.; Mullaney, J. T.; Nunes, A.; Scarborough, R. M.; Arfsten, A. E.; Skeleton, M. A.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Jakubowsky, J. A.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2085–2101.

<sup>66</sup> Koivunen, E.; Wang, B.; Rouslathi, E.; *Bio-Technology* **1995**, *13*, 265–270.

<sup>67</sup> Historia y desarrollo químico del Cilengitide: Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H.; *Anti-Cancer Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.



**Figura 18.** Ejemplo de inhibidores cíclicos que contienen la triada RGD.

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”®.

El **RGD4C** es un péptido compuesto por dos macrociclos limitados por enlaces disulfuro y está siendo empleado en el estudio de bacteriófagos en la terapia contra el cáncer;<sup>68</sup> es 20 veces más potente que otros miméticos con un solo enlace disulfuro y 200 veces más potente que los péptidos abiertos más utilizados. El problema de este compuesto es que puede adoptar diferentes conformaciones.

El **EMD 121974** o **Cilengitide**® nace del estudio de Aumailley, Kessler y sus colaboradores<sup>41b</sup> sobre la influencia de los *D*-aminoácidos en la conformación que adopta el ciclo  $c(\text{RGDFV})$  y del posterior estudio de Dechantsreiter, Kessler y sus colaboradores sobre la influencia de la *N*-metilación.<sup>69</sup> Es una de las sustancias inhibitoras de integrinas  $\alpha_V\beta_3$  más potentes y selectivas (frente a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ )

<sup>68</sup> Yata, T.; Nianiaris, N.; Songsivilai, S.; Hajitou, A.; *Gene Therapy of Cancer* **2014**, 479–490.

<sup>69</sup> Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H.; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033–3040.

que existen y demuestra baja toxicidad.<sup>70</sup> En el año 2007 fue aceptado como medicamento huérfano para el tratamiento del glioblastoma humano (un tipo de tumor cerebral).<sup>71</sup> En estudios con ratones de fase I y II el Cilengitide demostró ser eficaz provocando la regresión del tumor tanto empleado como monoterapia como en combinación con radioterapia.<sup>72</sup> Sin embargo, en estudios de fase III, el Cilengitide no mostró mejoras significativas frente al placebo en los pacientes con glioblastoma.<sup>73</sup>

Desde el descubrimiento del Cilengitide se han realizado infinidad de investigaciones en este campo a su alrededor; un estudio que nos llama especialmente la atención es la sustitución de los enlaces amida por enlaces éster realizado por el grupo de Cupido y Albericio.<sup>74</sup> A este tipo de compuestos que combinan enlaces amida y éster se les denomina **depsipéptidos** o ciclopéptidos heterodéticos.

Como ya se ha mencionado, tanto los péptidos naturales como los sintéticos, para unirse a un receptor y mostrar actividad, tienen que adoptar una conformación concreta, que no tiene porque ser la conformación más estable. Trabajar con péptidos cíclicos ayuda a tener una preorganización. Los ciclos peptídicos de pequeño tamaño determinan su conformación (o grupo de conformaciones) con ayuda de enlaces de hidrógeno. Si se cambia precisamente estos puntos donde se crean los enlaces de

---

<sup>70</sup> Eskens, F. A. M. L.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Bottcher, S.; Wynendaele, W.; Drevs, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T.; *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 917–926.

<sup>71</sup> a) Reardon, D. A.; Fink, K. L.; Mikkelsen, T.; Cloughesy, T. F.; O'Neill, A.; Plotkin, S.; Glantz, M.; Ravin, P.; Raizer, J. J.; Rich, K. M.; Schiff, D.; Shapiro, W. R.; Burdette-Radoux, S.; Dropcho, E. J.; Wittemer, S. M.; Nippgen, J.; Picard, M.; Nabors, L. B.; *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5610–5617. b) Burke, P. a.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; DeNardo, G. L.; *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263–4272.

<sup>72</sup> a) Gilbert, M. R.; Kuhn, J.; Lamborn, K. R.; Lieberman, F.; Wen, P. Y.; Mehta, M.; Cloughesy, T.; Lassman, A. B.; DeAngelis, L. M.; Chang, S.; Prados, M.; *J. Neurooncol* **2012**, *106*, 147–153. b) Nabors, L. B.; Mikkelsen, T.; Hegi, M. E.; Ye, X.; Batchelor, T.; Lesser, G.; Peereboom, D.; Rosenfeld, M. R.; Olsen, J.; Brem, S.; Fisher, J. D.; Grossman, S. A.; *Cancer* **2012**, *118*, 5601–5607. c) Stupp, R.; Hegi, M. E.; Neyns, B.; Goldbrunner, R.; Schlegel, U.; Clément, P. M. J.; Grabenbauer, G. G.; Ochsenbein, A. F.; Simon, M.; Dietrich, P. Y.; Pietsch, T.; Hicking, C.; Tonn, J. C.; Diserens, A. C.; Pica, A.; Hermisson, M.; Krueger, S.; Picard, M.; Weller, M.; *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2712–2718. d) Mikkelsen, T.; Brodie, C.; Finniss, S.; Berens, M. E.; Rennert, J. L.; Nelson, K.; Lemke, N.; Brown, S. L.; Hahn, D.; Neuteboom, B.; Goodman, S. L.; *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2719–2727.

<sup>73</sup> Eisele, G.; Wick, A.; Eisele, A. C.; Clément, P. M.; Tonn, J.; Tabatabai, G.; Ochsenbein, A.; Schlegel, U.; Neyns, B.; Krex, D.; Simon, M.; Nikkhah, G.; Picard, M.; Stupp, R.; Wick, W.; Weller, M.; *J. Neurooncol* **2014**, *117*, 141–145.

<sup>74</sup> Cupido, T.; Spengler, J.; Ruiz-Rodriguez, J.; Adan, J.; Mitjans, F.; Puilats, J.; Albericio, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2732–2737.

hidrógeno, las conformaciones que adoptarán los péptidos, y las poblaciones de cada conformación, podrían ser diferentes, alterando así la actividad.<sup>75</sup>

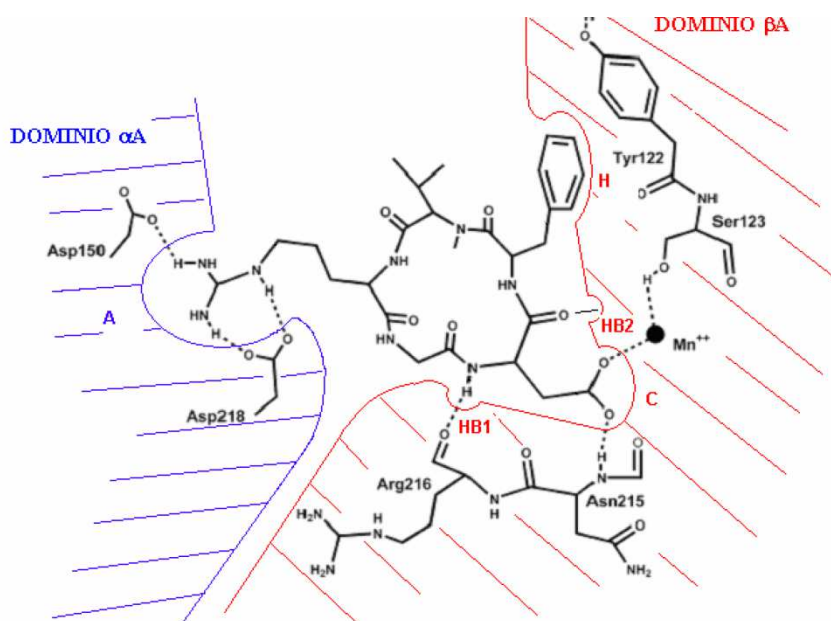
Cupido y Albericio empleando la molécula de Cilengitide como modelo, sintetizaron una serie de depsipéptidos con resultados diversos e interesantes. Todos estos miméticos sintetizados, en mayor o menor medida, han resultado ser antagonistas de los ligandos vitronectina y fibronectina. Demostrando así que una modificación de un enlace estructural puede dar lugar a cambios importantes en la actividad del compuesto. Hay que añadir que los depsipéptidos tienen además mayor estabilidad metabólica, y que los enlaces de tipo éster no son reconocidos por las peptidasas.

Es importante mencionar que el Cilengitide además ha servido para la obtención de la estructura de **rayos X** del segmento extracelular de la integrina  $\alpha_V\beta_3$ . Gracias a este logro ha sido posible una definición más precisa de los centros activos de los dominios  $\alpha_A$  y  $\beta_A$  de la integrina  $\alpha_V\beta_3$ . Las modelizaciones llevadas a cabo con el Cilengitide 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  $\beta_A$  tal y como se representa en la *Figura 19*.<sup>76</sup>

---

<sup>75</sup> Los cambios en la conformación de las proteínas por la influencia del intercambio de enlaces amida por enlaces de tipo éster, y por lo tanto, la eliminación de sus correspondientes enlaces de hidrógeno, ha sido extensamente estudiada. Esta es una pequeña selección de ejemplos: a) Scheike, J. A.; Baldauf, C.; Spengler, J.; Albericio, F.; Pisabarro, M. T.; Kokschi; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7766–7769. b) Powers, E. T.; Deechongkit, S.; Kelly, J. W.; *Adv. Protein Chem.* **2005**, *72*, 39–78. c) Jenkins, C. L.; Vasbinder, M. M.; Miller, S. J.; Raines, R. T.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2619–2622. d) Koh, J. T.; Cornish, V. W.; Schultz, P. G.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 11314–11322.

<sup>76</sup> a) Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P.; *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *19*, 495–507. b) Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B. S.; Wang, J. H.; Springer, T. A.; *Nature* **2004**, *432*, 59–67. c) Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K. E.; Novellino, E.; Kessler, H.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393–4404. d) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A.; *Science* **2002**, *296*, 151–155. e) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Diefenbach, B.; Dunker, R.; Scott, D.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A.; *Science* **2001**, *294*, 339–345.



**Figura 19.** Representación de los centros de interacción del Cilengitide con el receptor de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Con la intención de encontrar compuestos más efectivos en la inhibición del crecimiento de tumores cancerígenos, la presente Tesis Doctoral se centra en la síntesis de una **librería de compuestos inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$** , tanto **“miméticos abiertos”** como **ciclopéptidos**, que por otro lado serán tanto **homodéticos** como **depsipéptidos**.

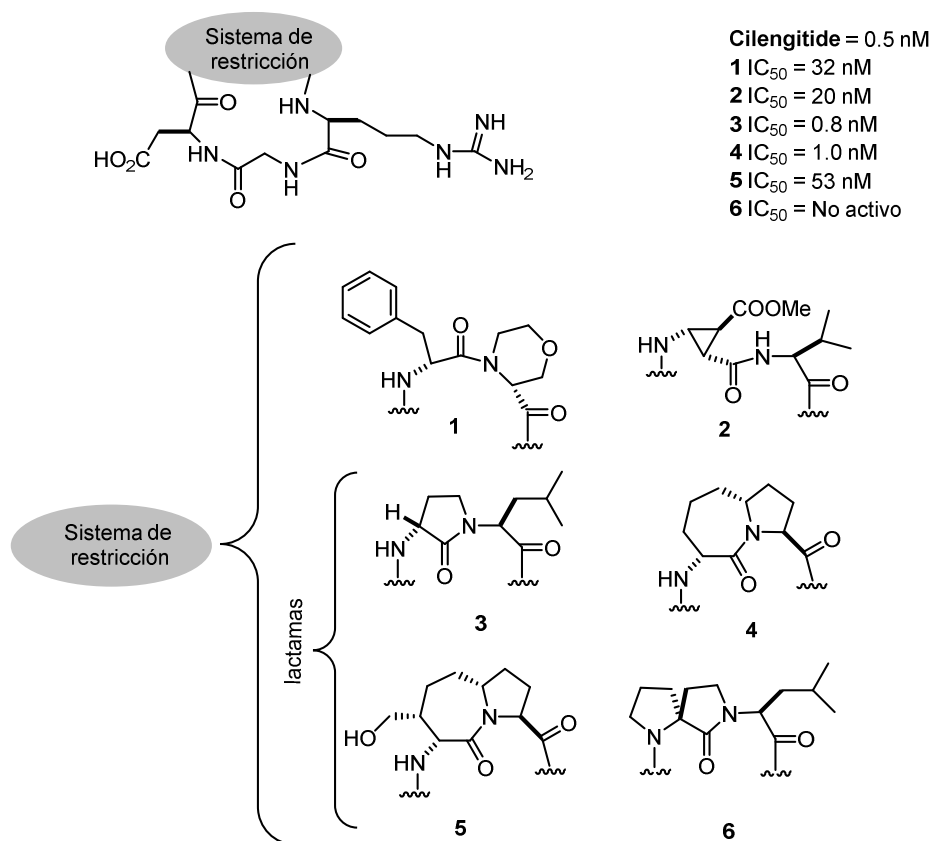
Para tal fin la estrategia utilizada consiste en la introducción de  **$\beta$ -lactamas** tanto en el macrociclo, estrategia conocida por nuestro laboratorio de investigación desde hace años, como en los peptidomiméticos de cadena abierta.

### 2.5.2. Antecedentes en la síntesis de ciclopéptidos RGD lactámicos

Una de las estrategias más utilizadas para inducir giros concretos y controlados en los péptidos cíclicos es la introducción de ciclos lactámicos y espirolactámicos, llamados **“lactamas de Freidinger”**<sup>77,6</sup> (Figura 20).

<sup>77</sup> a) Perdih, A.; Kikelj, D.; *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1525–1556. b) Freidinger, R. M.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5553–5566. c) Souers, A. J.; Ellman, J. A.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431–7448. d) Müller, G.; Hessler, G.; Decornez, H. Y.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 894–896. e) Gante, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699–1720. f) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R.; *Science* **1980**, *210*, 656–658.





**Figura 20.** Diferentes tipos de ciclopéptidos con conformaciones restringidas mediante la incorporación de un ciclo, los compuestos **3**, **4**, **5** y **6** contienen en su estructura “Lactamas de Freidinger”. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos **1**<sup>78</sup>, **2**<sup>79</sup>, **3**<sup>80</sup>, **4**<sup>81</sup>, **5**<sup>82</sup> y **6**<sup>80</sup> con respecto al Cilengitide.

Estos **sistemas de restricción** inducen en su mayoría giros  $\beta$ , y hay que mencionar que la distribución espacial de los grupos de reconocimiento puede ser modulada debido a la flexibilidad del enlace de hidrógeno formado entre el carbonilo y la amina. Además la inserción de un ciclo adicional dentro del macrociclo reduce aún más las poblaciones conformacionales mayoritarias del péptido.

<sup>78</sup> Cini, N.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Bottoncetti, A.; Raspanti, S.; Pupi, A.; Guarna, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1542–1549.

<sup>79</sup> Urman, S.; Gaus, K.; Yang, Y.; Strijowski, U.; Sewald, N.; de Pol, S.; Reiser, O.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3976–3978.

<sup>80</sup> Haubner, R.; Schmitt, W.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H.; *J. Am. Soc.* **1996**, *118*, 7881–7891.

<sup>81</sup> Belsivi, L.; Bernardi, A.; Checchia, A.; Manzoni, L.; Potenza, D.; Scolastico, C.; Castorina, M.; Cupelli, A.; Giannini, G.; Carminati, P.; Pisano, C.; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001–1004.

<sup>82</sup> Arosio, D.; Manzoni, L.; Araldi, E. M. V.; Caprini, A.; Monferini, E.; Scolastico, C.; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1611–1617.

En la bibliografía hay numerosos estudios sobre este campo, sin embargo, no se ha conseguido incrementar la actividad inhibidora de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  en relación al Cilengitide. Además este modelo presenta algunas limitaciones:

- En numerosas ocasiones se requieren dos ciclos para crear el giro  $\beta$  deseado.
- El elemento de restricción y los grupos de reconocimiento se encuentran en el mismo lugar presentando interacciones no deseadas, especialmente en receptores di- y politópicos.<sup>83</sup>
- Los elementos de restricción son en su mayoría de un tamaño considerable ocasionando problemas estéricos a la hora de aproximarse al receptor.
- El diseño de librerías de miméticos no es generalizable y en ocasiones los compuestos son sintéticamente no accesibles.

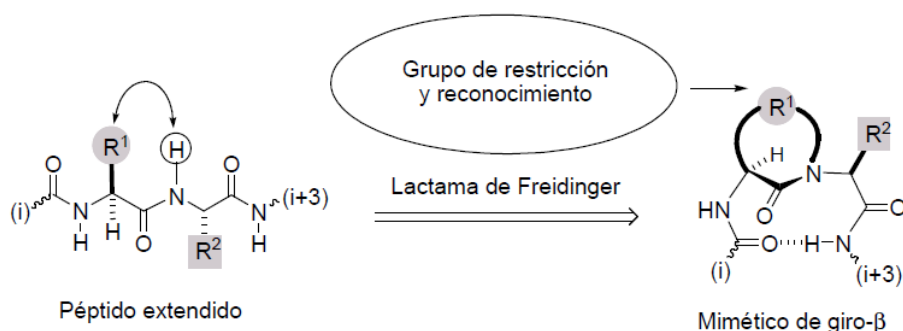
#### **2.5.2.1. Separación del grupo de reconocimiento del ciclo que genera la restricción conformacional**

El modelo de restricción conformacional de Freidinger (*Esquema 5*) implica la formación de un puente alquílico interresidual entre el sustituyente  $R^1$  de la posición  $C\alpha$  del residuo (i+1) y el átomo de nitrógeno contiguo en el residuo (i+2). Así, el sustituyente  $R^1$  modificado pasa a formar parte del nuevo residuo pseudopéptido cíclico y se logra inducir un cambio direccional en la cadena. Sin embargo, la alteración del residuo  $R^1$  podría ser un problema ya que este grupo podría jugar un papel importante en el reconocimiento con el receptor; además el nuevo ciclo creado podría impedir el acercamiento al receptor por razones estéricas. Teniendo en cuenta estas observaciones, se planteó la mejora de este modelo creando un grupo de restricción que no alterara los grupos de reconocimiento y que presentará el tamaño mínimo para no crear impedimentos estéricos con el receptor;<sup>84</sup> los resultados del desarrollo de esta hipótesis son los que se describen a continuación.

---

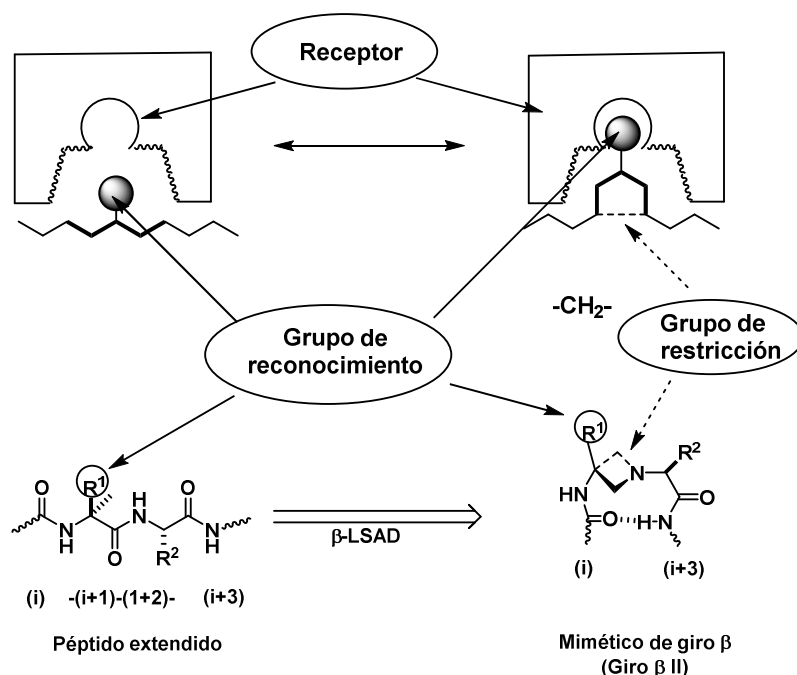
<sup>83</sup> Lehn, J. M.; Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F.; *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon, Oxford, **1996**.

<sup>84</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Galarza, R.; Khamrai, U. K.; Vazquez, J.; Pascual-Teresa, B.; Nieto, P. M.; Linden, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3056–3058.



**Esquema 5.** Modelo de Freidinger para inducir cambios direccionales en cadenas peptídicas mediante la formación de una lactama interresidual.

Mediante estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (*Esquema 6*), se pudo establecer que la inserción de un puente metileno entre las posiciones C $\alpha$  (i+1) y N (i+2) de una cadena peptídica lineal provocaba 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>85</sup>

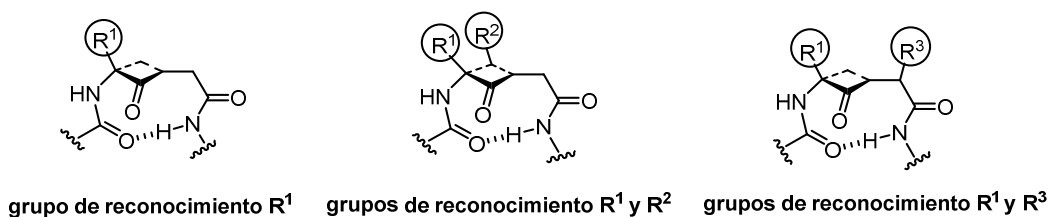


**Esquema 6.** Principio de separación de elementos de restricción y de reconocimiento mediante peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos.

<sup>85</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Miranda, J. I.; Fratila, R. M.; Matute, C.; Domercq, M.; Gago, F.; Martín-Santamaría, S.; Linden, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243–16260.

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, consiguiendo el mismo tipo de giro que presentan las lactamas de Freindinger pero resolviendo algunas de las limitaciones más importantes.

En nuestro grupo de investigación se estudiaron los giros resultantes de diferentes  $\beta$ -lactamas con intención de lograr estructuras con los grupos de reconocimiento posicionados en diferentes lugares.<sup>86</sup> En todos los casos se logró una fuerte estabilización de la conformación  $\beta$ -girada de tipo  $\beta$ -II o  $\beta$ -II’:



**Figura 21.** Diferentes propuestas para receptores tanto monotópicos como ditópicos.<sup>85,86</sup>

Curiosamente los primeros peptidomiméticos naturales conocidos fueron antibióticos  $\beta$ -lactámicos; cuyo esqueleto de 3-amino- $\beta$ -lactama imita la secuencia (D)-Ala-(D)-Ala, un componente esencial de los peptidoglicanos que forman las paredes bacterianas. Hay que añadir que hoy en día la síntesis y aplicaciones de las  $\beta$ -lactamas están ampliamente descritas<sup>87</sup> ya que se encuentran en diversos compuestos con relevancia biológica<sup>88</sup> además de considerarse como intermedios sintéticos polivalentes.<sup>89</sup>

<sup>86</sup> a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentová, E.; Jiménez, A.; Oyarbide, J.; Fratila, R. M.; Mirada, J. I.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 101–104. b) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Benito, A.; Cuervo, L.; Fratila, R. M.; Jiménez, A.; Loinaz, I.; Miranda, J. I.; Pytlewska, K. R.; Micle, A.; Linden, A.; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4443–4446.

<sup>87</sup> a) Aranda M. T.; Perez-Faginas, P.; Gonzalez-Muñiz, R.; *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 325–341. b) Singh, G. S.; D’hooghe, M.; De kimpe, N.; *Comprehensive Heterocyclic Chemistry-III*; Elsevier: Oxford, **2008**. c) Singh, G. S.; *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7631–7649. d) Gunda, I. G.; *The Organic Chemistry of  $\beta$ -Lactams*; VCH Publishers, Inc. **1993**.

<sup>88</sup> Janecki, T.; *Natural Lactones and Lactams. Synthesis, Occurrence and Biological Activity*; Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.

<sup>89</sup> a) Alcaide, B.; Almendros, P.; Arangoncillo, C.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4437–4492. b) Ojima, I.; *Adv. Asym. Synth.* **1995**, *1*, 95–146.

### 2.5.2.2. Síntesis de ciclopéptidos RGD lactámicos empleando el diseño $\beta$ -LSAD

Aplicando el diseño  $\beta$ -LSAD la Doctora I. Loinaz<sup>90</sup> sintetizó el primer ciclopeptidomimético  $\beta$ -lactámico, el compuesto **II**, análogo del compuesto *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] **I** (Figura 22).

A partir del estudio conformacional del mimético **II** en disolución acuosa mediante RMN y Dinámica Molecular, se estableció que la  $\beta$ -lactama, estabilizaba giros- $\gamma$  en ciclopentapéptidos y no giros  $\beta$ , como ocurría en péptidos lineales o en el ciclopentapéptido **I**.

**Ensayos del nivel de adhesión**<sup>91,92</sup> sobre células HUVEC<sup>93</sup> sobreexpresadas en integrina  $\alpha_v\beta_3$  y cultivadas sobre vitronectina (ligando natural de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ ), mostraron que la integrina  $\alpha_v\beta_3$  mostraba una preferencia hacia el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **II** ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ) del mismo orden que la que presentaba hacia el Cilengitide ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ) y claramente superior a la del compuesto **I**.

Estos resultados positivos dieron lugar a subsiguientes investigaciones de este tipo de moléculas  $\beta$ -lactámicas en el laboratorio. Siguiendo el trabajo de la Doctora I. Loinaz, el Doctor Joseba Oyarbide<sup>94</sup> investigó la influencia de sustituyentes metilo en el residuo (5) del macrociclo. Para ello sintetizó los ciclopentapeptidomiméticos **IIIa**, **IIIb** y **IIIc** (Figura 23).

---

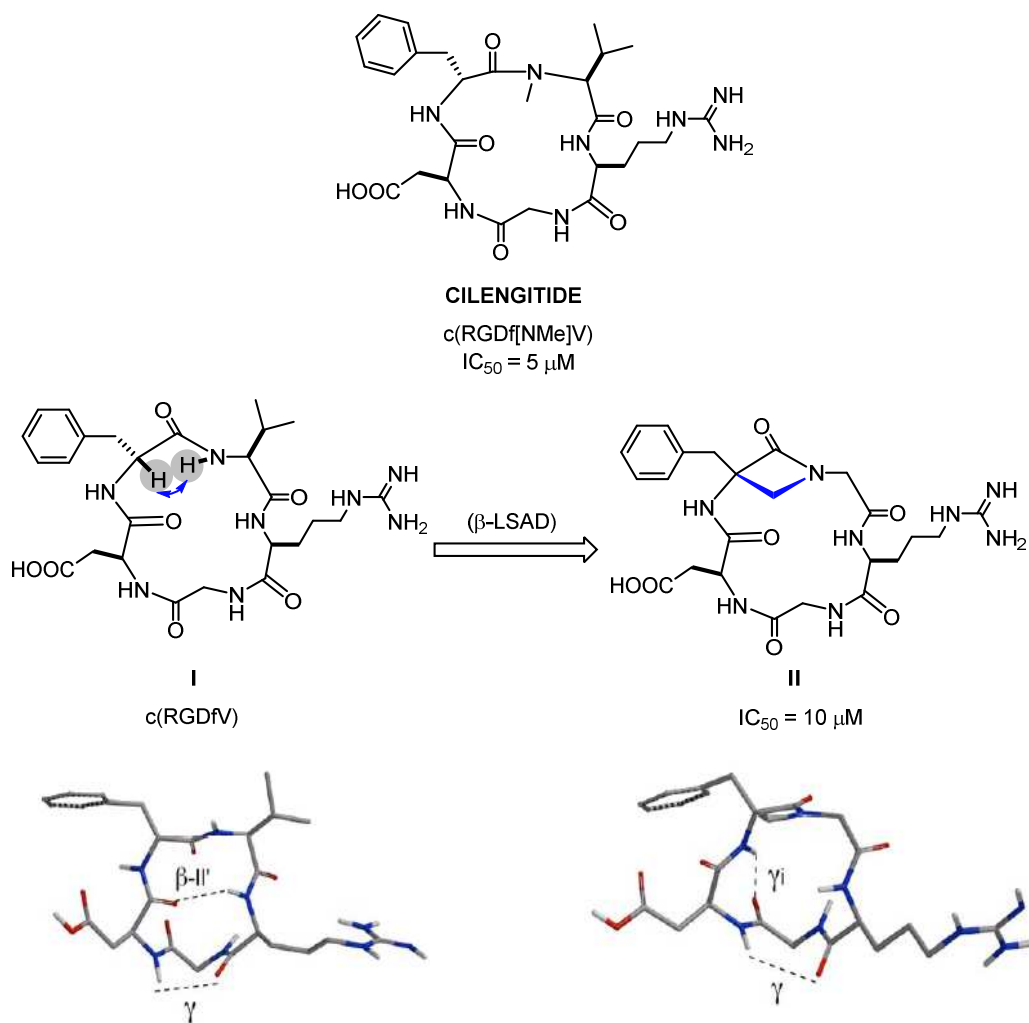
<sup>90</sup> Loinaz, I.; Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Estudio de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", **2004**.

<sup>91</sup> El ensayo del nivel de adhesión da información sobre la interacción del ligando sintético con el receptor en competición con el ligando natural desplazándolo. Para más información ver *el apartado 4.2.4*, pág. 192.

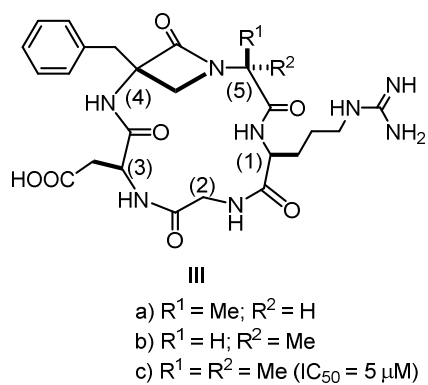
<sup>92</sup> Todos los ensayos biológicos de las moléculas sintetizadas en nuestro laboratorio fueron desarrollados en los laboratorios de la empresa Genetadi S. L., por los Doctores José Luis Castrillo, Silvia Ávila y Antonio Laso.

<sup>93</sup> Las células HUVEC son las células madres obtenidas del cordón umbilical (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Estas células son fuertes y estables y por ser endoteliales se sabe que poseen las integrinas que nos interesan.

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



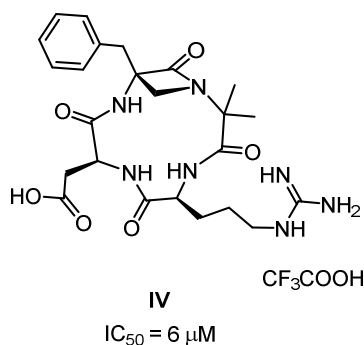
**Figura 22.** Estructura y conformación mayoritaria en disolución acuosa de los ciclopeptidos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] I y *ciclo*-[Asp-D-Phe-(β-Lactama)-Arg-Gly] II.



**Figura 23.** Ciclopeptidomiméticos con diferente sustitución en el residuo (5).

De los tres compuestos sintetizados el **IIIc** fue el que mayor capacidad de desplazamiento del ligando natural presentó ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ), con una actividad similar a la del compuesto de referencia Cilengitide.

Por otro lado el Doctor J. Oyarbide con objetivo de estudiar la influencia del número de residuos del ciclopéptido y la disminución de la distancia entre los aminoácidos aspártico y arginina sintetizó el **tetrapéptido IV** (*Figura 24*) derivado del pentapéptido **IIIc**, **prescindiendo de la glicina** perteneciente a la triada RGD. Inicialmente se preparó este compuesto para profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad en el receptor  $\alpha_V\beta_3$  y sorprendentemente los resultados de inhibición de la adhesión de la vitronectina ( $IC_{50} = 6 \mu M$ ) fueron comparables a los de los pentapéptidos.



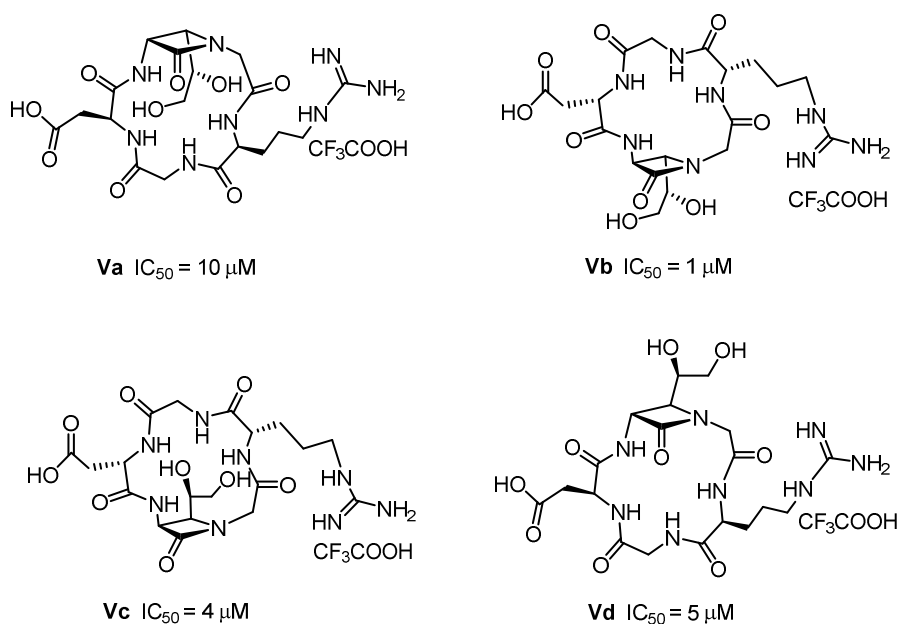
**Figura 24.** Ciclotetrapeptidomimético IV.

Por otro lado, hasta este momento no se conocían apenas ejemplos de ciclopéptidos de RGD portadores de **grupos polares** en los residuos (4) y (5) del ciclo, y por ello el Doctor X. Fernández<sup>95</sup> decidió reemplazar por primera vez la  $\beta$ -lactama 3,3-disustituida por una 3,4-disustituida incorporando además un grupo hidrofílico en el carbono C4 de la  $\beta$ -lactama (*Figura 25*).<sup>96</sup> El proyecto del Doctor X. Fernández está basado en una observación de Kessler<sup>53</sup> sobre la mejora de actividad que puede tener la incorporación de residuos portadores de cadenas polares en esa región del receptor. Hay que comentar que aunque en la mayoría de los ejemplos la actividad inhibidora del compuesto que estudian es menor, por lo que se especula, podría haber un bolsillo hidrofílico.

<sup>95</sup> Fernández, X.; Tesis Doctoral, UPV/EHU. "ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD: síntesis, estudio conformacional, actividad biológica y análisis génico" **2010**.

<sup>96</sup> La reacción de Staudinger ofrece una gran versatilidad estructural, pudiendo introducir grupos de diferente naturaleza en las posiciones C3 y C4.

El trabajo del Dr. Fernández concluyó con la síntesis de las moléculas diastereoméricas **Va**, **Vb**, **Vc** y **Vd** (Figura 25). La molécula **Va** ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ) resultó tener una actividad de la inhibición de la adhesión de la vitronectina inferior al Cilengitide ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ) y las moléculas **Vc** ( $IC_{50} = 4 \mu M$ ) y **Vd** ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ) lograron igualar la actividad del Cilengitide; pero la molécula **Vb** ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ) logró superar la actividad del Cilengitide hasta llegar a ser 5 veces mayor. Se comprobó también que estos compuestos no presentaban toxicidad en cultivos celulares.

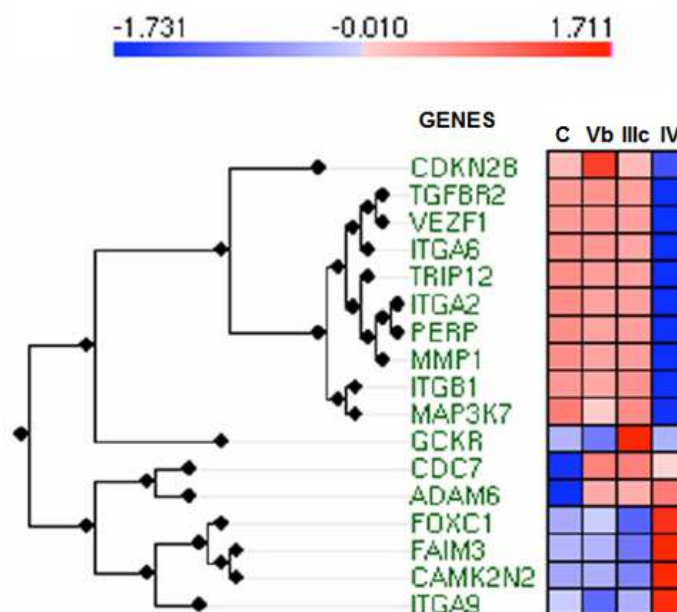


**Figura 25.** Ciclopentapeptidomiméticos 3,4-disustituidos.

Cabe destacar que un análisis más profundo sobre la respuesta biológica de los compuestos **IIIc**, **IV** y **Vb** mediante el estudio de la **expresión génica** por *microarrays*, reveló que el tetrapéptido carente de glicina **IV** mostraba un comportamiento génico opuesto al de sus análogos pentapeptídicos, aunque su nivel de inhibición la adhesión del ligando vitronectina fuera similar (Esquema 7).<sup>97</sup>

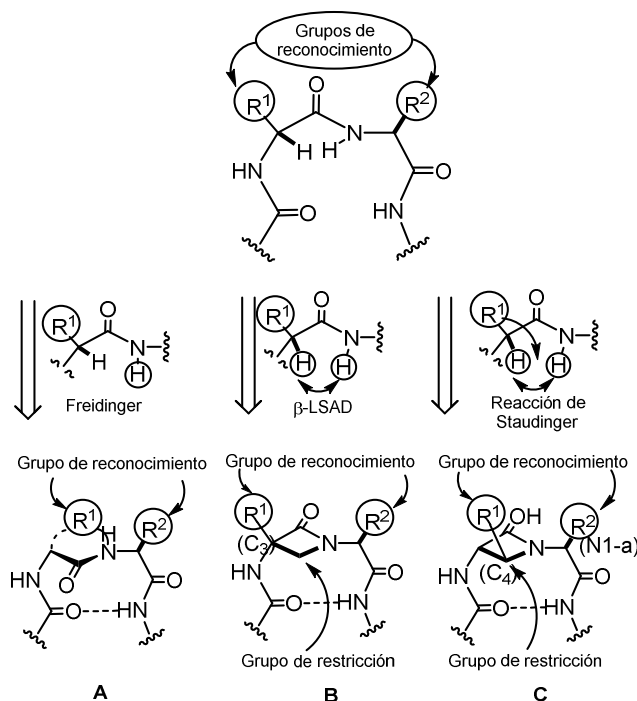
<sup>97</sup> Aizpurua, J. M.; Ganboa, J. I.; Palomo, C.; Loinaz, I.; Oyarbide, J.; Fernandez, X.; Balentová, E.; Fratila, R. M.; Jiménez, A.; Miranda, J. I.; Laso, A.; Ávila, S.; Castrillo, J. L.; *ChemBioChem* **2011**, *12*, 401–405.





**Esquema 7.** Resultados del análisis de expresión génica por *microarrays* donde el compuesto **C** es la molécula Cilengitide.

A modo de resumen en el *Esquema 8* se muestran las diversas estrategias sintéticas abordadas en nuestro grupo de investigación frente a la clásica de Freidinger:



**Esquema 8.** Resumen de las diversas estrategias empleadas.



## ***OBJETIVOS GENERALES***

---



### 3. Objetivos generales

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el diseño, la síntesis y caracterización, y el estudio biológico y conformacional, de peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos inhibidores de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Las moléculas objetivo de este proyecto son tanto ciclopéptidos (*Capítulo 1*) como miméticos de cadena abierta (*Capítulo 2*).

Para las síntesis profundizaremos en la estrategia desarrollada en nuestro grupo de investigación en la que se diseñan macrociclos con  $\beta$ -lactamas como elementos de restricción que limitan la libertad conformacional del macrociclo en disolución. Las  $\beta$ -lactamas que emplearemos serán  $\beta$ -lactamas 3,4-disustituidas, ya que son las que han presentado mejores resultados biológicos.



## *CAPÍTULO 1*

---

### **Miméticos cíclicos**





## ***Objetivos del capítulo 1***

---



## 4. Capítulo 1: Miméticos cíclicos

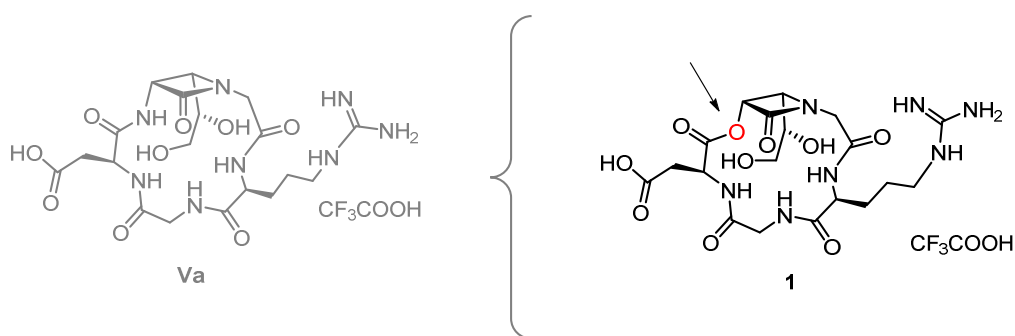
### 4.1. Objetivos

De acuerdo con los antecedentes del grupo presentados anteriormente, a continuación se definen los objetivos específicos del primer capítulo de la presente Tesis Doctoral.

#### 4.1.1. Síntesis de miméticos cíclicos de los ligando naturales de la integrina $\alpha_v\beta_3$

##### 4.1.1.1. Depsipéptido 1

La primera molécula que se planteó como objetivo fue un depsipéptido que nace de la sustitución de un enlace peptídico del macrociclo **Va** por un enlace de tipo éster (*Ester Scan*).<sup>74</sup> La molécula **1** se diseñó con objeto de estudiar los cambios en las preferencias conformacionales que, presumiblemente y de acuerdo a los datos de la bibliografía, se producen en un macrociclo tras modificar la naturaleza de alguno de los enlaces peptídicos.<sup>75</sup>

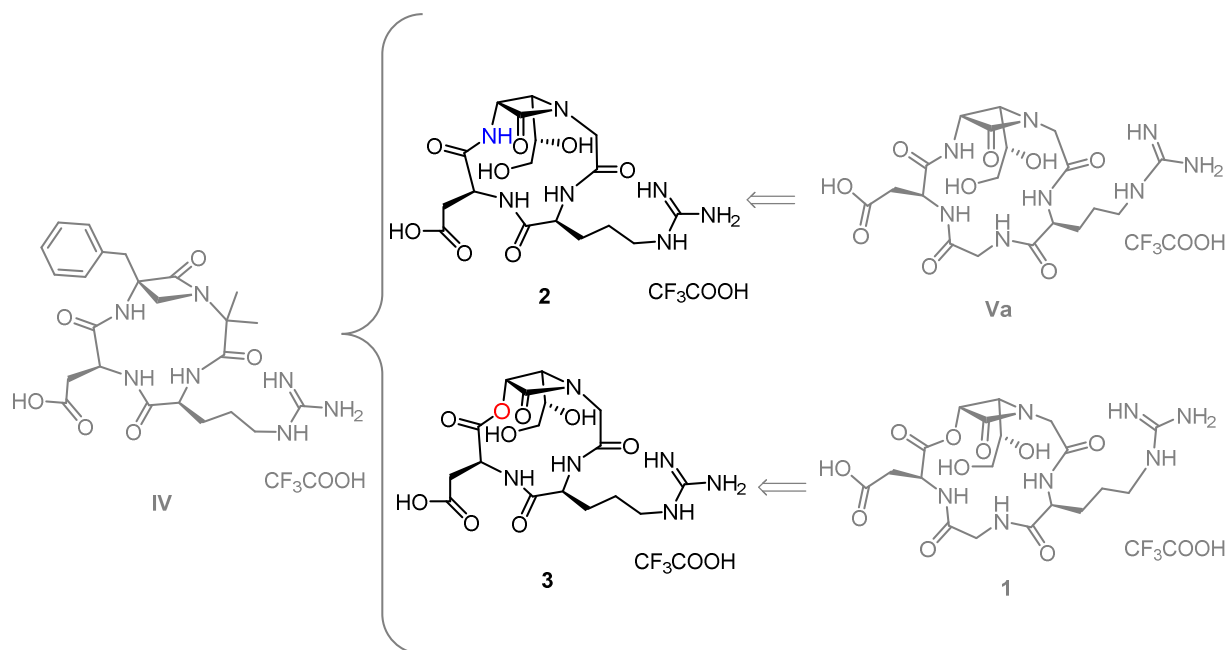


Esquema 9. Molécula objetivo 1.

##### 4.1.1.2. Tetrapeptidomiméticos 2 y 3

Como se ha señalado en la introducción, en el apartado 2.5.2.2 (pág. 49), la molécula tetrapeptídica **IV**, preparada mediante la elicitación de la glicina en la secuencia RGD, presenta una adhesión frente al receptor  $\alpha_v\beta_3$  similar a su análogo pentapeptídico **IIIc**, sin embargo, en cuanto a su expresión génica, muestra un

comportamiento agonista respecto al ligando natural vitronéctina.<sup>97,98</sup> Para comprobar y poder generalizar el comportamiento agonista del tetrapéptido **IV** nos planeamos sintetizar los compuestos **2** y **3** miméticos tetrapeptídicos RD de la molécula objetivo **1** y la molécula **Va**, con exclusión de la glicina.



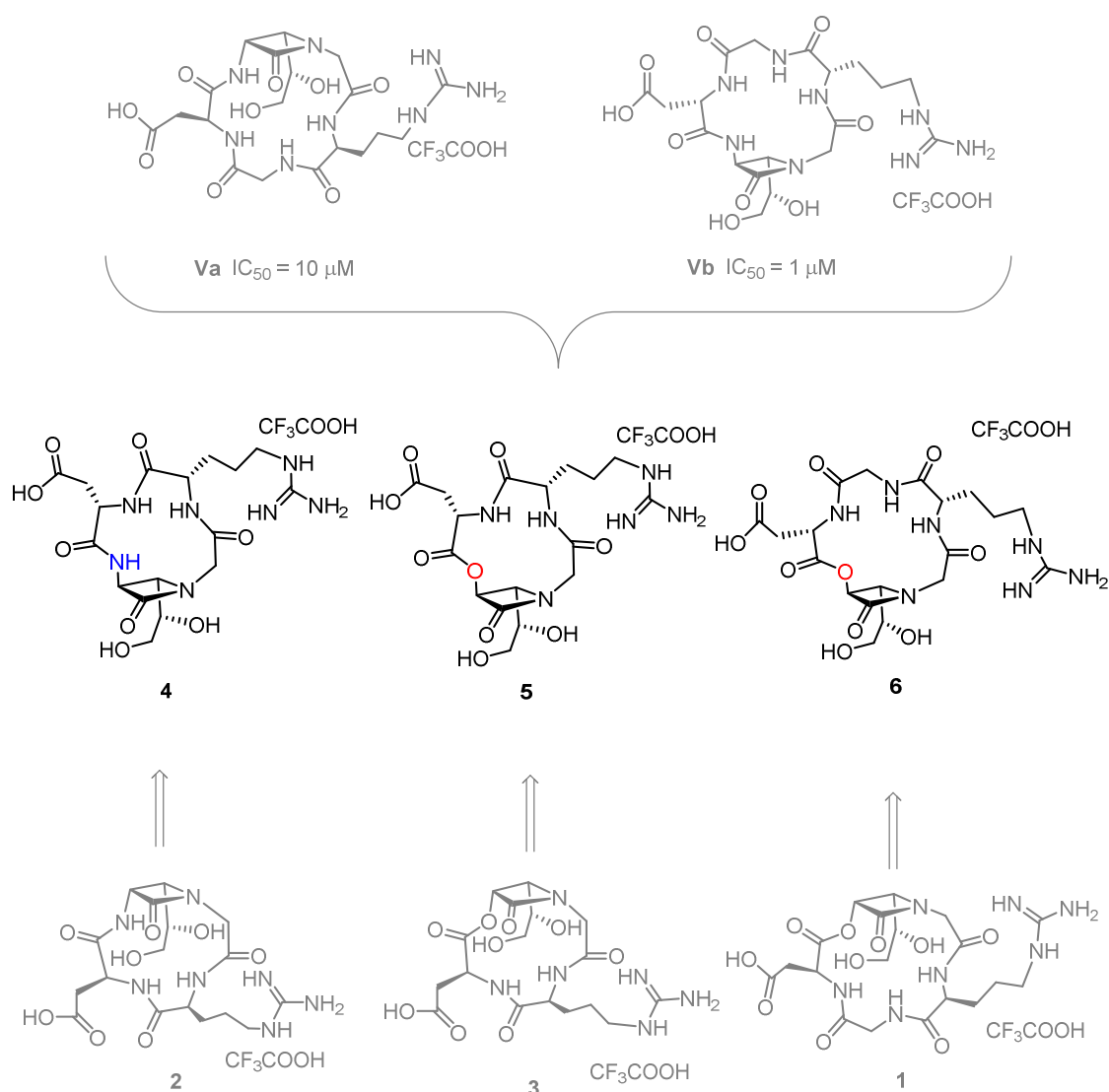
Esquema 10. Moléculas objetivo **2** y **3**.

#### 4.1.1.3. Miméticos a partir de *trans*-lactamas **4**, **5** y **6**

Habiéndose comprobado que diferencias en la configuración de los macrociclos RGD **Va** y **Vb** conducen a variaciones significativas en la actividad biológica de dichos compuestos,<sup>41b,95</sup> se planteó también como objetivo sintetizar los análogos de los ciclos **1**, **2** y **3** de configuración *trans* en C3 y C4 de la  $\beta$ -lactama (**4**, **5** y **6**).

<sup>98</sup> Para más información véase el apartado 4.2.4 (pág. 192).

## Objetivos

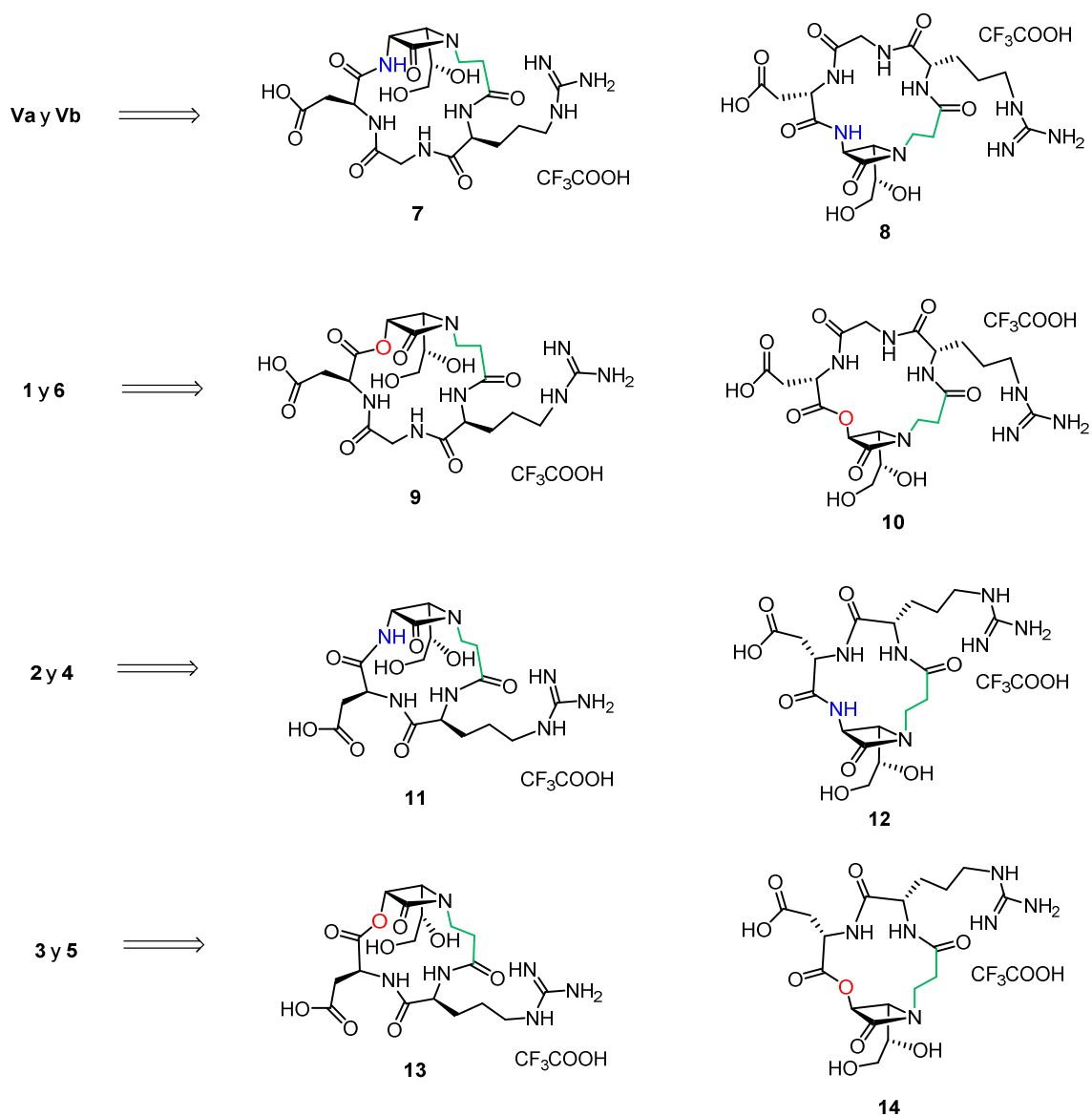


**Figura 26.** Moléculas objetivo **4, 5 y 6**.

### 4.1.1.4. Incremento en la flexibilidad de los ciclos 7–14

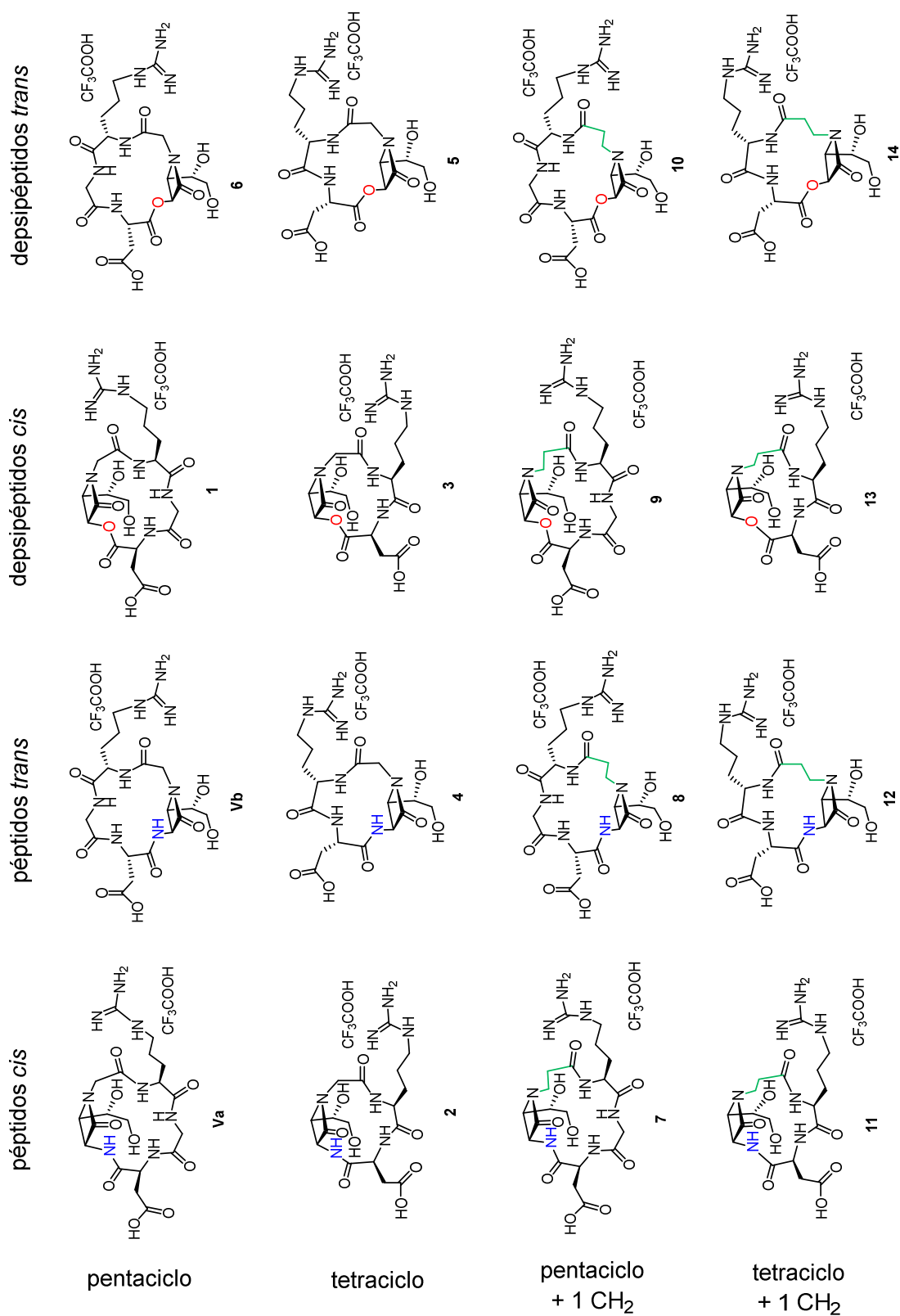
Nos planteamos también incrementar la flexibilidad de los ciclopéptidos y los ciclodepsipéptidos mediante la adición de un metileno en la cadena del macrociclo con la intención de, en primer lugar, estudiar la influencia de los diferentes grados de rigidez del macrociclo en la interacción con el receptor;<sup>43</sup> y en segundo lugar, facilitar la etapa de ciclación, ya que al disponer de una cadena más grande y flexible, los extremos de las cadenas podrían acercarse con mayor facilidad.

Para abordar este objetivo se sintetizaron las moléculas **7–14** de las que se espera una mayor flexibilidad estructural gracias al metileno añadido. Sus estructuras derivan de los compuestos **1–6, Va y Vb** (*Esquema 11*).



Esquema 11. Moléculas objetivo 7–14.

Tabla 4. Resumen de moléculas objetivo.



### **4.1.2. Evaluación biológica**

Una vez sintetizadas y caracterizadas todas estas moléculas su actividad biológica será evaluada mediante un análisis de expresión génica cualitativo para determinar su capacidad de inhibir la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Este experimento se realizará mediante la técnica de *microarrays* de ADNc empleando células endoteliales HUVEC humanas. Los datos obtenidos se confirmarán mediante un análisis de expresión génica cuantitativo mediante la técnica de la PCR y se compararán con los resultados obtenidos anteriormente en el experimento de *array*. Además también se realizará un test de la inhibición de la adhesión cásico y se medirá la supervivencia de las células.

### **4.1.3. Estudio conformacional**

Con el fin de aproximarnos a las conformaciones mayoritarias en disolución de los ciclopéptidos se llevará a cabo un análisis conformacional mediante cálculos teóricos restringidos a través de mediciones de  $^1\text{H}$ -RMN y posteriores estudios mediante *docking* de interacción con el receptor.

Este estudio conformacional permitiría, por un lado, estudiar la conformación que adoptan los peptidomiméticos sintetizados, determinando así la disposición espacial de los grupos de interacción con el receptor; y por otro lado, nos permitiría estudiar la interacción del compuesto con el centro activo de la integrina, dándonos información sobre la relación estructura/actividad.



## ***Resultados y discusión del capítulo 1***

---



## 4.2. Resultados y discusión del capítulo 1

En el siguiente apartado se describe en primer lugar y siguiendo el esquema descrito en el apartado de *Objetivos*, el trabajo experimental realizado durante la Tesis Doctoral.

A continuación se valoran los resultados experimentales conseguidos y se plantean objetivos secundarios para complementar el trabajo sintético.

Y para finalizar se expone el análisis conformacional de las moléculas objetivo preparadas y se analizan los resultados biológicos obtenidos en los ensayos de expresión génica.

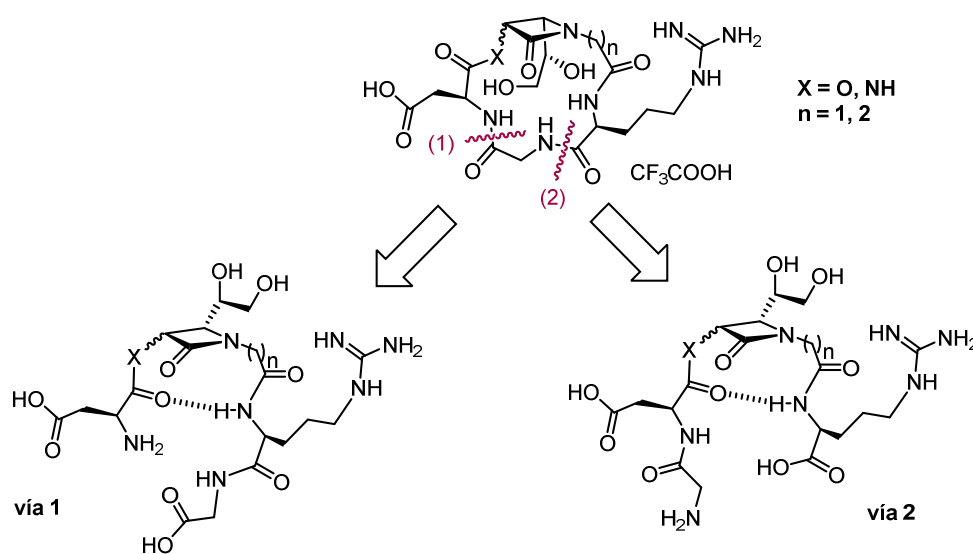
### 4.2.1. Plan de síntesis

#### 4.2.1.1. Retrosíntesis

El primer paso para plantear la retrosíntesis de peptidomiméticos cíclicos fue la elección del enlace peptídico idóneo para llevar a cabo la ciclación del compuesto lineal. En el caso de los pentapeptidomiméticos y teniendo en cuenta los antecedentes descritos por la Doctora I. Loinaz,<sup>90,99</sup> el cierre del ciclo se puede realizar mediante la formación del enlace péptidico (1) entre el aspártico y la glicina o (2) entre la glicina y la arginina (*Esquema 12*). Gracias a la introducción de una  $\beta$ -lactama en una cadena peptídica se puede esperar una preorganización  $\beta$ -girada en el péptido de cadena abierta de acuerdo con el principio  $\beta$ -LSAD mencionado en la introducción. Dicha preorganización  $\beta$ -girada conduce a la formación del enlace de hidrógeno entre el carbonilo del ácido aspártico y la amida de la arginina aproximando los extremos de las cadenas  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{COOH}$  facilitando así su acoplamiento, y de esta manera, la ciclación del producto.

---

<sup>99</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Miranda, J. I.; Fratila, R. M.; Matute, C.; Domercq, M.; Gago, F.; Martin-Santamaria, S.; Linden, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243–16260.



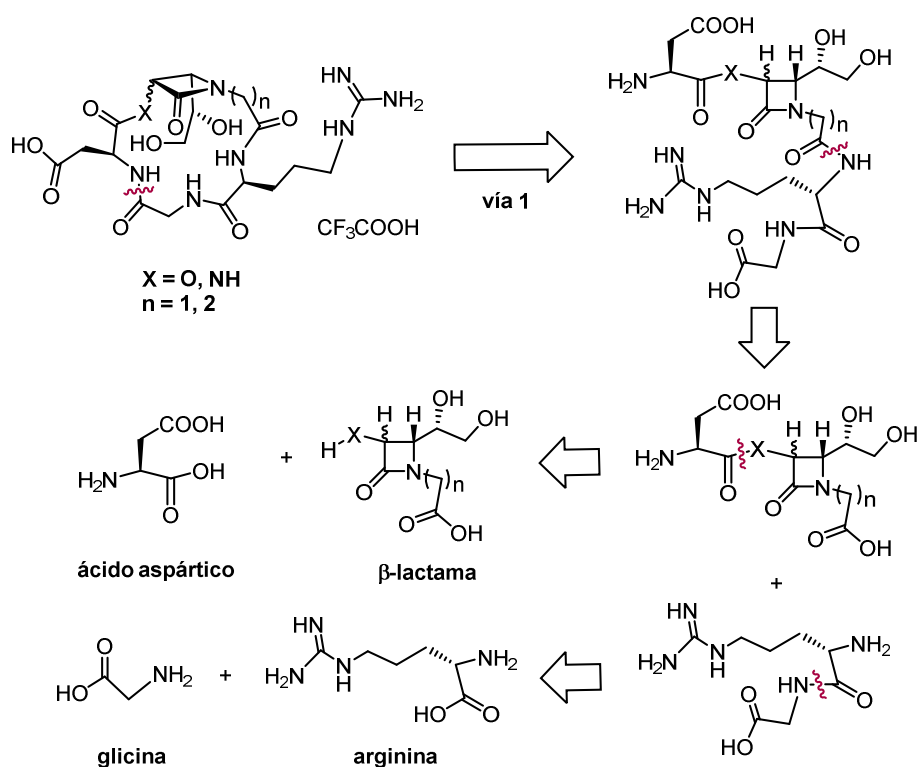
**Esquema 12.** Esquema retrosintético de la etapa de macrociclación.

En un principio se plantearon dos vías posibles para la formación del ciclo como se muestra en el *Esquema 12*. La vía 2 podría conducir a la epimerización del carbono  $\alpha$  del aminoácido arginina durante la etapa de ciclación. Por ello, inicialmente se seleccionó la **vía 1** que además podría transcurrir con menores efectos estéricos.<sup>67,95</sup>

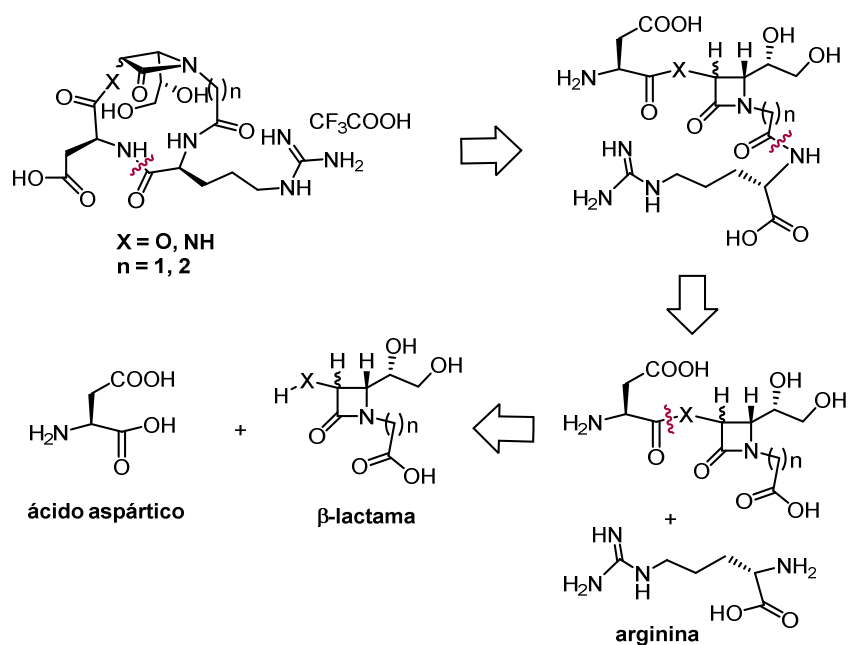
Para llevar a cabo la síntesis mediante esta vía fue necesaria la preparación del dipéptido glicina-arginina en una etapa previa, desarrollando así una síntesis convergente en las últimas etapas del proceso.

El compuesto lineal se puede subdividir entonces en cuatro estructuras de partida conocidas; los aminoácidos naturales ácido aspártico, glicina y arginina; y la  $\beta$ -lactama 3,4-disustituida con el grupo 4-(1,2-propanodiol):

El caso de los tetrapeptidomiméticos se procedió de la misma manera, llevándose a cabo la reacción de ciclación a través del enlace formado entre el ácido aspártico y la arginina. Como se puede observar en el *Esquema 14*, las moléculas de partida en este caso fueron: ácido aspártico, arginina y la correspondiente  $\beta$ -lactama 3,4-disustituida.



**Esquema 13.** Esquema retrosintético de la formación de los pentapeptidomiméticos.



**Esquema 14.** Esquema retrosintético de la formación de los tetrapeptidomiméticos.

### 4.2.1.2. Grupos protectores, reactivos y condiciones

La elección de unos grupos protectores adecuados es crucial para llevar a cabo la síntesis total de los productos deseados; para que la elección sea correcta hay que tener en cuenta los reactivos y condiciones que se van a emplear durante todo el proceso. Uno de los principales problemas que presenta la síntesis es que las cadenas laterales tanto la de la arginina como la del ácido aspártico, y el sustituyente 1,2-propanodiol de la  $\beta$ -lactama tienen que permanecer protegidos en el transcurso de la síntesis, incluida la ciclación, y ser desprotegidos en la última etapa. Por esa razón se tuvieron que utilizar dos juegos de grupos protectores ortogonales.<sup>100</sup>

Guiándonos por los buenos resultados conseguidos en experiencias anteriores decidimos emplear, por un lado, el grupo benciloxicarbonilo (Cbz) y el éster bencílico para proteger el grupo amina del ácido aspártico y el ácido carboxílico de la arginina o glicina respectivamente (Figura 27). Y por otro lado el grupo éster *tert*-butílico, el grupo acetónico del *D*-gliceraldehido y el 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf)<sup>101</sup> para proteger, el ácido carboxílico de la cadena lateral del ácido aspártico, el sustituyente 1,2-propanodiol de la  $\beta$ -lactama y la guanidina de la cadena lateral de la arginina respectivamente. Sintetizando la cadena lineal precursora del ciclo *Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)- $\beta$ -lactama-Arg(Pbf)-Gly-OBn* para el caso de los pentapeptidomiméticos y la *Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)- $\beta$ -lactama-Arg(Pbf)-OBn* para el caso de los tetrapeptidomiméticos.

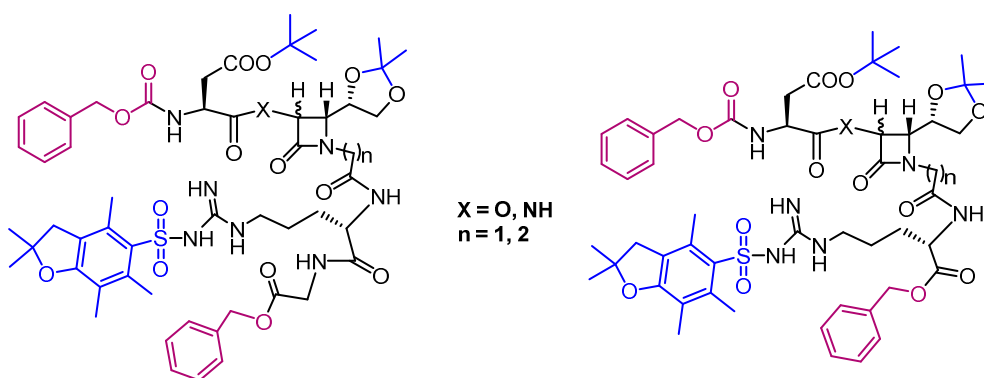


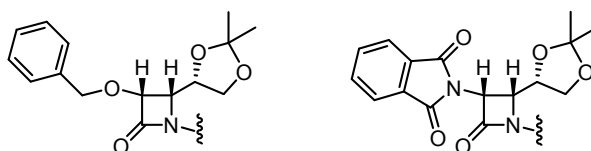
Figura 27. Elección de grupos protectores ortogonales.

<sup>100</sup> a) Greene, T. W.; Wuts, G. W.; *Protective Groups in Organic Synthesis*, third edition, Wiley interscience, New York **1999**. b) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F.; *Chem Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504. c) Schelhaas, m.; Waldmann, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056–2083.

<sup>101</sup> Para más información sobre la eficacia del grupo Pbf como protector del el grupo guanidina de la arginina consultar: Carpino, L. A.; Shroff H.; Triolo, S. A.; Mansour, E. S. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829–7832.

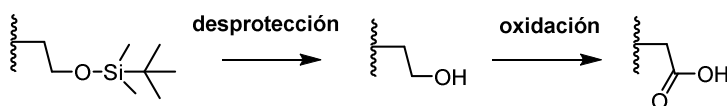
De esta manera los grupos protectores Cbz y éster bencílico se pueden desproteger mediante hidrogenolisis catalizada por paladio sin afectar al resto de los grupos protectores; que una vez ciclada la molécula, se pueden eliminar en una última etapa empleando ácido trifluoroacético.<sup>102</sup>

Establecida la estrategia de los grupos protectores principales, se planteó el procedimiento para proteger el resto de los grupos funcionales. En el caso de los depsipéptidos, para la síntesis de la  $\beta$ -lactama se utilizó el grupo benciloxilo (OBn) a la hora de proteger el grupo alcohol de la posición C3; grupo que se desprotege mediante hidrogenolisis catalizada por paladio para su acoplamiento con el ácido aspártico. En el caso de los péptidos en cambio, el grupo amino de la  $\beta$ -lactama se protegió con el grupo ftalimidoilo, desprotegiéndolo después con hidrazina. Ambas  $\beta$ -lactamas se prepararon, como detallaremos más adelante, de manera directa mediante la reacción de Staudinger.<sup>103</sup>



**Figura 28.** Grupos protectores de la posición 3 de las  $\beta$ -lactamas.

Para la preparación del ácido carboxílico de la posición N1 de la  $\beta$ -lactama se optó por la oxidación del propanol, protegido mediante el *terc*-butil dimetil silano (OTBDMS) como se describe en el *Esquema 15*. Este grupo protector es estable en condiciones de reacción muy diversas y se desprotege selectivamente empleando fluoruro de piridinio, dando lugar a un alcohol fácilmente transformable en ácido carboxílico mediante una reacción de oxidación empleando 2,2,6,6-tetrametilpiridin-1-oxilo (TEMPO), en cantidades catalíticas, como agente oxidante y elbisacetoxiodobenceno (BAIB) en cantidades estequiométricas como reoxidante.<sup>95</sup>



**Esquema 15.** Grupo protector de la posición N1 de las  $\beta$ -lactama y formación del ácido carboxílico.

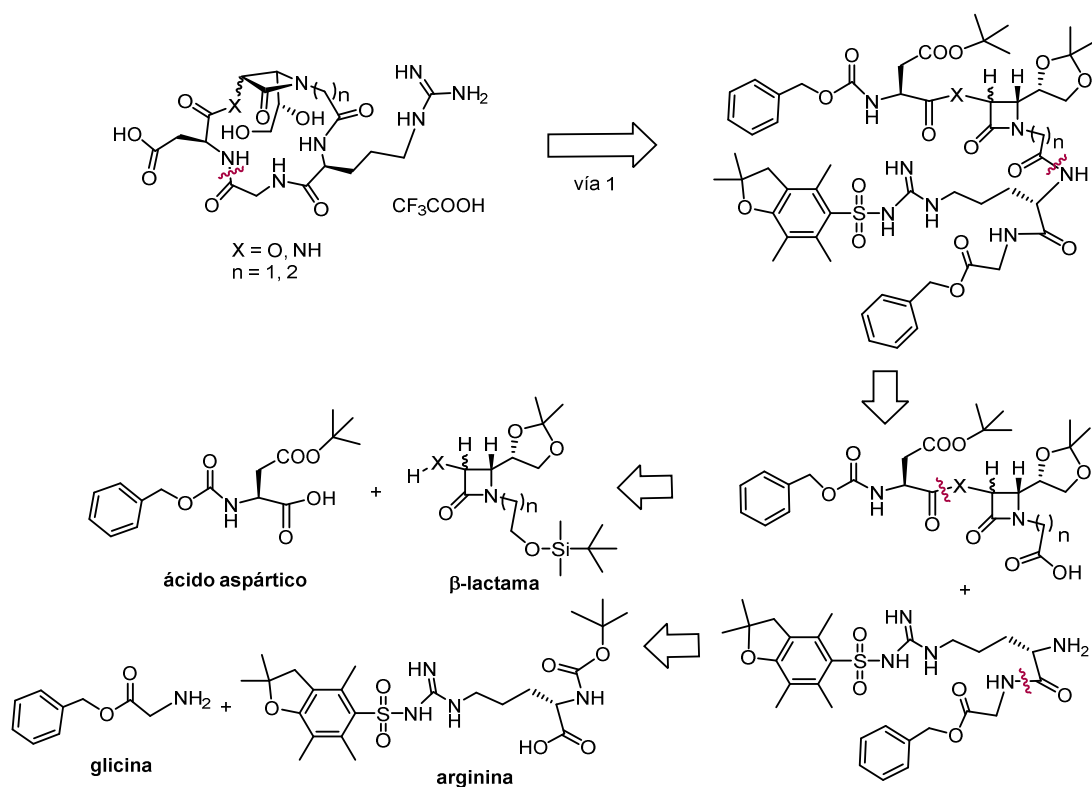
<sup>102</sup> López, S. E.; Salazar, J.; *J. Fluorine Chem.* **2013**, *156*, 73–100.

<sup>103</sup> a) Staudinger, H.; *Die Ketene*; Enke: Stuttgart **1912**, 71. b) Staudinger, H.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1908**, *356*, 51–123.

Por último, para el acoplamiento de la arginina con la glicina, o para la protección de la arginina, se seleccionó como protector del grupo amino de la arginina el *tert*-butoxicarbonil (Boc), ya que se puede desproteger en medio ácido, con ácido fórmico, sin que la reacción afecte al grupo Pbf ni al OBn presentes en la estructura de la arginina.<sup>104</sup>

Para los acoplamientos peptídicos<sup>105</sup> se utilizó, inicialmente, el agente de acoplamiento clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC·HCl) y el aditivo 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBT); aunque, como se detallará en los apartados posteriores, también se emplearon otros reactivos a fin de optimizar los diferentes acoplamientos inter- e intramoleculares. Para la ciclación, en cambio, se optó por el agente de acoplamiento hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU) y el aditivo 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt).

Resumiendo, los esquemas retrosintéticos con los grupos protectores son los siguientes:

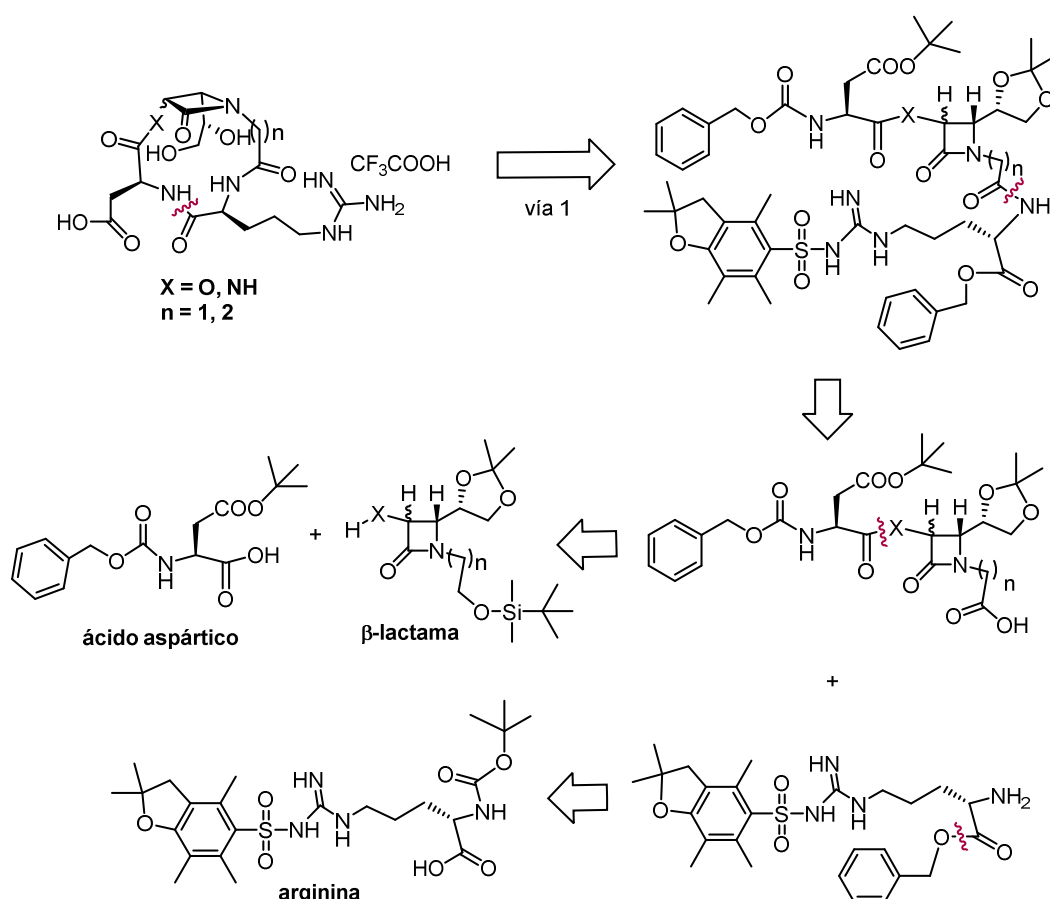


**Esquema 16.** Esquema retrosintético de la formación de los pentapeptidomiméticos. Grupos protectores.

<sup>104</sup> Ragnarsson, U.; Grehn, L.; *RSC Advances* **2013**, *3*, 18691–18697.

<sup>105</sup> a) Maude, S.; Tai, L. R.; Davies, R. P. W.; Liu, B.; Harris, S. A.; Kocienski, P. J.; Aggeli, A.; *Topics in Current Chem.* **2012**, *310*, 27–70. b) El-Faham A.; Albericio, F.; *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.





Esquema 17. Retrosíntesis total de los tetrapeptidomiméticos. Grupos protectores.

#### 4.2.1.3. Inductores quirales<sup>106</sup>

Hoy en día es ampliamente conocida la importancia de conseguir compuestos farmacológicos enantioméricamente puros<sup>107</sup> para evitar efectos adversos no deseados.<sup>108</sup> A nivel molecular, en ausencia de un entorno quiral, los enantiómeros de

<sup>106</sup> La quiralidad a nivel molecular se entiende como la no superponibilidad entre una entidad química y su imagen especular; es una característica universal que está presente en varios niveles de la materia. a) Avalos, M.; Babiano, R.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 2845–2874. Para un análisis sobre sus orígenes consultar: b) Guijarro, A.; Yus, M.; *The Origin of Chirality in the Molecules of Life: A revision from Awareness to the Current Theories and Perspectives of this Unsolved Problem*, RCS Publishing, **2008**.

<sup>107</sup> Desde los años 90, la comercialización de fármacos enantioméricamente puros ha superado el porcentaje de fármacos racémicos. a) Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; Agranat, I.; *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 105–110. En el año 2006, más del 80% de los fármacos aprobados por la FDA fueron enantioméricamente puros. b) Thayer, A. N.; *Chem. Eng. News* **2007**, *85*, 53–110.

<sup>108</sup> La tragedia de la Talidomida es uno de los casos más representativos de este problema: Stephens, T.; Brynner, R.; *Dark Remedy: The Impact of Thalidomide and Its Revival as a Vital Medicine*; Perseus, Cambridge, M. A. **2001**.

una molécula presentan propiedades químicas y físicas casi idénticas; no obstante, en presencia de un entorno quiral los enantiómeros pueden presentar propiedades dispares y son escasos los ejemplos en los que dos enantiómeros de una molécula generen la misma respuesta en un proceso biológico.<sup>109</sup> Por esta razón es imprescindible conocer y dirigir la estereoquímica de los compuestos durante toda la síntesis.

La síntesis de las  $\beta$ -lactamas se llevó a cabo mediante la reacción de cicloadición [2+2] conocida como la reacción de Staudinger;<sup>103,110</sup> una reacción centenaria muy utilizada en nuestro laboratorio por su versatilidad, alto rendimiento y predictibilidad estereoquímica.<sup>111</sup>

La  $\beta$ -lactama es el producto de la cicloadición entre una cetena y una imina en donde se forman, dos enlaces carbono-carbono y dos centros estereogénicos contiguos. La imina y la cetena se forman *in situ*; la imina se genera con una configuración *E* partiendo de la amina y el aldehído correspondiente, y la cetena por dehidrohalogenación del cloruro de ácido en medio básico.<sup>112</sup> Como se puede observar en el *Esquema 18*, los dos nuevos centros estereogénicos formados tendrán entre ellos una configuración relativa *cis*.<sup>113,114</sup>

<sup>109</sup> Triggle, D. J.; *Chirality in Natural and Applied Science*, Blackwell Science, Ltd., Bodwin, Cornwall, UK, **2002**, 108–138.

<sup>110</sup> Aunque la reacción de Staudinger es una de las más empleadas en la formación de  $\beta$ -lactamas, existen otros métodos como, la condensación de una imina y un enolato de éster: a) Brown, M. J.; *Heterocycles* **1989**, *29*, 2225–2244. b) Hart, D. J. Ha, D. C.; *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1447–1465. La ciclación de un hidroxomato: c) Miller, M. J.; *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 49–56. La cicloadición entre un alqueno y un isocianato: d) Chmielewski, M.; Kaluza, Z.; Furman, B.; *Chem. Commun.* **1996**, 2689–2696.

<sup>111</sup> Revisiones realizadas por nuestro grupo: a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Oiarbide, M.; *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1837–1872. b) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Oiarbide, M.; *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *12*, 3223–3235.

<sup>112</sup> Tidwel, T. T.; *Ketenes*, John Wiley, New York, **1995**.

<sup>113</sup> a) Arrieta, A.; Lecea, B.; Cossío, F. P.; *Top Heterocycl. Chem.* **2010**, *22*, 313–347. b) Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Sierra, M. A.; *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 925–936. c) Palomo, C.; Cossío, F. P.; Cuevas, C.; Lecea, B.; Mielgo, A.; Román, P.; Luque, A.; Martínez-Ripollo, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9630–9369. d) Hegedus, L. S.; Montgomery, J.; Narukawa, Y.; Snustad, D. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5784–5791.

<sup>114</sup> En la bibliografía también se pueden encontrar ciertos casos en los que la estereoquímica de la  $\beta$ -lactama es *trans*, estos son algunos ejemplos: empleando iminas con configuración *Z*: a) Alcaide, B.; Rodríguez-Vicente, A.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2005–2006. b) Muller, M.; Bur, D.; Tschamber, T.; Streith, J.; *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 767–773. Empleando ácidos clorhídricos  $\alpha,\beta$ -insaturados: c) Podlech, J.; Linder, M. R.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5873–5883. d) Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Mathur, A.;

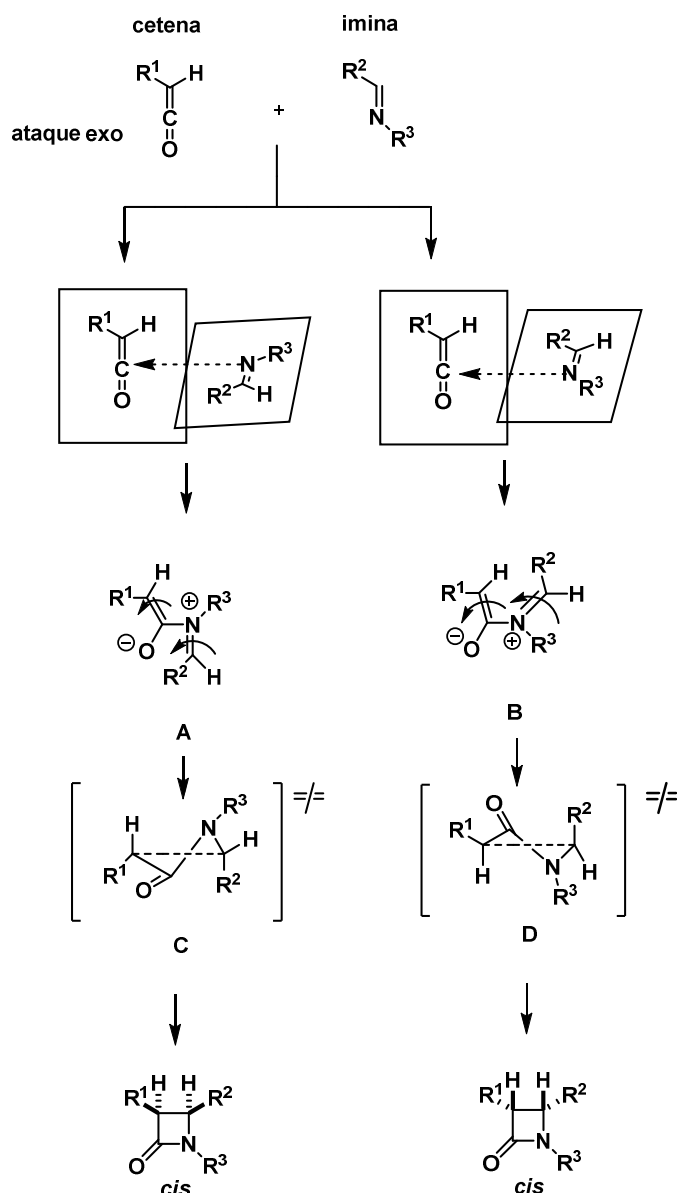
Tal y como se muestra en el *Esquema 18* observamos que se trata de una reacción por etapas. En la primera etapa se produce la aproximación de la imina a la cetena, donde el ataque nucleófilico del nitrógeno de la imina con configuración *E* corresponderá a una aproximación *exo*, es decir, por el lado menos impedido.<sup>115</sup> La aproximación puede tener lugar según las dos orientaciones representadas en el esquema que darían lugar a los intermedios zwitteriónicos **A** y **B**. La segunda etapa implica el cierre conrotatorio del sistema azadiénico que conduce a la formación del anillo  $\beta$ -lactámico **E** o **F**. Tal y como se observa en el esquema 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<sup>2</sup> de la imina.

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  $\beta$ -lactamas enantiómeras **E** y **F** en una proporción equimolecular. Sin embargo, el estereocontrol entre las dos estructuras *cis* posibles se puede ejercer mediante el empleo de inductores quirales;<sup>111</sup> gracias a la diferenciación energética que provocarían entre los dos estados de transición **C** y **D**. Por lo tanto, de acuerdo con este mecanismo, el origen de la estereoselectividad está relacionado con la diferencia energética entre los dos estados de transición **C** y **D** que dan lugar al anillo.

---

Wagle, D. R.; *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products*; Lukacs, G. Ed.; S Springer-Verlag, **1993**, vol. 2, p. 551. Gracias a la migración del grupo sililo empleando N-Silyliminas: e) Campomanes, P.; Menéndez, M. I.; Sordo, T. L.; *J. Phys. Chem. A*. **2005**, *109*, 11022–11026. f) Arrieta, A.; Cossío, F. P.; Lecea, B.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8458–8464. g) Bongini, A.; Panunzio, M.; Piersanti, G.; Bandini, E.; Martelli, G.; Spunta G.; Venturini, A.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2379–2390. Empleando iminas que permitan la estabilización de la carga positiva del intermedio zwitteriónico, pudiéndose isomerizar el enlace C=N a altas temperaturas: h) Diez, E.; Fernández, R.; Márquez-López, E.; Martín-Zamora, E.; Lassaletta, J. M.; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2749–2752. Empleando catalizadores: i) Lee, E. C.; Hodous, B. L.; Bergin, E.; Shih, C.; Fu, G. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11586–11587. j) Weatherwax, A.; Abraham, C. J.; Lectka, T.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3461–3463. k) Townes, J. A.; Evans, M. A.; Queffelec, J.; Taylor, S. J.; Morken, J. P.; *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2537–2540.

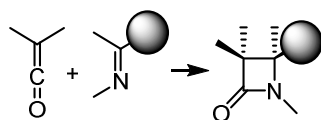
<sup>115</sup> Cossío, F. P.; Ugalde, J. M.; López, X.; Lecea, B.; Palomo, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 995–1004.



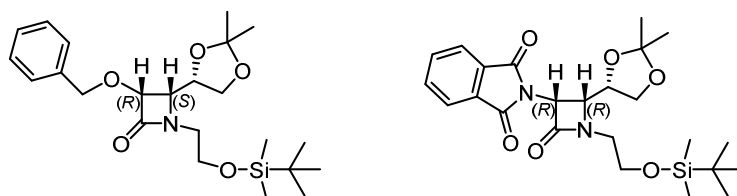
**Esquema 18.** Mecanismo de reacción de la cicloadición [2+2], proceso en etapas en el que se consigue únicamente la  $\beta$ -lactama *cis*.

Tras analizar los antecedentes descritos en nuestro laboratorio se decidió introducir el auxiliar quiral en el aldehído que da lugar a la formación de la imina como se muestra en el *Esquema 19*. Según nuestra experiencia, este tipo de cicloadiciones son las que muestran una mayor estereoselectividad. Para ello se seleccionó el acetónido *S* del gliceraldehído desarrollado por Bose,<sup>116</sup> un inductor que dará lugar a la  $\beta$ -lactama con la configuración *cis* C3(*R*),C4(*S*) en el caso de las 3-hidroxi- $\beta$ -lactamas y *cis* C3(*R*),C4(*R*) para el caso de las 3-amino- $\beta$ -lactamas (*Figura 29*).

<sup>116</sup> Wagle, D. R.; Garai, C.; Chiang, J.; Monteleone, M. G.; Kurys, B. E.; Strohmeyer, T. W.; Hedge, V. R.; Manhas, M. S.; Bose, A. K.; *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4227–4236.



**Esquema 19.** Aproximación cetena aquiral a imina quiral para la formación de las β-lactamas.



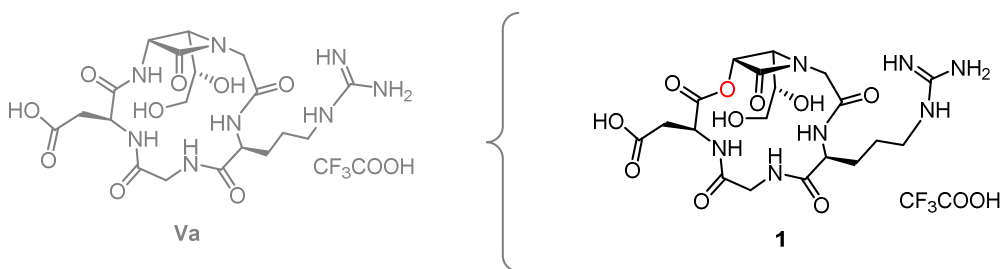
**Figura 29.** Configuración de las β-lactamas resultantes de la reacción de Staudinger.

Para la síntesis de las β-lactamas de configuración *trans* se pensó en llevar a cabo la epimerización del carbono C3 de las β-lactamas *cis* a través dos vías diferentes: mediante la acción de una base de Brønsted o una sustitución nucleofílica  $S_N2$ .

## 4.2.2. Síntesis de miméticos cíclicos de los ligandos naturales de la integrina $\alpha_v\beta_3$

### 4.2.2.1. Depsipentapéptido 1

En primer lugar se preparó la molécula objetivo **1**, con el fin de estudiar los cambios en las preferencias conformacionales con respecto a su análogo amídico **Va** tras modificar la naturaleza de los enlaces.

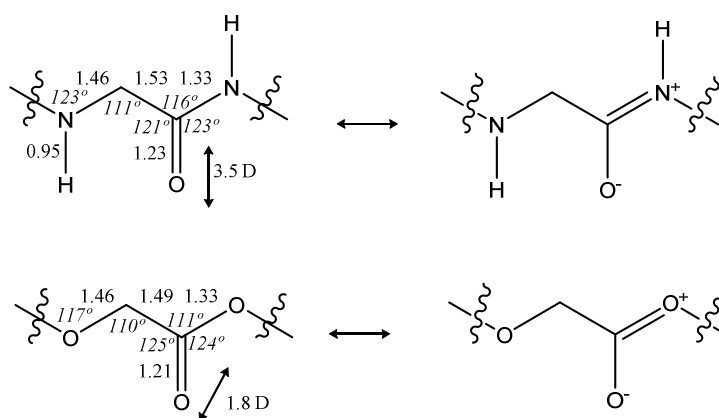


Esquema 20. Molécula objetivo **1**.

Las características geométricas<sup>117,75b</sup> de los enlaces éster y amida son muy similares; las longitudes y ángulos entre los átomos son comparables, ambos están estabilizados por resonancia y los dos muestran preferencia por la conformación *trans*.

La diferencia más importante reside en la capacidad de formar enlaces de hidrógeno: el enlace amida es capaz de actuar como dador o aceptor en la formación de enlaces de hidrógeno; el enlace éster, en cambio, no contiene ningún átomo de hidrógeno con el que actuar como dador y es un aceptor débil. Además la longitud del enlace de hidrógeno generado es ligeramente superior en el caso del éster. Estos enlaces participan en la estabilización de las diferentes conformaciones; por lo que modulando el patrón de enlaces de hidrógeno se pueden modificar las preferencias torsionales y por consiguiente los equilibrios entre las diferentes estructuras tridimensionales, variando así, la disposición de las cadenas laterales y como consecuencia su actividad biológica.<sup>134,138</sup>

<sup>117</sup> Más información sobre las diferencias entre los enlaces éster y amida: Raines, R. T.; Choudhary, A.; *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1801–1807.



**Esquema 21.** Diferencias entre el enlace éster y amida.

Por otro lado, cabe destacar, que al disponer de enlaces éster, este tipo de estructuras podrían tener mayor estabilidad metabólica ya que no serían reconocidas por las proteasas humanas, y por lo tanto se degradarían mucho más lentamente.

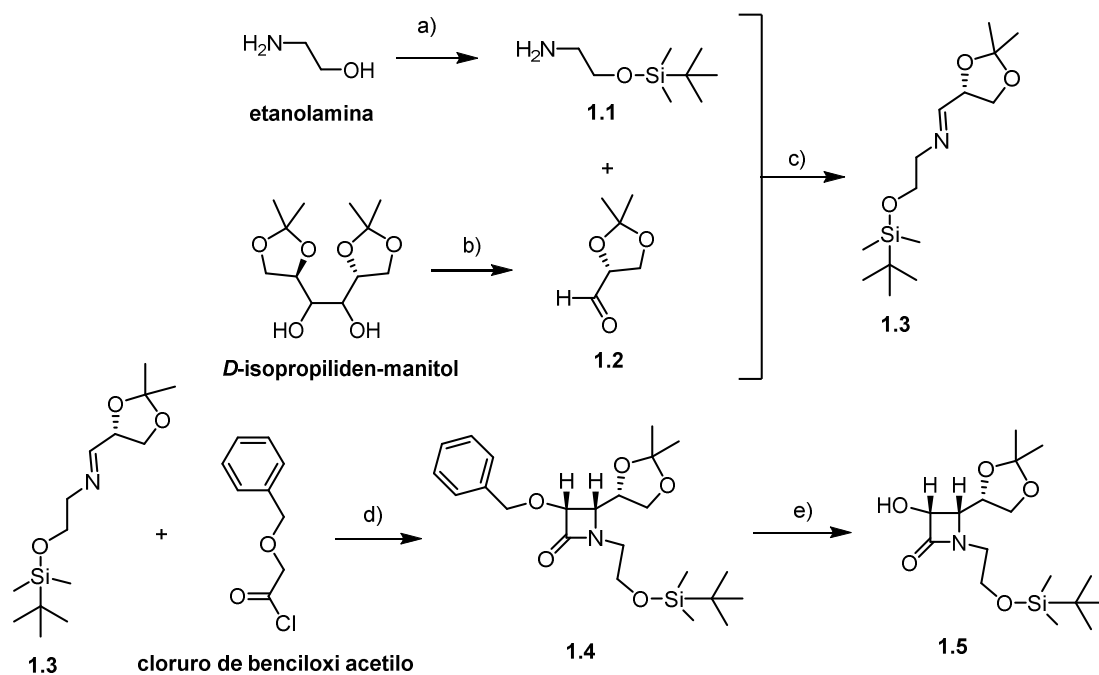
Como se ha descrito en la retrosíntesis, el compuesto lineal precursor del pentadepsipéptido cíclico se puede subdividir en cuatro subestructuras de partida: por un lado, la  $\beta$ -lactama y el ácido aspártico, y por el otro, la arginina y la glicina.

#### 4.2.2.1.1. Síntesis de la *cis*-3-hidroxi- $\beta$ -lactama 1.5

Para la obtención de la BnO- $\beta$ -lactama **1.4** se llevó a cabo la reacción de Staudinger entre la cetena derivada del cloruro de benciloxiacetilo y la imina **1.3** previamente preparada, tal y como se describe en el *Esquema 22*. Para ello se empleó como producto de partida la etanolamina con el grupo hidroxilo protegido mediante sililación con TBDMS<sup>118</sup> y el aldehído, (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-carbaldehído, resultante de la oxidación del *D*-isopropiliden-manitol comercial.<sup>119</sup> La condensación de ambos compuestos dio lugar a la imina **1.3** de configuración *E*, que tras tratamiento con el cloruro de ácido correspondiente en presencia de trietilamina (TEA) produjo la  $\beta$ -lactama deseada. La formación del aldehído y la imina se controló mediante <sup>1</sup>H-RMN; observando la aparición de la señal del protón del aldehído y el de la imina a 9.7 ppm y 7.7 ppm respectivamente.

<sup>118</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentová, E.; Jiménez, A.; Oyarbide, J.; Fratila, R. M.; Miranda, J. I.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 101–104.

<sup>119</sup> Schmid, C. R.; Bryant, J. D.; *Org. Synth.* **1993**, *72*, 6.



**Esquema 22.** Síntesis de la  $\beta$ -lactama **1.5** a)  $\text{ClSiMe}_2^t\text{Bu}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t. a., 12 h. b)  $\text{NaIO}_4$  sobre gel de sílice,<sup>120</sup>  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h. c) tamiz molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h. d) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de  $-78^\circ\text{C}$  a t. a., 16 h. e)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd/C 10%, metanol, reflujo, 1h. (Rto. global del 68%)

El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice básica, ya que el gel de sílice ácido da lugar a la hidrólisis parcial del grupo TBDMS. La  $\beta$ -lactama **1.4** resultante se obtuvo como sólido blanco con un rendimiento global del 72%. El producto se caracterizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y las señales se asignaron con la ayuda de un experimento bidimensional COSY (Figura 30 y Figura 31).

La constante de acoplamiento entre los protones H1 y H2 del producto obtenido resultó ser de 5.1 Hz; valor indicativo de una configuración relativa *cis* en C3-C4 del anillo  $\beta$ -lactámico.<sup>121,113b</sup>

Cabe mencionar que en el crudo de reacción no se encontró evidencias de la formación del otro diastereómero posible de configuración relativa *cis*; lo que implica una inducción de quiralidad prácticamente total en buen acuerdo con los precedentes bibliográficos.<sup>116</sup>

<sup>120</sup> Zhong, Y. L.; Shing, T. K. M.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2622–2624.

<sup>121</sup>  $J_{cis} = 4\text{--}6\text{ Hz}$ ;  $J_{trans} = 0\text{--}3\text{ Hz}$ .



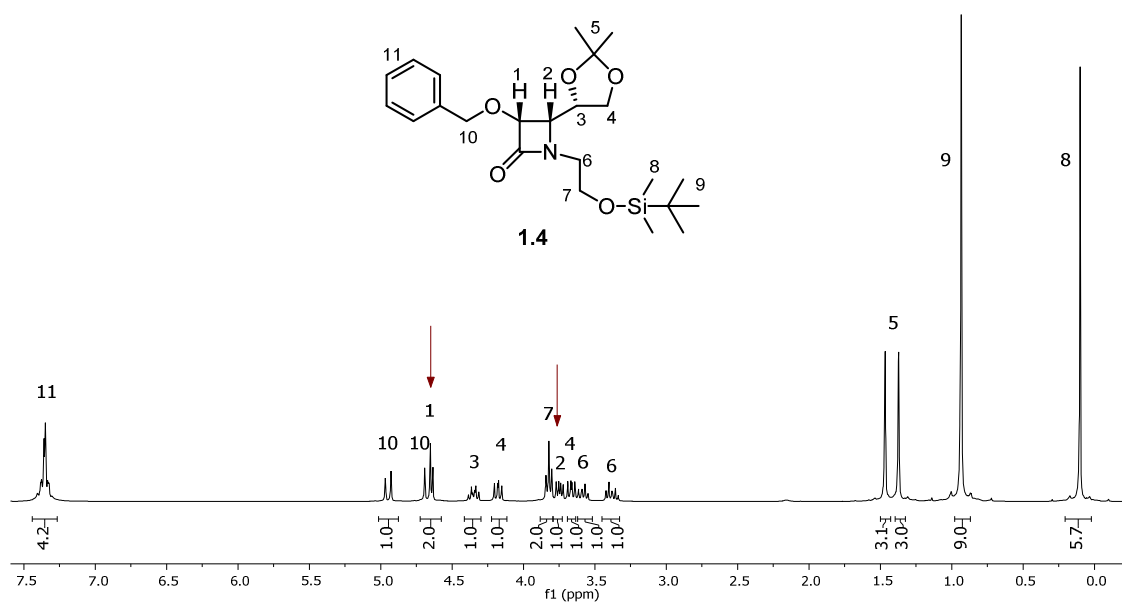


Figura 30.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.4.

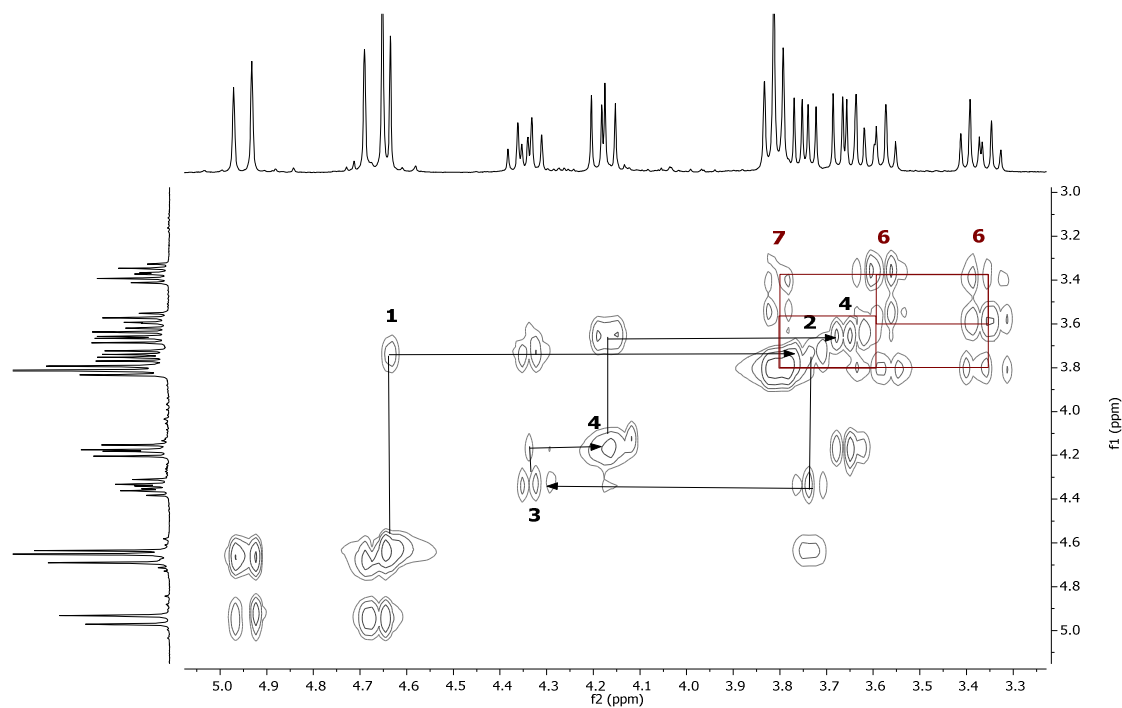
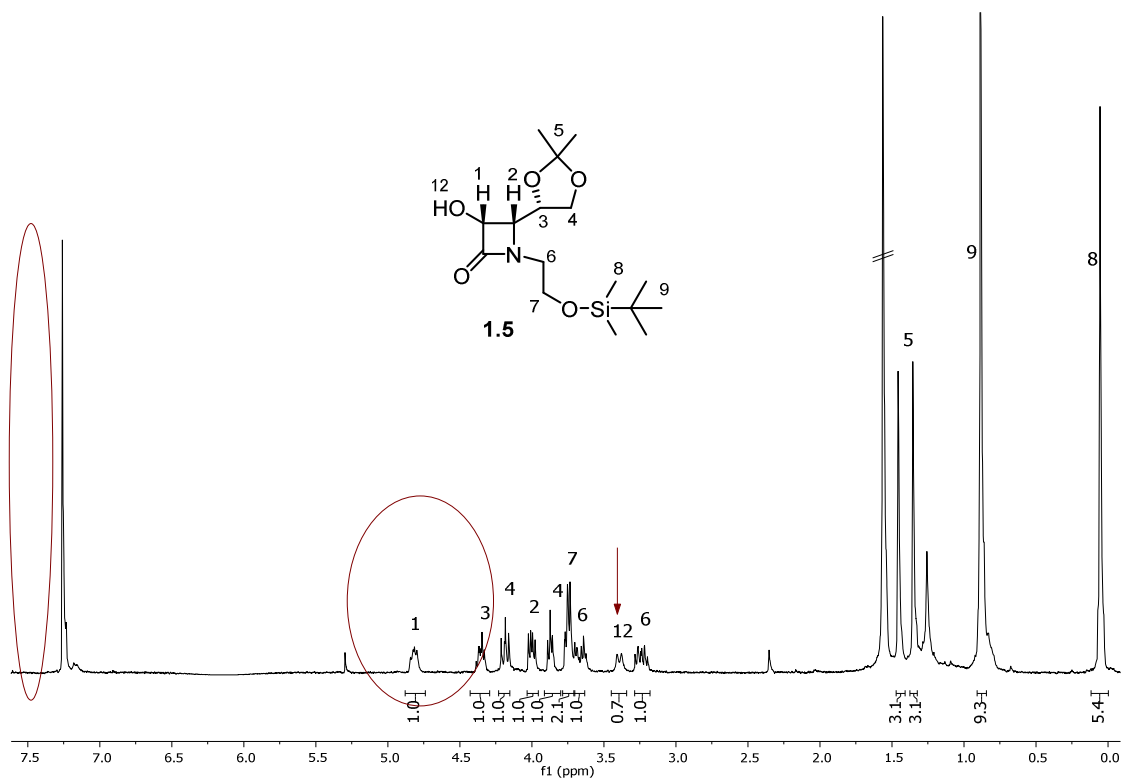


Figura 31. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) ampliado del compuesto 1.4.

La subsiguiente hidrogenolisis<sup>122</sup> del grupo benciloxilo en **1.4** condujo a la  $\beta$ -lactama **1.5** que tras cristalización de hexano se obtuvo con un rendimiento del 96%.

Como se puede observar en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (*Figura 32*) las señales pertenecientes al grupo protector desaparecen ( $\delta_{\text{arom}} = 7.50\text{--}7.25$  ppm y  $\delta_{\text{CH}_2\text{-Ph}} = 4.91\text{--}4.53$  ppm) e incluso se puede ver la señal correspondiente al protón del hidroxilo desprotegido, H12 ( $\delta_{\text{OH}} = 3.39$  ppm).



**Figura 32.** <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **1.5**.

Por otra parte los espectros de IR de ambos compuestos **1.4** y **1.5** se muestran en la *Figura 33*. El espectro correspondiente al compuesto **1.5** revela una señal a 3333 cm<sup>-1</sup> característica del grupo hidroxilo libre.

<sup>122</sup>a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Maneiro, E.; Odriozola, B. J.; *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1505–1507. b) Anwer, M. K.; Spatola, A. F.; *Synthesis* **1980**, 11, 929–932.

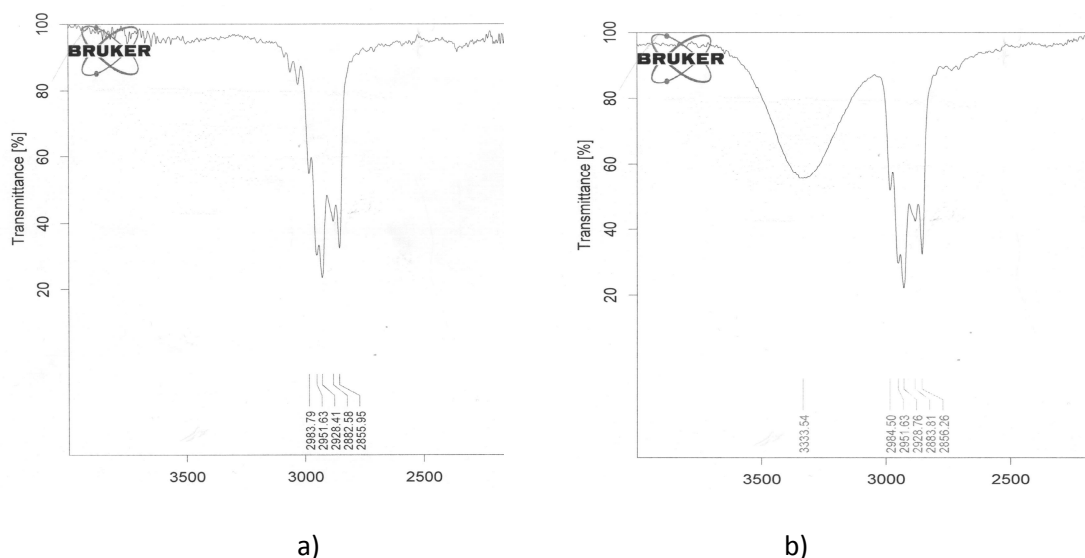
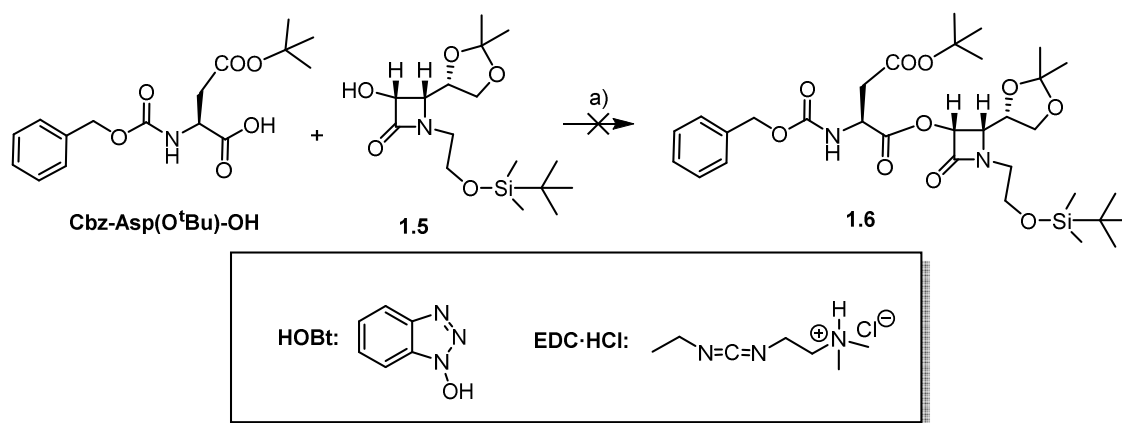


Figura 33. Espectroscopía infrarroja a) compuesto **1.4** b) compuesto **1.5**.

#### 4.2.2.1.2. Acoplamiento de la $\beta$ -lactama **1.5** con el ácido aspártico

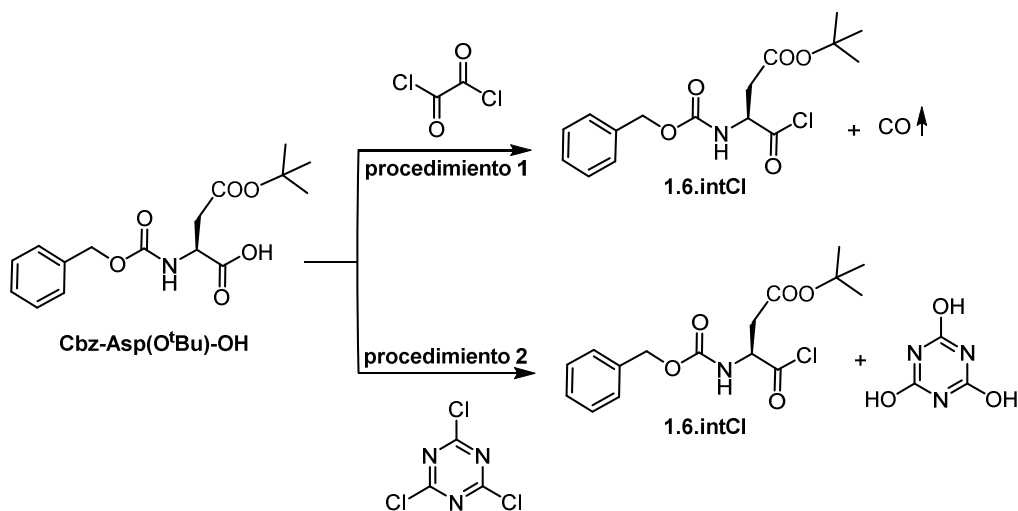
Una vez preparada la  $\beta$ -lactama **1.5**, el siguiente paso fue su acoplamiento con el ácido aspártico. Para ello se hizo reaccionar la HO- $\beta$ -lactama **1.5** con el Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, comercialmente asequible, empleando como agentes de acoplamiento el clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimina (EDC·HCl) y el 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt).



**Esquema 23.** Acoplamiento entre la  $\beta$ -lactama **1.5** y el ácido aspártico, formación del enlace éster.  
a) EDC·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h.

Tras 16 horas de reacción no se observó evolución apreciable mediante TLC. El crudo obtenido se analizó por <sup>1</sup>H-RMN y se pudo comprobar que el sustrato de reacción **1.5** no había sufrido ninguna transformación. Dicho sustrato de partida fue recuperado por cromatografía flash en columna de gel de sílice básica.

A la vista de este resultado se procedió a modificar las condiciones de reacción activando el ácido aspártico mediante la formación de un halogenuro de ácido.<sup>100b,105</sup> En primer lugar se llevó a cabo la síntesis del cloruro de ácido y para ello se plantearon dos procedimientos (*Esquema 24*).



**Esquema 24.** Activación del ácido aspártico por transformación en un cloruro de ácido.

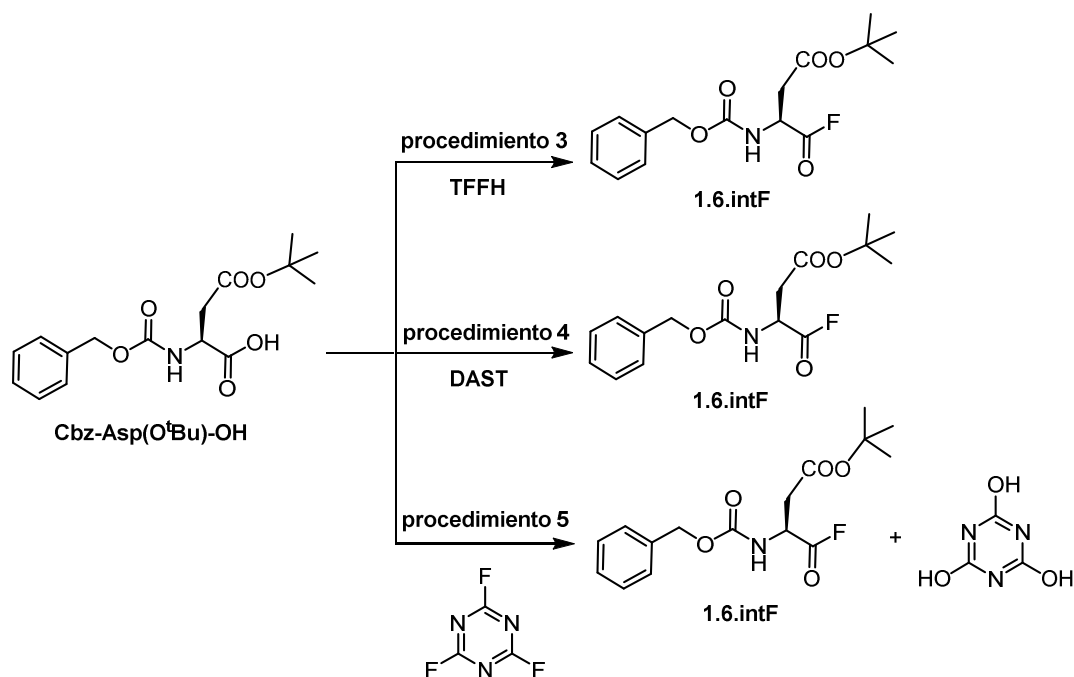
El primer procedimiento consistió en sintetizar el cloruro de ácido empleando cloruro de oxalilo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y *N,N*-dimetilformamida (DMF) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>123</sup> Para el segundo procedimiento en cambio se empleó cloruro de cianurilo en presencia de piridina a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  en DMF.<sup>124</sup> Aunque en ambos casos se detectó el cloruro buscado mediante  $^1\text{H-RMN}$ , el compuesto resultó no ser estable.

Vista la imposibilidad de aislar el cloruro del ácido aspártico se pensó realizar la reacción de activación del ácido y el acoplamiento con la HO- $\beta$ -lactama **1.5** en un único paso. Para ello se empleó el procedimiento 1 ya que el único subproducto generado en la reacción es el monóxido de carbono. Se realizó la activación del ácido aspártico de la manera descrita en el primer procedimiento y a los 20 minutos se le añadió una disolución de la  $\beta$ -lactama **1.5** en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Desgraciadamente no se observó el producto de acoplamiento deseado.

Ante estos resultados se decidió probar la síntesis del fluoruro del ácido aspártico. Tras una búsqueda bibliográfica se consideraron tres procedimientos (*Esquema 25*).

<sup>123</sup> a) Senokuchi, K.; Nakai, H.; Nagao, Y.; Sakai, Y.; Katsube, N.; Kawamura, M.; *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 441–463. b) Wisser, A.; Grudzinskas, C. V.; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3972–3974.

<sup>124</sup> Li, P. F.; Chen, C. F.; *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9250–9259.



**Esquema 25.** Activación del ácido aspártico mediante la formación del fluoruro de ácido.

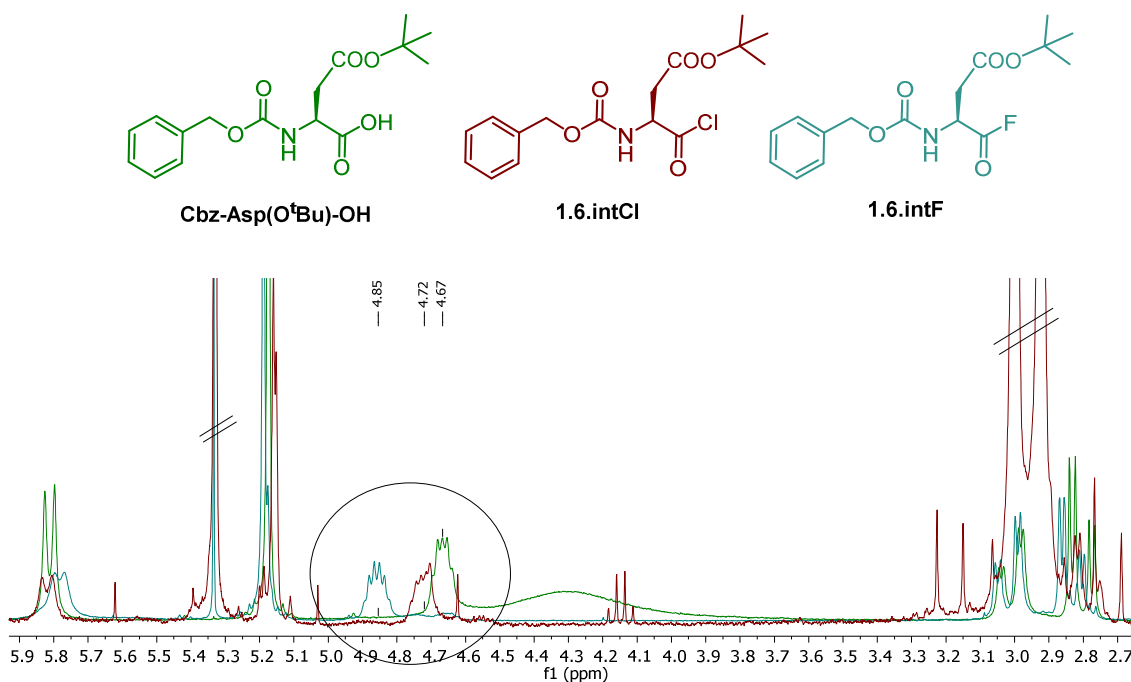
El procedimiento 3 consistió en el empleo de hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio (TFFH) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y piridina,<sup>125</sup> y el procedimiento 4 en el empleo de trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .<sup>126</sup> El resultado de ambos procedimientos fue, desgraciadamente, el producto de partida.

El procedimiento 5 se llevó a cabo empleando fluoruro de cianurilo y piridina en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>127</sup> Esta vez sí se logró cristalizar el fluoruro de ácido del aspártico, producto que resultó ser estable.

<sup>125</sup> a) Fiammengo, R.; Licini, G.; Nicotra, A.; Modena, G.; Pasquato, L.; Scrimin, P.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5905–5910. b) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5401–5402.

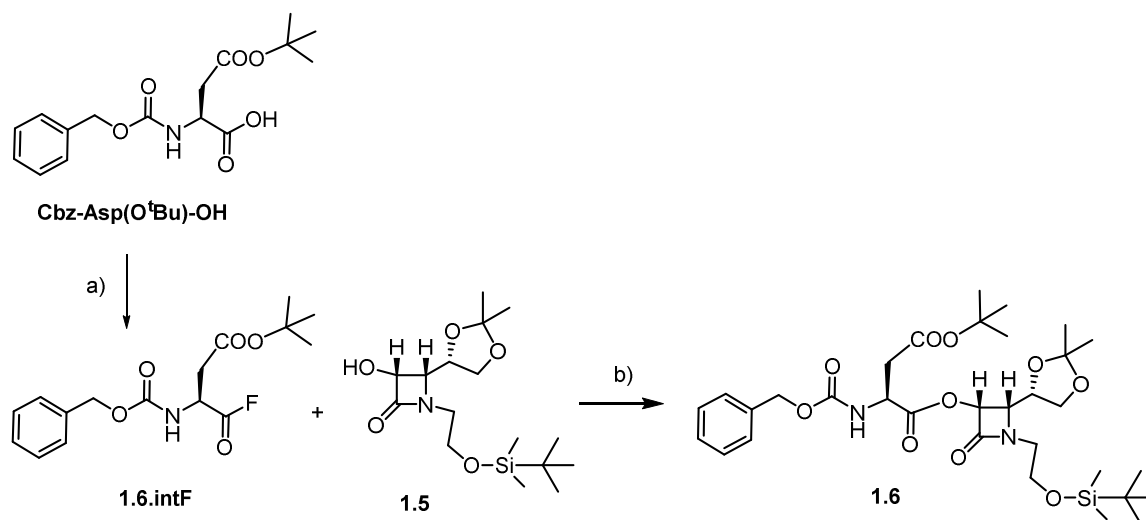
<sup>126</sup> a) Brown, Z. Z.; Schafmeister, C. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14382–14383. b) Wipf, P.; Wang, Z.; *Org. Lett.* **2007**, 9, 1605–1607. c) Fauq, A. H.; Singh, R. P.; Meshri, D. T.; *e-Eros Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2001**, 1789–1790. d) Kaduk, C.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L.; Bienert, M.; *Letters in Peptide Science* **1995**, 2, 285–288. e) Hudlicky, M.; *Org. React.* **1988**, 35, 513–641.

<sup>127</sup> a) Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D.; *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2611–2614. b) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Guang Chao, H.; DeSelms, R. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9651–9652.



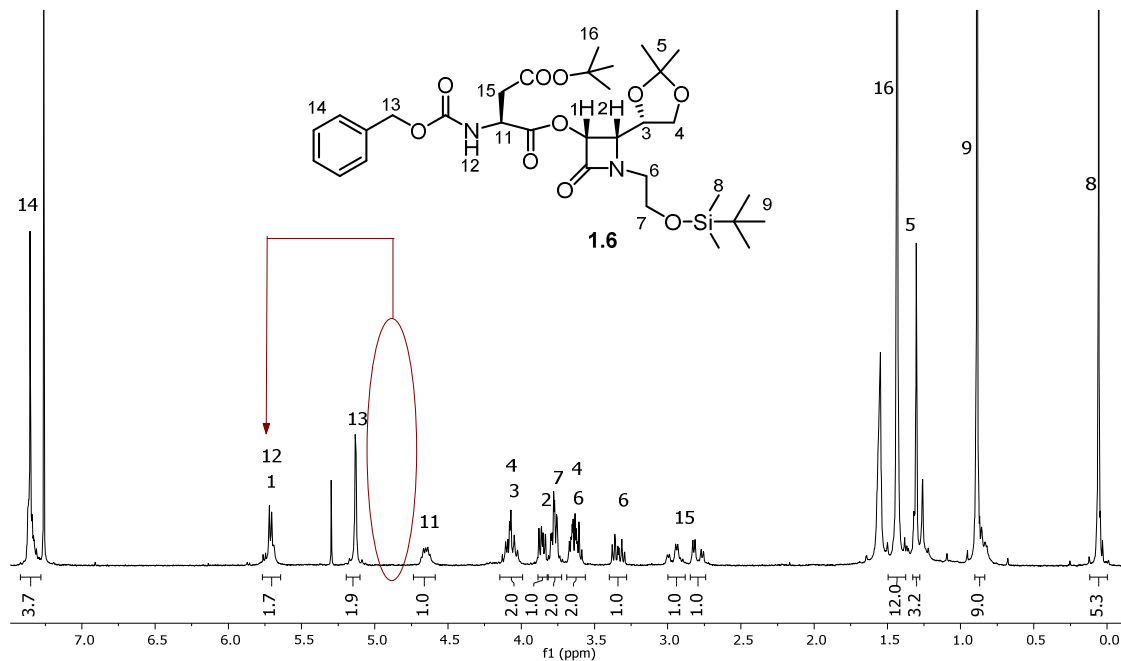
**Figura 34.**  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del Cbz-Asp( $\text{O}^t\text{Bu}$ )-OH (comercial), Cbz-Asp( $\text{O}^t\text{Bu}$ )-Cl (procedimiento 2) y Cbz-Asp( $\text{O}^t\text{Bu}$ )-F (procedimiento 5); donde se aprecian las diferencias en el desplazamiento de las señales correspondientes a los protones del  $\text{C}_\alpha$  del aminoácido.

Una vez preparado el fluoruro de ácido **1.6.intF** se procedió a su acoplamiento con la HO- $\beta$ -lactama **1.5** dando como resultado el producto **1.6**, con elevado rendimiento (92%) y pureza.



**Esquema 26.** Acoplamiento entre el fluoruro de ácido aspártico y la  $\beta$ -lactama **1.5**. a) fluoruro de cianurilo, piridina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C}$ , 1 h. b) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t. a., 30 min. (Rto. global del 88%)

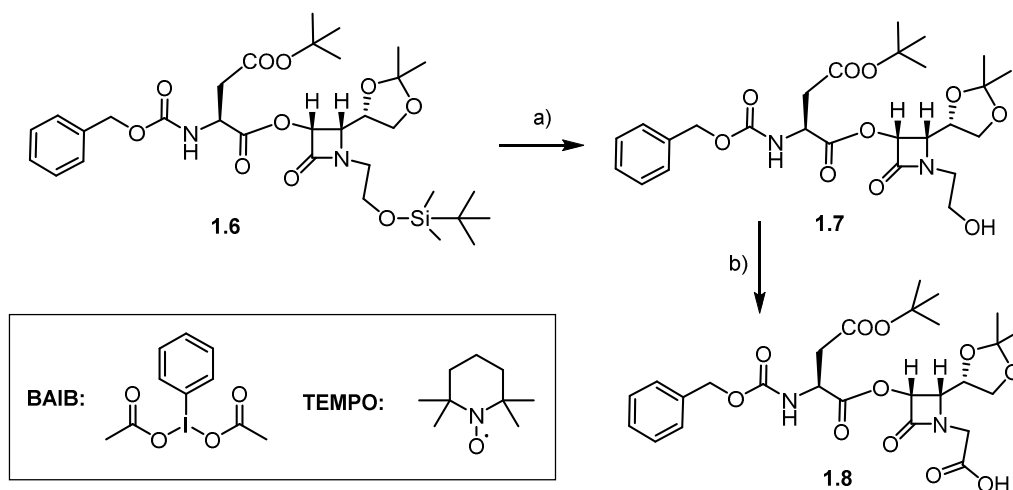
La formación del compuesto se confirmó mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN. En la *Figura 35* se observa el desplazamiento del H1, protón del carbono C3 de la  $\beta$ -lactama, hacia un campo más bajo ( $\delta_{\text{H1}(1.5)} = 4.82 \text{ ppm} < \delta_{\text{H1}(1.6)} = 5.77\text{--}5.68 \text{ ppm}$ ) gracias a la formación del enlace éster.



**Figura 35.**  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **1.6**. Se ha optado por no emplear el número 10 al enumerar los hidrógenos para que la numeración coincida con la de su análogo peptídico.

#### 4.2.2.1.3. Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol

Una vez acoplado el ácido aspártico a la  $\beta$ -lactama la siguiente etapa consiste en la desprotección del grupo *tert*-butil dimetil sililo y la posterior oxidación del alcohol resultante a ácido carboxílico (*Esquema 27*); para la posterior formación del enlace peptídico.



**Esquema 27.** Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol. a) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). b) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (83%).

Para la desprotección del grupo TBDMS se utilizó fluoruro de piridinio en tetrahidrofurano (THF).<sup>128</sup> La reacción se siguió por TLC y en tres horas se obtuvo el compuesto **1.7**, de manera casi cuantitativa y sin necesidad de purificación para etapas posteriores.

Como se puede observar en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (*Figura 36*) las señales pertenecientes a los dos metilos y al *terc*-butilo del TBDMS, H8 y H9, desaparecen por completo ( $\delta_{\text{TBDMS}} = 1.00\text{--}0.00$  ppm) y se observa el protón perteneciente al grupo hidroxilo recién desprotegido, H17 ( $\delta_{\text{OH}} = 3.33$  ppm).

La transformación del grupo hidroxilo a ácido carboxílico se llevó a cabo con éxito mediante oxidación con el bisacetoxiodobenceno (BAIB) en cantidad estequiométrica y 2,2,6,6-tetrametilpiridin-1-oxilo (TEMPO) en cantidad catalítica.<sup>129</sup>

<sup>128</sup> a) Kong, K.; Moussa, Z.; Lee, C.; Romo, D.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19844–19856. b) Nicolaou, K. C.; Webber, S. E.; *Synthesis* **1986**, *6*, 453–461.

<sup>129</sup> a) Passiniemi, M.; Koskinen, A. M. P.; *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6736–6738. b) Epp, J. B.; Widlanski, T. S.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293–295.



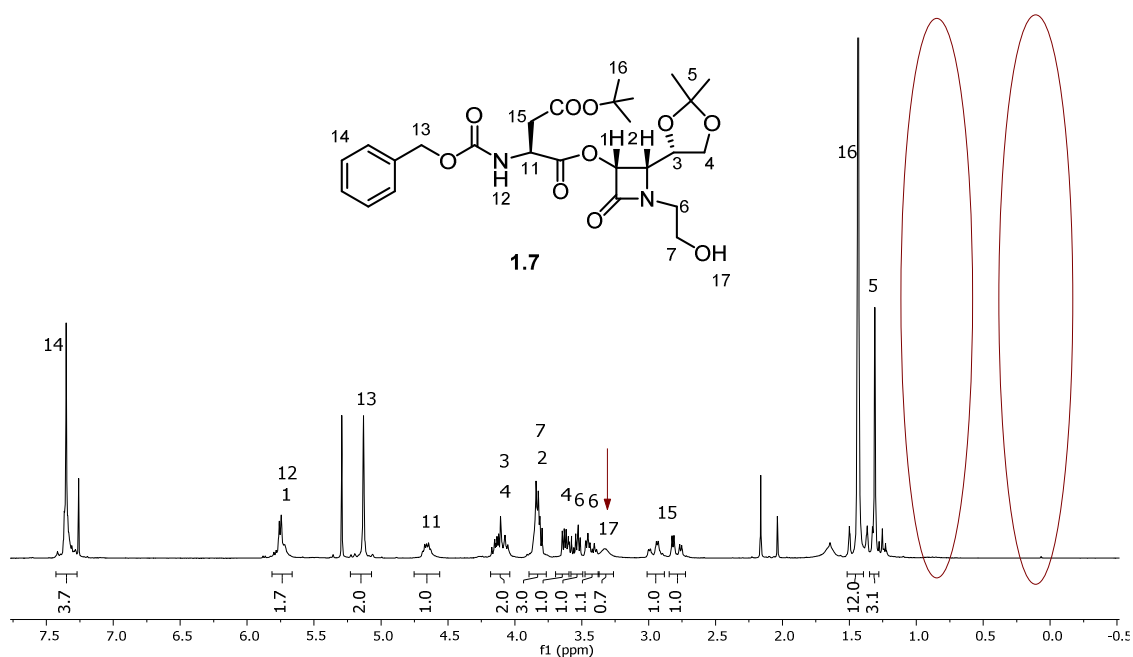


Figura 36.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **1.7**.

La formación del compuesto **1.8** se confirmó por el desplazamiento a un campo más bajo de los protones diasterotópicos H6 ( $\delta_{\text{H6}(1.7)} = 3.55$  y  $3.43$  ppm  $<$   $\delta_{\text{H6}(1.8)} = 4.35$  y  $4.20$ – $3.95$  ppm), causado por un mayor desapantallamiento provocado por el ácido carboxílico recién formado y la desaparición de los protones H7 ( $\delta_{\text{H7}(1.7)} = 3.88$ – $3.77$  ppm) (Figura 36 y Figura 37).

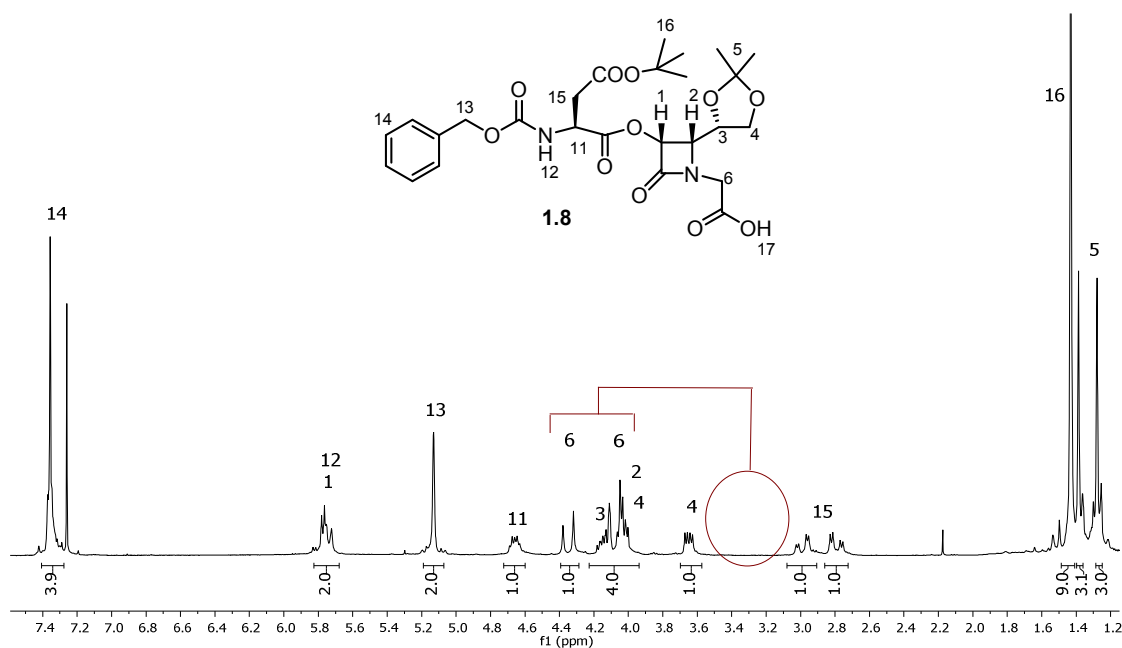
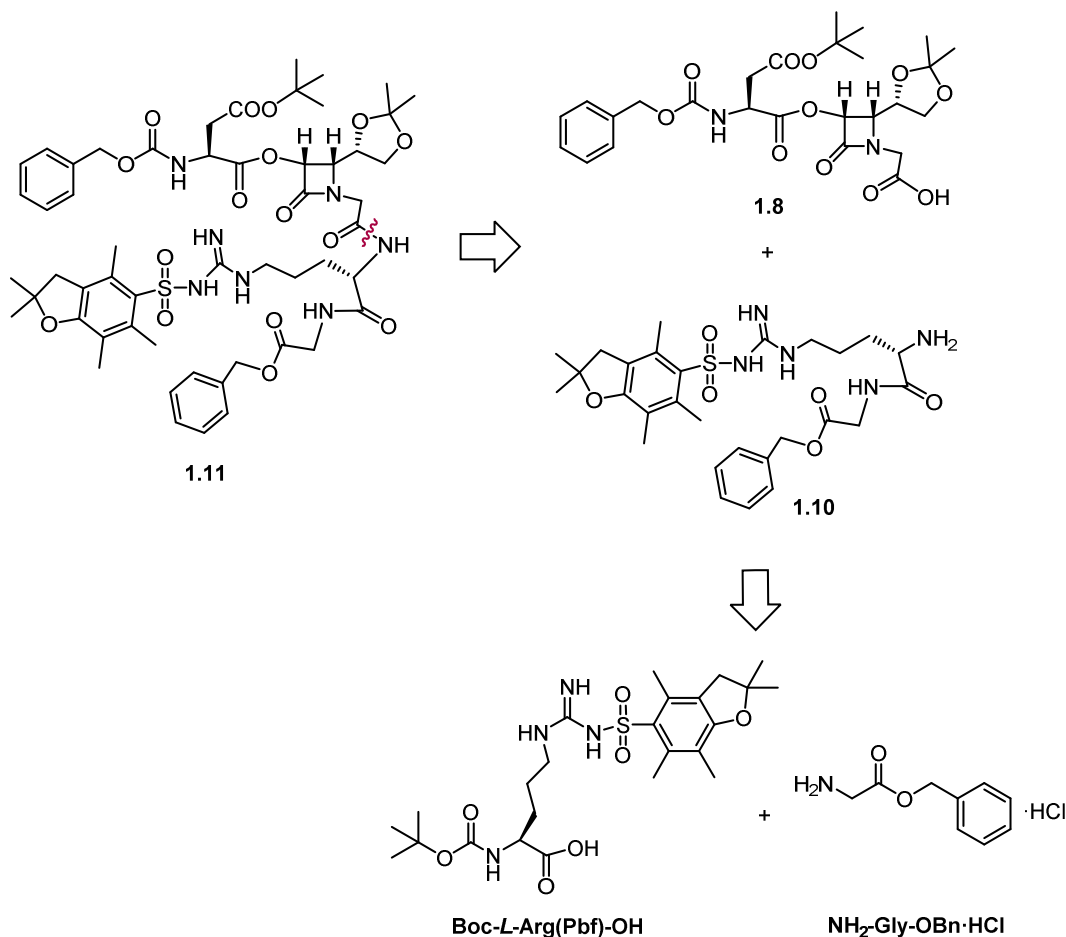


Figura 37.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **1.8**.

#### 4.2.2.1.4. Acoplamiento del compuesto **1.8** con el dipéptido arginina-glicina<sup>130</sup>

Con el fin de optimizar el rendimiento global del depsipéptido lineal **1.11**, nos propusimos llevar a cabo su síntesis en forma convergente; preparando el dipéptido arginina-glicina **1.10** en una etapa previa tal como se describe en el *Esquema 28*:

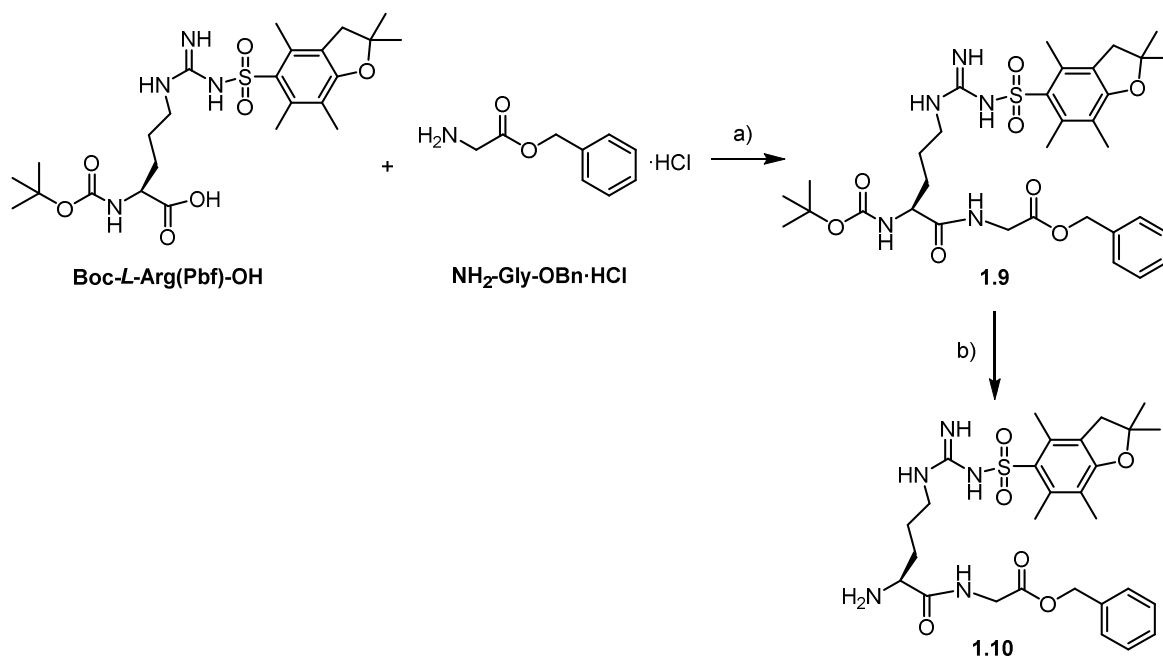


**Esquema 28.** Restrosíntesis del compuesto **1.11**.

Para la formación del dipéptido **1.10** partimos de los aminoácidos protegidos Boc-Arg(Pbf)-COOH y NH<sub>2</sub>-Gly-OBn·HCl, ambos comerciales y asequibles. El acoplamiento se llevó a cabo utilizando los agentes de acoplamiento EDC·HCl y HOBT en presencia de la base TEA. El dipéptido se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice obteniendo el producto **1.9** en forma de espuma blanca.

<sup>130</sup> En este punto se separan las rutas sintéticas de los depsipentapéptidos **1** y **3**, ya que el último no contiene el aminoácido glicina en su estructura.

A continuación se desprotegió quimiosselectivamente el grupo Boc en medio ácido; la reacción se siguió por TLC y en 5 horas la conversión fue total obteniéndose un sólido blanco que no precisó de purificación. El dímero con el grupo amino de la arginina libre **1.10** se obtuvo con un rendimiento global del 84%.



**Esquema 29.** Formación del dímero arginina-glicina. a) EDC-HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h. b) HCOOH, t. a., 5 h. (Rto. global del 84%)

La estructura de los compuestos **1.9** y **1.10** se confirmó mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN. En la *Figura 38* se pueden observar la señal perteneciente al enlace peptídico recién formado, H4 ( $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.60$  ppm), que confirman el acoplamiento y en la *Figura 39* la desaparición de la señal correspondiente al *terc*-butilo del grupo Boc, H1, y la señal de la amida, H2, que nos confirma la desprotección (1.50–1.30 ppm). A demás también es notable el desplazamiento del protón del C $\alpha$  de la arginina, H3, hacia un campo más alto ( $\delta_{\text{H3(1.9)}} = 4.36\text{--}4.21$  ppm >  $\delta_{\text{H3(1.10)}} = 3.51\text{--}3.37$  ppm).

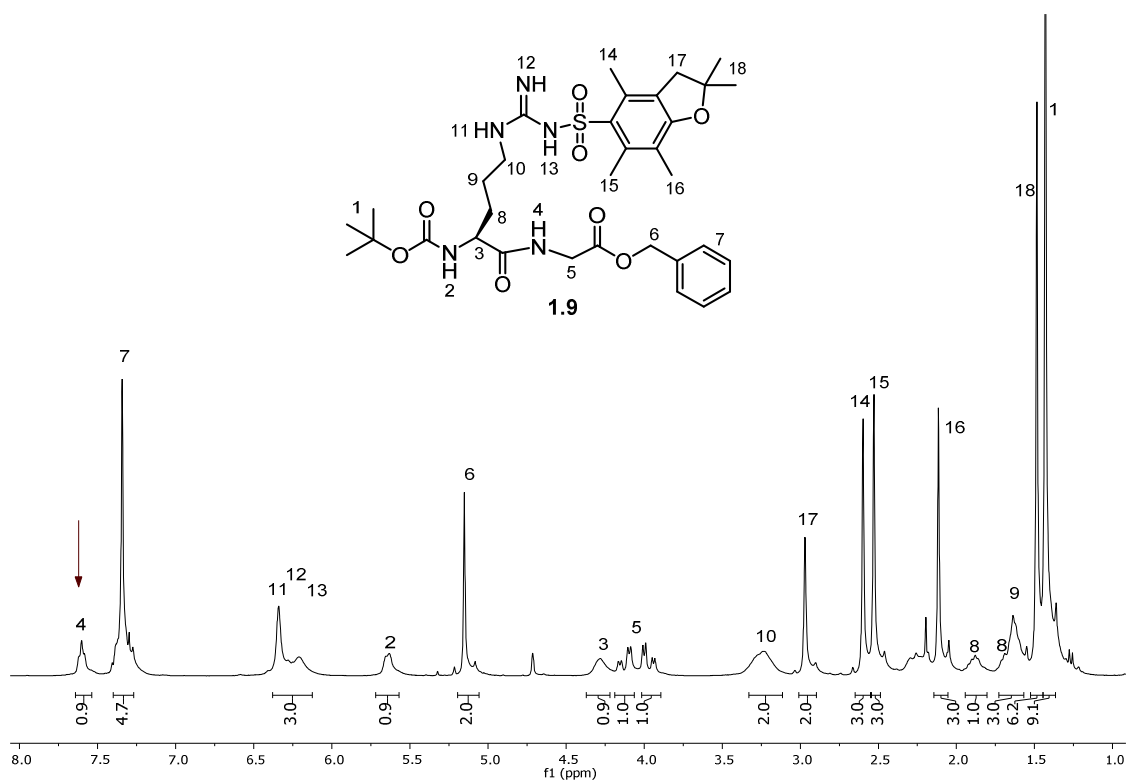


Figura 38.  $^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.9.

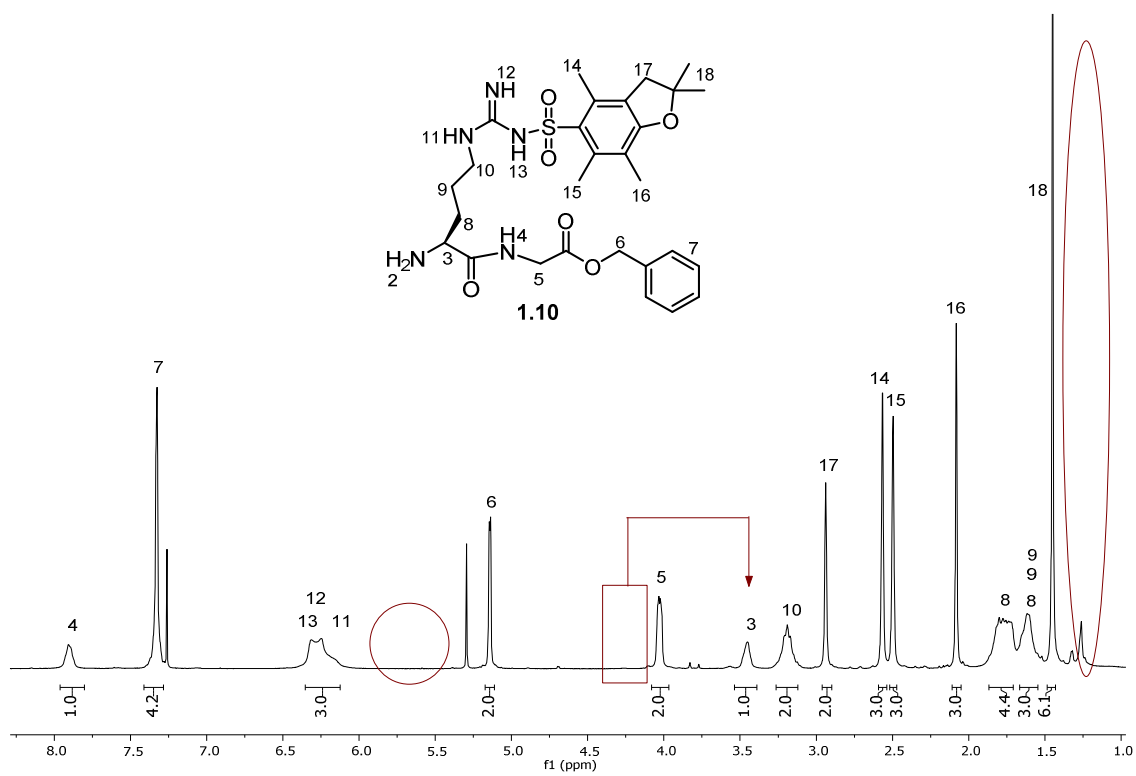
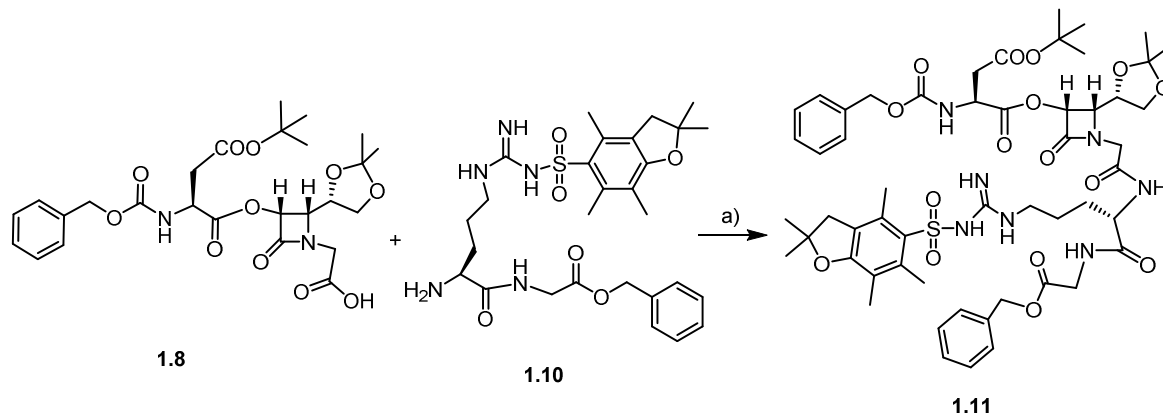


Figura 39.  $^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.10.

Una vez preparado el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** con el grupo amino libre y habiendo obtenido el compuesto Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **1.8** se procedió a su acoplamiento peptídico para dar lugar al compuesto **1.11**, precursor lineal del depsipentapéptido cíclico **1**.



**Esquema 30.** Formación del precursor lineal del compuesto cíclico **1**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (76%).

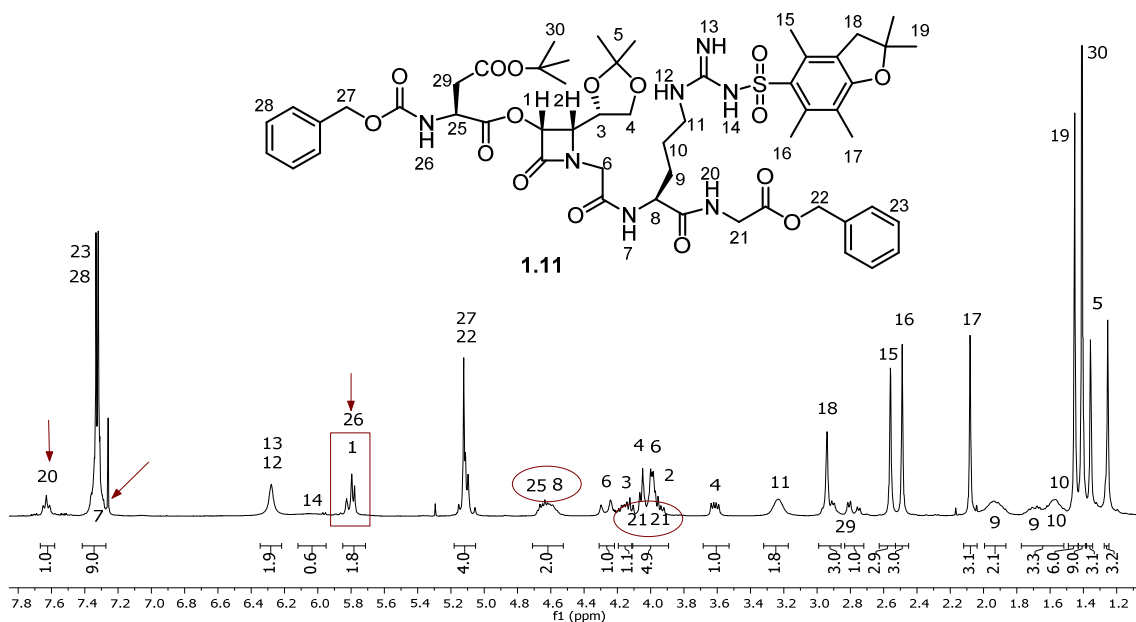
El acoplamiento se llevó a cabo, empleando EDC·HCl y HOBT como agentes de acoplamiento en presencia de TEA. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice ácida obteniendo un sólido blanco en forma de espuma con un rendimiento del 76%. Este procedimiento se pudo escalar a nivel de más de un gramo de compuesto sin apreciar variación en el rendimiento.

Hay que añadir que la molécula **1.11** dispone de un grupo guanidina que puede protonarse, dificultando su purificación mediante columna de gel sílice ácida. Durante la elución mediante columna la guanidina se protona y los compuestos se separan en grupos distintamente protonados, hecho que dificulta la identificación del producto que buscamos. Una vez aislados, estos productos se pueden desprotonar mediante un lavado básico empleando una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Además este tipo de moléculas tiende a formar agregados en función de la concentración lo que modifica el espectro de <sup>1</sup>H-RMN.<sup>131</sup>

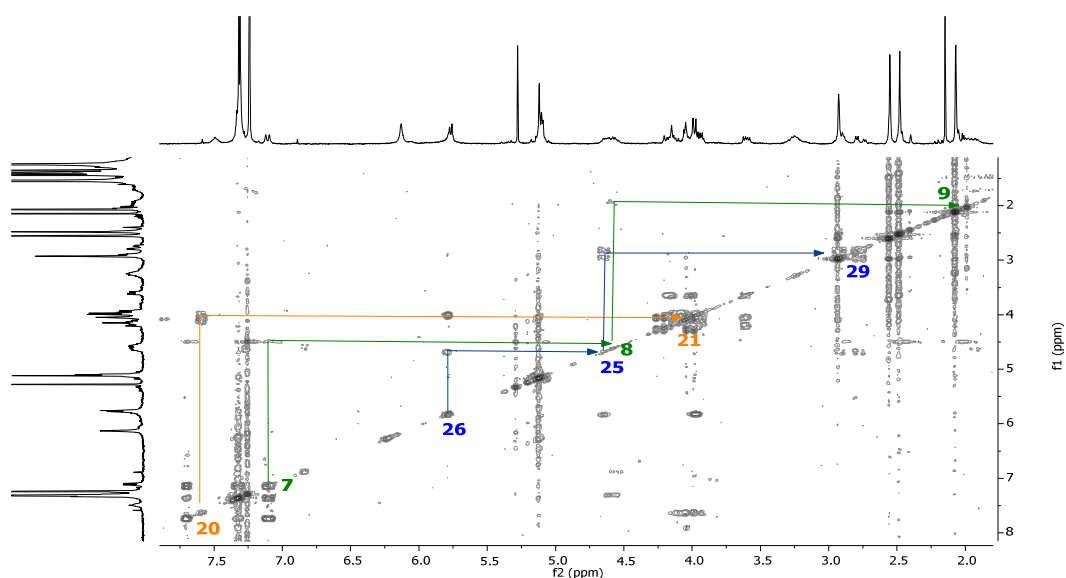
La estructura del compuesto **1.11** se confirmó mediante espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN asignándose los protones con ayuda de un experimento COSY. En la *Figuras 40–42* se observan las tres señales pertenecientes a los protones de los tres enlaces amida que posee la molécula **1.11**, H26, H7 y H20 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.86\text{--}5.74$  ppm,  $\delta_{\text{NH[Arg]}} =$

<sup>131</sup> Todos los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se encuentran en el apartado *Anexo* pág. 369.

7.40–7.20 ppm y  $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.63$  ppm), y las señales de cruce propias de los acoplamientos con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos correspondientes (H25, H8 y H21). A demás de la señal en campo bajo ( $\delta_{\text{H1}} = 5.86$ –5.74 ppm) del protón del carbono C3 de la  $\beta$ -lactama. Este conjunto de señales indica que los cuatro componentes del precursor, aspártido,  $\beta$ -lactama, arginina y glicina; están unidos debidamente.



**Figura 40.**  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **1.11**. Se ha vuelto a comenzar con la numeración y se ha optado por no emplear el número 24 al enumerar los hidrógenos para que coincida con la de sus análogos peptídicos, pudiéndose comparar más fácilmente.



**Figura 41.** COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **1.11**.

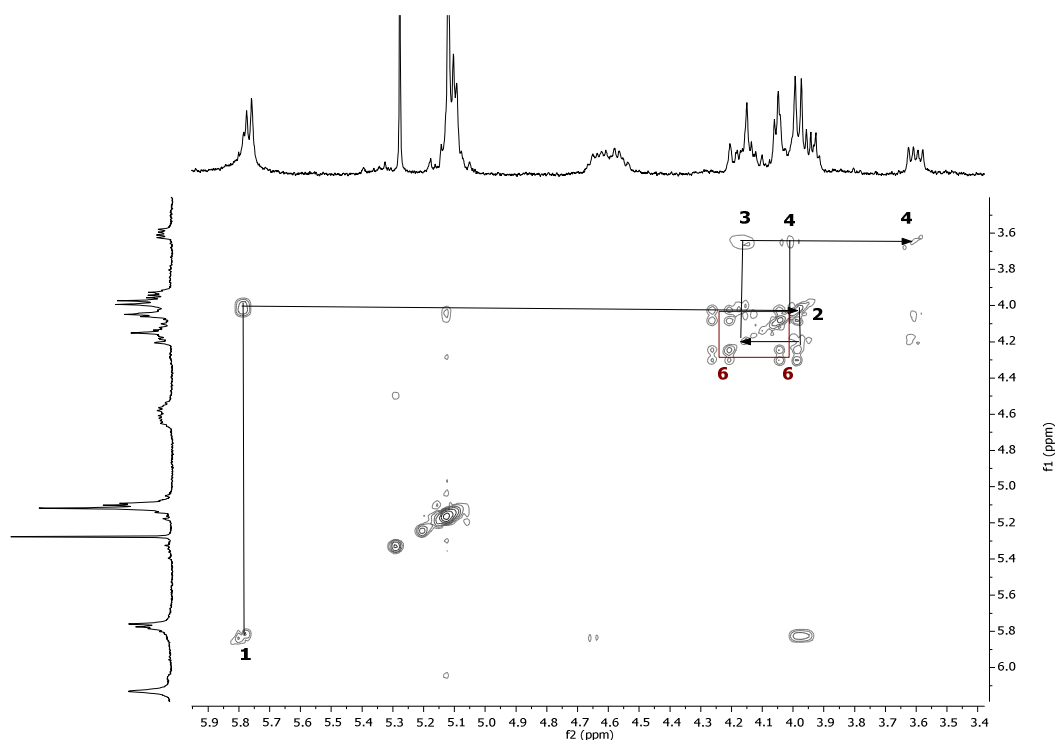
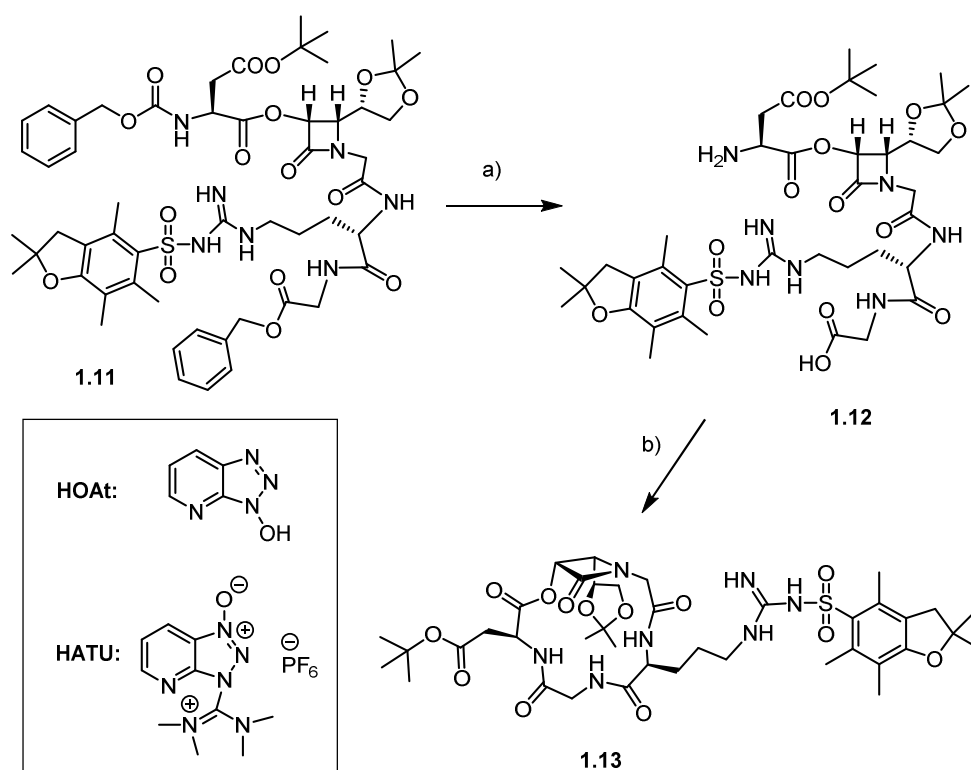


Figura 42. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) aumentado del compuesto **1.11**.

#### 4.2.2.1.5. Desprotección y ciclación

La ciclación del precursor es la reacción más compleja ya que requiere que las cadenas laterales de las moléculas estén direccionadas o próximas entre sí. Como se especifica en el apartado "Retrosíntesis" 4.2.1.1 (pág. 71) y en el apartado 2.5.2.2. de la *Introducción* (pág. 49), la inserción de una  $\beta$ -lactama en un pseudopéptido acíclico provoca una fuerte estabilización de la conformación  $\beta$ -girada aproximando las cadenas laterales y facilitando la formación del enlace peptídico intramolecular.

Además también se necesitan condiciones de alta dilución para que suceda el acoplamiento intramolecular en vez del intermolecular.



**Esquema 31.** Desprotección de los grupos benciloxilo y Cbz y posterior ciclación. a)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. b) HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$ , DMF,  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h.

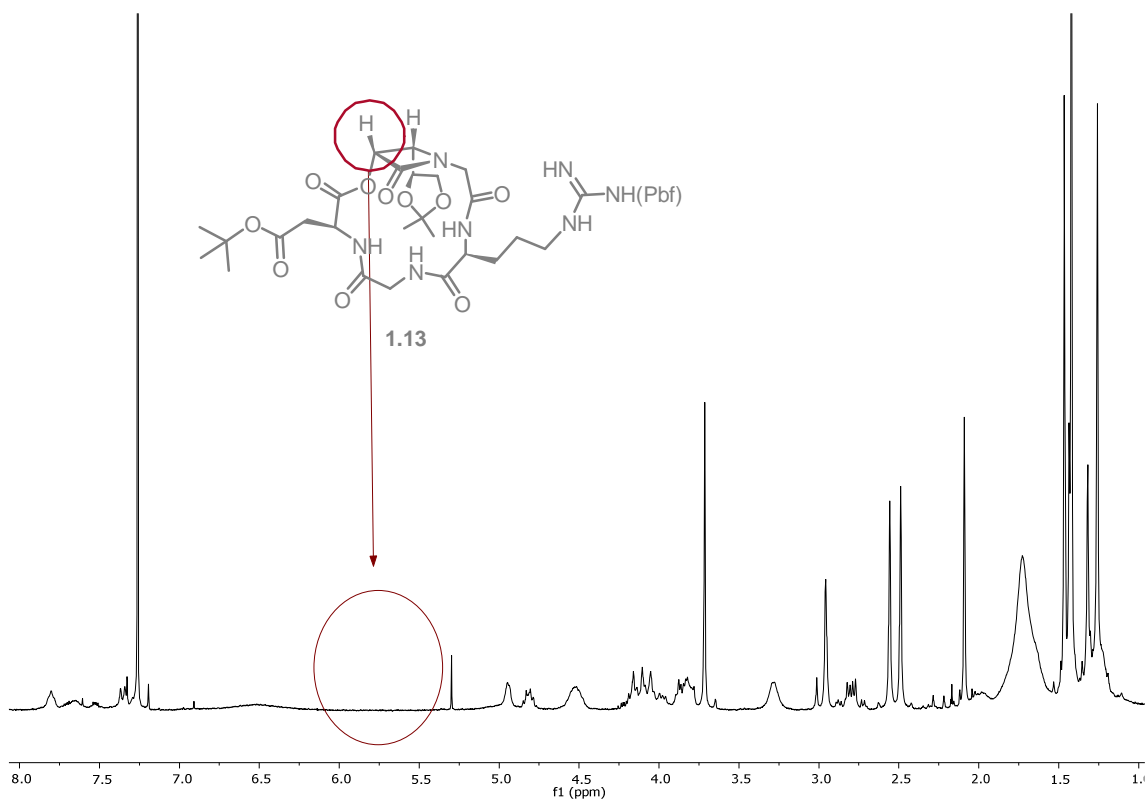
Para llevar a cabo la ciclación conducente al compuesto **1.13** (*Esquema 31*), hay que eliminar en primer lugar los grupos Cbz y benciloxilo, que protegen el grupo amino y el carboxilo a enlazar, mediante una hidrogenolisis.<sup>132</sup> Para ello se empleó Pd/C como catalizador y metanol como disolvente a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno.

Tras comprobar mediante  $^1\text{H}$ -RMN la ausencia de señales de los protones aromáticos la reacción de ciclación se llevó a cabo empleando los agentes de acoplamiento HATU y HOAt en presencia de  $\text{KHCO}_3$  en DMF a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  en condiciones de alta dilución (2 mmol/L).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción, como se puede observar en la *Figura 43*, no muestra ninguna señal entre 5.5 y 6.0 ppm, donde debería localizarse la señal del protón unido al carbono C3 de la hidroxilactama unida mediante un enlace éster al ácido aspártico; aunque el resto de las señales sí parecen presentar los desplazamientos esperados.

<sup>132</sup> a) Blaser, H.-U.; Indolese, A.; Schnyder, A.; Steiner, H.; Studer, M.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2001**, *173*, 3–18. b) Rylander, P. N.; *Hydrogenation Methods*, Engelhard Corporation Edison, New Jersey **1985**.

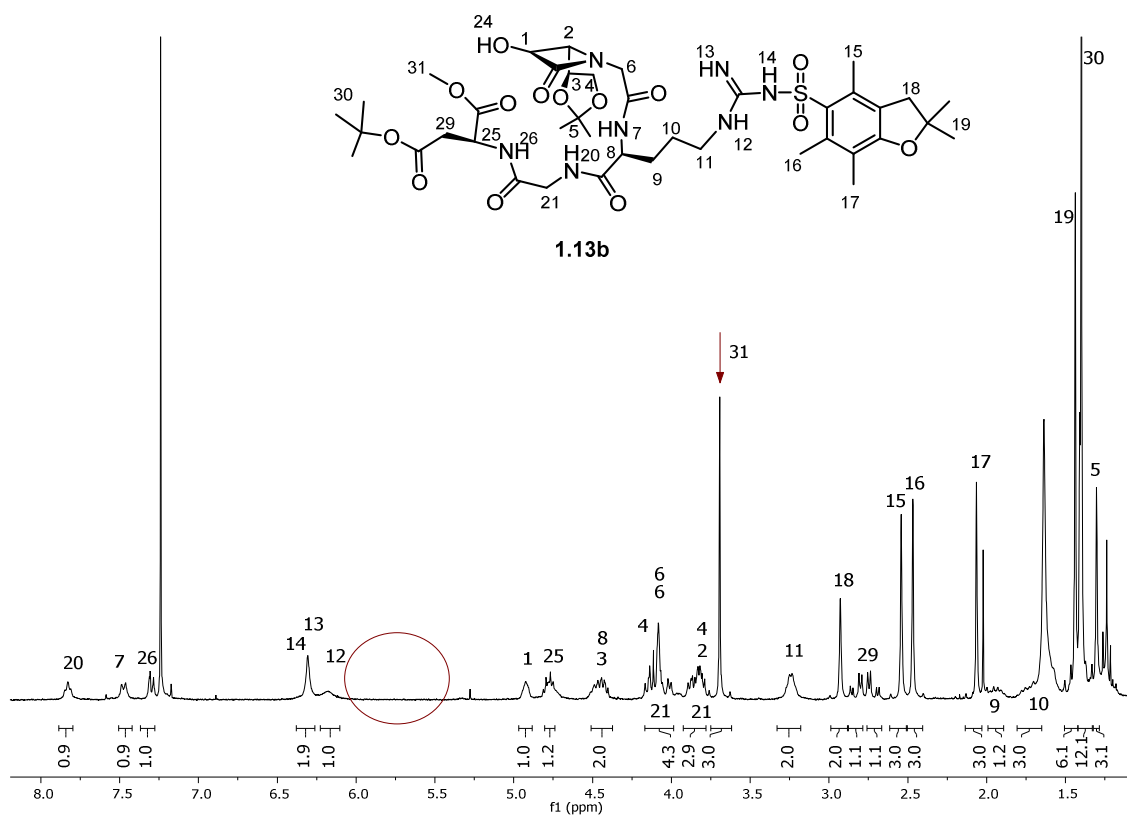




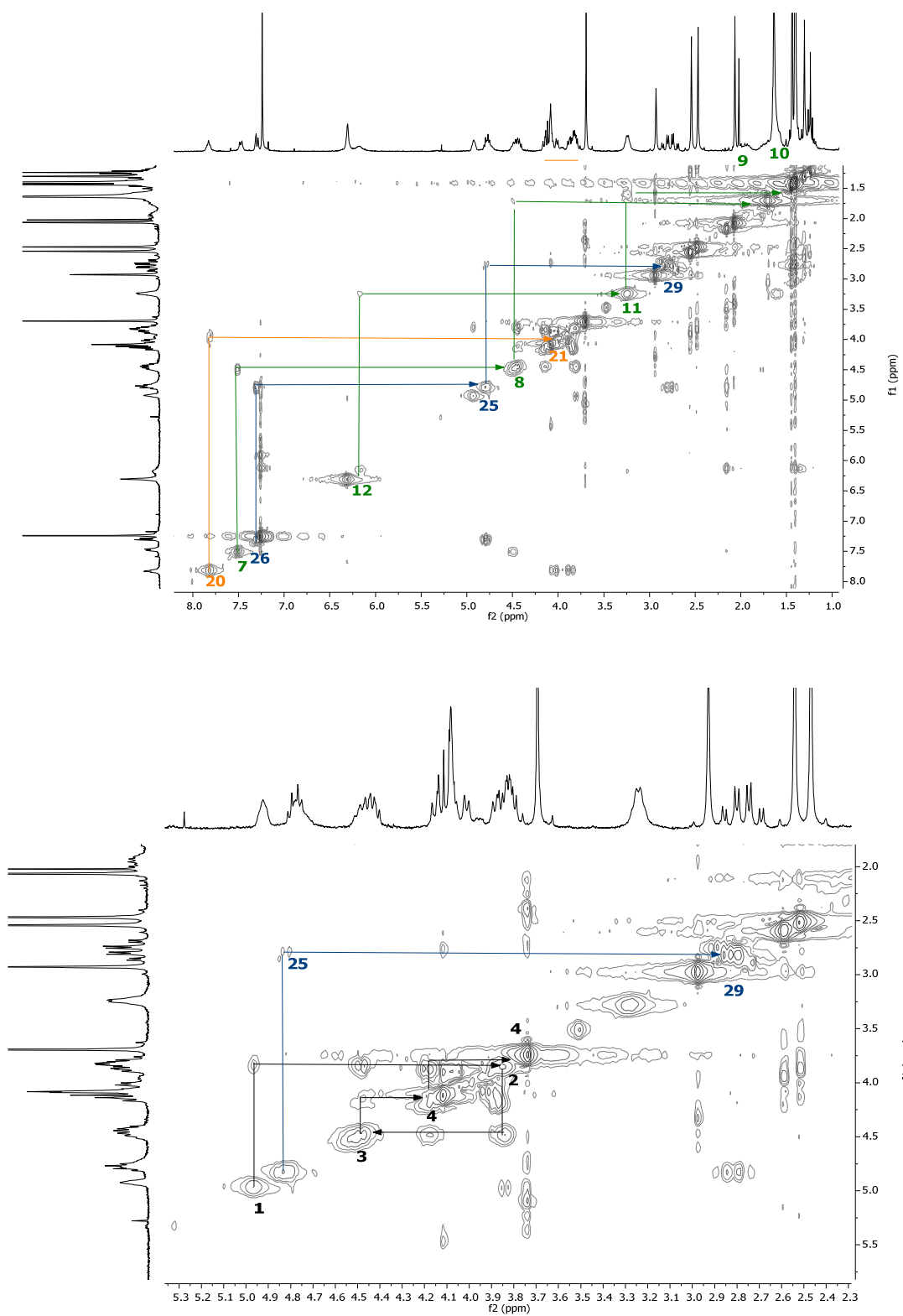
**Figura 43.**  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción de la ciclación del producto **1.12**.

Con el fin de analizar el resultado de la reacción se purificó el compuesto mayoritario empleando una placa preparativa de gel de sílice y se caracterizó el producto aislado mediante experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN y COSY. Como se puede ver en las *Figuras 44–45* en el espectro se encuentran todas las señales de protón pertenecientes al compuesto **1.13**, pero la señal perteneciente al protón presente sobre el carbono C3 de la  $\beta$ -lactama, H1, está desplazada hacia un campo más alto ( $\delta_{\text{H1}(1.11)} = 5.86\text{--}5.74\text{ ppm} > \delta_{\text{H1}(1.13b)} = 4.94\text{--}4.90\text{ ppm}$ ). Este desplazamiento coincide con el desplazamiento de H1 cuando el carbono que lo sustenta (C3) está unido a un grupo hidroxilo (ver *Figura 32*, pág. 86); lo que parece indicar que el ciclo se ha podido abrir por el enlace éster dando lugar a una nueva estructura lineal.

Por otro lado, en la *Figura 44* hay una señal a 3.70 ppm, cuya integración corresponde a tres protones, que no pertenece a las moléculas **1.11**, **1.12** ni **1.13** y que podría corresponder al producto de transesterificación **1.13b** causada tanto por trazas de metanol en la etapa de ciclación (H31), como por el metanol empleado como disolvente en la etapa de hidrogenolisis.



**Figura 44.**  $^1\text{H-NMR}$  del producto mayoritario de la ciclación del compuesto **1.12** conseguido empleando las siguientes condiciones: hidrogenación:  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t. a., 16 h; ciclación: HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$ , DMF,  $-15^\circ\text{C}$ , 16 h.



**Figura 45.** COSY del producto mayoritario de la ciclación del compuesto **1.12** conseguido empleando las siguientes condiciones: hidrogenación: H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h; ciclación: HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

Esta observación se confirmó por análisis de masa aproximada mediante UPLC-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) del producto **1.13b**. El análisis dio como resultado un único producto cuya masa (+ H<sup>+</sup>) fue de 896.69 m/z, diferente a la masa del producto objetivo (masa exacta teórica = 863.3735) en 32.31 unidades, y coincidente con la del producto **1.13b** (masa exacta teórica = 895.3997; masa exacta teórica + H<sup>+</sup> = 896.4075) (*Esquema 32*).<sup>133</sup>

Una vez confirmado que la molécula había sufrido transesterificación se realizó un estudio para averiguar en qué etapa ocurría. Establecimos las dos hipótesis expuestas en el *Esquema 32*: 1) o bien había ocurrido en la etapa de hidrogenolisis con metanol como disolvente dando como resultado los compuestos **1.12b** y **1.12c**; 2) o en la etapa de ciclación, transesterificándose con las trazas de metanol que podía haber en el medio.

Para verificar la hipótesis correcta y aproximarnos a una solución, realizamos un análisis de UPLC-MS al crudo de la reacción de hidrogenación.

En este caso en el espectro de UPLC se observa un pico cuya masa (+ H<sup>+</sup>) es 711.39 m/z y que pertenece al fragmento de la hidrólisis del compuesto **1.12**: HO-β-lactama-Arg-Gly-OH, por lo que la transesterificación ocurre en esta etapa.

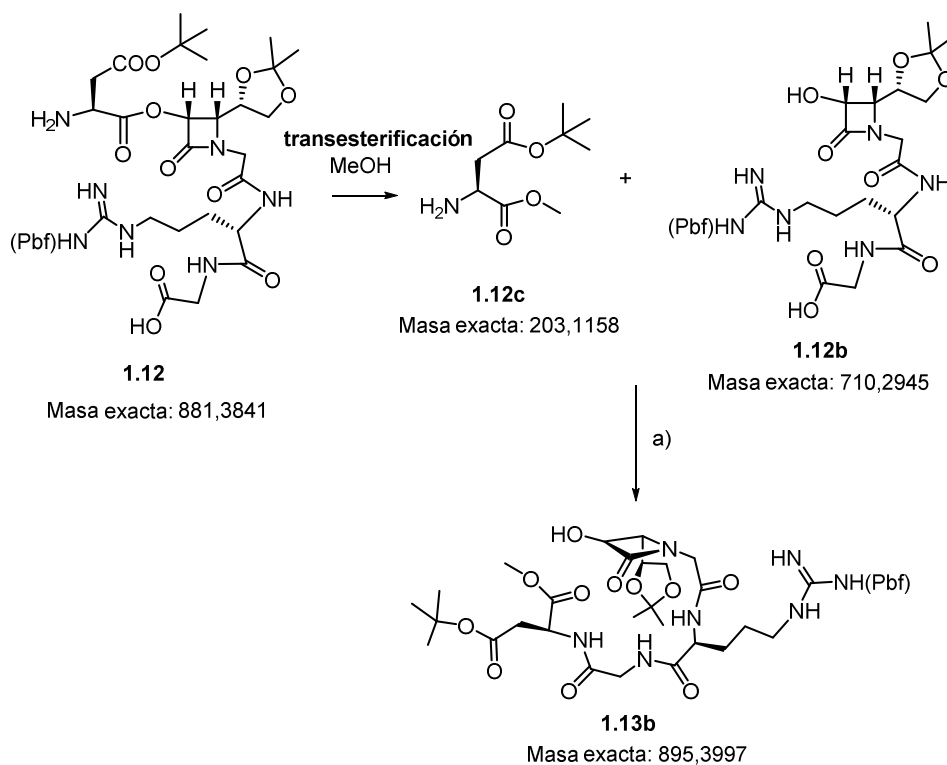
Para solucionar el problema pensamos en optimizar las condiciones de reacción de la hidrogenolisis cambiando el disolvente, la temperatura y el tiempo de reacción. Se hicieron varios ensayos con 20 mg del producto de partida (*Tabla 5*). Los crudos de reacción se analizaron por UPLC-MS determinando el porcentaje de conversión y de hidrólisis.

En primer lugar se probó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas con diferentes disolventes, siendo el THF y el AcOEt los que mejores resultados ofrecían (ent. 3 y 4). Aún así se detectaba producto de hidrólisis por lo que se pensó en disminuir los tiempos de reacción y la temperatura. Como puede observarse en la tabla la entrada 8 es la que presenta mejores resultados por lo que la reacción se llevó a cabo de nuevo en esas condiciones y en una escala de 200 mg.

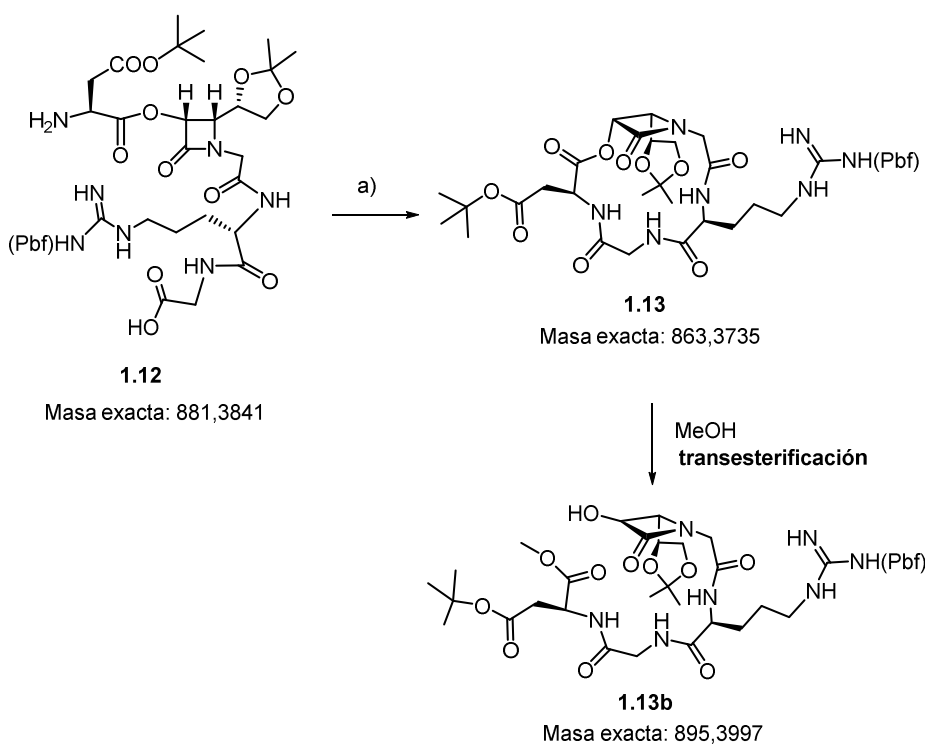
---

<sup>133</sup> Los espectros de UPLC-MS se encuentran en el apartado *Anexo* pág. 496.

1) Transesterificación en la etapa de hidrogenolisis



2) Transesterificación en la etapa de ciclación



**Esquema 32.** Hipótesis planteadas sobre la transesterificación. Masas exactas teóricas de los compuestos que toman parte en ambas hipótesis. a) HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$ , DMF,  $-15^\circ\text{C}$ , 16 h.

**Tabla 5.** Reacción llevada a cabo con el compuesto **1.11** a escala de 20 mg y catalizada con Pd/C.

Ent.	Disolvente <sup>b</sup>	T (°C)	t (h) <sup>c</sup>	Transesterificación (%)	Conv. (%)
1	MeOH	t. a.	20	100	100
2	EtOH	t. a.	20	57	100
3	AcOEt	t. a.	20	37	100
4	THF	t. a.	20	15	100
5	AcOEt	t. a.	3 <sup>a</sup>	20	99
6	THF	t. a.	2 <sup>a</sup>	8	99
7	AcOEt	0	6 <sup>a</sup>	8	99
8	THF	0	3 <sup>a</sup>	2	99

<sup>a</sup> El tiempo de reacción de se determinó por TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10)) paralizando la reacción con la aparición del producto de hidrólisis. <sup>b</sup> Además se llevaron a cabo las reacciones añadiendo ácidos de diferente carácter pero no se observaron mejoras en la reacción.<sup>134,132</sup>

<sup>c</sup> Se intentaron reducir los tiempos de reacción empleando un hidrogenador a presión pero los resultados tampoco fueron satisfactorios.<sup>132</sup>

La reacción se llevó a cabo a 0 °C en un baño de H<sub>2</sub>O/hielo usando como disolvente THF y se controló mediante TLC; a las 4 horas se observó la formación del producto de hidrólisis pero al haber aumentado la escala, en esta ocasión la conversión no fue tan alta. Además en el matraz apareció un precipitado en forma de polímero que podría deberse a la hidrogenación del THF. Por lo que se repitió la reacción empleando la mezcla de disolventes EtOAc/THF (1/1). Al igual que en el caso anterior a las 4 horas se observó el producto de hidrólisis por TLC con una conversión todavía baja, pero esta vez no se observó polimerización del disolvente. Mediante <sup>1</sup>H-RMN de una alícuota pudimos ver que tan solo se había hidrogenado uno de los grupos protectores por lo que la reacción se dejó en agitación toda la noche. Tras 16 horas se comprobó que la conversión había sido completa y la mezcla de reacción se filtró con celita, se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió en DMF para llevar a cabo la ciclación en las condiciones anteriormente mencionadas (*Figura 38*, pág. 96).

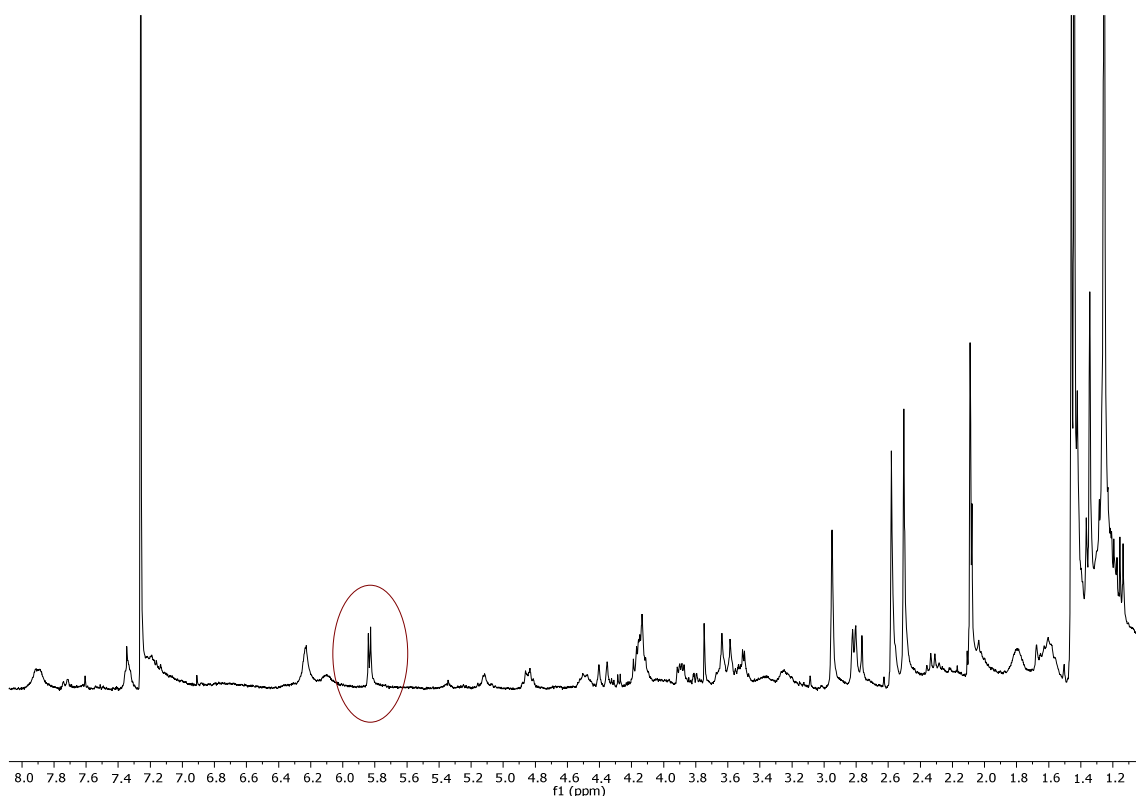
Esta vez, en el crudo de la reacción de ciclación, sí que se observa la señal perteneciente al protón del carbono C3 de la β-lactama (*Figura 46*) por lo que

<sup>134</sup> a) Studer, M.; Blaser, H.-U.; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1996**, *112*, 437–445. b) Nakajima, M.; Watanabe, B.; Han, L.; Shimizu, B.; Wada, K.; Fukuyama, K.; Suzuki, H.; Hiratake, J.; *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1176–1194. c) Zhou, T.; Hider, R. C.; Jenner, P.; Campbell, B.; Hobbs, C. J.; Rose, S.; Jairaj, M.; Tayarani-Binazir, K. A.; Syme, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4035–4042.

procedimos a su purificación mediante placa preparativa de gel de sílice,<sup>135</sup> consiguiendo un sólido blanco con un rendimiento global del 65%.

Confirmamos la estructura del compuesto **1.13** mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN y asignamos las señales de cada protón mediante un experimento COSY. En las Figuras 47–48 se observan las tres señales pertenecientes a los protones de los tres enlaces amida que posee la molécula **1.13**, H26, H7 y H20 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 7.88$  ppm,  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 7.08$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.99\text{--}7.92$  ppm), y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H8 y H21). A demás, se puede observar la señal a campo bajo ( $\delta_{\text{H1}} = 5.86$  ppm) del protón del carbono C3 de la  $\beta$ -lactama, H1, característica de un enlace éster. El conjunto de estas señales indica que la ciclación tuvo lugar sin la rotura de ningún enlace.

Al realizar el análisis de UPLC-MS se observó una sola señal cuya masa (+ H<sup>+</sup>) era 864.51 m/z, masa que esta vez sí coincide con el valor teórico (masa exacta teórica 863.3735; masa exacta teórica + H<sup>+</sup> = 864.3813).



**Figura 46.** <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción de ciclación del compuesto **1.12** hidrogenado en las condiciones óptimas determinadas: EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h.

<sup>135</sup> En la purificación del compuesto **1.11** empleamos acetona en vez de metanol para proteger al enlace éster de posibles ataques nucleofílicos.

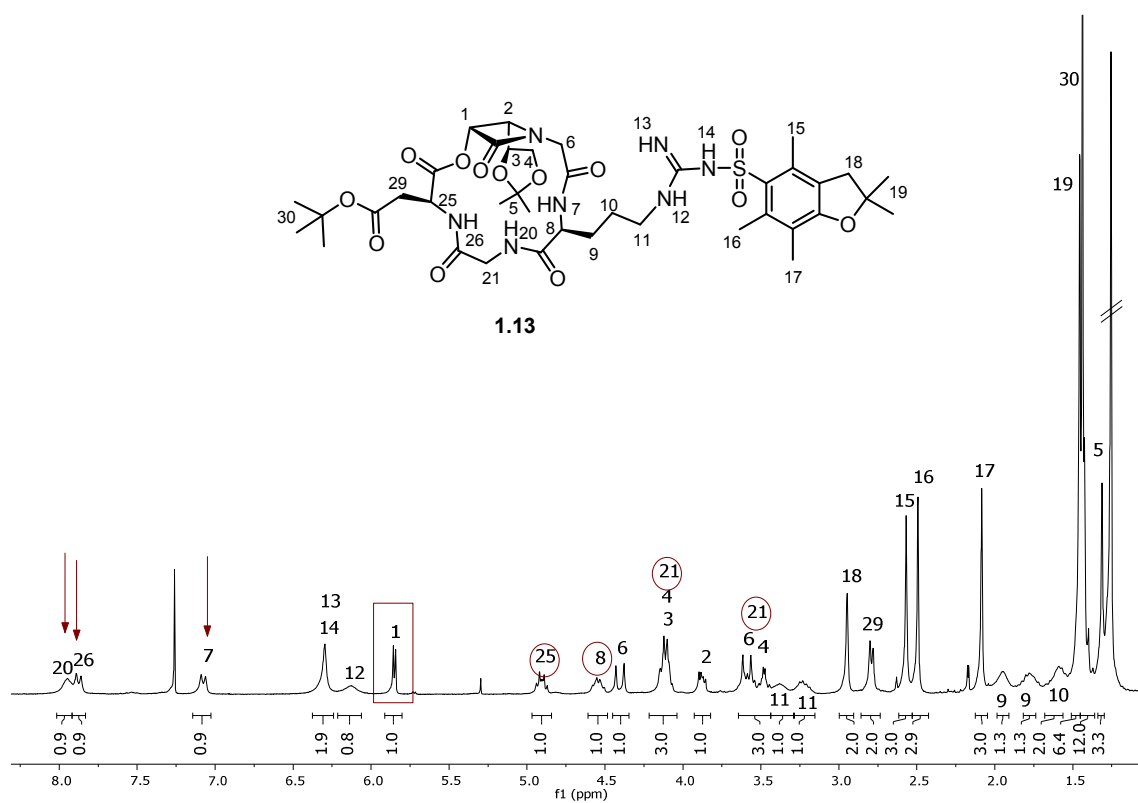


Figura 47.  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **1.13** purificado.

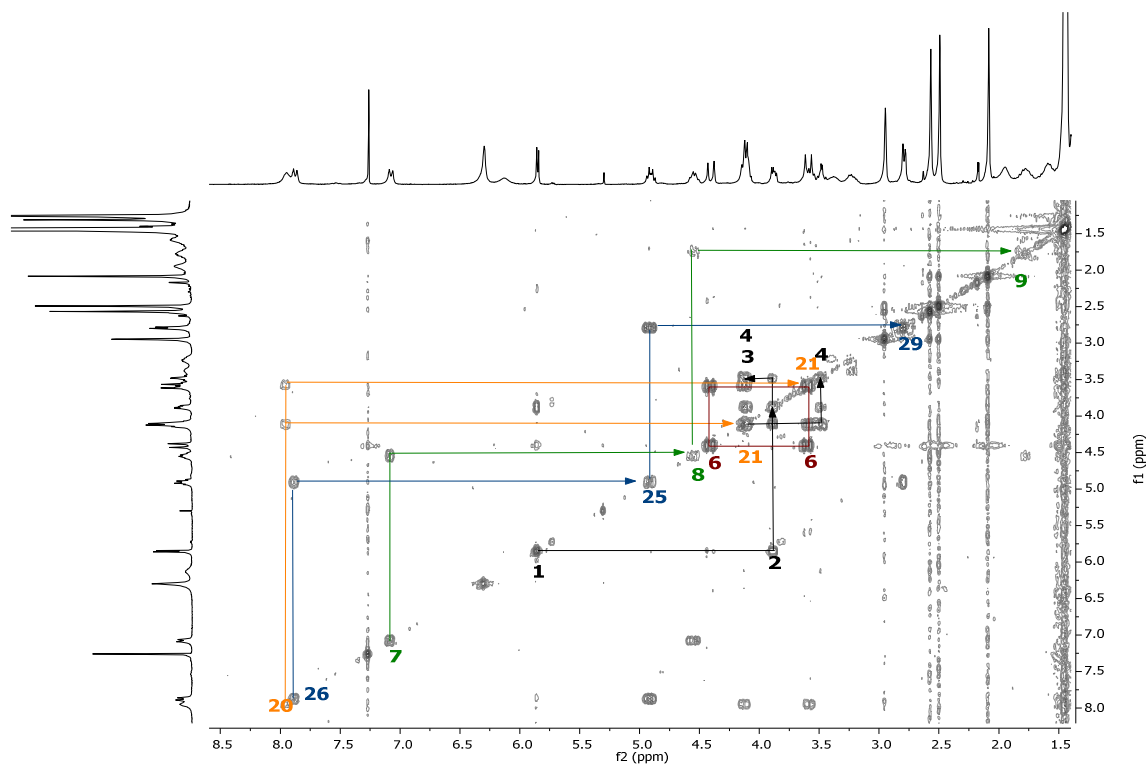
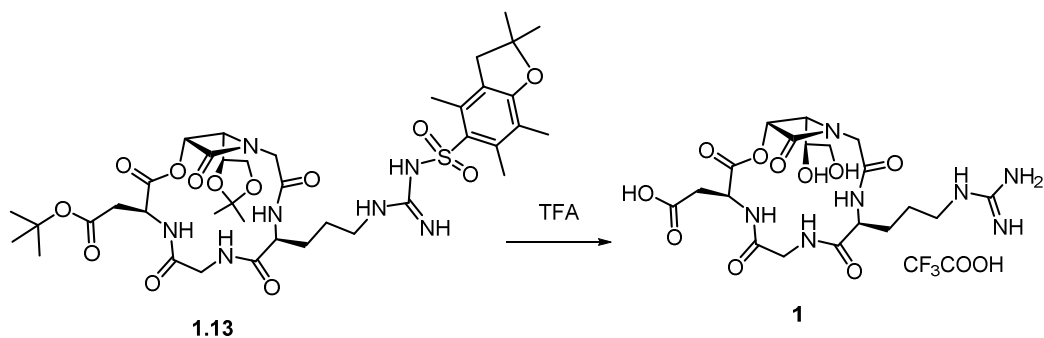


Figura 48. COSY del compuesto **1.13** purificado.



#### 4.2.2.1.6. Desprotección exhaustiva del compuesto 1.13

Una vez preparado el ciclodepsipéptido el último paso a realizar fue la desprotección exhaustiva de los grupos protectores <sup>t</sup>Bu, acetal y Pbf de las cadenas laterales de los aminoácidos.



**Esquema 33.** Desprotección exhaustiva de la molécula **1.13**. Obtención de la molécula objetivo **1**.

Para ello se disolvió el compuesto cíclico **1.13** en ácido trifluoroacético y la mezcla se calentó a 30 °C durante 5 horas; a continuación se evaporó el disolvente a presión reducida obteniendo un crudo de color marrón oscuro que resultó ser la descomposición del producto. Con objetivo de suavizar las condiciones se empleó cloroformo/ácido trifluoroacético (70/30) pero el resultado fue idéntico; por lo que se bajó la temperatura a 4 °C; en estas condiciones la desprotección no fue cuantitativa a las 72 horas.

Tras estos resultados, nos planteamos el empleo de *scavengers* como coayudantes en la desprotección; el papel que juega el *scavenger* o “secuestrador” es el de retener a los radicales libres que se forman al desprotegerse el grupo Pbf impidiendo reacciones secundarias no deseadas y cooperando en la desprotección. El uso de trimetilclorosilano y fenol es una opción descrita en la bibliografía.<sup>136</sup> La reacción se llevó a cabo disolviendo el sustrato **1.13**, Me<sub>3</sub>SiCl y fenol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y añadiendo a 4 °C TFA gota a gota. Aunque la reacción debería transcurrir en 5 horas tras 72 horas todavía se observaban las señales correspondientes al Pbf mediante <sup>1</sup>H-RMN.

Otra alternativa se basa en el empleo de trietilsilano en una disolución de TFA y agua (9/1).<sup>137</sup> En estas condiciones la desprotección resultó no ser cuantitativa a las 72

<sup>136</sup> Kaiser, E.; Tam, J. P.; Kubiak T. M.; Merrifield R. B.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 303–306.

<sup>137</sup> Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson T. J.; Douglas, K. T.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5441–5444.

horas por lo que se pensó en sustituir el TFA por el anhídrido de TFA, una especie más activa, accediendo al depsipéptido **1** tras 16 horas.

**Tabla 6.** Optimización de la reacción de desprotección del ciclo **1.13**.

Ent.	Ácido	Disolvente	Aditivo	T (°C)	T (h)	Resultado
1	TFA	-	-	30	5	Descomposición
2	TFA	CHCl <sub>3</sub>	-	30	5	Descomposición
3	TFA	-	-	4	72	Conv. no completa
4	TFA	CHCl <sub>3</sub>	-	4	72	Conv. no completa
5	TFA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Me <sub>3</sub> SiCl/fenol	4	72	Conv. no completa
6	TFA	H <sub>2</sub> O	Et <sub>3</sub> SiH	0 → 4	72	Conv. no completa
7	Anhídrido de TFA	H <sub>2</sub> O	Et <sub>3</sub> SiH	0 → 4	16	Conv. completa

El compuesto **1** se analizó mediante <sup>1</sup>H-RMN. Tras la asignación de señales mediante un experimento COSY podemos afirmar que la estructura del compuesto obtenido se corresponde con el depsipentapéptido **1** (Figuras 49 y 50). La señal a campo bajo del protón del C3 de la β-lactama, H1 (δ<sub>H1</sub> = 5.86 ppm), indica que el enlace no se ha roto en la desprotección. En la 4.2, <sup>1</sup>H-RMN realizado en agua no deuterada, se pueden observar las señales de protón pertenecientes a los grupos amida (H26, H7 y H20) y al grupo guanidino (H12, H13 y H14).

La masa exacta (+ H<sup>+</sup>) encontrada mediante HRMS (*high-resolution mass spectrometry*), 516.2051 m/z, coincide también con la masa exacta teórica calculada, 515.1976 (masa exacta calculada + H<sup>+</sup> = 516.2054).

Por lo que se puede concluir que se ha sintetizado por primera vez un depsipéptido cíclico β-lactámico con estructura RGD.

## Resultados y discusión

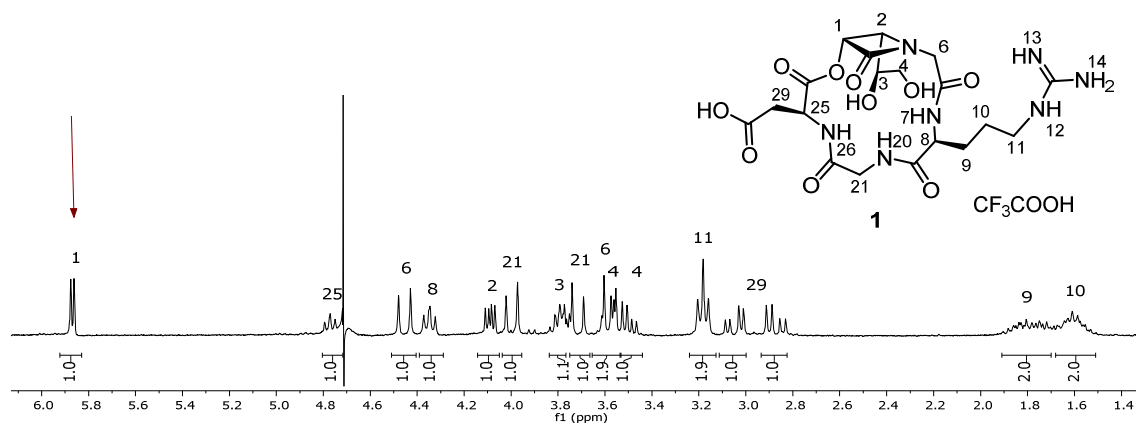


Figura 49.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del compuesto 1.

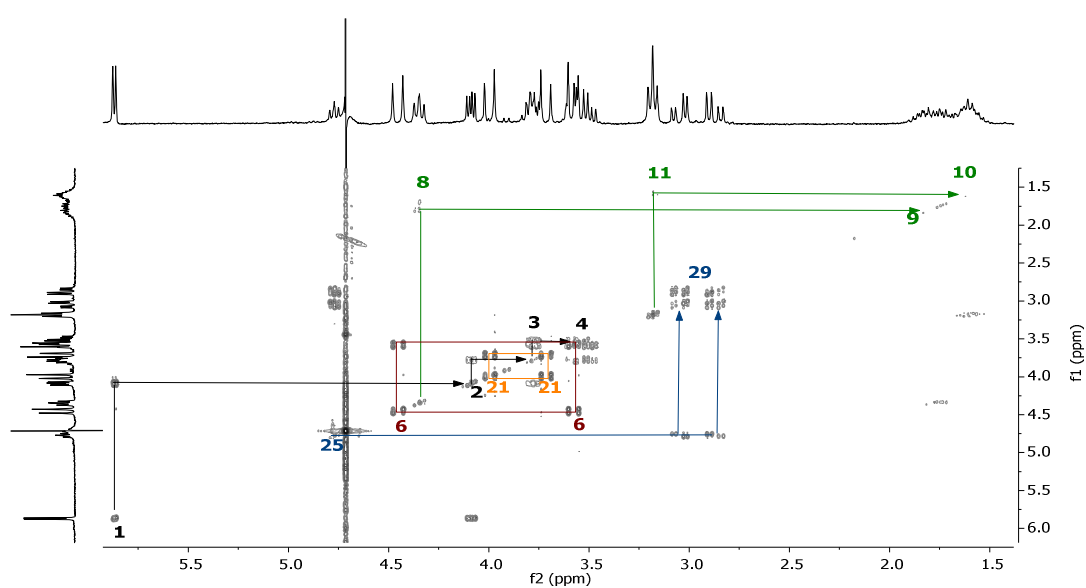


Figura 50. COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del compuesto 1.

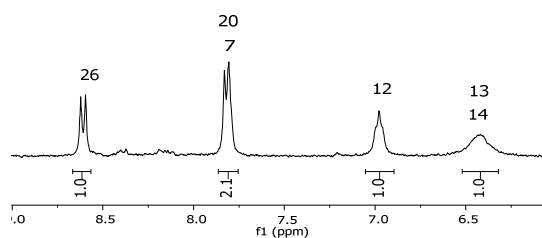


Figura 51.  $^1\text{H}$ -RMN ampliado ( $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (10/90)) del compuesto 1.<sup>138</sup>

<sup>138</sup> Para poder ver los protones pertenecientes a los grupos amida y guanidinio no se puede emplear agua deuterada, ya que los hidrógenos de estos grupos se intercambian rápidamente por los deuterios del disolvente.

#### 4.2.2.2. Síntesis de los tetrapeptidomiméticos **2** y **3**

El siguiente objetivo consistió en la síntesis de los tetrapeptidomiméticos **2** (péptido) y **3** (depsipéptido) que poseen la secuencia RD y carecen de glicina en el macrociclo. Con la síntesis de estos compuestos se podrá estudiar la generalización del comportamiento agonista del proceso de angiogénesis en los tetrapeptidomiméticos.

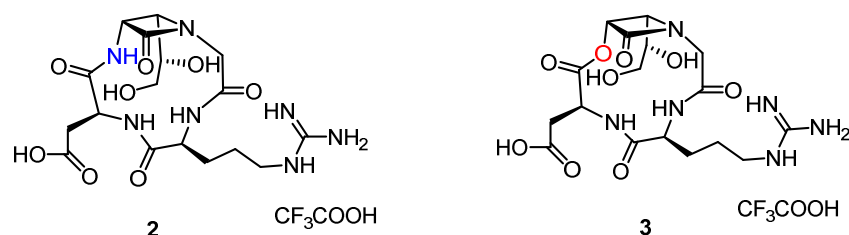


Figura 52. Moléculas objetivo **2** y **3**.

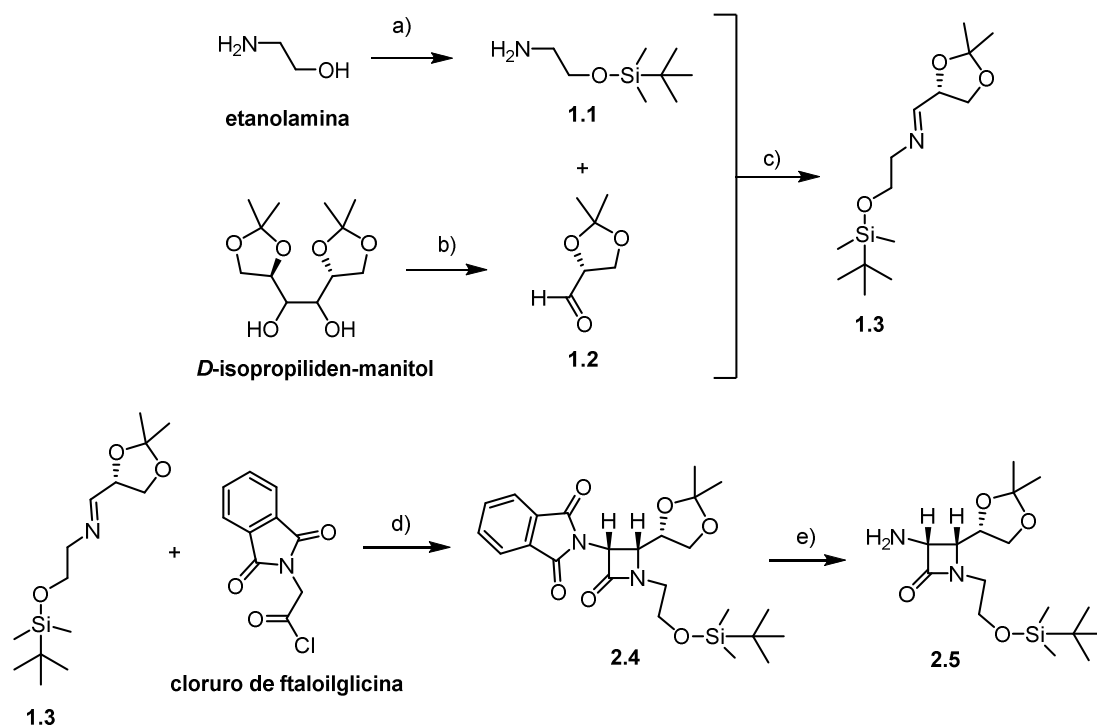
##### 4.2.2.2.1. Tetrapéptido **2**

El compuesto **2**, a diferencia del compuesto **1**, es un tetrapéptido, que no contiene el aminoácido glicina en su estructura. Además, todos los enlaces entre los diferentes aminoácidos son peptídicos por lo que la  $\beta$ -lactama de partida deberá tener un grupo amino como sustituyente sobre el carbono C3.

##### 4.2.2.2.1.1. Síntesis de la *cis*-3-amino- $\beta$ -lactama **2.5**

Como ya se ha comentado al principio de este capítulo la reacción de Staudinger da lugar de forma mayoritaria a  $\beta$ -lactamas de configuración *cis*. Por tanto empleando el ácido carboxílico adecuado se puede obtener la *cis* 3-amino- $\beta$ -lactama de forma directa.

Por ejemplo, utilizando el cloruro de ftaloilglicina, y la imina **1.3** se obtuvo la azetidín-2-ona **2.4** en forma de sólido blanco con un rendimiento del 77%, tras su purificación mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice básica.



**Esquema 34.** Síntesis de la β-lactama *cis* **2.5**. a)  $\text{ClSiMe}_2^t\text{Bu}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20 °C, 12 h. b)  $\text{NaIO}_4$  sobre gel de sílice,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. c) tamiz molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. d) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de -78 °C a t. a., 16 h. e)  $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, t. a., 48 h. (Rto. global del 73%)

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN mostró las señales de los protones en C3 (H1) y C4 (H2) a 5.32 ppm y 3.96 ppm respectivamente con una constante de acoplamiento de 5.3 Hz indicativa de una configuración *cis* (Figura 53).<sup>121</sup>

Para la desprotección del grupo ftaloilo bastó con disolver la β-lactama protegida **2.4** en etanol y añadirle hidracina;<sup>139</sup> tras 48 horas el resultado fue la β-lactama **2.5** en forma de aceite amarillo.

Como se puede observar en la Figura 54 las señales correspondientes a los protones aromáticos desaparecen (7.50–7.25 ppm) y el protón H1 se desplaza hacia un campo más alto ( $\delta_{\text{H1}(2.4)} = 5.32 \text{ ppm} > \delta_{\text{H1}(2.5)} = 4.29\text{--}4.13 \text{ ppm}$ ).

<sup>139</sup> Rivera, G.; Bandyopadhyay, D.; Jaggi, S.; Gonzales, R. C.; Banik, B. K.; *Heterocyclic Communications*, **2009**, *15*, 323–325.

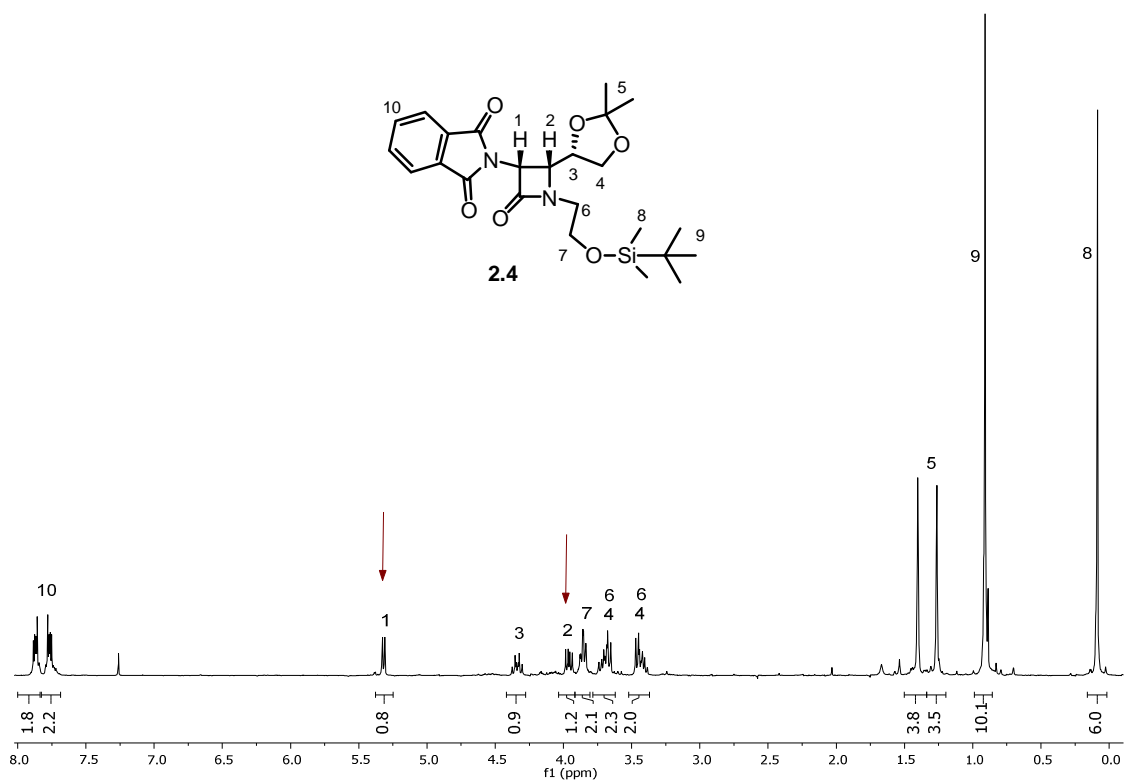


Figura 53.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.4.

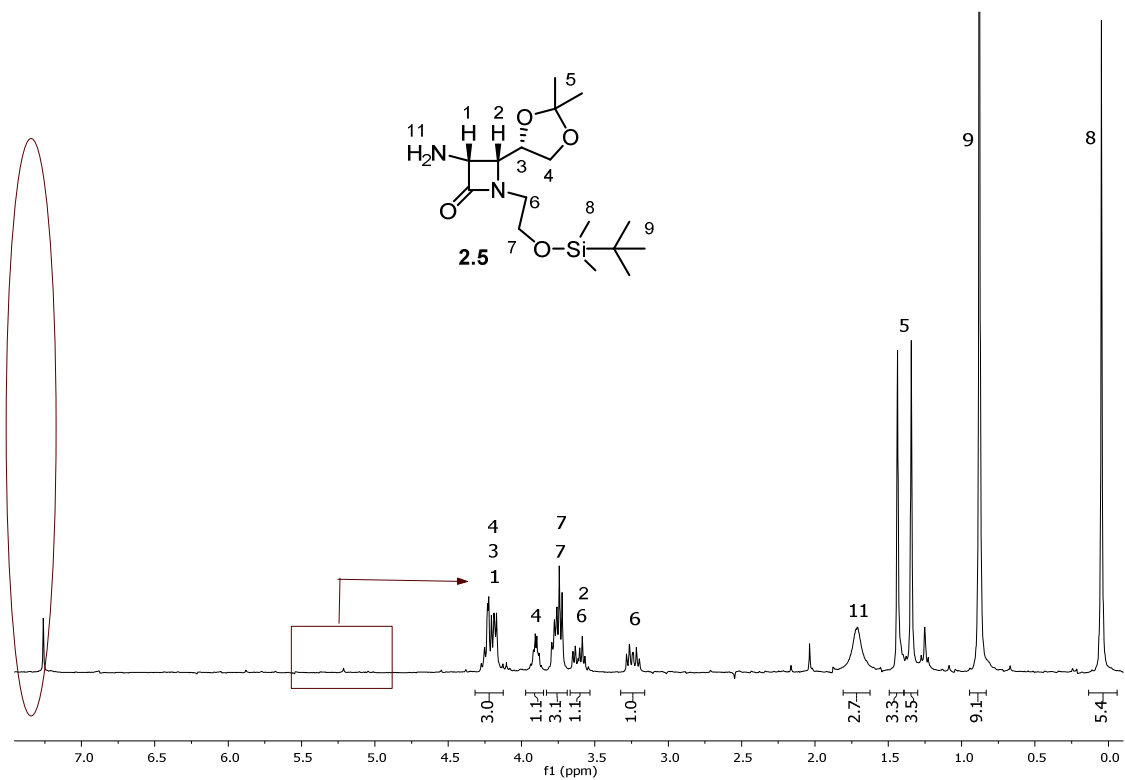
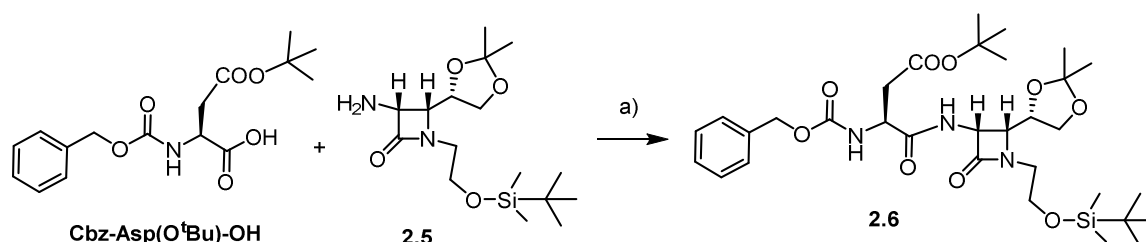


Figura 54.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.5.

#### 4.2.2.2.1.2. Acoplamiento de la $\beta$ -lactama **2.5** con el ácido aspártico

La siguiente etapa consistió en la preparación del compuesto **2.6** a partir de la  $\beta$ -lactama **2.5** y el ácido aspártico protegido como se muestra en el (*Esquema 35*). Para ello se utilizaron los agentes de acoplamiento típicos EDC·HCl y HOBT, en presencia de TEA. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice básica.



**Esquema 35.** Acoplamiento del aspártico a la  $\beta$ -lactama **2.5**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (79%).

En esta ocasión no fue necesario activar el ácido aspártico mediante la formación de fluoruro de ácido como para el caso del compuesto **1.6** y el producto **2.6** se obtuvo en forma de sólido blanco con un rendimiento del 79%.

En las *Figuras 55* y *56* se puede observar la señal perteneciente al enlace amida formado, H10 ( $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}}$  = 7.45–7.29 ppm), y la señal de cruce que corresponde al acoplamiento con el protón del carbono C3 de la  $\beta$ -lactama, H1; en esta ocasión desplazado hacia un campo más bajo ( $\delta_{\text{H1(2.5)}}$  = 4.29–4.13 ppm <  $\delta_{\text{H1(2.6)}}$  = 5.27 ppm), pero no tan bajo como en el caso del enlace éster de la molécula **1.6** ( $\delta_{\text{H1}}$  = 5.77–5.68 ppm).

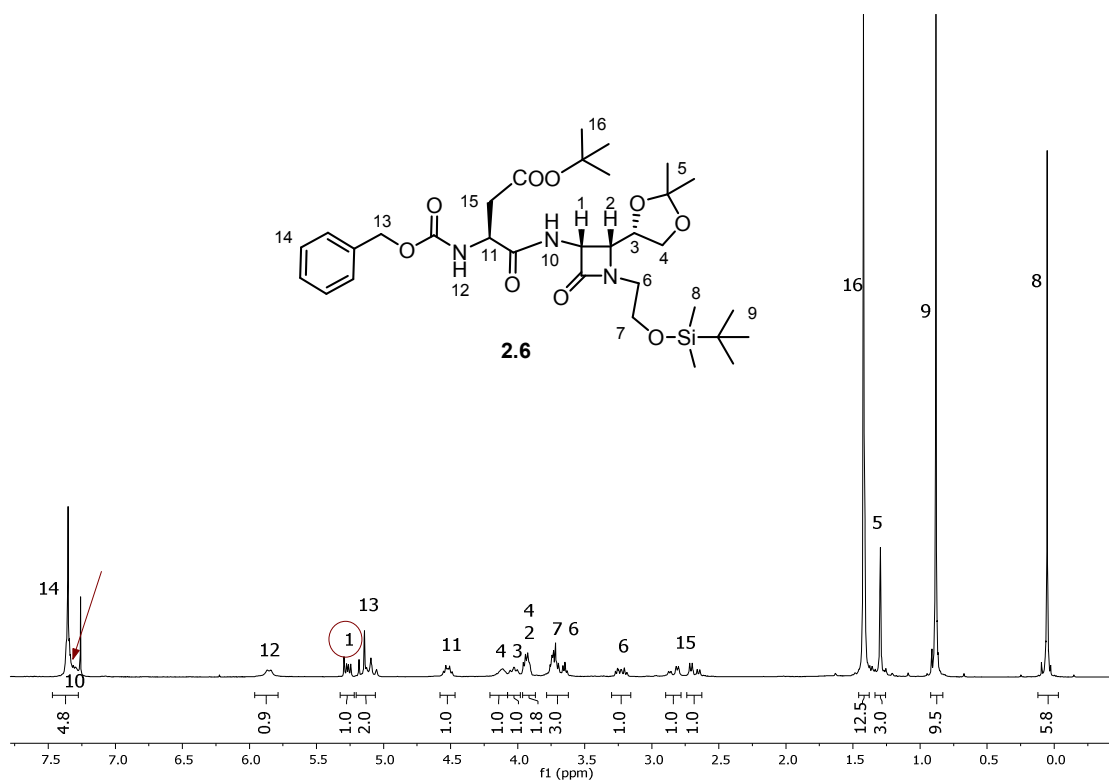


Figura 55.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.6.

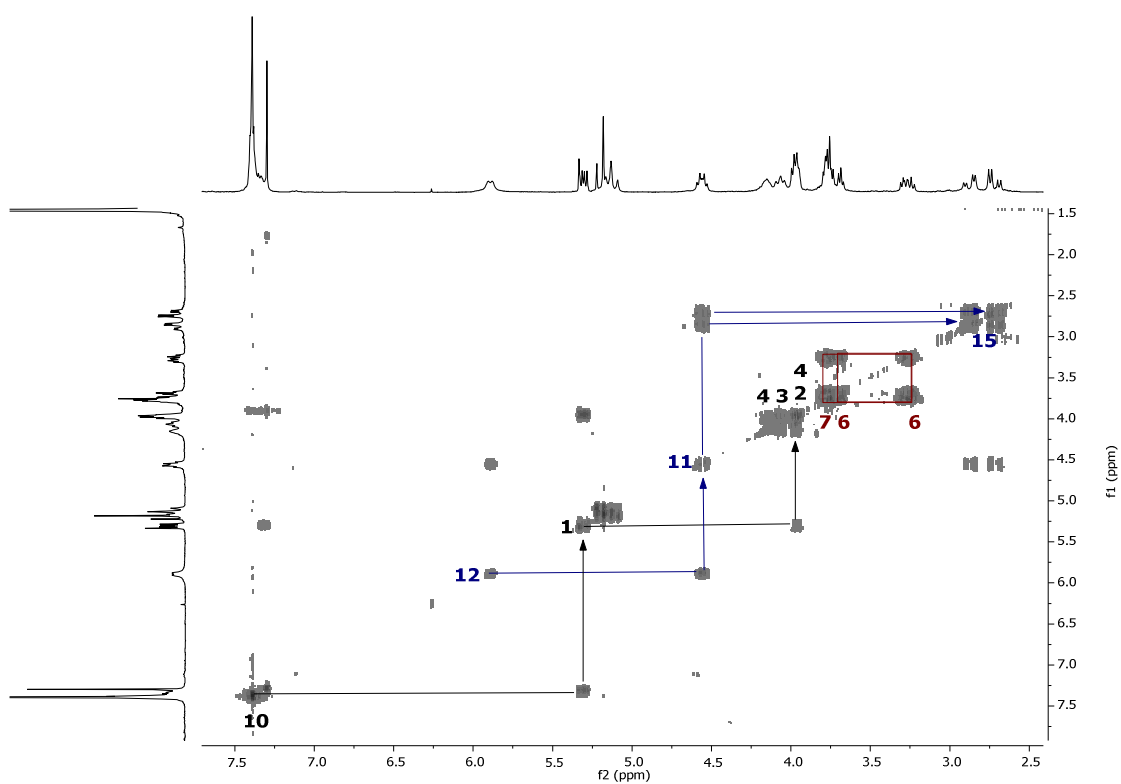


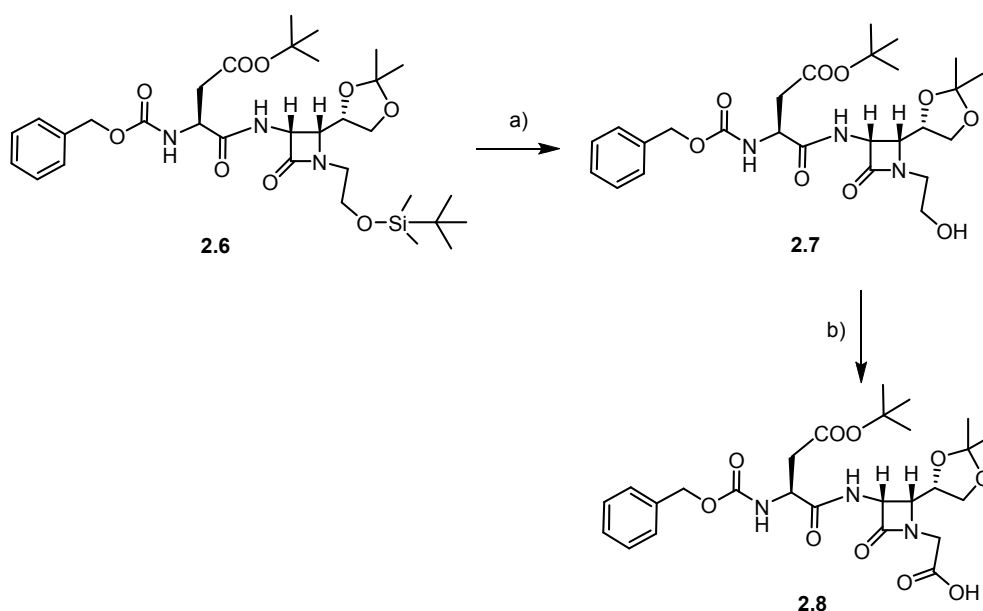
Figura 56.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.6.



#### 4.2.2.2.1.3. Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol.

La desprotección del grupo TBDMS del compuesto **2.6** y posterior oxidación al ácido carboxílico **2.8** se llevó a cabo empleando las mismas condiciones utilizadas en la síntesis del compuesto **1** (*Esquema 36*). Ambas reacciones trascurrieron sin problemas dando como resultado el compuesto **2.8** en forma de sólido blanco con un rendimiento global del 73%.

La formación del producto se confirmó mediante  $^1\text{H-RMN}$ ; en la *Figura 57* se observa la desaparición de las señales pertenecientes al grupo sililo (H8 y H9) entre 1.00 y 0.00 ppm y el desplazamiento hacia un campo más bajo de los protones diastereotópicos H6 gracias a la formación del ácido carboxílico ( $\delta_{\text{H6}(2.6)} = 3.23$  y  $3.80\text{--}3.57$  ppm  $<$   $\delta_{\text{H6}(2.8)} = 4.28\text{--}4.14$  y  $4.09\text{--}3.95$  ppm).



**Esquema 36.** Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol a ácido carboxílico. a) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C  $\rightarrow$  t. a., 3 h (96%). b) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (76%).

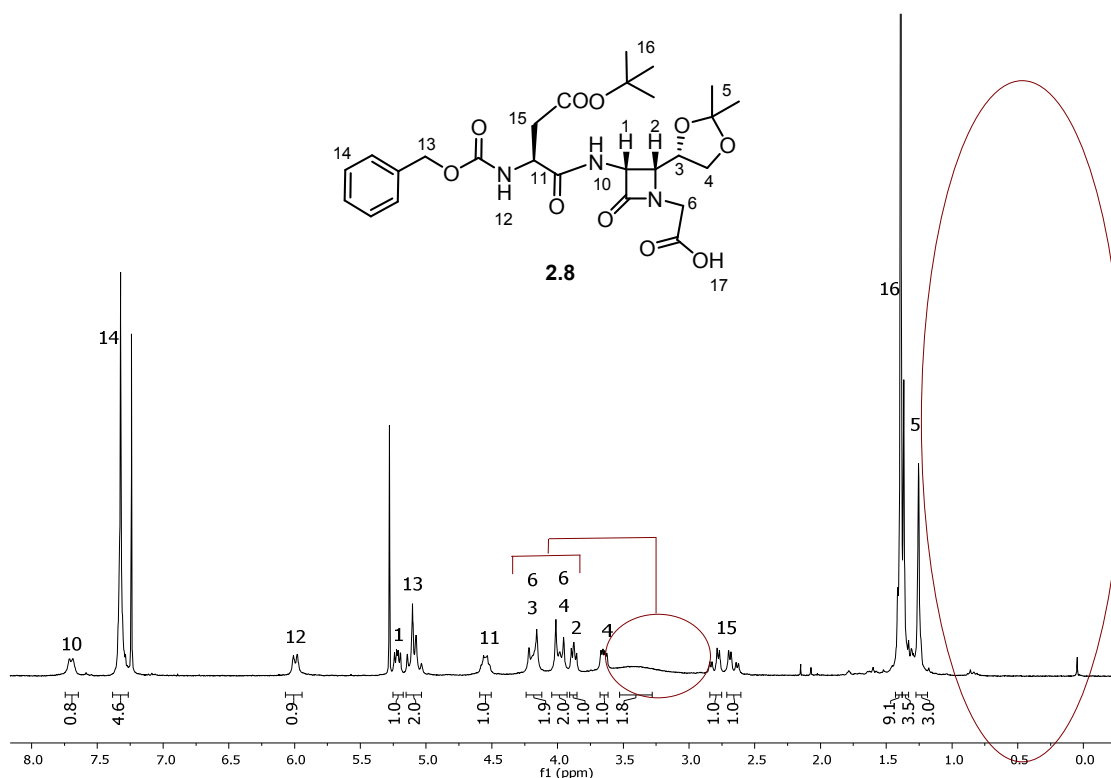
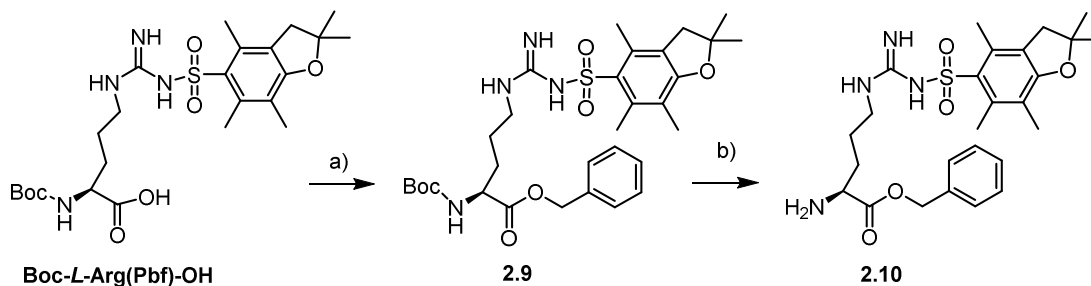


Figura 57.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **2.8**.

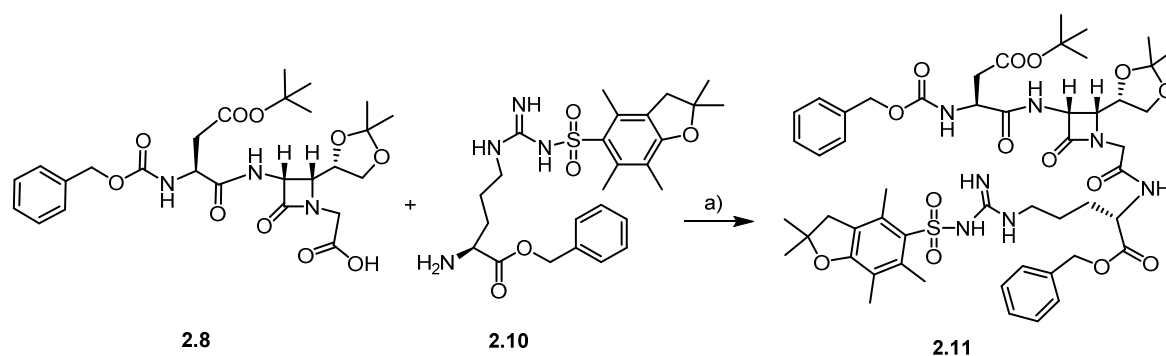
#### 4.2.2.2.1.4. Acoplamiento del compuesto **2.8** con la arginina

El siguiente paso consistió en el acoplamiento del ácido carboxílico del compuesto **2.8** con la arginina previamente protegida como se muestra en el *Esquema 37*. Para ello se procedió a proteger el grupo carboxilo como éster bencílico; tras su purificación mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice ácida el compuesto **2.9** resultante se desprotegió con ácido fórmico para dar lugar al producto **2.10** con un rendimiento global del 76%.



**Esquema 37.** Formación de  $\text{NH}_2$ -L-Arg(Pbf)-OBn (**2.10**). a) BnOH, EDC-HCl, HOBT, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  t. a., 16 h. b)  $\text{HCOOH}$ , t. a., 5 h. (Rto. global del 76%)

Una vez obtuvimos el Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **2.8** y la NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** se procedió a su acoplamiento empleando las condiciones de reacción utilizadas para la formación del precursor lineal **1.11**, es decir, EDC·HCl y HOBT en presencia de TEA. El producto resultante **2.11** se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice ácida obteniendo un sólido blanco en forma de espuma con un rendimiento del 70%.



**Esquema 38.** Acoplamiento de la arginina **2.10** a la β-lactama **2.8**. Síntesis del precursor **2.11**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (70%).

Como en todos los casos la estructura del producto **2.11** se confirmó mediante espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN. En las *Figuras 58* y *59* se pueden observar las tres señales correspondientes a los protones de los enlaces amida, H26, H24 y H7 ( $\delta_{\text{NH}[\text{Asp}]} = 6.08$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 7.82$  ppm y  $\delta_{\text{NH}[\text{Arg}]} = 7.58$  ppm), y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1 y H8).

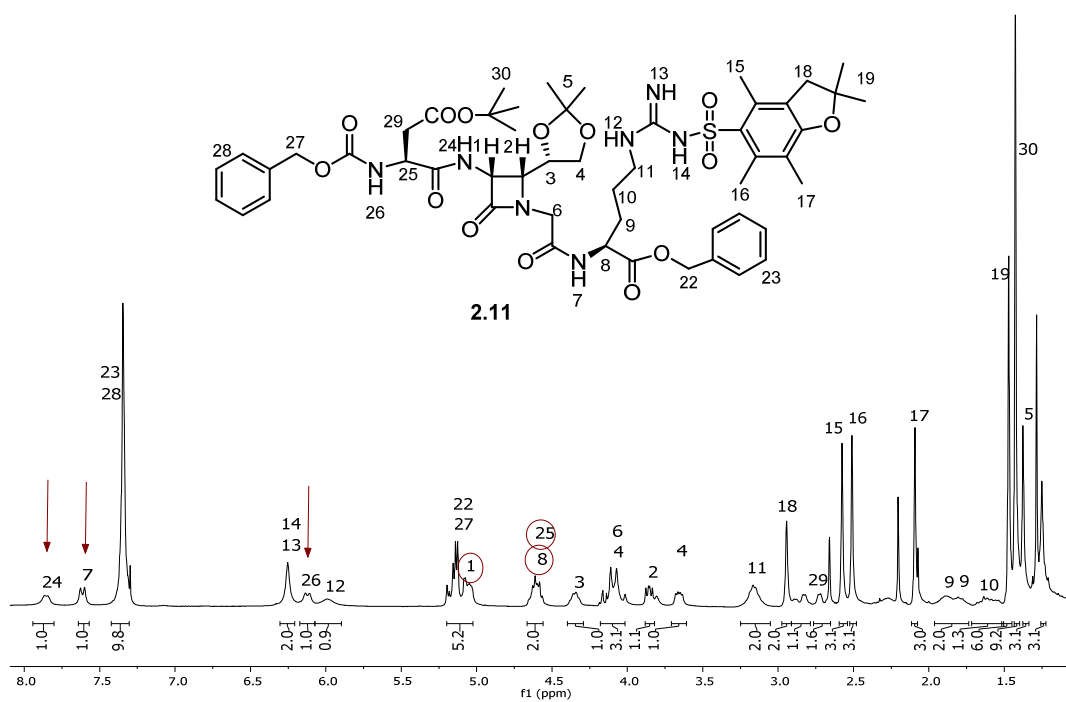


Figura 58.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.11. Se ha optado por no emplear los números 20 y 21, empleados en el caso de los pentapéptidos para numerar la glicina.

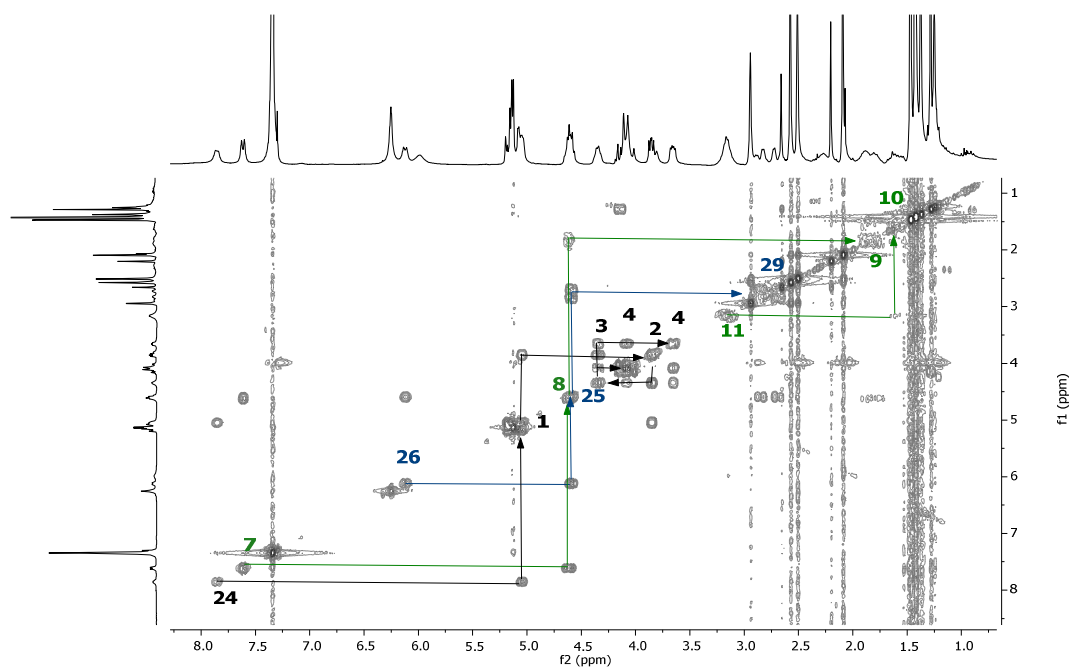
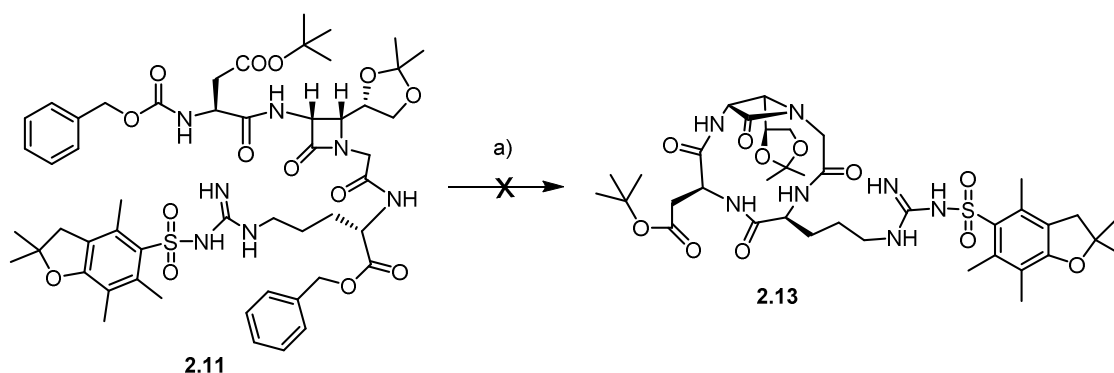


Figura 59. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.11.

#### 4.2.2.2.1.5. Desprotección e intentos de ciclación

El producto **2.11** se sometió a hidrogenolisis en condiciones estándares y posteriormente se procedió a su ciclación en condiciones de alta dilución (2 mmol/L) y empleando los agentes de acoplamiento HOAt y HATU a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Esquema 39*). En estas condiciones la ciclación fue infructuosa, el crudo de la reacción fue muy sucio y no se observó la presencia del producto **2.13** esperado.



**Esquema 39.** Desprotección de los grupos benciloxilo y Cbz y posterior ciclación. a) 1)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$ , DMF,  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 h.

Mediante UPLC-MS se pudo detectar que el producto **2.11** que se obtenía sin problemas a escala de gramos, tenía la masa esperada (masa exacta teórica = 1047.4623; masa exacta teórica (+  $\text{H}^+$ ) = 1048.4701; masa (+  $\text{H}^+$ ) encontrada = 1048.68 m/z).

La reacción de ciclación se ensayó en distintas condiciones variando la temperatura ( $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y t. a.) y se probaron también otros agentes de acoplamiento como el EDC·HCl y HOBt en presencia de TEA, empleado en el resto de los acoplamientos peptídicos; y la 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ)<sup>105</sup> (en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  16 horas); pero en ningún caso se logró formar el producto de ciclación. Tras múltiples ensayos se abandonó la síntesis del tetrapéptido **2**.

#### 4.2.2.2.2. Tetradepsipéptido 3

Para sintetizar el tetradepsipéptido **3** partimos de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-COOH **1.8** (pág. 94) y la NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (pág. 118) y realizamos el resto de la síntesis siguiendo los procedimientos optimizados para los compuestos **1** y **2**.

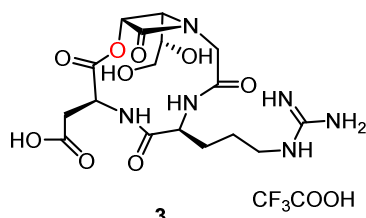
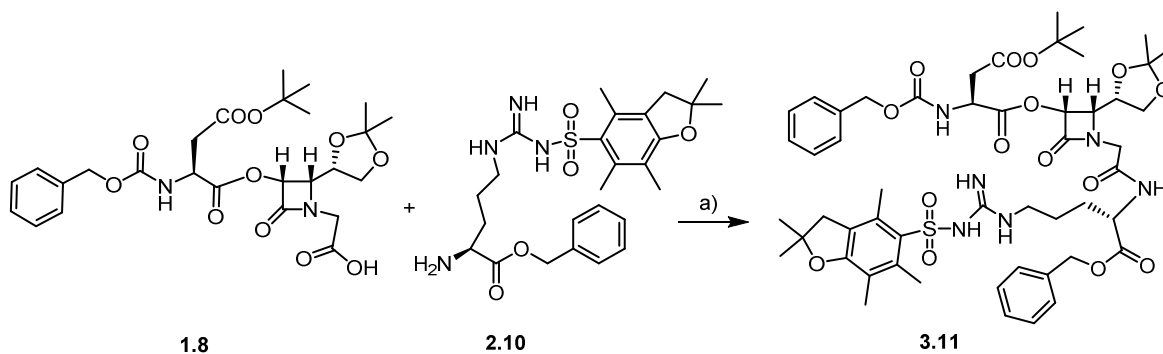


Figura 60. Tetradepsipéptido **3**.

##### 4.2.2.2.2.1. Acoplamiento del compuesto **1.8** con la arginina

Una vez preparada la NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** con el grupo amino libre se llevó a cabo su acoplamiento con la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **1.8** en las condiciones usuales reflejadas en el *Esquema 40*, lo que nos llevó al precursor lineal **3.11** con un rendimiento de 76%.



**Esquema 40.** Acoplamiento de la arginina a la β-lactama **1.8**. Síntesis del precursor **3.11**. a) EDC-HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (76%).

En la *Figuras 61* y *62* se recogen los espectros de <sup>1</sup>H-RMN del producto **3.11** y su experimento COSY; donde se observan las señales pertenecientes a los protones de los dos enlaces amida H26 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.81$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 6.85$  ppm) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25 y H8); a demás de la señal perteneciente al H1 a campo bajo característica del enlace éster ( $\delta_{\text{H1}} = 5.74$  ppm).

## Resultados y discusión

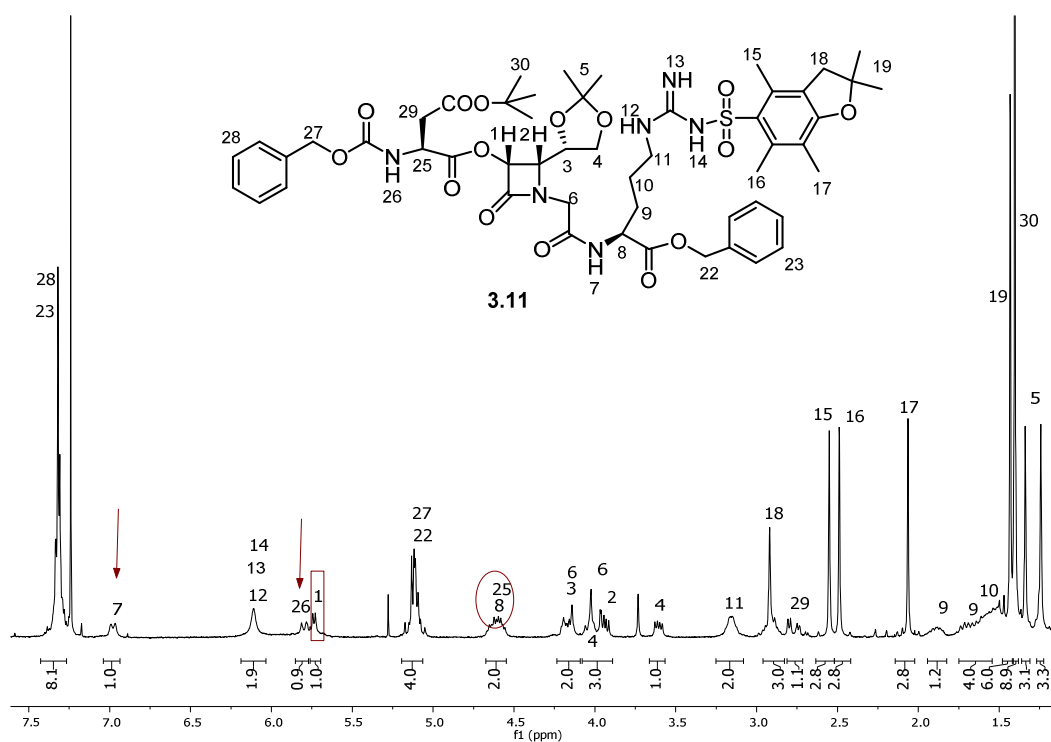


Figura 61.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3.11**.

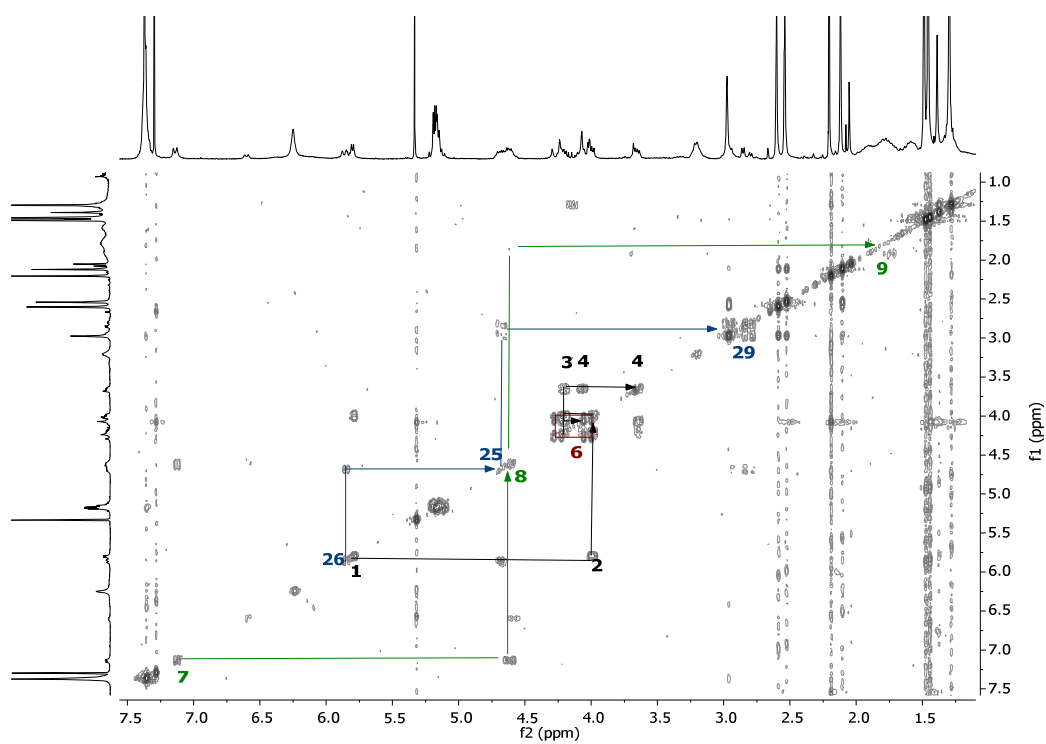
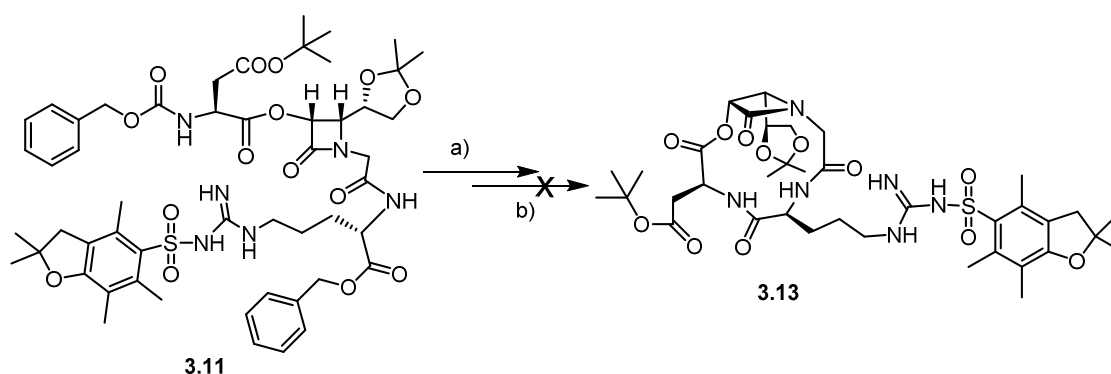


Figura 62. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3.11**.

#### 4.2.2.2.2. Desprotección e intentos de ciclación

La hidrogenación y ciclación del precursor **3.11** se realizó empleando las condiciones óptimas determinadas para el compuesto **1.11**, es decir, la hidrogenación fue catalizada por Pd/C en una disolución EtOAc/THF (1/1) durante 16 horas y la ciclación en DMF a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas empleando los agentes de acoplamiento HATU y HOAt.



**Esquema 41.** Desprotección de los grupos benciloxilo y Cbz y posterior ciclación. a)  $\text{H}_2$ , Pd/C, EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h. b) HATU, HOAt,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 h.

La reacción se ensayó en varias ocasiones pero no se consiguió generar el producto de ciclación **3.13**.

De nuevo se confirmó mediante UPLC-MS que el precursor lineal **3.11** tenía la masa esperada (masa exacta teórica = 1048.4463; masa exacta teórica (+  $\text{H}^+$ ) = 1049.4541; masa encontrada (+  $\text{H}^+$ ) = 1049.60 m/z), por lo que dedujimos que las condiciones de ciclación ensayadas no eran las óptimas. Desafortunadamente tras varios ensayos se abandonó la síntesis del tetrapeptido **3**.



#### 4.2.2.3. Síntesis de los miméticos *trans* 4, 5 y 6

Aunque no fue posible la ciclación de los tetrapeptidomiméticos, sin glicina y con una configuración relativa C3/C4 *cis* en la  $\beta$ -lactama, **2** y **3**; continuamos con los objetivos planteados y abordamos la preparación de los compuestos **4** y **5**. En este caso al tratarse de ciclos con  $\beta$ -lactamas de configuración relativa C3/C4 *trans* la ciclación podría ser más sencilla ya que el sustituyente de la posición C4 de la  $\beta$ -lactama plantearía, en principio, un impedimento estérico menor.

La posible disminución del rendimiento en la etapa de ciclación se confirmó en la Tesis Doctoral de Xabier Fernández, aunque las diferencias no fueron más allá del 5–9%.

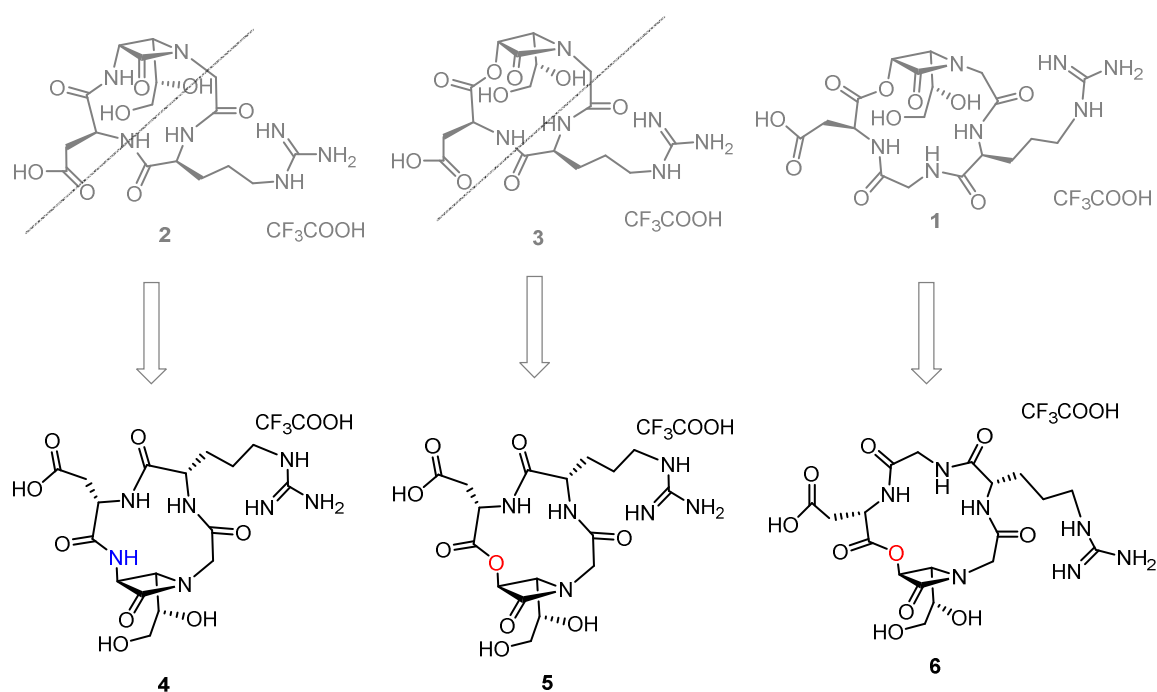


Figura 63. Moléculas objetivo 4, 5 y 6.

#### 4.2.2.3.1. Tetrapéptido 4

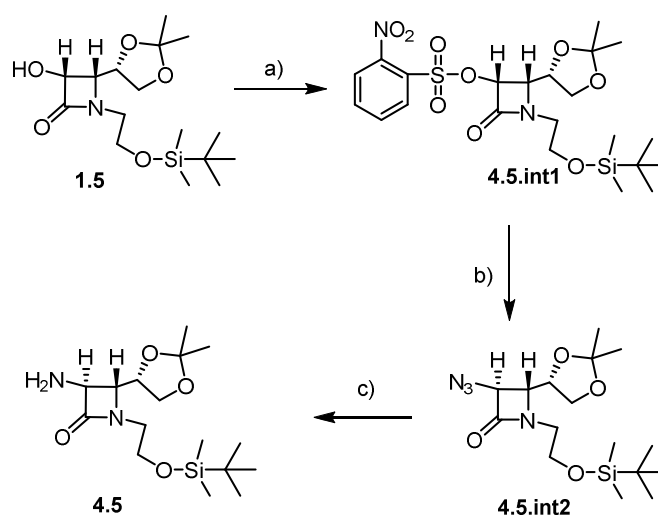
Para la síntesis del tetrapéptido **4**, se requiere una 3-amino- $\beta$ -lactama de configuración relativa *trans*.

##### 4.2.2.3.1.1. Síntesis de la *trans*-3-amino- $\beta$ -lactama 4.5

La síntesis de la  $\beta$ -lactama **4.5** se llevó a cabo como se indica en el *Esquema 42* donde la etapa clave es una inversión de la configuración en el carbono de la posición C3 de la  $\beta$ -lactama **1.5**.

En primer lugar la  $\beta$ -lactama **1.5** se transformó cuantitativamente en **4.5.int1** por tratamiento con cloruro de 2-nitrobenzoilsulfonilo a 0 °C en presencia de TEA.

La formación del compuesto **4.5.int1** se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN donde se pueden ver las señales de los protones aromáticos del grupo nosilo (*Figura 64*).



**Esquema 42.** Síntesis de la  $\beta$ -lactama *trans* **4.5**. Inversión de la configuración. a) *o*-Ns-Cl, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 16 h (96%). b)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 80 °C, 2 h (65%). c) Pd/ $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{H}_2$ , EtOH, 16 h (96%).

A continuación se procedió a la sustitución nucleofílica ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) con inversión de la configuración mediante azida sódica como nucleófilo y las condiciones de Stanfield optimizadas;<sup>140</sup> En estas condiciones, se obtuvo la azida **4.5.int2** con un 65% de rendimiento.

<sup>140</sup> O'brien, P. M.; Sliskovic, D. R.; Blankley, C. J.; Roth, B. D.; Wilson, M. W.; Hamelhele, K.; L.; Krause, B. R.; Santfield, R. L.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1810–1822.

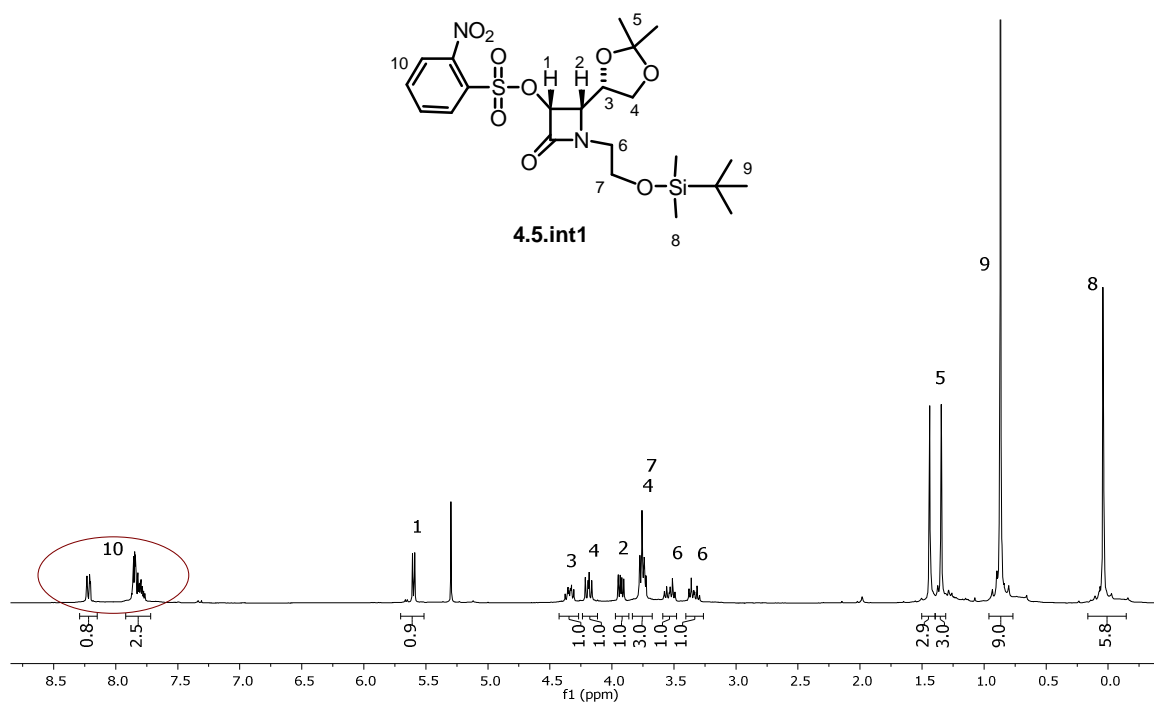


Figura 64. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **4.5.int1**.

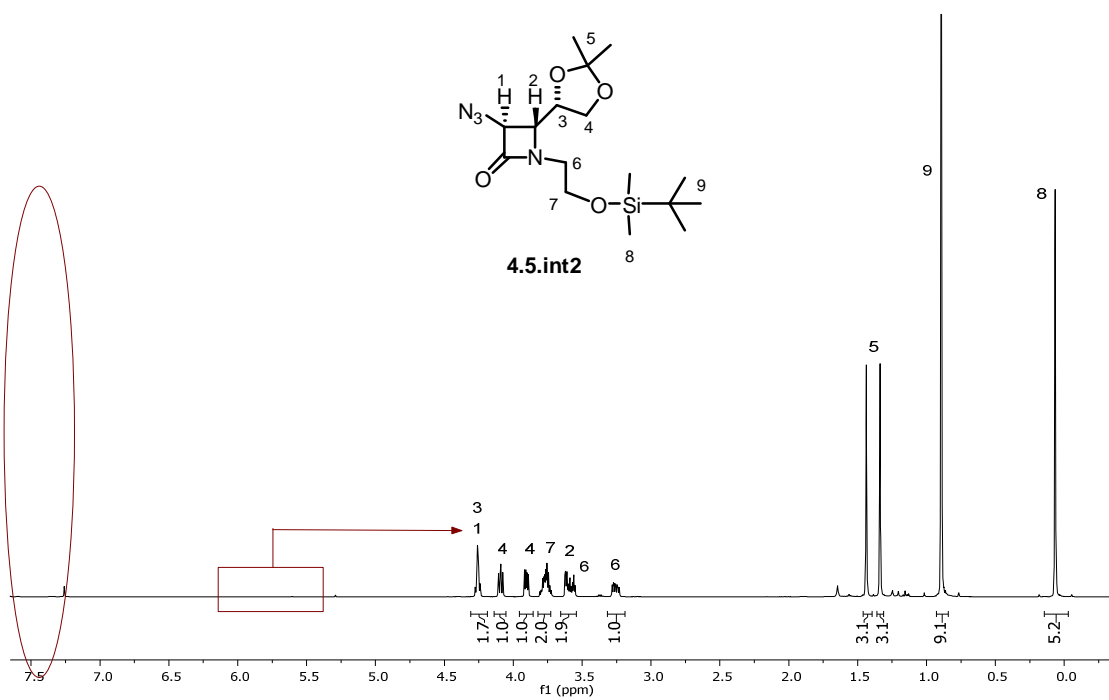
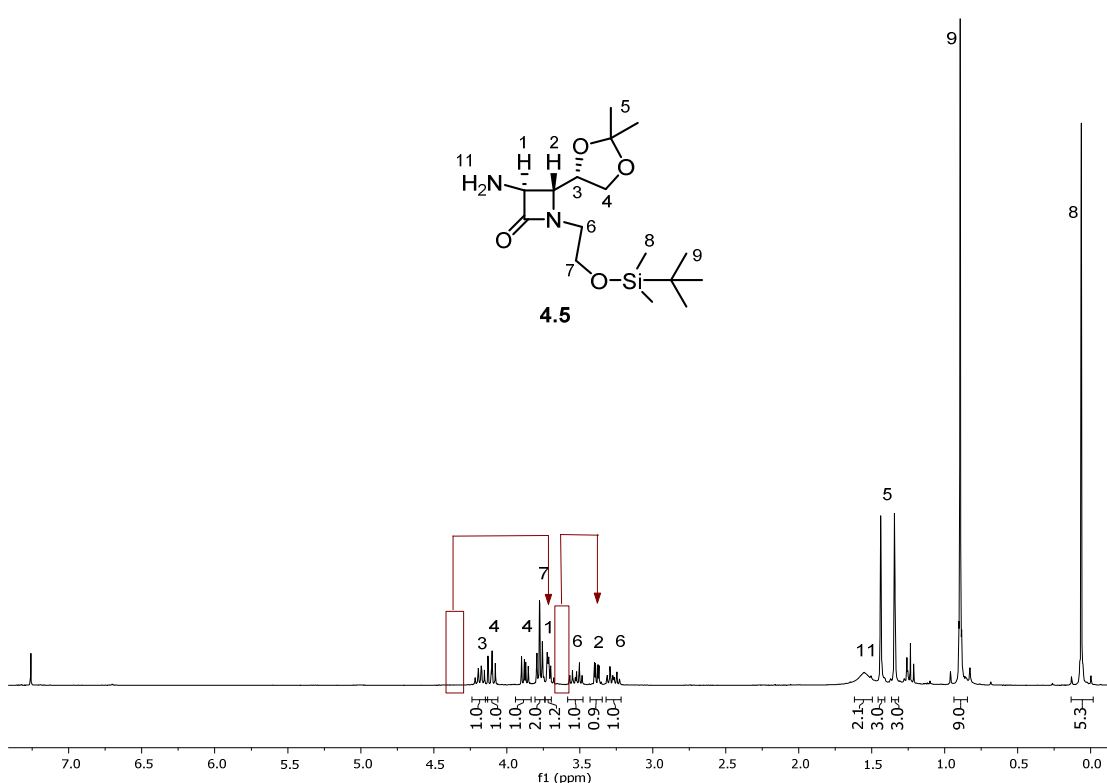


Figura 65. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **4.5.int2**.

La formación del compuesto **4.5.int2** se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN (*Figura 65*), por un lado se observa la desaparición de las señales de los protones aromáticos (H10) y el desplazamiento de la señal perteneciente al protón del C3 (H1) hacia un campo más alto ( $\delta_{\text{H1}(4.5.\text{int1})} = 5.60 \text{ ppm} > \delta_{\text{H1}(4.5.\text{int2})} = 4.30\text{--}4.22 \text{ ppm}$ ); y por otro lado la constante de acoplamiento entre los dos protones  $\beta$ -lactámicos cambia de 5.0 Hz a 2.0 Hz, valor característico de una configuración relativa *trans*,<sup>121</sup> hecho que confirma la inversión de configuración en el carbono C3.

La última etapa para acceder al compuesto **4.5** consiste en la hidrogenación del grupo azida catalizada por Pd/CaCO<sub>3</sub> en etanol y bajo atmósfera de dando como resultado el producto **4.5** en forma de aceite amarillo.

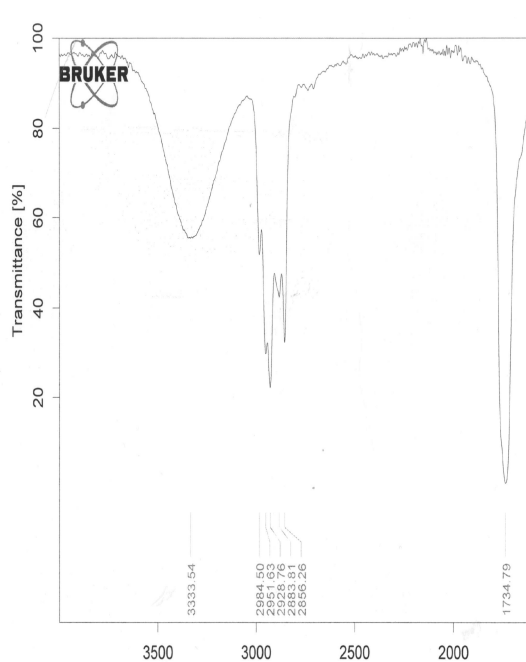


**Figura 66.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **4.5**.

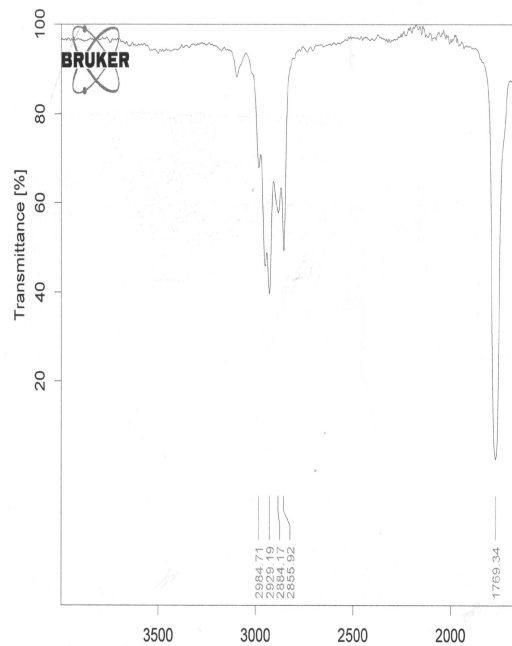
Mediante  $^1\text{H}$ -RMN (*Figura 66*) se puede observar el desplazamiento de los protones  $\beta$ -lactámicos hacia un campo más alto gracias a la reducción del grupo azida ( $\delta_{\text{H1}(4.5.\text{int2})} = 4.30\text{--}4.22 \text{ ppm} > \delta_{\text{H1}(4.5)} = 3.75\text{--}3.66 \text{ ppm}$  y  $\delta_{\text{H2}(4.5.\text{int2})} = 3.62 \text{ ppm} > \delta_{\text{H2}(4.5)} = 3.38 \text{ ppm}$ ). Hay que añadir que la constante de acoplamiento entre ellos sigue siendo característica de una configuración relativa *trans* (2.3 Hz).

La formación de los intermedios de la secuencia de la síntesis del compuesto **4.5** también se puede seguir mediante espectroscopía de infrarrojo (*Figura 67*); ya que

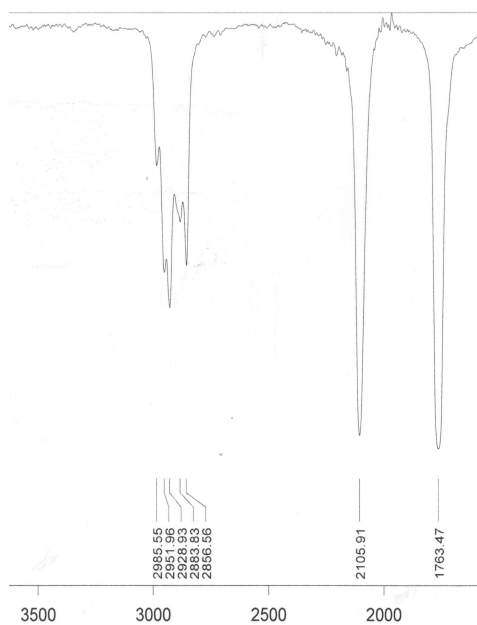
se puede ver con facilidad la aparición y desaparición de las bandas características de la azida ( $2106\text{ cm}^{-1}$ ), el hidroxilo ( $3333\text{ cm}^{-1}$ ) y la amina ( $3373\text{ cm}^{-1}$ ).



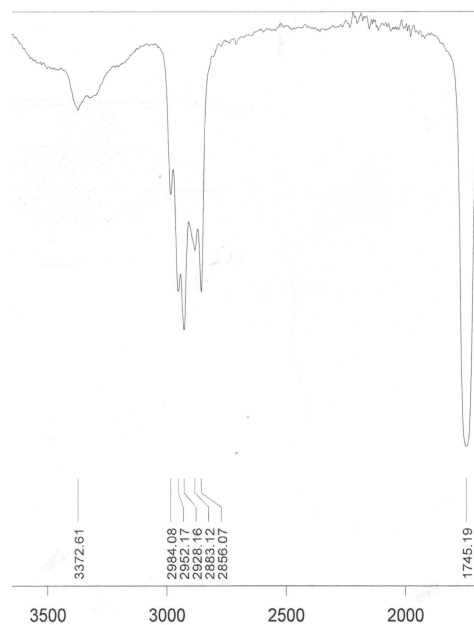
1.5



4.5.int1



4.5.int2



4.5

Figura 67. Espectros de IR de los intermedios de síntesis del compuesto 4.5.

Cabe destacar que los valores de los datos de la rotación óptica también sugieren un cambio de configuración.

**Tabla 7.** Valores de rotación óptica de los intermedios de síntesis del compuesto **4.5**.

Compuesto	$[\alpha]_D^{25}$	Concentración en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>4.5.int1</b>	+85.02	1
<b>4.5.int2</b>	-105.25	1
<b>4.5</b>	-37.99	1

#### 4.2.2.3.1.2. Síntesis del tetrapéptido **4.11** e intentos de ciclación

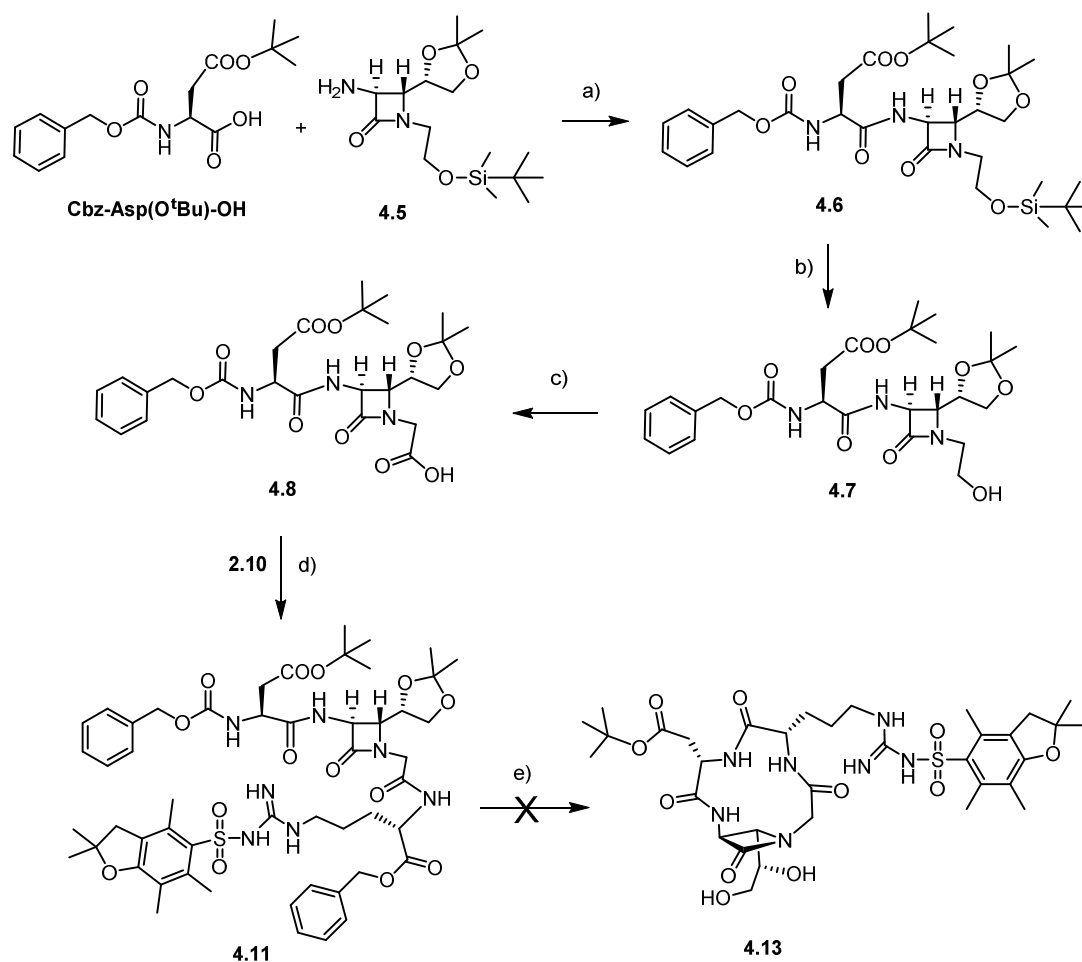
Una vez preparada la *trans* β-lactama **4.5** la síntesis del tetrapéptido **4.11**, precursor del **4.13**, se realizó de acuerdo con el *Esquema 43* que implica: la formación del compuesto **4.6** y su transformación en el ácido carboxílico **4.8** a través de la oxidación del compuesto **4.7**.

La obtención del precursor lineal **4.11**, que se consiguió sin problemas a escala de gramos, se confirmó mediante <sup>1</sup>H-RMN; en las *Figuras 68* y *69* se pueden observar las señales correspondientes a los tres enlaces peptídicos, H26, H24 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 6.08$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 7.82$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 7.58$  ppm) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1 y H8).

Mediante UPLC-MS se pudo detectar que el producto **4.11** que se obtenía sin problemas a escala de gramos, tenía la masa esperada (masa exacta teórica = 1047.4623; masa exacta teórica (+ H<sup>+</sup>) = 1048.4701; masa (+ H<sup>+</sup>) encontrada = 1048.62 m/z).

Desgraciadamente la ciclación tampoco tuvo lugar en este caso.<sup>141</sup>

<sup>141</sup> Todos los espectros de la síntesis se encuentran recogidos en el apartado *Anexo* pág. 369.



**Esquema 43.** Síntesis completa del tetrapéptido *trans* 4.13. a) EDC-HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (82%). b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (76%). d) EDC-HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (76%). e) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

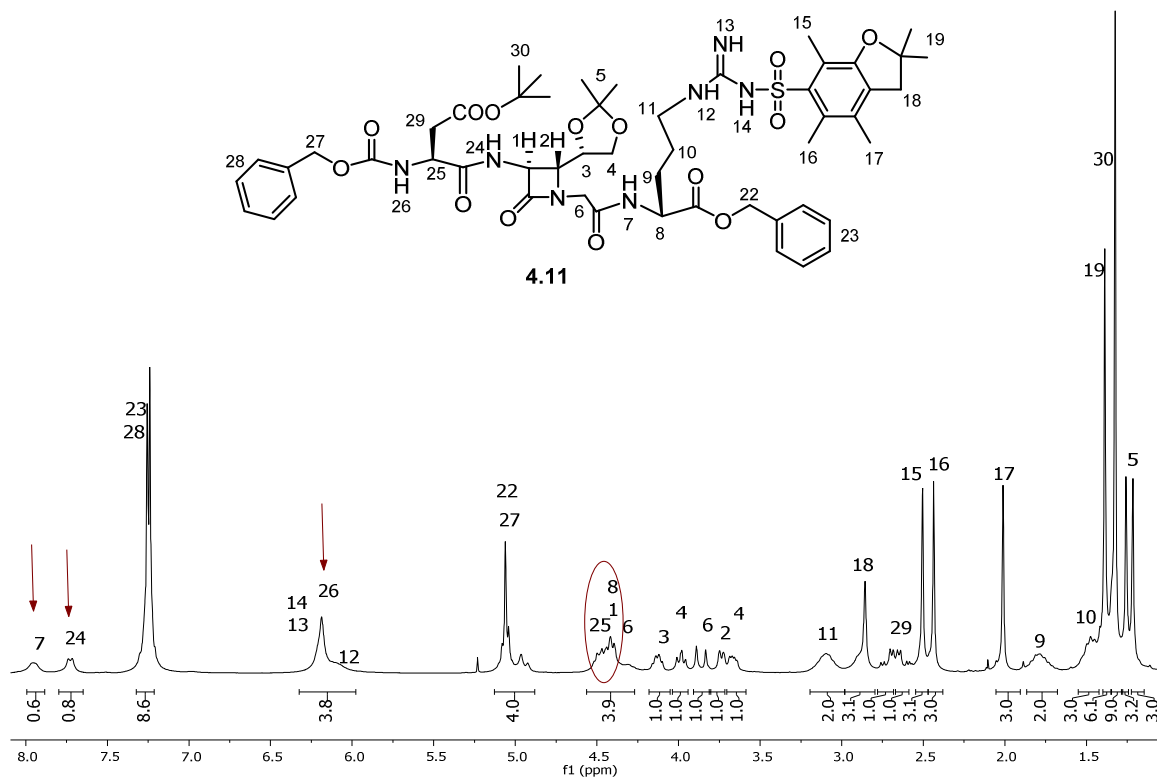


Figura 68. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 4.11.

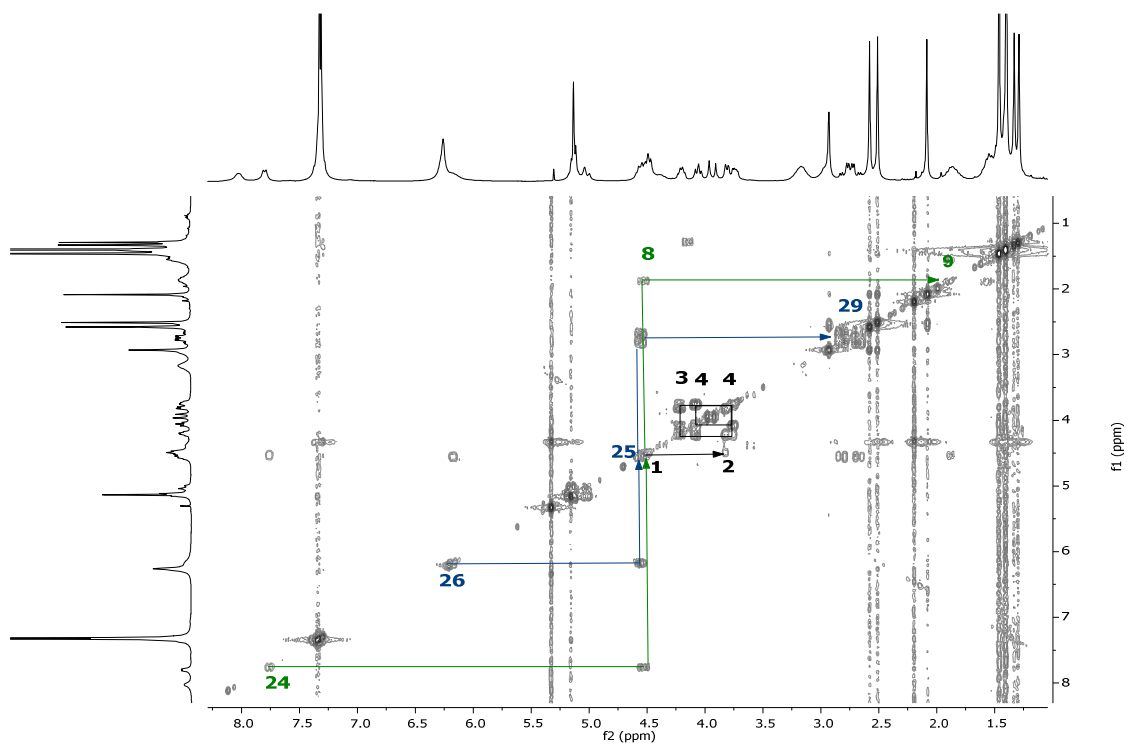


Figura 69. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 4.11.



#### 4.2.2.3.2. Depsipéptidos 5 y 6

Para la síntesis del tetradepsipéptido **5** y pentadepsipéptido **6** se requiere una 3-oxo- $\beta$ -lactama de configuración relativa *trans*.

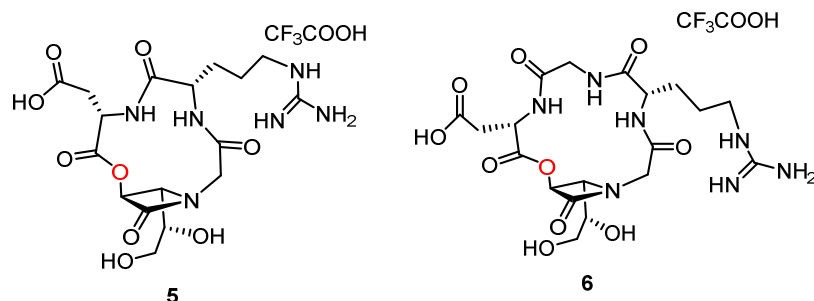
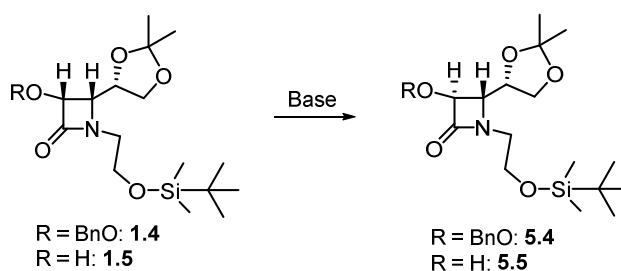


Figura 70. Tetradepsipéptido **5** y pentadepsipéptido **6**.

##### 4.2.2.3.2.1. Síntesis de la *trans*-3-hidroxi- $\beta$ -lactama 5.5

Para sintetizar la  $\beta$ -lactama **5.5** hay que llevar a cabo la inversión de configuración en la posición C3 de la  $\beta$ -lactama **1.5** pero manteniendo el grupo hidroxilo como sustituyente.

Para tal objetivo se siguió en procedimiento de Bose consistente en el tratamiento de la correspondiente  $\beta$ -lactama *cis* con **bases de Brønsted**.<sup>116</sup> La reacción se probó tanto con el hidroxilo libre (compuesto **1.5**) como el hidroxilo protegido con el grupo benciloxilo (compuesto **1.4**) y se realizó a reflujo empleando varios disolventes, pero en ningún caso se consiguió la inversión deseada recuperándose en todos los casos el producto de partida inalterado (*Esquema 44* y *Tabla 8*).

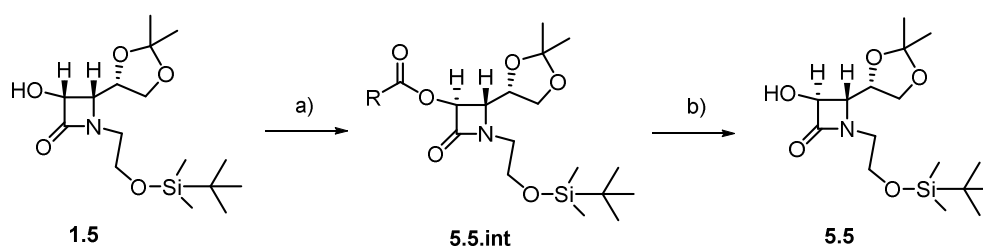


Esquema 44. Epimerización del carbono C3.

**Tabla 8.** Condiciones de reacción utilizadas para la inversión de configuración del carbono C3.

Entrada	Compuesto	Base 5 equiv.	Disolvente	T (°C)	T (h)
1	<b>1.4</b>	TEA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45	48
2	<b>1.4</b>	TEA	DMF	160	48
3	<b>1.4</b>	DBU	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45	48
4	<b>1.4</b>	DBU	DMF	160	48
5	<b>1.5</b>	TEA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45	48
6	<b>1.5</b>	TEA	DMF	160	48
7	<b>1.5</b>	DBU	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45	48
8	<b>1.5</b>	DBU	DMF	160	48

En vista del resultado anterior se decidió emplear la reacción de **Mitsunobu** para invertir la configuración del alcohol (*Esquema 45*).<sup>142</sup> Para ello la HO-β-lactama **1.5** se hizo reaccionar con diferentes ácidos en presencia de trifenil fosfina (PPH<sub>3</sub>) y un azodicarboxilato de dietilo (DEAD) o de diisopropilo (DIAD) (*Tabla 9*).



**Esquema 45.** Reacción de Mitsunobu y posterior saponificación; inversión de la configuración. a) PPh<sub>3</sub>, ácido, DEAD o DIAD, THF o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h. b) LiOH/H<sub>2</sub>O, THF, 0 °C → t. a., 1.5 h.

<sup>142</sup> La reacción de Mitsunobu es el condensación de un alcohol primario o secundario a un pronucleófilo ácido mediado por un azodicarboxilato de alquilo y una trialquil- o triarilfosfina. La característica más importante de la reacción es que ocurre con inversión de la configuración. Para revisiones generales véase: a) Fletcher, S.; *Org. Chem. Front.* **2015**, 2, 739–752. b) Reynolds, A. J.; Kassiou, M.; *Cur. Org. Chem* **2009**, 13, 1610–1632. c) Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan kumar, K. V. P.; *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2551–2651. d) But, T. Y. S.; Toy, P. H.; *Chem Asian J.* **2007**, 2, 1340–1355. e) Ahn, C.; Correia, R.; DeShong, P.; *J. Og. Chem.* **2002**, 67, 1751–1753.

**Tabla 9.** Distintas condiciones para la reacción de Mitsunobu.<sup>143</sup>

Entrada	Ácido	Fosfina	Azodicaroxilato	Disolvente
1	HCOOH	PPh <sub>3</sub>	DEAD	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
2	HCOOH	PPh <sub>3</sub>	DIAD	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
3	Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH	PPh <sub>3</sub>	DEAD	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
4	Ácido 4-nitrobenzoico	PPh <sub>3</sub>	DEAD	THF
5	Ácido picolínico	PPh <sub>3</sub>	DIAD	THF
6	Ácido acético	PPh <sub>3</sub>	DIAD	THF
7	PhCOOH	PPh <sub>3</sub>	DIAD	THF

En ninguna de las condiciones ensayadas se obtuvo el éster **5.5.int** esperado, recuperándose el sustrato de partida.

Otras alternativas como: la **Desoxigenación de Barton-McCombie**<sup>144</sup> de la 3-HO-β-lactama **1.5** y posterior hidroxilación para obtener el compuesto termodinámico; ó la reacción de **Diazotación**<sup>145</sup> de la 3-NH<sub>2</sub>-β-lactama **4.5** y sustitución del grupo amino por hidroxilo; ó la **Inversión de la configuración** en la 3-nosiloxi-O-β-lactama **4.5.int1** mediante el uso de NaCH<sub>3</sub>COO en DMSO,<sup>116</sup> resultaron ser completamente infructuosas.

También se intentó conseguir la β-lactama *trans* mediante síntesis directa llevando a cabo la reacción de cicloadición [2+2] a reflujo, facilitando así la formación

<sup>143</sup> Algunos ejemplos: a) Sidorowicz, L.; Skarzewski, J.; *Synthesis* **2011**, 5, 708–710. b) Dodge, J. A.; Nissen, J. S.; Presnell, M.; *Org. Syntheses*, **1998**, 9, 607–611. c) Sammakia, T.; Jacobs, J. S.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2685–2688. d) Coleman, R. S.; Grant, E. B.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8341–8344.

<sup>144</sup> La Desoxigenación de Barton-McCombie consiste en la sustitución de un grupo hidroxilo por un hidrógeno, de tal manera que se elimina el sustituyente. La reacción es radicalaria y comienza convirtiendo el alcohol en un tioéster (R-OH → R-O(C=S)-R'). De esta manera se podría a continuación introducir un hidroxilo en esta posición mediante un ataque nucleófilo que se realizaría dando como resultado el diastereómero termodinámicamente más activo, el *trans*. Para más información sobre la Desoxigenación de Barton-McCombie: a) Barton, D. H. R.; McCombie S. W.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1975**, 1, 1574–1585. b) Heravi, M. M.; Bakhtiari, A.; Faghihi, Z.; *Curr. Org. Syn.* **2014**, 11, 787–823. c) McCombie, S. W.; Motherwell, W.; B.; Tozer, M. J.; *Org. Reactions* **2012**, 77, 161–591.

<sup>145</sup> La reacción de diazotación (Peter Griess **1860**) consiste en reaccionar una amina primaria con ácido nitroso en medio ácido formando así una sal de diazonio. Esta sal a continuación se sustituirá por el grupo hidroxilo mediante el ataque nucleófilo del agua del medio. Deechongkit, S.; You, S.-L.; Kelly, J. W.; *Org. Lett.* **2004**, 6, 497–500.

del diasterómero más estable termodinámicamente.<sup>114</sup> El resultado fue idéntico a los anteriores.

Después de todos estos intentos se abandonó la síntesis de los correspondientes ciclodepsipéptidos **5** y **6**.

#### 4.2.2.4. Miméticos de mayor flexibilidad 7–14

Tal como se describió en el apartado de *Objetivos*, los compuestos **7–14**, se diseñaron con la idea de conseguir macrociclos ligeramente más flexibles, que nos permitieran comprobar si la hipótesis propuesta por algunos autores sobre la necesidad de cierta flexibilidad en los miméticos para adaptarse mejor al receptor es correcta.<sup>43</sup>

Los ligandos peptídicos (naturales o sintéticos) raramente se unen con sus receptores afines mediante su conformación más estable; el receptor aplica una “presión” sobre el péptido, una vez reconocido, para que adopte la conformación más favorable. Ambos componentes, el ligando y el receptor, pueden reorganizarse para una mejor adaptación. Mimetizar la estructura de un compuesto que ha demostrado afinidad con el receptor puede ser una buena estrategia, pero una rigidez excesiva puede ser contraproducente; por ello, una cierta flexibilidad puede dar pie al peptidomimético a adoptar la estructura más bioactiva.

Por otro lado, desde un punto de vista sintético, un metileno adicional en el precursor lineal podría aproximar en mayor medida los extremos de ambas cadenas facilitando la ciclación.

La síntesis de las moléculas **7–11** se realizó siguiendo los procedimientos de reacción optimizados durante la Tesis Doctoral. Cabe mencionar que las moléculas **10** y **14**, se descartaron ya que no se pudo obtener la *trans*-3-hidroxi- $\beta$ -lactama **5.5**.

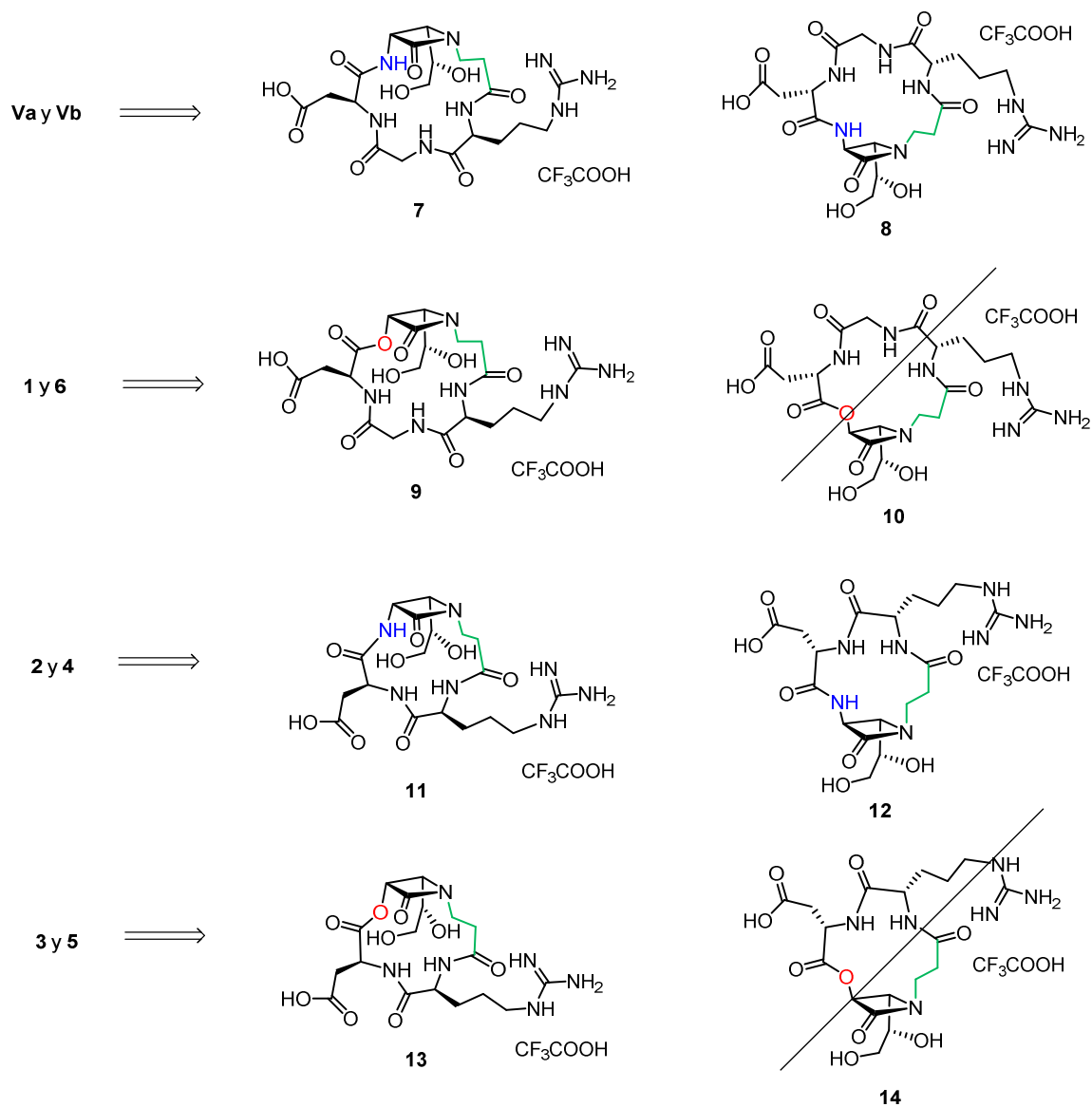


Figura 71. Moléculas objetivo 7–14.

Antes de iniciar la síntesis de tales compuestos, se comprobó la hipótesis planteada sobre que la elongación de la cadena conllevará una mayor flexibilidad, mediante un estudio teórico de dinámica molecular empleando el programa NAMD, con campo de fuerza AMBER.

#### 4.2.2.4.1. Estudios teóricos sobre la flexibilidad

Se calcularon las conformaciones de menor energía posibles para las moléculas **Va** (ciclopéptido), **1** (ciclopepsipéptido), **7** (ciclopéptido con un metileno adicional) y **9** (ciclopepsipéptido con un metileno adicional) mediante dinámica molecular empleando el programa NAMD y un campo de fuerza AMBER.<sup>146</sup>

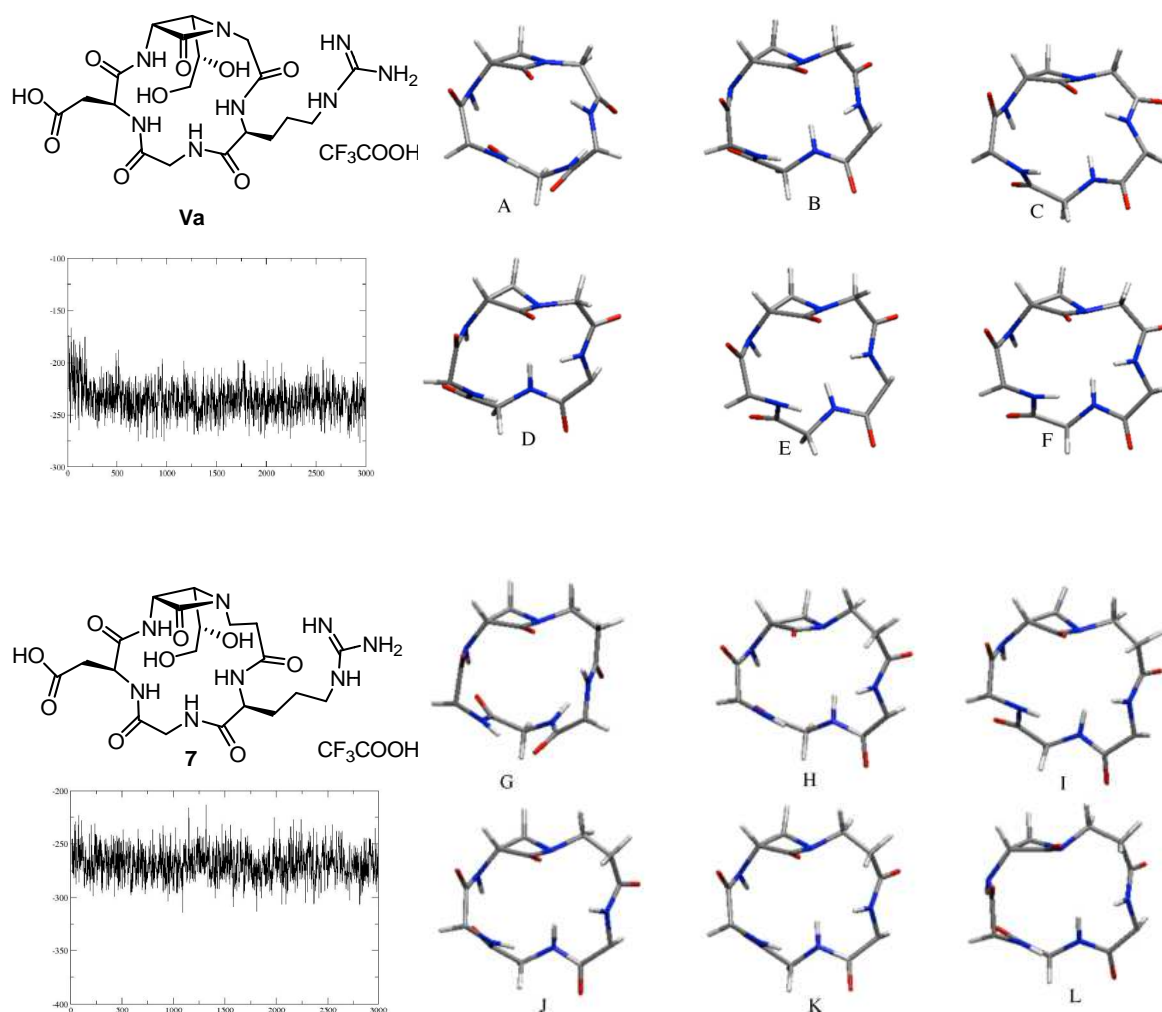
En la presentación gráfica de los *Cluster* no se aprecian impedimentos importantes entre las seis conformaciones de menor energía propuestas en ninguna de las cuatro estructuras; dándonos a entender que todas las moléculas son capaces de adoptar las diferentes conformaciones sin problema. Pero si nos fijamos en los valores numéricos más detalladamente sí que se observa un comportamiento desigual en los compuestos con un metileno adicional en la cadena.

Si comparamos las estructuras **Va** y **1** con sus análogos correspondientes de cadena más larga **7** y **9**, podemos ver que la diferencia de energía entre las distintas conformaciones es más pequeña para el caso de los ciclos con un metileno más. Si la barrera energética entre las conformaciones es más pequeña podemos deducir que la molécula podrá pasar de una conformación a otra con mayor facilidad; por lo que se concluye que las estructuras **7** y **9** son ligeramente más flexibles.

---

<sup>146</sup> Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel R. D.; Kalé, L.; Schulten, K.; *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.

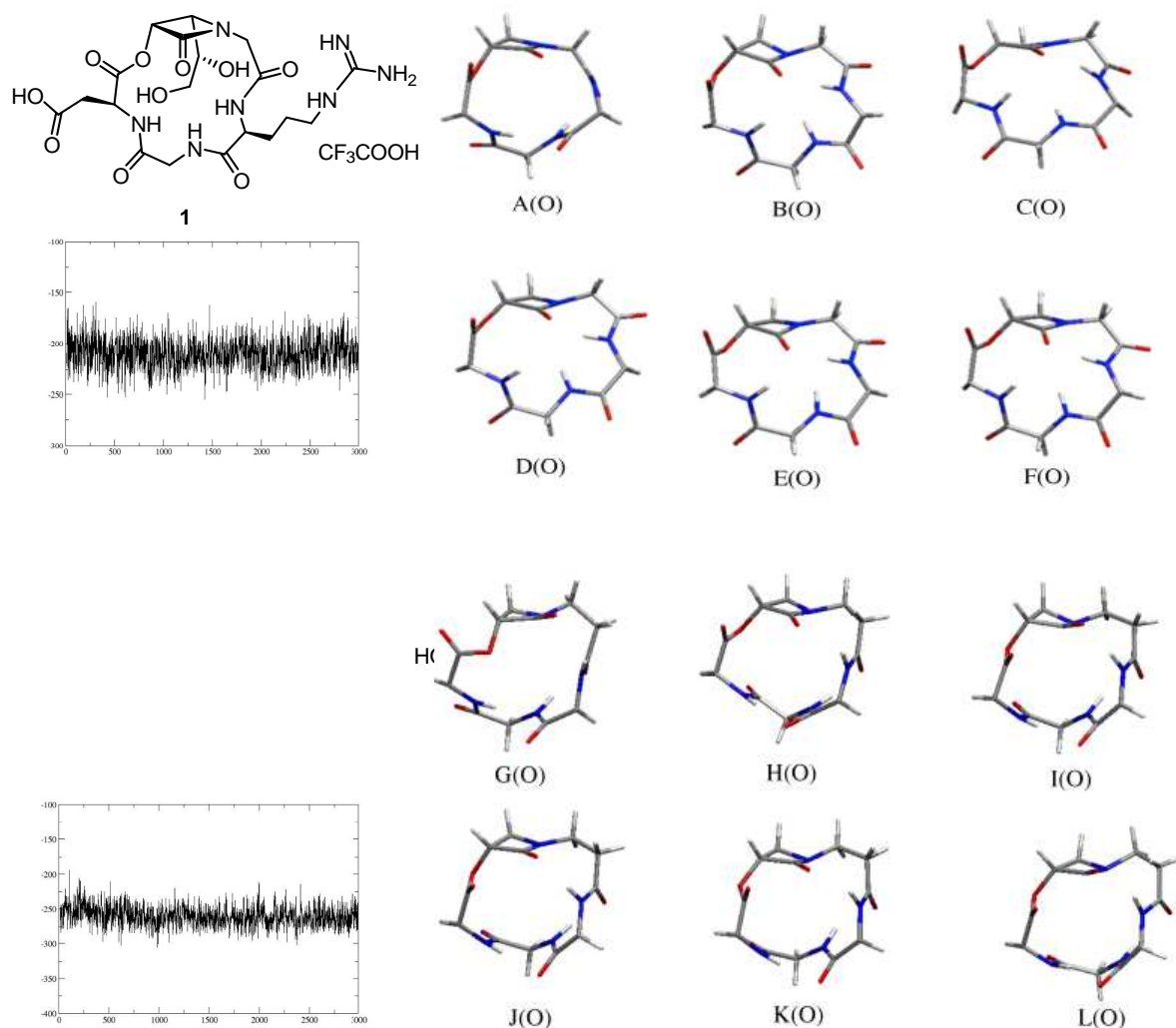
**Tabla 10.** Energías de los péptidos **Va** y **7** calculadas a 300 K y la diferencia entre dichas energías.



Conf	Energía (KJ/mol)	Diferencia de energía (KJ/mol)
A	-193.24	
		15.05
B	-208.29	
		37.65
C	-245.94	
		11.22
D	-234.73	
		20.52
E	-255.25	
		35.54
F	-219.71	

Conf	Energía (KJ/mol)	Diferencia de energía (KJ/mol)
G	-268.70	
		1.52
H	-267.18	
		21.95
I	-289.13	
		19.92
J	-269.21	
		0.29
K	-268.92	
		1.53
L	-267.39	

**Tabla 11.** Energías de los depsipéptidos **1** y **9** calculadas a 300 K y la diferencia entre dichas energías.



Conf	Energía (KJ/mol)	Diferencia de energía (KJ/mol)
A(O)	-218.87	
B(O)	-218.18	0.69
C(O)	-234.39	16.21
D(O)	-204.79	29.60
E(O)	-209.01	4.22
F(O)	-198.69	10.32

Conf	Energía (KJ/mol)	Diferencia de energía (KJ/mol)
G(O)	-265.77	
H(O)	-266.14	0.37
I(O)	-269.27	3.13
J(O)	-271.02	1.75
K(O)	-246.06	24.96
L(O)	-256.16	10.10



#### 4.2.2.4.2. Péptidos *cis* 7 y 11

El pentapéptido **7** y el tetrapéptido **11**, requieren de una *cis*-3-amino- $\beta$ -lactama análoga a la  $\beta$ -lactama **2.5** pero con un metileno adicional en la cadena de la posición N1.

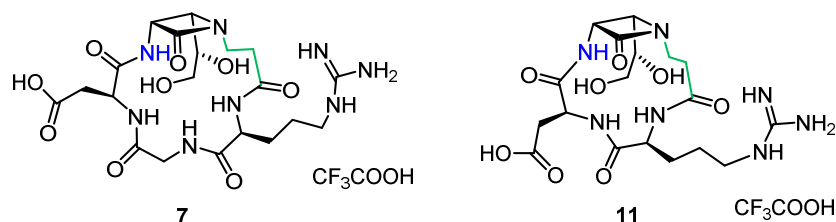
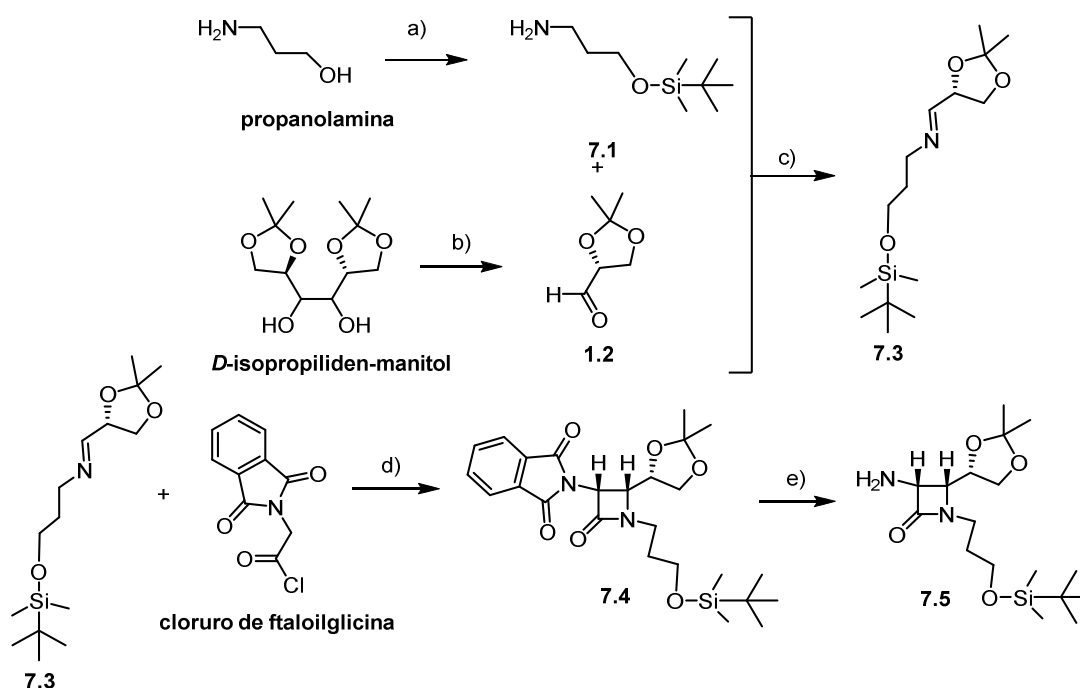


Figura 72. Pentapéptido **7** y tetrapéptido **11**.

##### 4.2.2.4.2.1. Síntesis de la *cis*-3-amino- $\beta$ -lactama 7.5

Para la síntesis de la  $\beta$ -lactama **7.5** se siguió el esquema propuesto para la síntesis de la  $\beta$ -lactama **2.5** sustituyendo la etanolamina por propanolamina para la formación del compuesto imídico. Así la imina **7.3** se hizo reaccionar con cloruro de ftaloilglicina en presencia de TEA para dar la  $\beta$ -lactama **7.4** (Esquema 46). A continuación se desprotegió el grupo ftaloilo obteniéndose como producto el compuesto **7.5** con un rendimiento global del 59%.



**Esquema 46.** Síntesis de la  $\beta$ -lactama *cis* **7.5**. a)  $\text{ClSiMe}_2^t\text{Bu}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20 °C, 12 h. b)  $\text{NaIO}_4$  sobre gel de sílice,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. c) tamiz molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. d) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de -78 °C a t. a., 16 h. e)  $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, t. a., 48 h. (Rto. global del 59%)

En las Figuras 76 y 77 se puede observar la señal perteneciente a los protones H6b del metileno adicional de la cadena lateral de la  $\beta$ -lactama ( $\delta_{H6b} = 2.09\text{--}1.76$  ppm). También podemos confirmar la desprotección del grupo ftaloilo por la desaparición de las señales de los protones aromáticos (7.93–7.68 ppm) y el desplazamiento de la señal del protón H1 de la  $\beta$ -lactama hacia un campo más alto ( $\delta_{H1(7.4)} = 5.32$  ppm  $>$   $\delta_{H1(7.5)} = 4.09$  ppm).

Hay que añadir que la constante de acoplamiento entre los dos protones de la  $\beta$ -lactama H1 y H2 es de 5.2 Hz, característica de una configuración *cis*.<sup>121</sup>

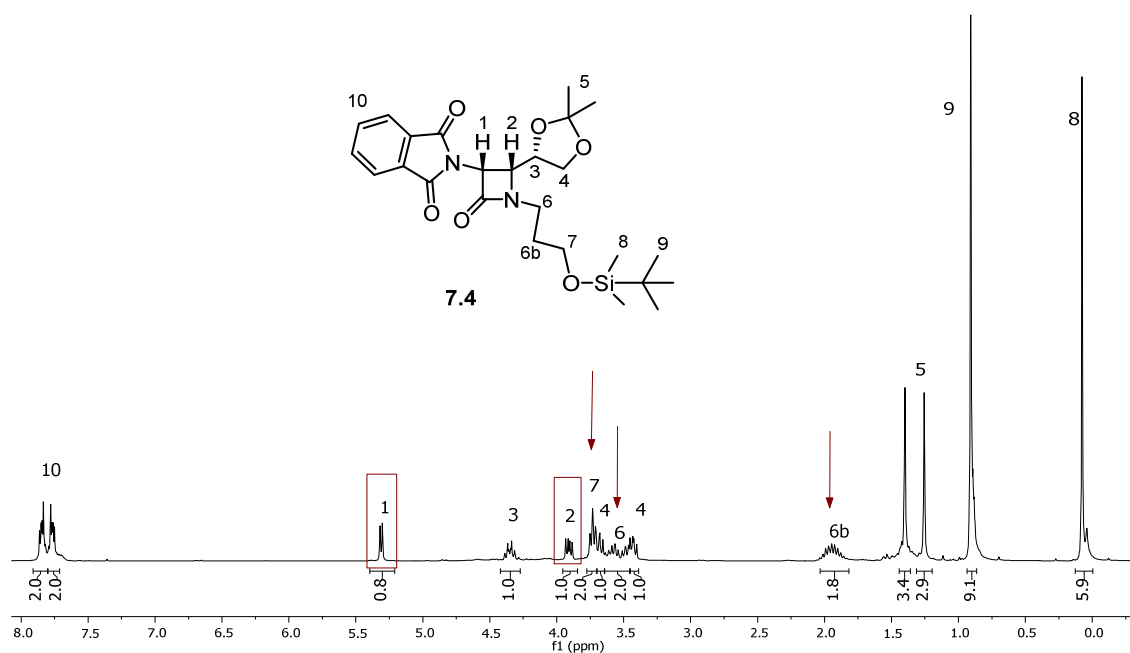


Figura 73. Espectro <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 7.4.

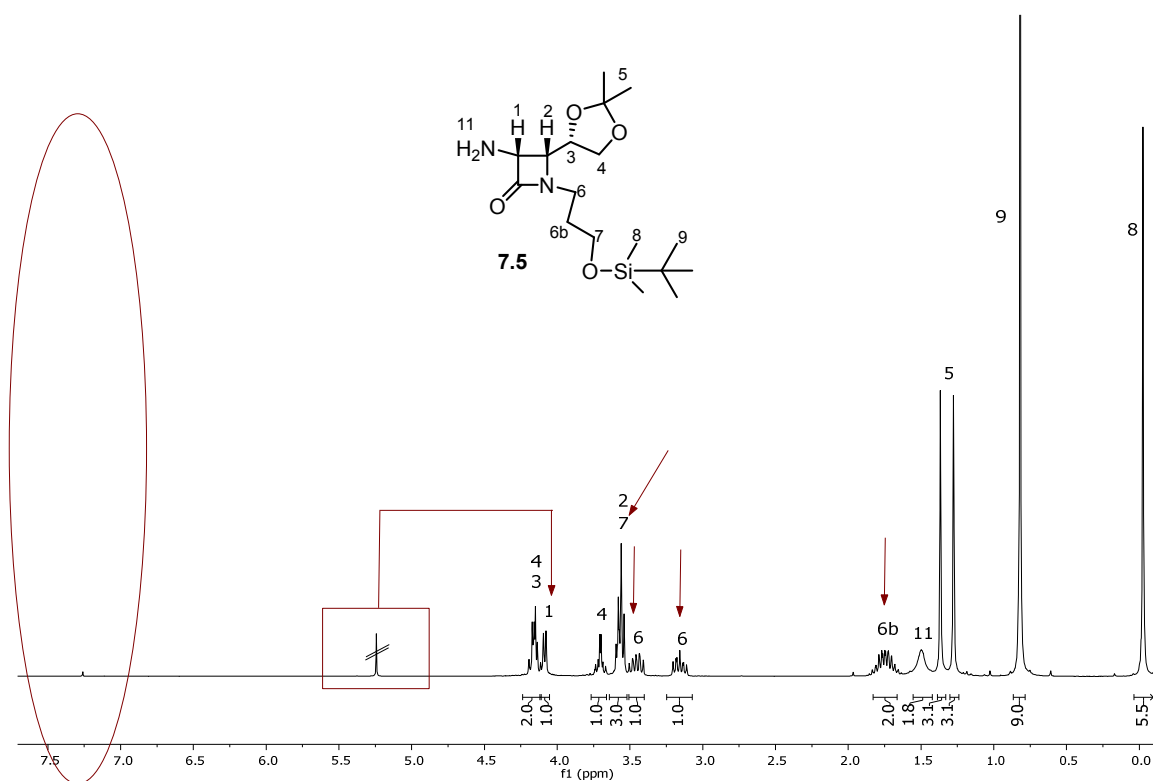
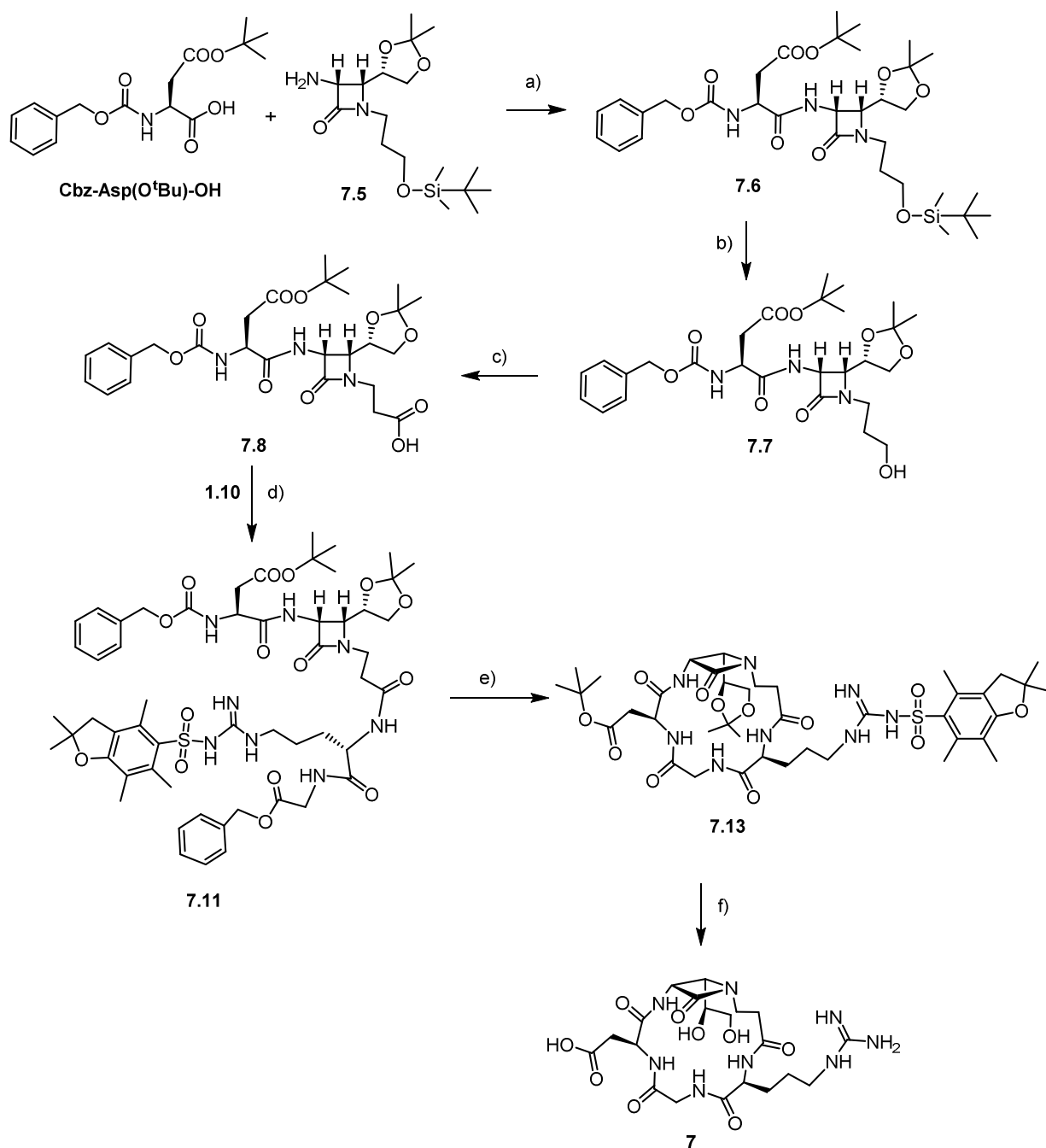


Figura 74. Espectro <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 7.5.

#### 4.2.2.4.2.2. Síntesis total del pentapéptido 7

El resto de la síntesis se completó siguiendo la secuencia de reacciones representadas en el *Esquema 47*. Esta secuencia implica la formación del compuesto **7.6** y su transformación en el ácido carboxílico **7.8**, a través de la oxidación del compuesto **7.7**; y el posterior acoplamiento del dipéptido **1.10** al ácido carboxílico **7.8** que da lugar al precursor lineal **7.11**, cuya hidrogenolisis catalizada por Pd y posterior ciclación conduce al ciclopentapéptido **7.13**.

En último lugar, la desprotección en medio ácido de los grupo protectores de las cadenas laterales nos conduce al compuesto objetivo **7**.



**Esquema 47.** Síntesis total del pentapéptido **7**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (78%). b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (72%). d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (74%). e) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h (Rto. global del 65%). f) Et<sub>3</sub>SiH, Anhidrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h (80%).

La formación de todos los productos de la secuencia se confirmó mediante RMN; en las Figuras 75–80 se pueden observar las señales correspondientes a los cuatro protones amídicos, H26, H24, H7 y H20, que contienen tanto el precursor lineal

**7.11** como su posterior producto de ciclación **7.13**, visualizándose en los experimentos bidimensionales COSY sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1, H8 y H21).

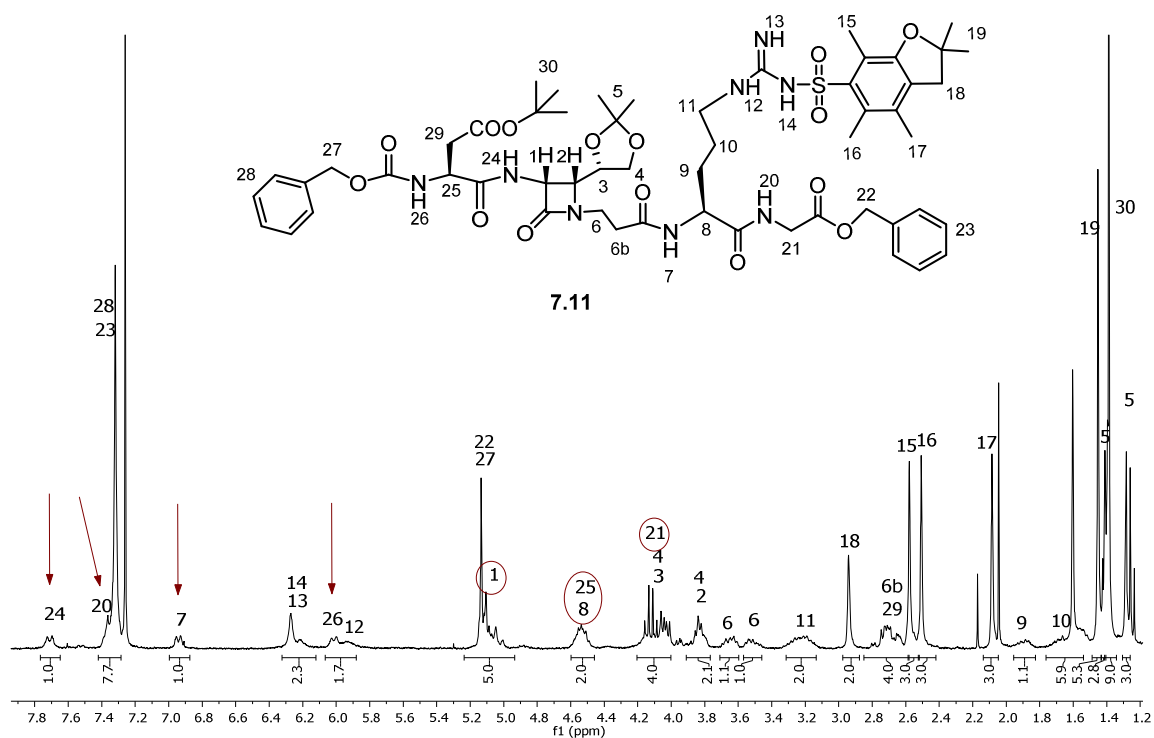


Figura 75. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **7.11**.

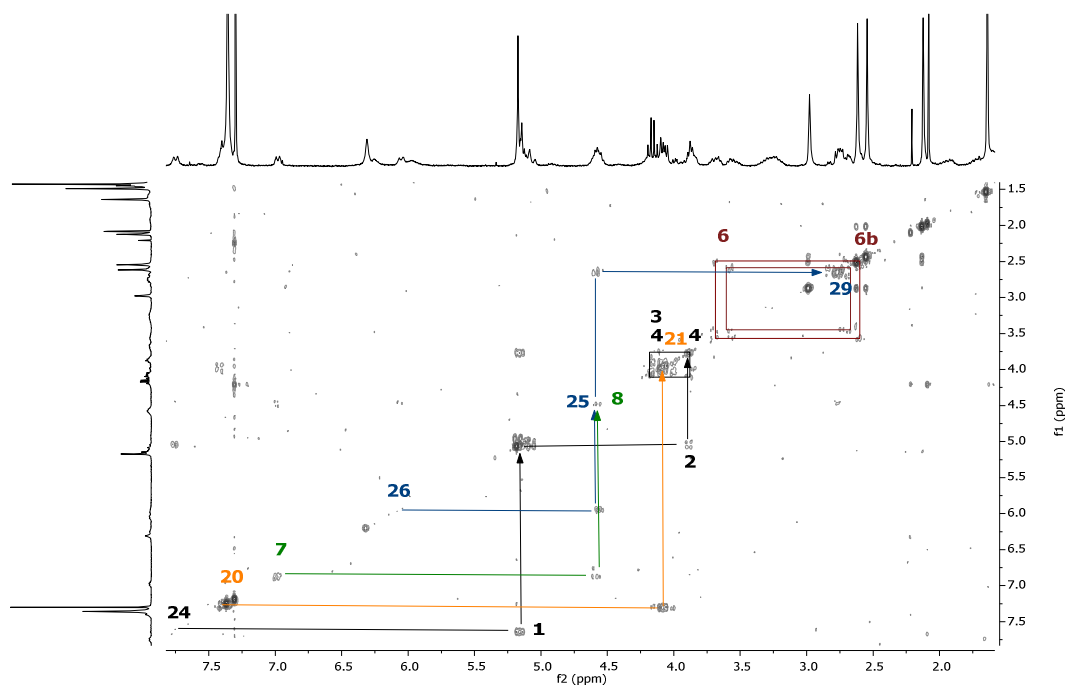


Figura 76. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **7.11**.

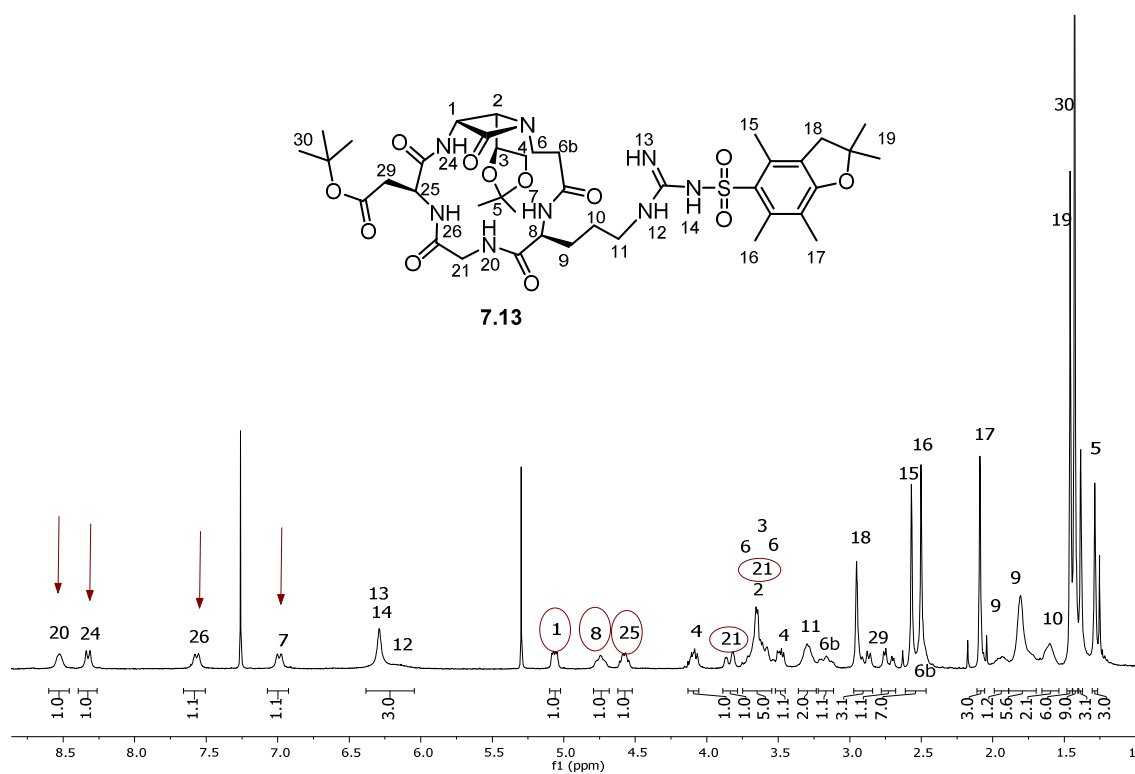


Figura 77. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 7.13.

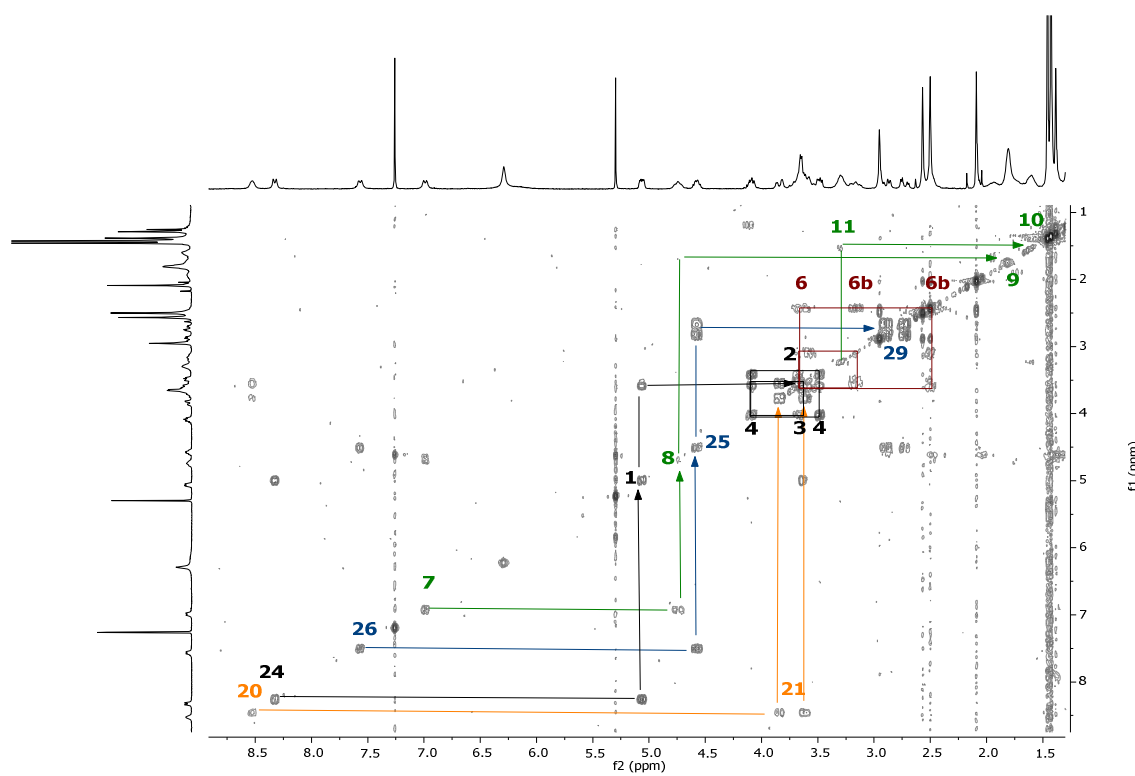


Figura 78. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 7.13.

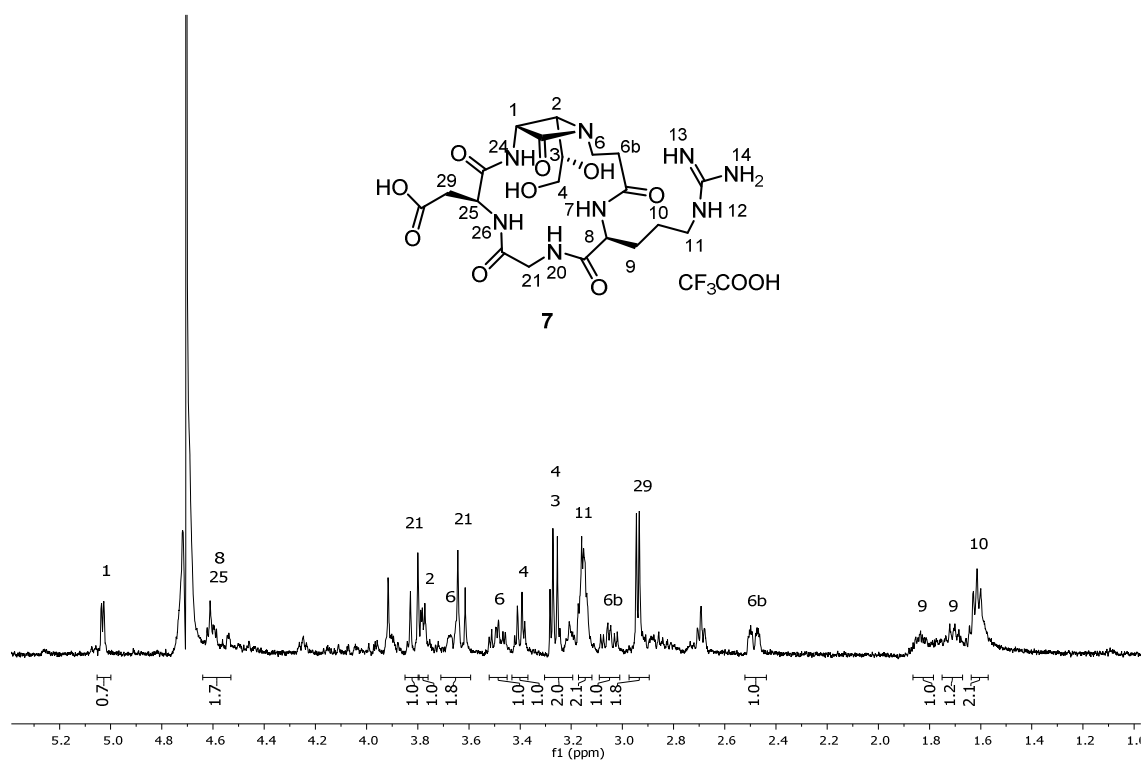


Figura 79. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 7.

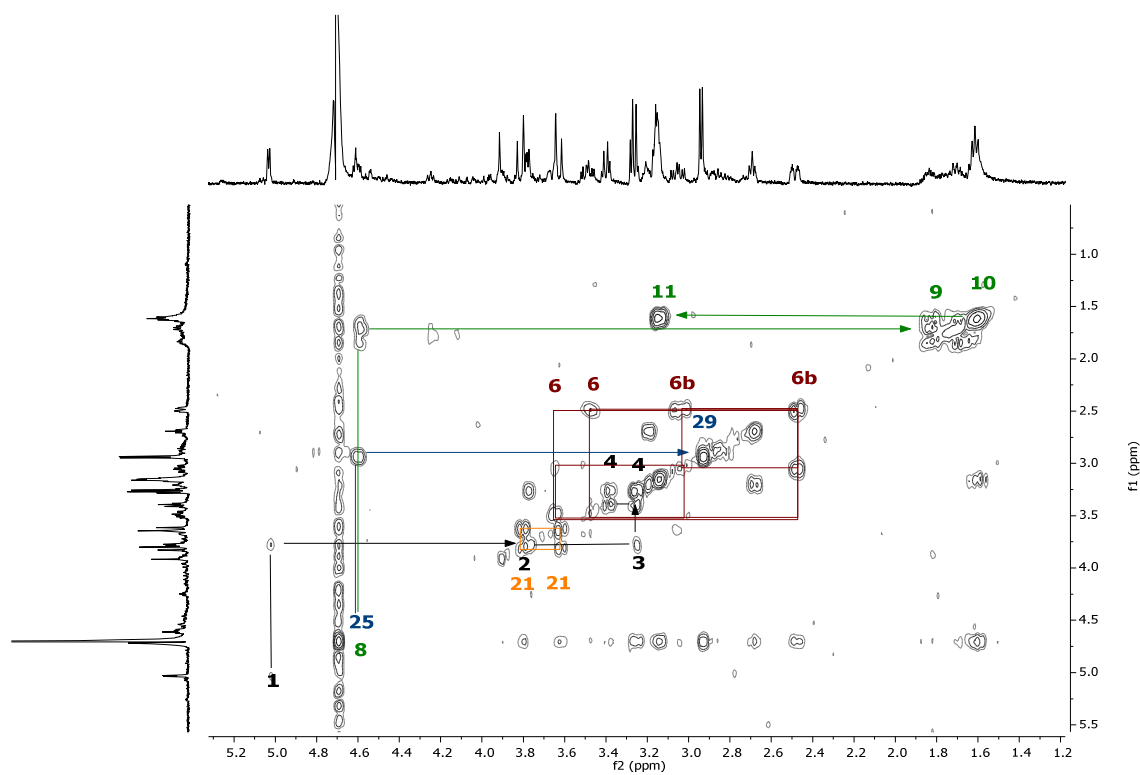


Figura 80. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 7.

Los productos **7.11**, **7.13** y **7** mostraron tener la masa esperada:

**Tabla 12.** Masas de los compuestos **7.11**, **7.13** y **7**. a) Masa encontrada mediante UPLC-MS; b) masa encontrada mediante HRMS.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ H <sup>+</sup> )	Masa encontrada (m/z) (+ H <sup>+</sup> )
<b>7.11</b>	1118.4994	1119.5072	1120.12 <sup>a</sup>
<b>7.13</b>	876.4051	877.5119	877.88 <sup>a</sup>
<b>7</b>	528.2292	529.2370	529.2368 <sup>b</sup>

#### 4.2.2.4.2.3. Síntesis del tetrapéptido 11.11 e intentos de ciclación

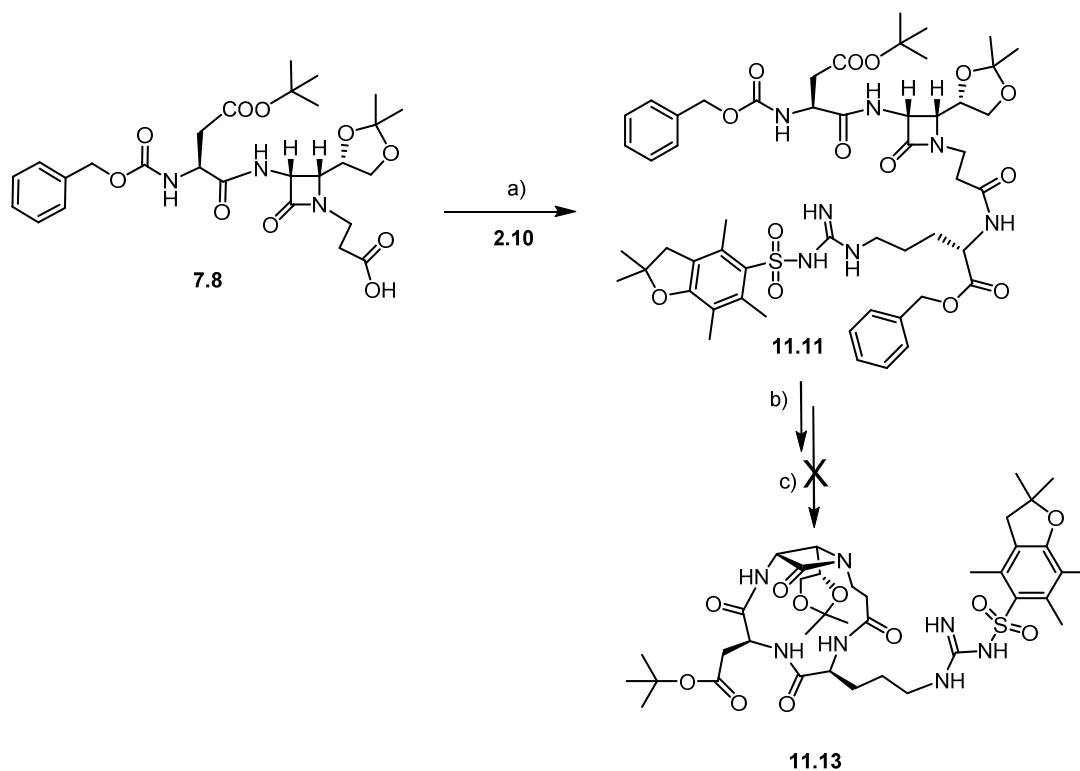
Aunque hasta el momento no se había conseguido sintetizar ningún tetrapeptidomimético se intentó llevar a cabo la síntesis de la molécula objetivo **11**, basándonos en la hipótesis de que una cadena lateral más larga y flexible podría dar lugar a una mayor aproximación de los extremos de ambas cadenas facilitando la ciclación.

Para la síntesis del tetrapéptido objetivo **11** partimos del compuesto **7.8** al que acoplamos el aminoácido arginina **2.10** debidamente protegido, dando lugar al precursor lineal **11.11** (*Esquema 48*).

En las *Figuras 81* y *82* se pueden observar los protones correspondientes a los tres enlaces amida H26, H24 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.97$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 7.55$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 6.49$  ppm) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1 y H8).

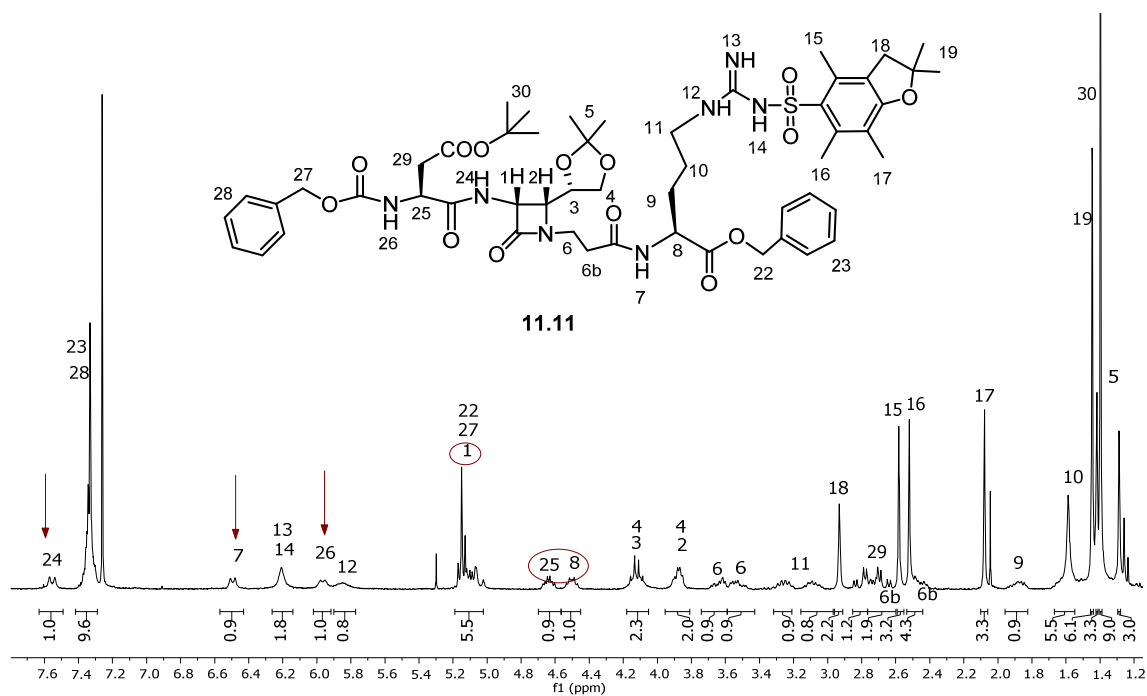
Desgraciadamente y tras varios intentos, de nuevo fue imposible la formación del producto de ciclación **11.13**.





**Esquema 48.** Síntesis total de la molécula **11.13**. a) EDC-HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (73%). b) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. c) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

Una mayor flexibilidad y una cadena más larga, por lo tanto, no han sido suficientes para aproximar las cadenas laterales y facilitar la ciclación.



**Figura 81.** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **11.11**.

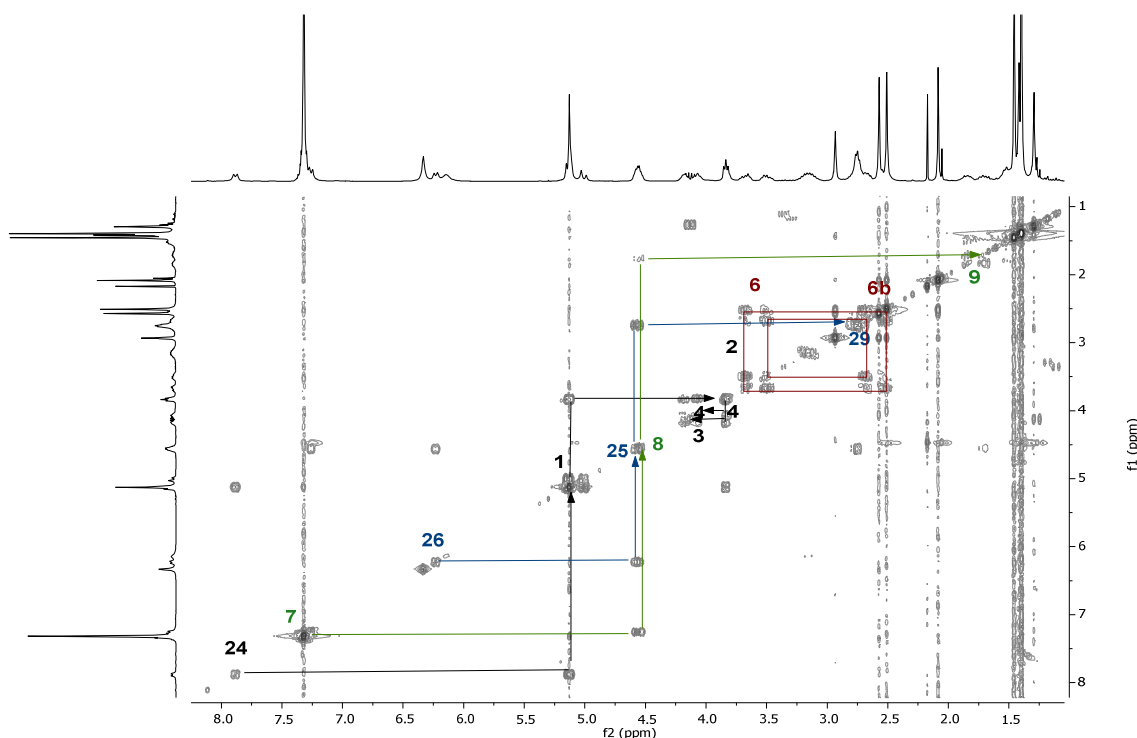


Figura 82. COSY (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **11.11**.

#### 4.2.2.4.3. Depsipéptidos *cis* **9** y **13**

El pentadepsipéptido **9** y su análogo tetrapeptídico **13**, requieren de una *cis*-3-hidroxi-β-lactama análoga a la β-lactama **1.5** pero con un metileno adicional en la cadena de la posición N1.

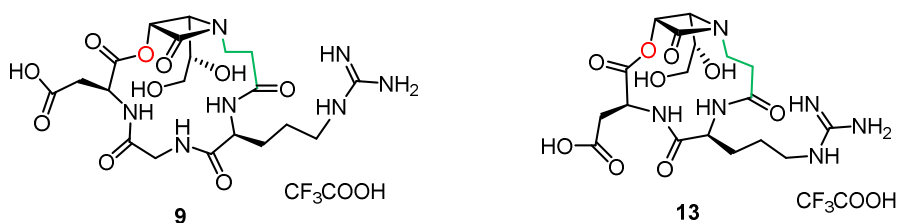


Figura 83. Depsipéptidos objetivo **9** y **13**.

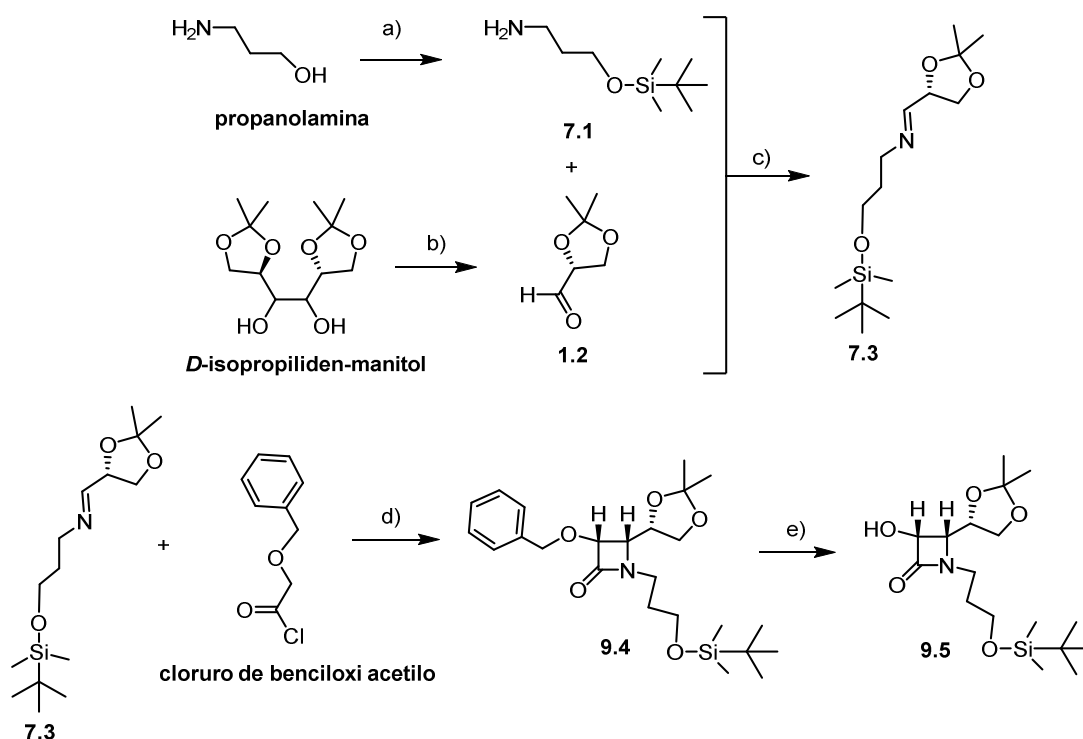
##### 4.2.2.4.3.1. Síntesis de la *cis*-3-hidroxi-β-lactama **9.5**

Para la síntesis de β-lactama **9.5** se siguió el esquema sintético propuesto para la β-lactama **1.5** sustituyendo la etanolamina por propanolamina para la formación del compuesto imídico. Así la imina **7.3** se hizo reaccionar con el cloruro de benciloxi

acetilo en presencia de TEA para dar lugar a la formación de la  $\beta$ -lactama **7.4** (Esquema 49).

A continuación se desprotegió el grupo benciloxilo obteniéndose el compuesto **9.5** con un rendimiento global del 53%.

En las Figuras Figura 8484 y 85 se puede observar la señal perteneciente a los protones H6b del metileno adicional de la cadena lateral de la  $\beta$ -lactama. También podemos confirmar la desprotección del grupo benciloxilo por la desaparición de las señales aromáticas (7.50–7.25 ppm). Hay que añadir que la constante de acoplamiento entre los dos protones de la  $\beta$ -lactama H1 y H2 es de 4.9 Hz, característica de una configuración *cis*.<sup>121</sup>



**Esquema 49.** Síntesis de la  $\beta$ -lactama *cis* **9.5**. a)  $\text{ClSiMe}_2^t\text{Bu}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20 °C, 12 h. b)  $\text{NaIO}_4$  sobre gel de sílice,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. c) tamiz molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 1 h. d) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de -78 °C a t. a., 16 h. e)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd/C 10%, metanol, reflujo, 1 h. (Rto. global del 53%)

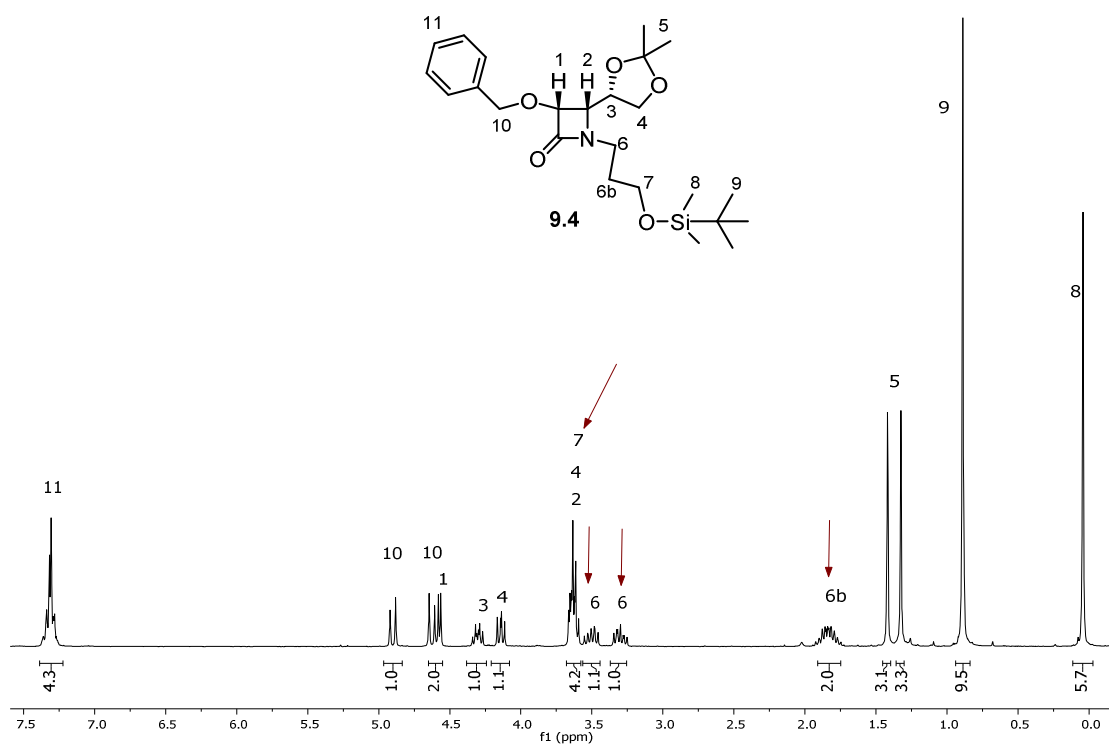


Figura 84. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 9.4.

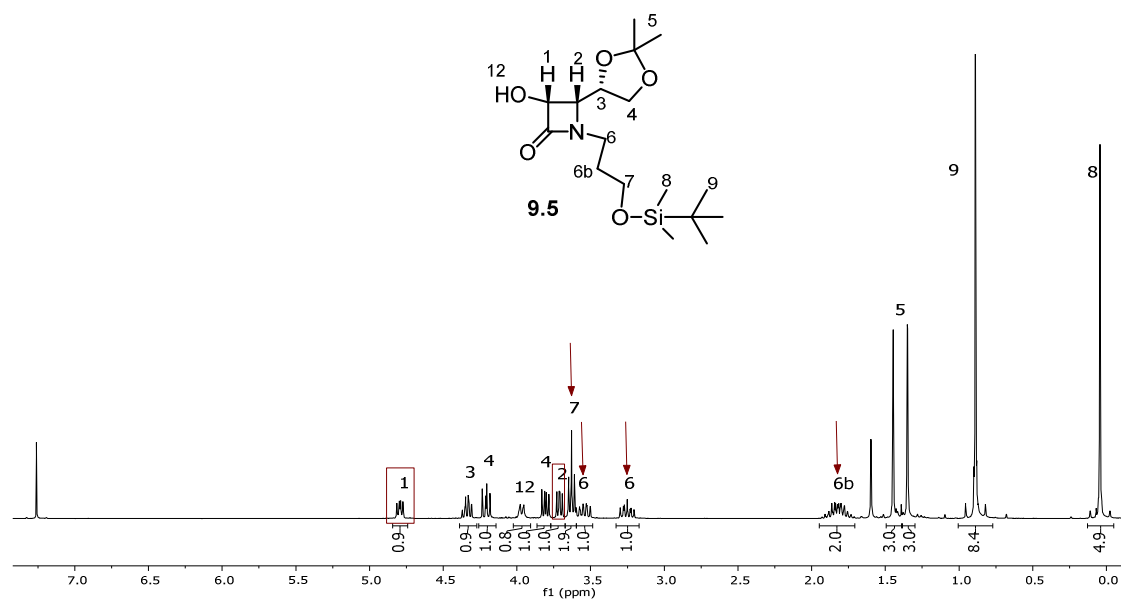


Figura 85. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 9.5.

#### 4.2.2.4.3.2. Síntesis total del pentadepsipéptido **9**

La síntesis del depsipéptido **9** se llevó a cabo con éxito siguiendo el *Esquema 50*.

En primer lugar se sintetizó el compuesto **9.6** que, tras la desprotección del grupo sililo y posterior oxidación del alcohol, condujo al ácido carboxílico **9.8**. El acoplamiento entre el compuesto **9.8** y el dipéptido **1.10** dio lugar al precursor lineal **9.11** cuya desprotección y posterior ciclación dieron como resultado el pentaciclo **9.13**.

En las *Figuras 86–89* se pueden observar las señales correspondientes a los tres enlaces amida H26, H7 y H20, tanto en el precursor lineal como en el macrociclo, y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H8 y H21).

Como se puede observar en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la *Figura 88*, en esta ocasión el protón del carbono C3 de la  $\beta$ -lactama (H1) sí que muestra un desplazamiento químico característico de un enlace éster ( $\delta_{\text{H}\alpha[\beta\text{-lactama}]} = 5.75$  ppm), hecho que indica que el éster no ha sufrido la reacción de transesterificación desacoplando el ácido aspártico de la  $\beta$ -lactama.

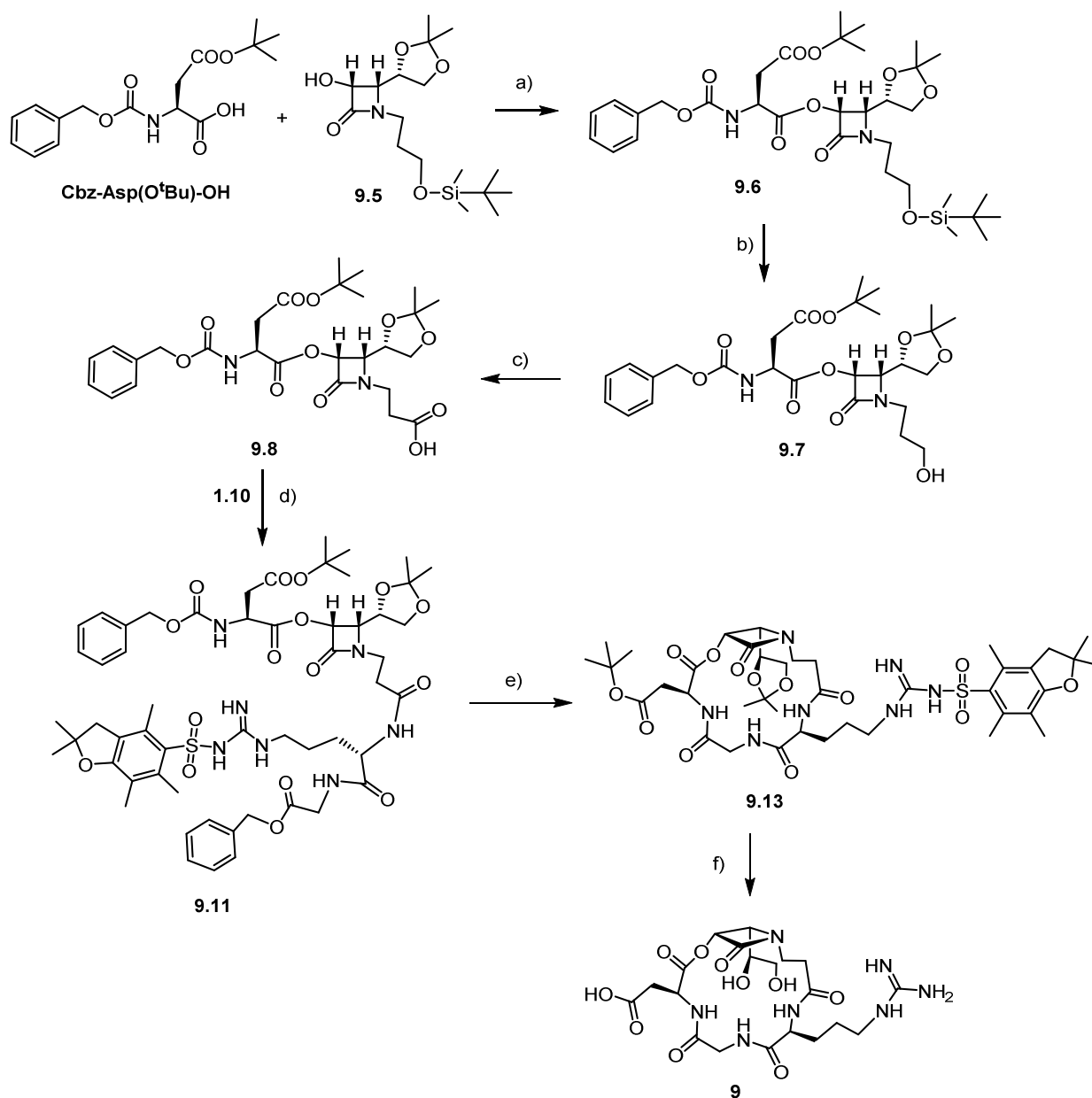
La desprotección del pentadepsipéptido cíclico **9.13** empleando anhídrido de TFA nos dio como resultado el compuesto objetivo **9** en forma de sólido blanco.

Los productos **9.11**, **9.13** y **9** mostraron tener la (*Tabla 13*):

**Tabla 13.** Masas de los compuestos **9.11**, **9.13** y **9**.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ H <sup>+</sup> )	Masa encontrada (m/z) (+ H <sup>+</sup> )
<b>9.11</b>	1119.4835	1120.4913	1120.56 <sup>a</sup>
<b>9.13</b>	877.3892	878.3970	878.43 <sup>a</sup>
<b>9</b>	529.2132	530.2210	530.2210 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Masa encontrada mediante UPLC-MS. <sup>b</sup> Masa encontrada mediante HRMS.



**Esquema 50.** Síntesis total del pentapéptido **9**. a) 1) (CFN)<sub>3</sub>, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15 °C, 1 h. 2) TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t. a., 30 min (Rto. global del 88%). b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (74%). d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (68%). e) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h (Rto. global del 45%). f) Et<sub>3</sub>SiH, Anhídrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h (80%).

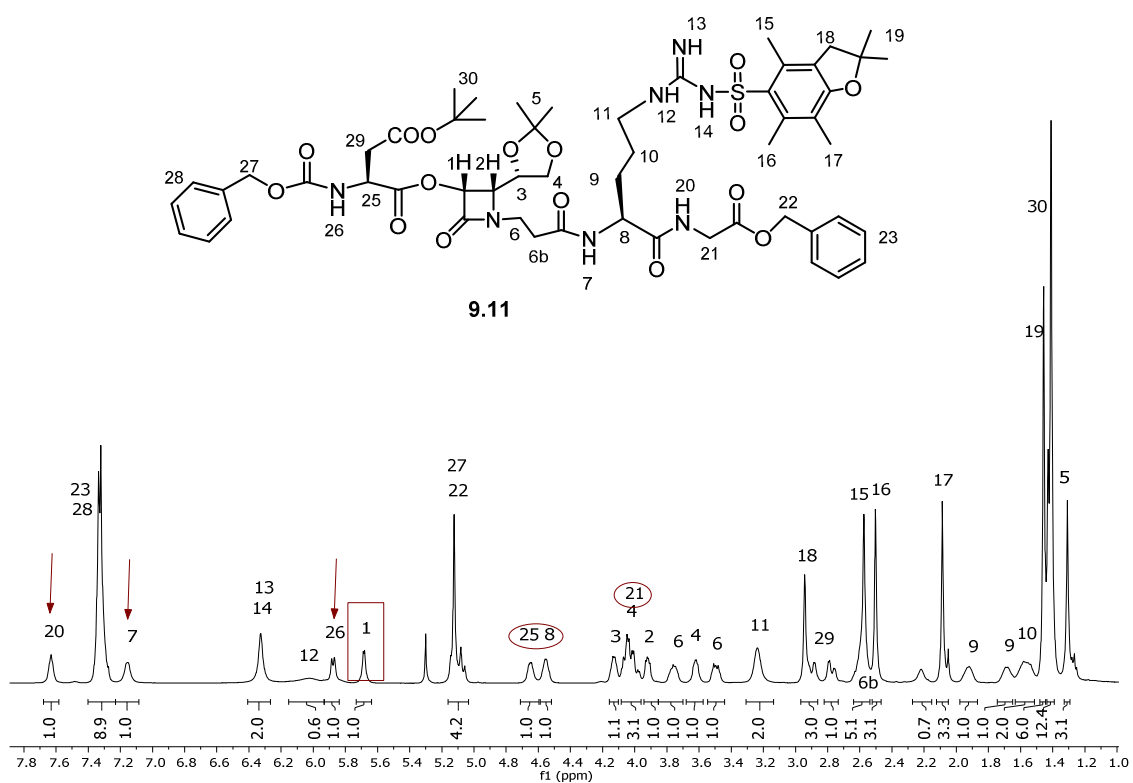


Figura 86. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto 9.11.

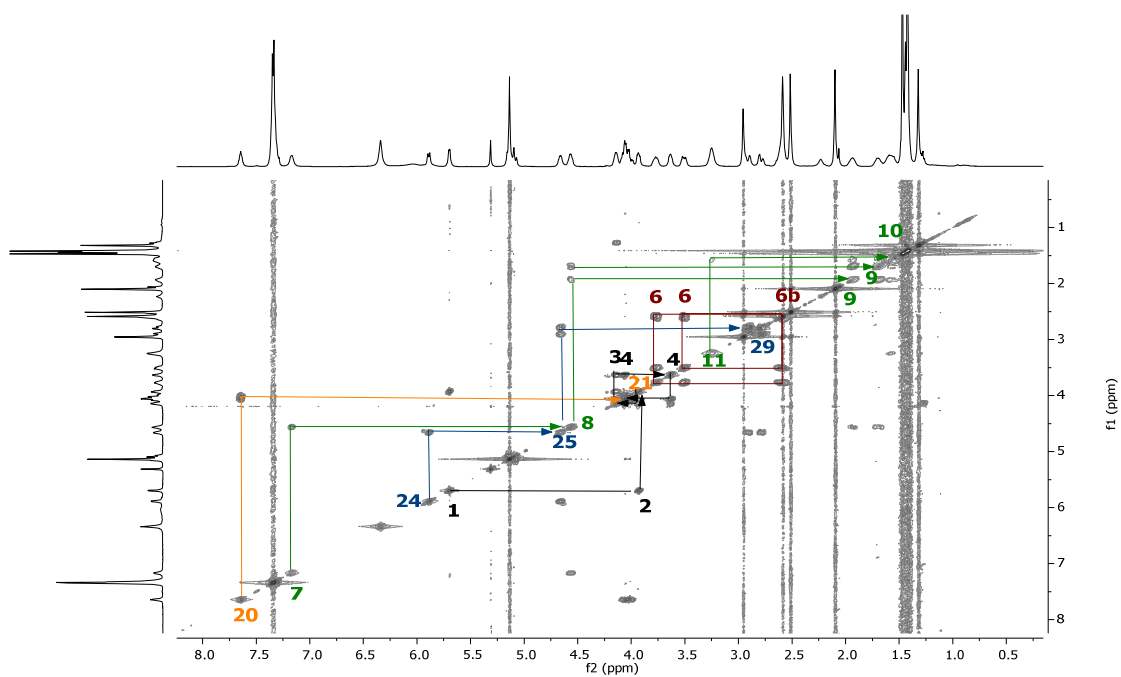


Figura 87. COSY del compuesto 9.11.

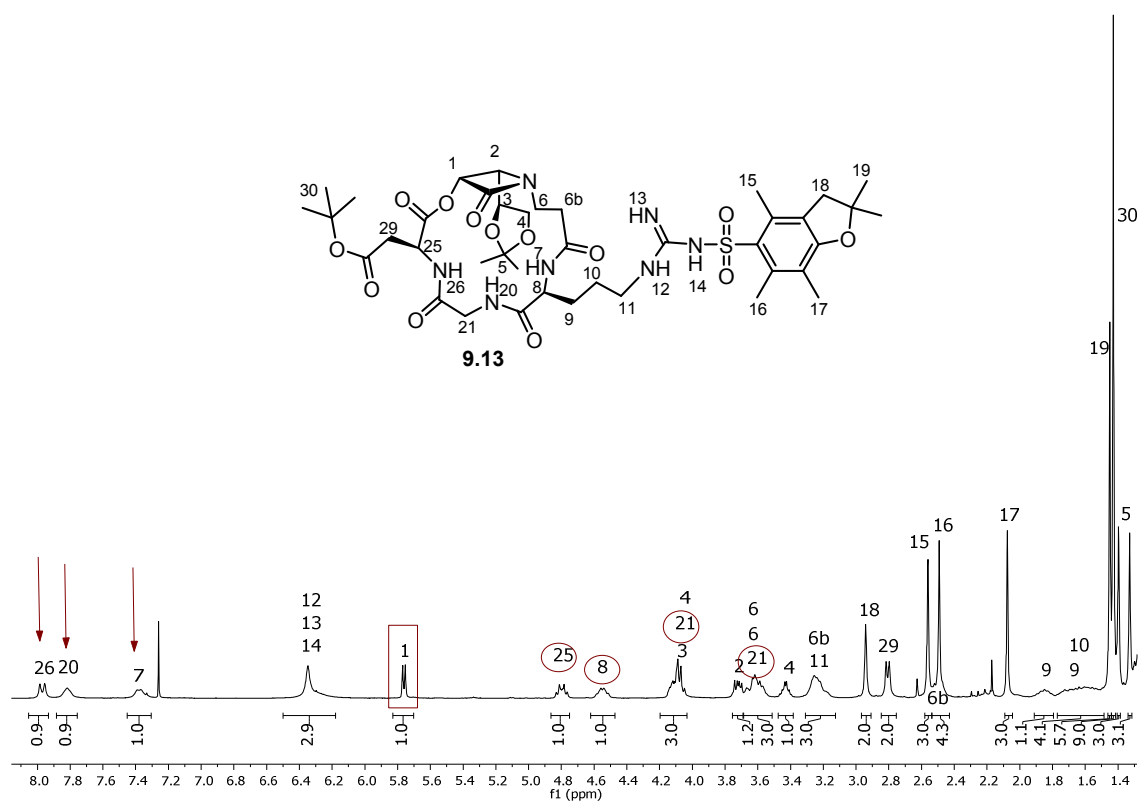


Figura 88. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto 9.13.

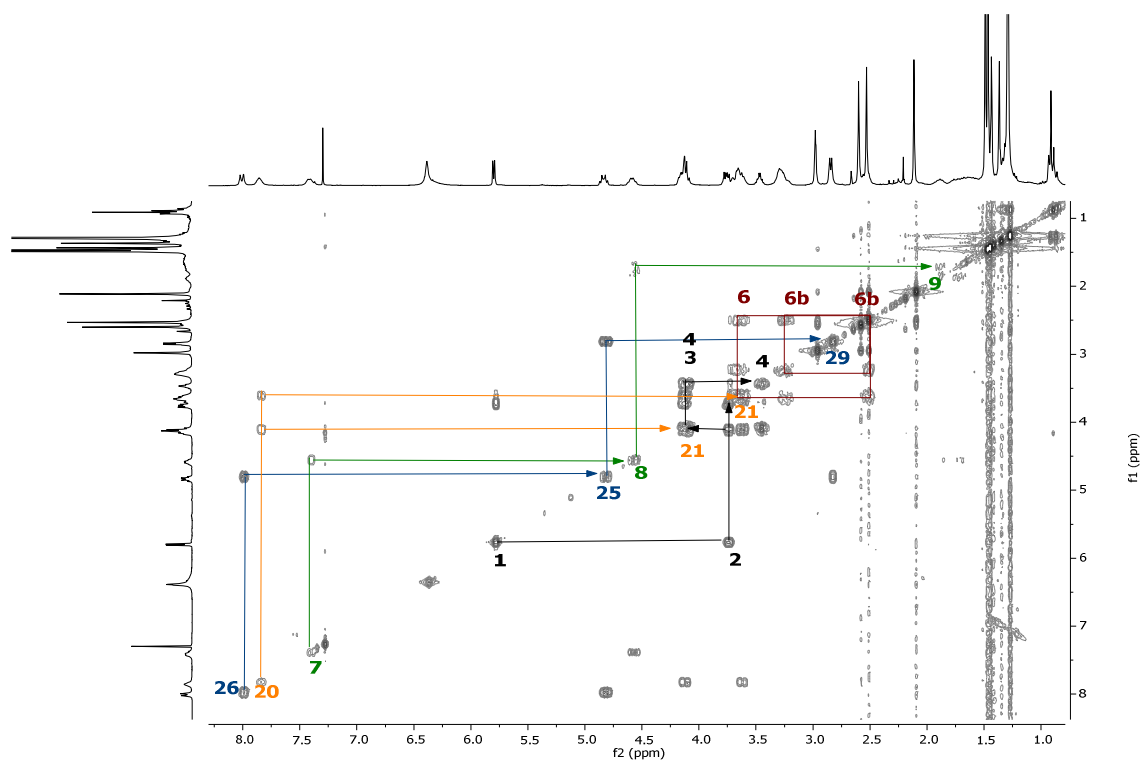


Figura 89. COSY del compuesto 9.13.



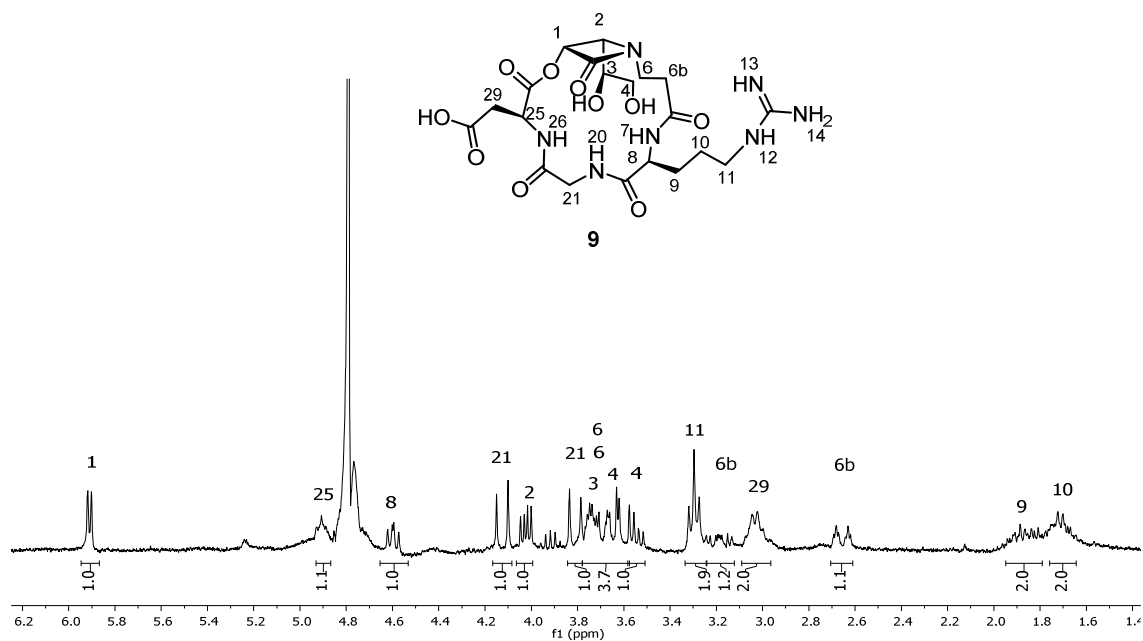


Figura 90. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto 9.

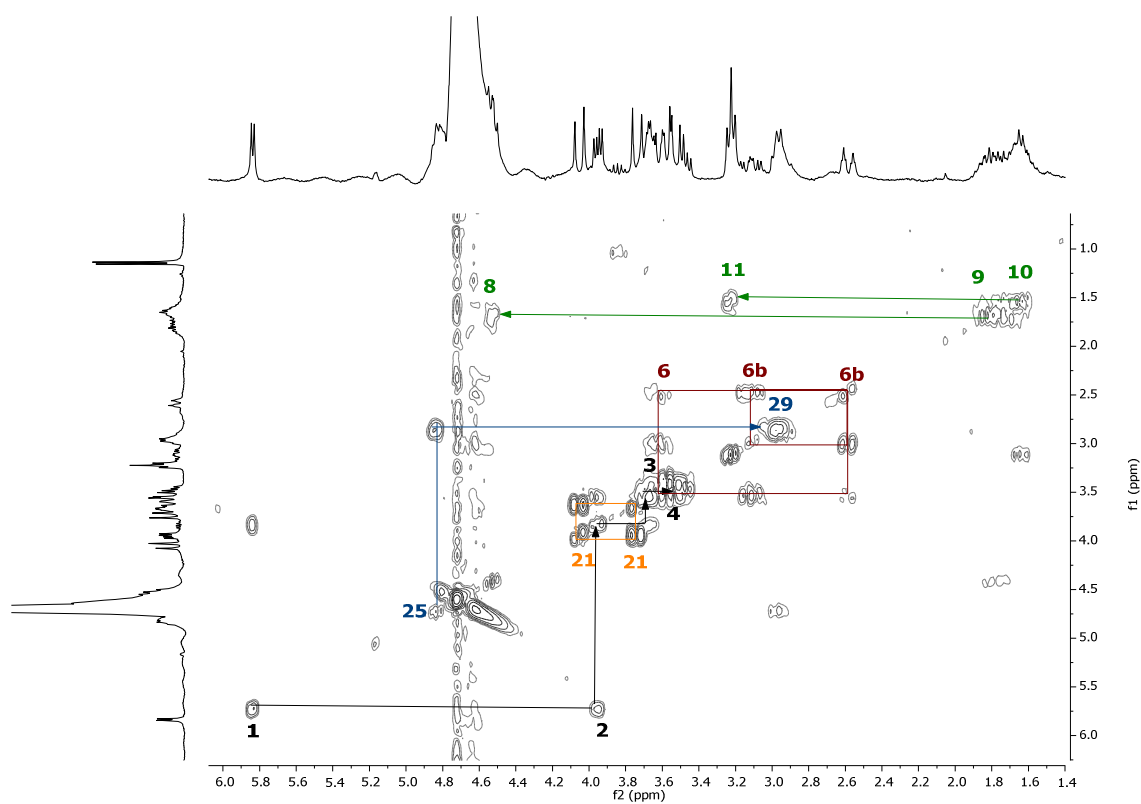


Figura 91. COSY del compuesto 9.

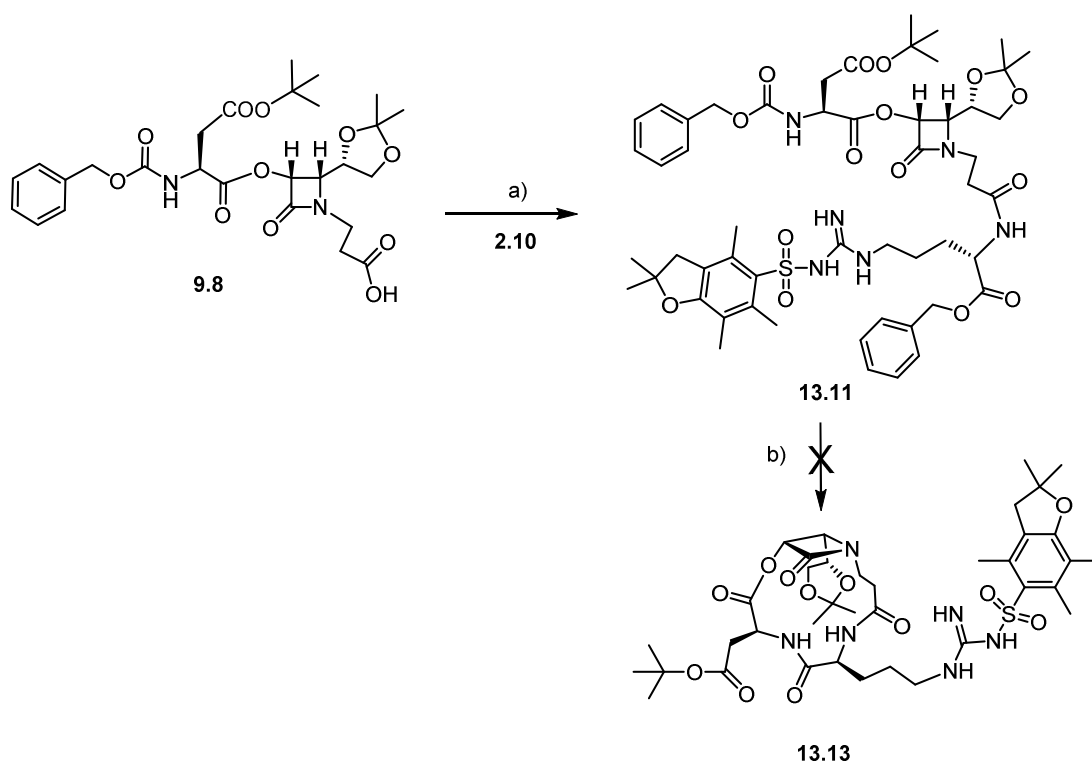
#### 4.2.2.4.3.3. Síntesis del tetradepsipéptido **13.11** e intentos de ciclación

El precursor lineal **13.11** se preparó partiendo del Cbz-Asp-β-lact-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **9.8** al que se le acopló la arginina debidamente protegida **2.10** siguiendo el *Esquema 51*.

Las *Figuras 92 y 93* muestran las señales de los dos enlaces amida H26 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.82$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 4.70\text{--}4.51$  ppm) del precursor lineal y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25 y H8). A demás de la señal a campo bajo del protón del carbono C3 de la β-lactama H1 ( $\delta_{\text{H1}} = 5.66$  ppm). El conjunto de estas señales confirman la obtención del producto **13.11**.

Por otro lado la masa (+ H<sup>+</sup>) encontrada en el experimento de UPLC-MS (1063.50 m/z) también coincide con la masa teórica esperada (masa exacta calculada = 1062.4620; masa exacta calculada (+ H<sup>+</sup>) = 1063.4698).

Aún así, de nuevo fue imposible generar el producto de ciclación **13.13**.



**Esquema 51.** a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (68%). b) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

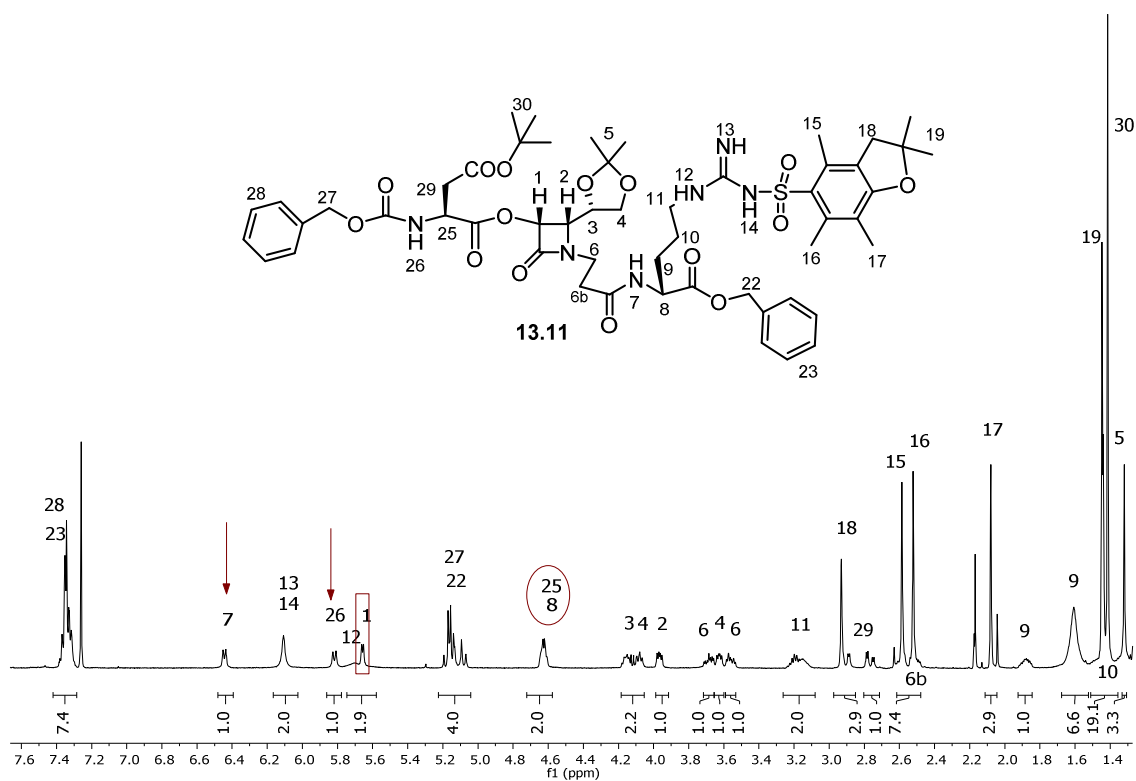


Figura 92. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 13.11.

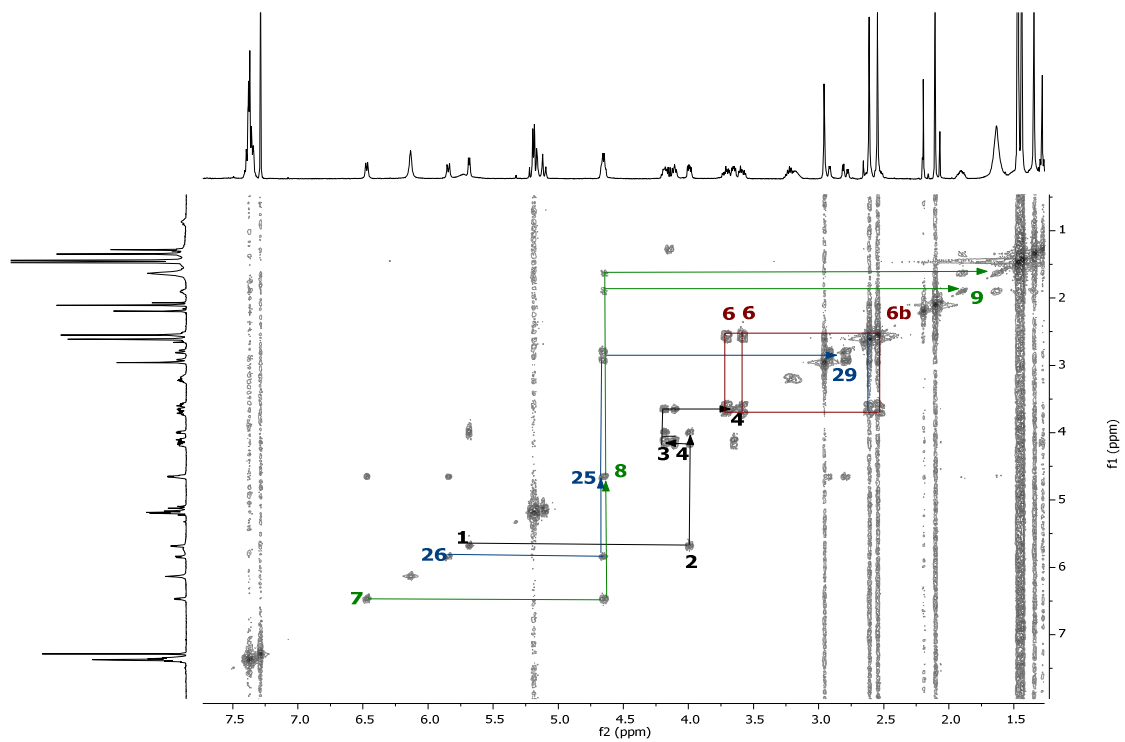


Figura 93. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 13.11.

#### 4.2.2.4.4. Péptidos *trans* 8 y 12

El pentapéptido **8** y su análogo tetrapeptídico **11**, requieren de una *cis*-3-amino- $\beta$ -lactama análoga a la  $\beta$ -lactama **4.5** pero con un metileno adicional en la cadena de la posición N1.

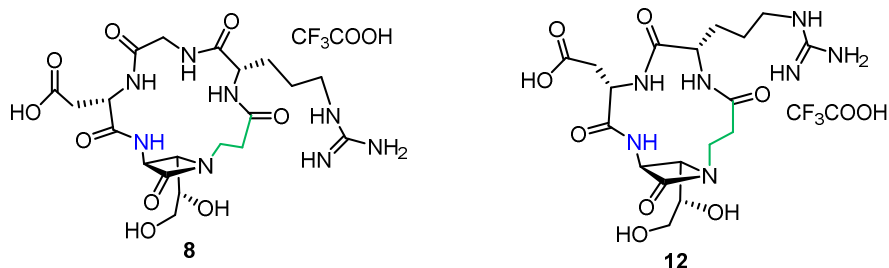
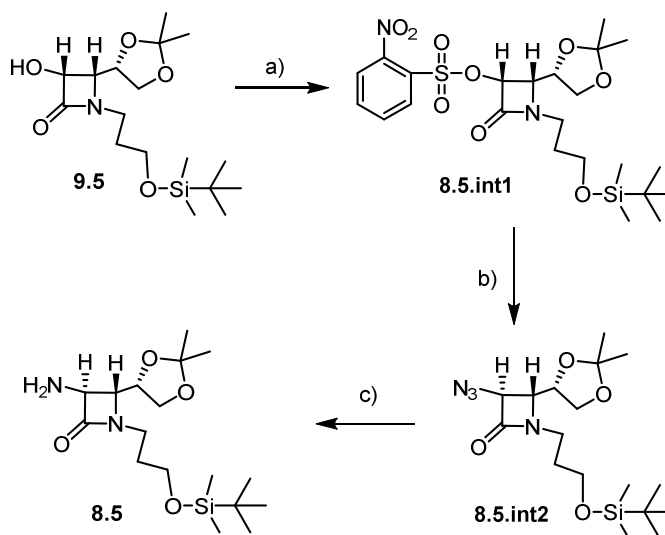


Figura 94. Moléculas objetivo **8** y **12**.

#### 4.2.2.4.4.1. Síntesis de la *trans*-3-amino- $\beta$ -lactama **8.5**

La síntesis de la  $\beta$ -lactama **8.5** se llevó a cabo siguiendo el esquema propuesto para la síntesis de la  $\beta$ -lactama **4.5**, donde la etapa clave es una inversión de la configuración en el carbono de la posición C3, en este caso, de la  $\beta$ -lactama **9.5** (Esquema 52).



Esquema 52. Síntesis de la  $\beta$ -lactama *trans* **8.5**. a) *o*-Ns-Cl, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 16 h (96%). b)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 80 °C, 2 h (63%). c) Pd/ $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{H}_2$ , EtOH, 16 h (96%).

En las Figuras 95 y 96 se pueden observar las señales correspondientes a los protones H6, H6b y H7 de la cadena lateral de la  $\beta$ -lactama con un metileno adicional.

Por otro lado, la inversión del centro cuaternario quedó confirmada también mediante  $^1\text{H}$ -RMN, por la disminución de la constante de acoplamiento entre los protones  $\beta$ -lactámicos H1 y H2 (**9.5**:  $J = 4.9$  Hz, **8.5.int1**:  $J = 5.0$  Hz, **8.5.int2**:  $J = 2.0$  Hz).

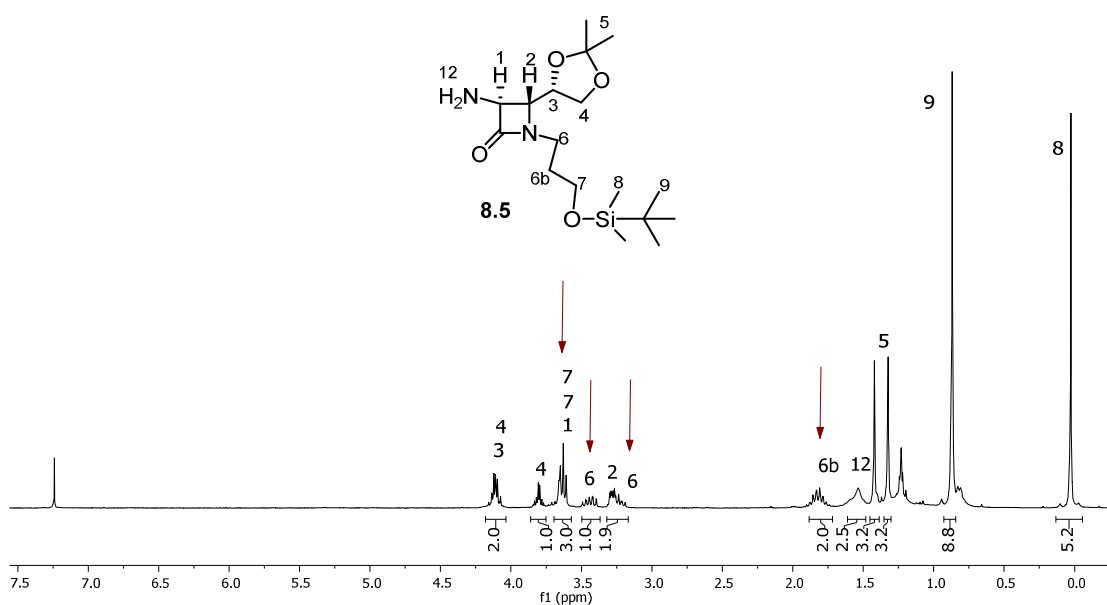


Figura 95. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **8.5**.

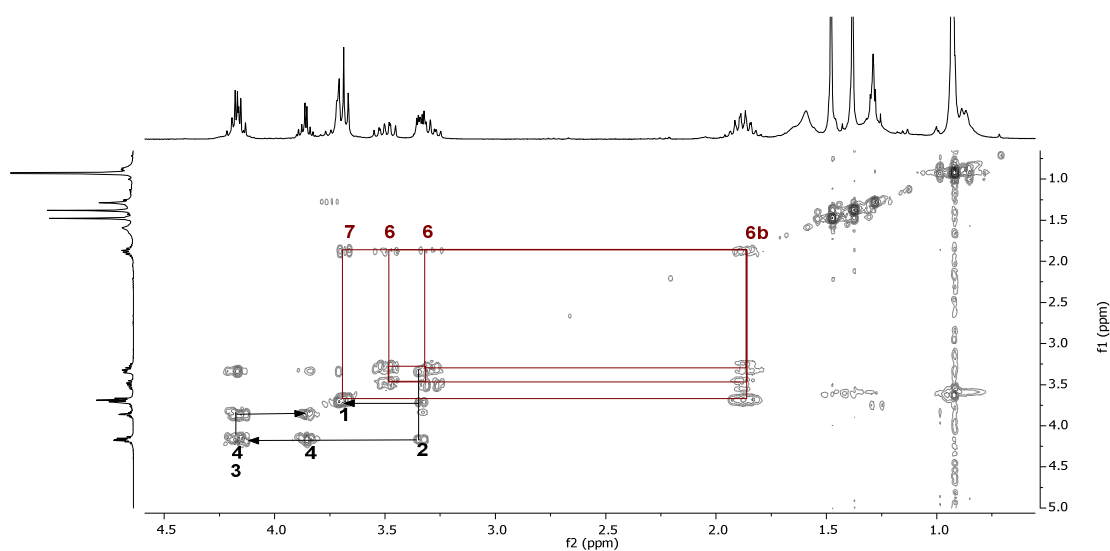
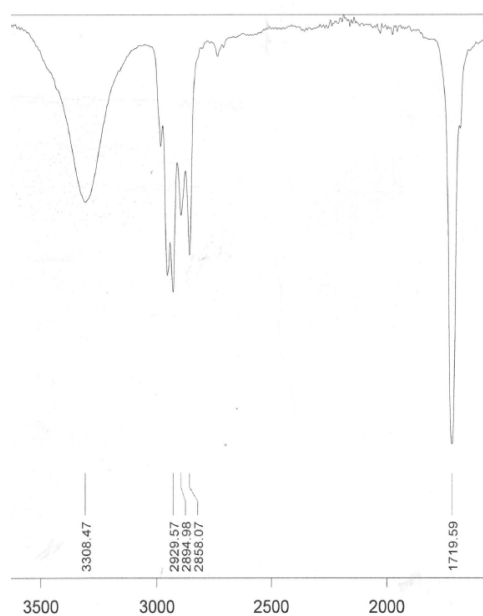
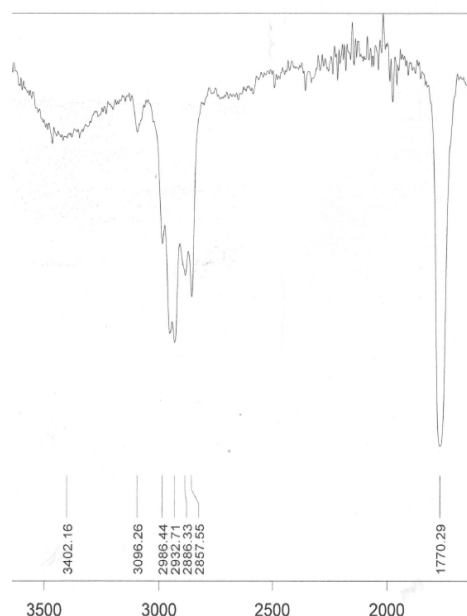


Figura 96. COSY del compuesto **8.5**.

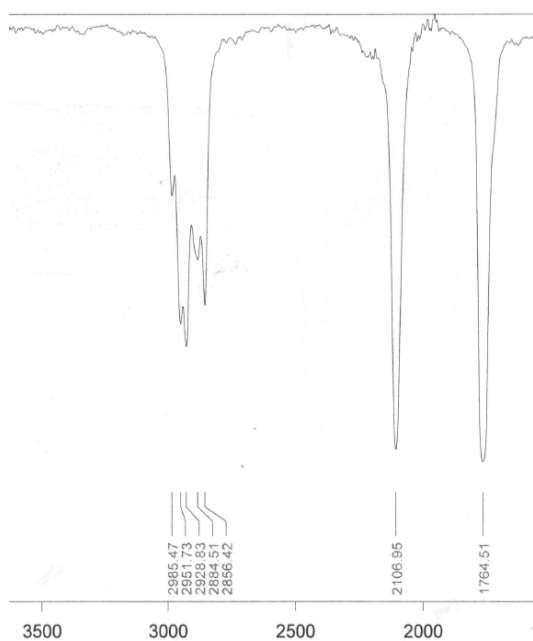
La formación de los intermedios de la secuencia se confirmó mediante espectroscopía de IR (*Figura 97*), gracias a la aparición y desaparición de las bandas características de la azida ( $2107\text{ cm}^{-1}$ ) y de los grupos hidroxilo ( $3308\text{ cm}^{-1}$ ) y amino ( $3387\text{ cm}^{-1}$ ).



9.5



8.5.int1



8.5.int2



8.5

**Figura 97.** Espectros de IR de los intermedios de síntesis del compuesto 8.5.

También se puede percibir la inversión midiendo los valores de rotación óptica.

**Tabla 14.** Valores de rotación óptica de los intermedios de síntesis del compuesto **8.5**.

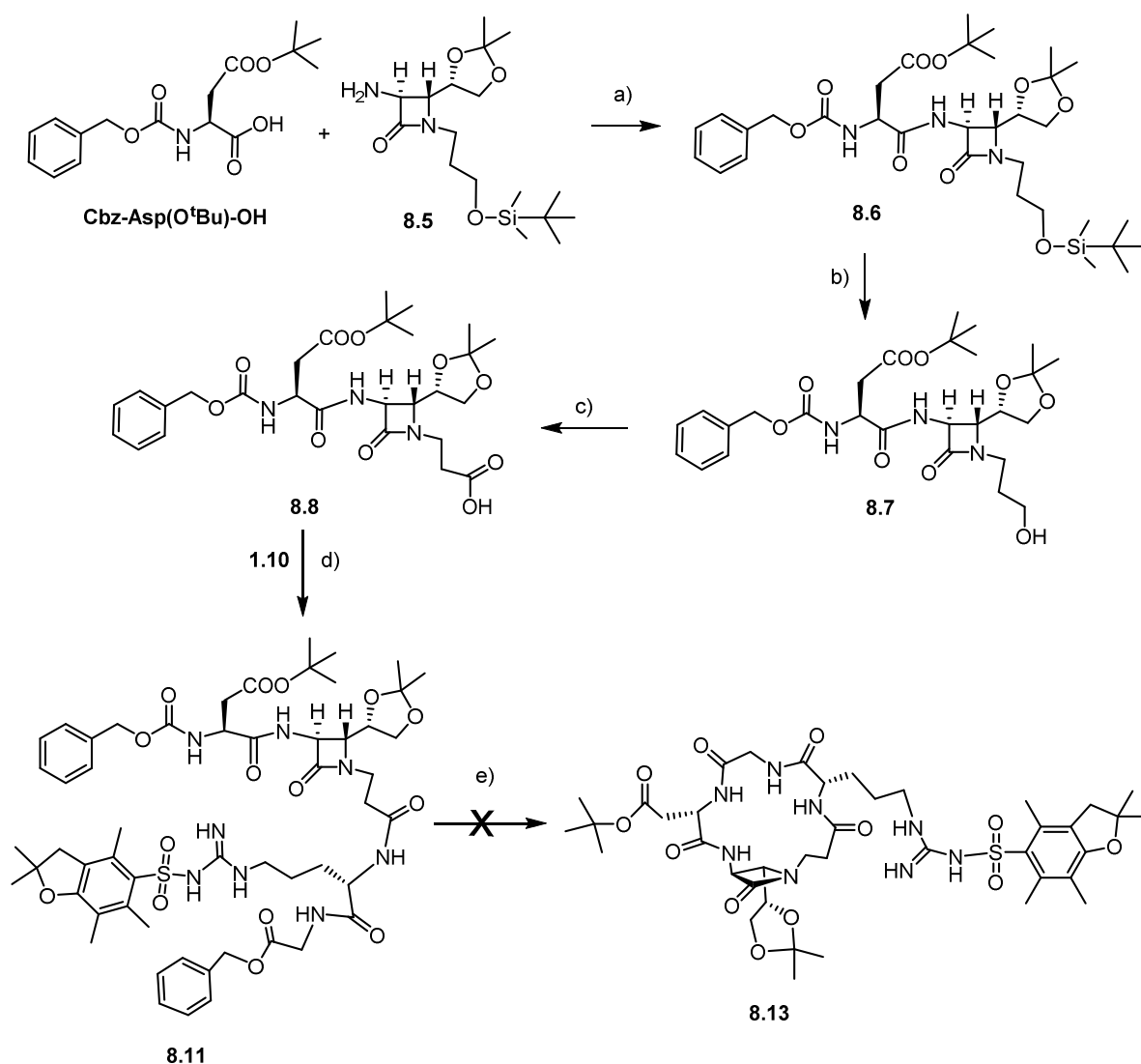
Compuesto	$[\alpha]_D^{25}$	Concentración en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>8.5.int1</b>	+88.89	1
<b>8.5.int2</b>	-84.60	1
<b>8.5</b>	-27.87	1

#### 4.2.2.4.4.2. Síntesis del pentapéptido **8.11** e intentos de ciclación

La síntesis del precursor lineal **8.11** se llevó a cabo mediante el esquema sintético propuesto para la síntesis de las moléculas **1**, **7** y **9** pero, para nuestra sorpresa, a diferencia de estos casos, no fue posible generar el producto de ciclación **8.13** (*Esquema 53*).

La formación del precursor lineal se confirmó mediante <sup>1</sup>H-RMN; en las *Figura 98–100* se pueden observar los cuatro protones de los enlaces amida del precursor lineal, H26, H24, H7 y H20 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 6.32$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 8.20$  ppm,  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 7.51$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.85$  ppm), así como sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1, H8 y H21).

En el análisis mediante UPLC-MS de nuevo se encontró la masa esperada para el precursor **8.11** (masa exacta calculada = 1118.4994; masa exacta calculada (+ H<sup>+</sup>) = 1119.5072; masa (+ H<sup>+</sup>) encontrada = 1119.42 m/z).



**Esquema 53.** Síntesis completa del pentapéptido *trans* 8.13. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (80%). b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (75%). d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (75%). e) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.



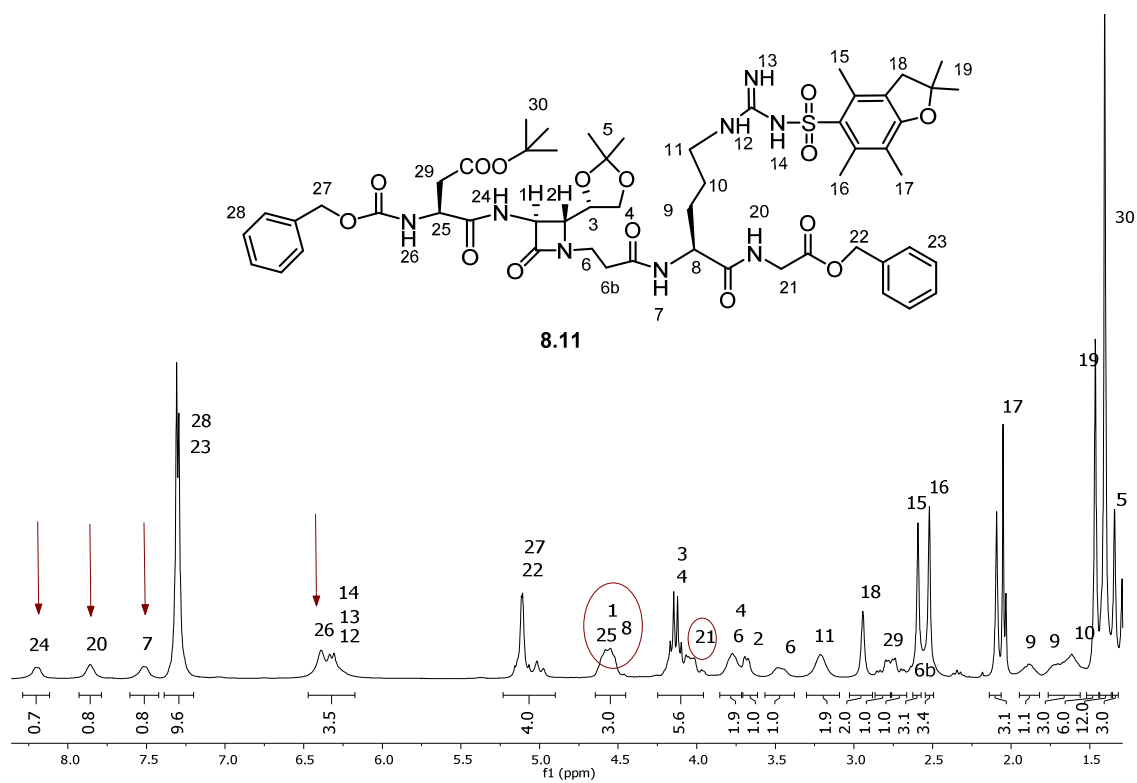


Figura 98. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 8.11.

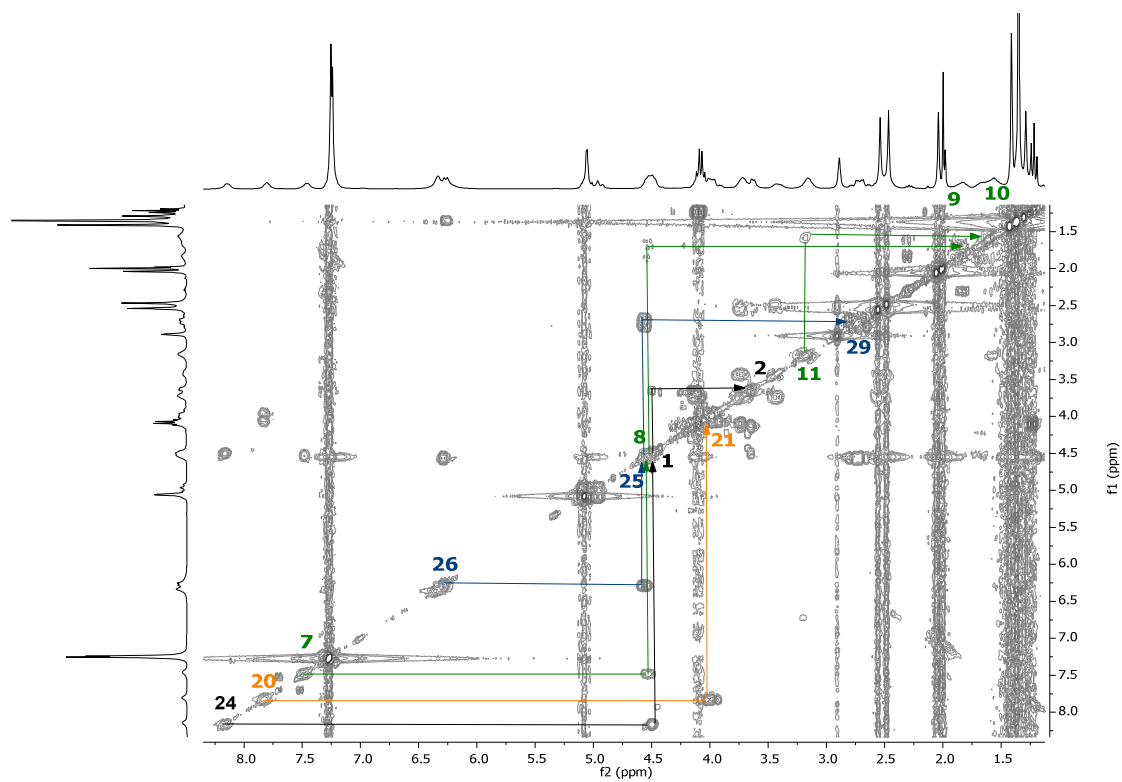


Figura 99. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 8.11.

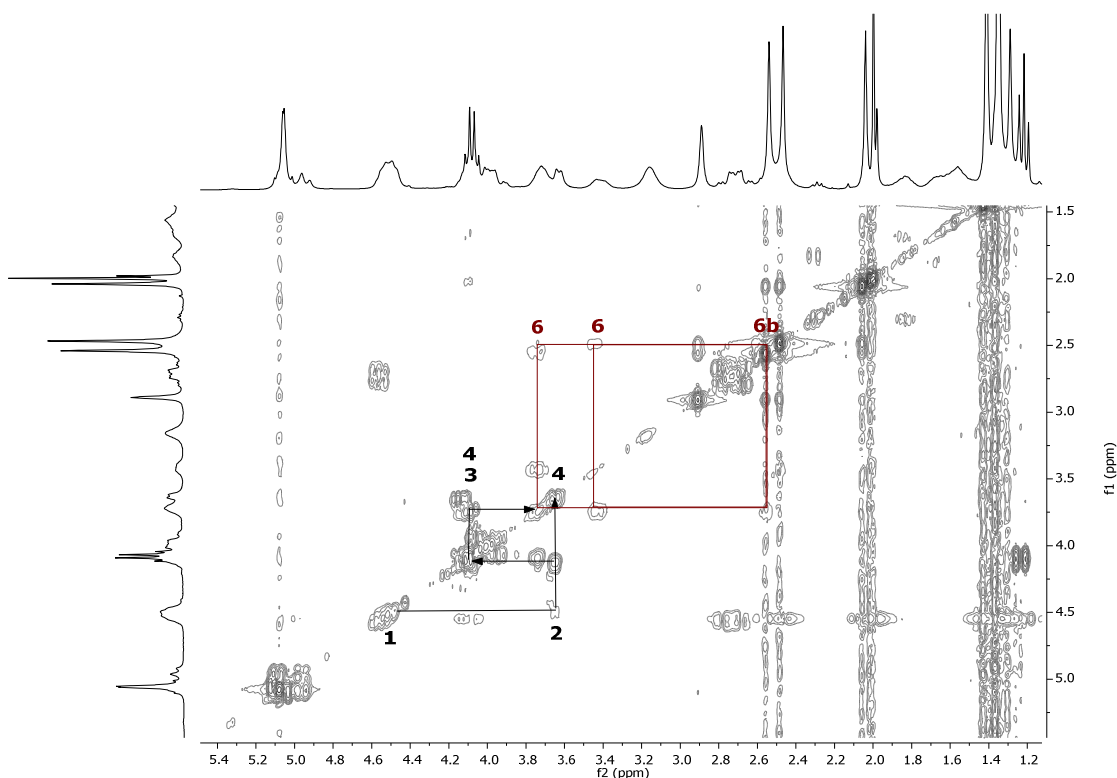


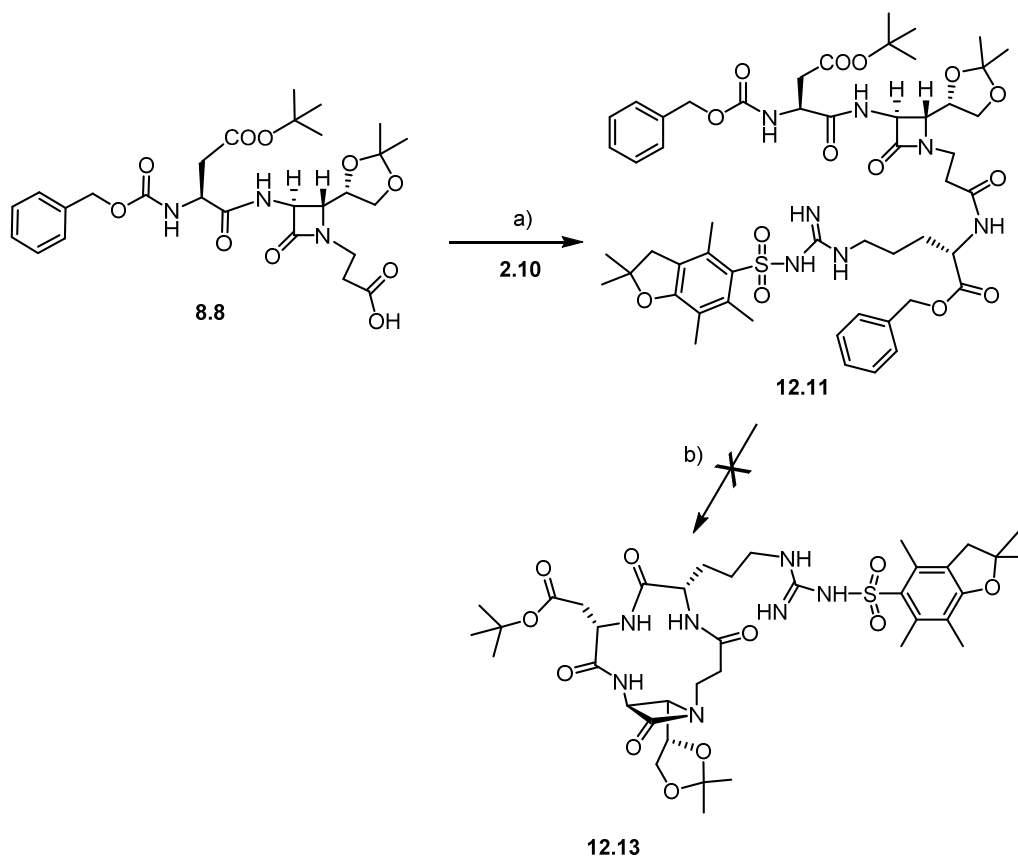
Figura 100. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **8.11**.

#### 4.2.2.4.4.3. Síntesis del tetrapéptido **12.11** e intentos de ciclación

La síntesis del precursor lineal **12.11** se llevó a cabo mediante el acoplamiento entre el compuesto **8.8** y la arginina debidamente protegida **2.10** como se propone en el *Esquema 54*.

La formación del precursor lineal se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN; en las *Figuras 101* y *102* se pueden observar los tres protones de los enlaces amida del precursor lineal, H26, H24 y H7 ( $\delta_{\text{NH}[\text{Asp}]} = 6.09$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 7.81$  ppm y  $\delta_{\text{NH}[\text{Arg}]} = 7.07$  ppm), así como sus correspondientes señales de cruce con los protones de los  $\text{C}\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1 y H8).

El análisis mediante UPLC-MS de nuevo mostró la masa esperada para el precursor **12.11** (masa exacta calculada = 1061.4780; masa exacta calculada (+  $\text{H}^+$ ) = 1062.4858; masa (+  $\text{H}^+$ ) encontrada = 1062.48 m/z).



**Esquema 54.** Síntesis completa de la molécula **12.13**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (75%). b) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. c) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

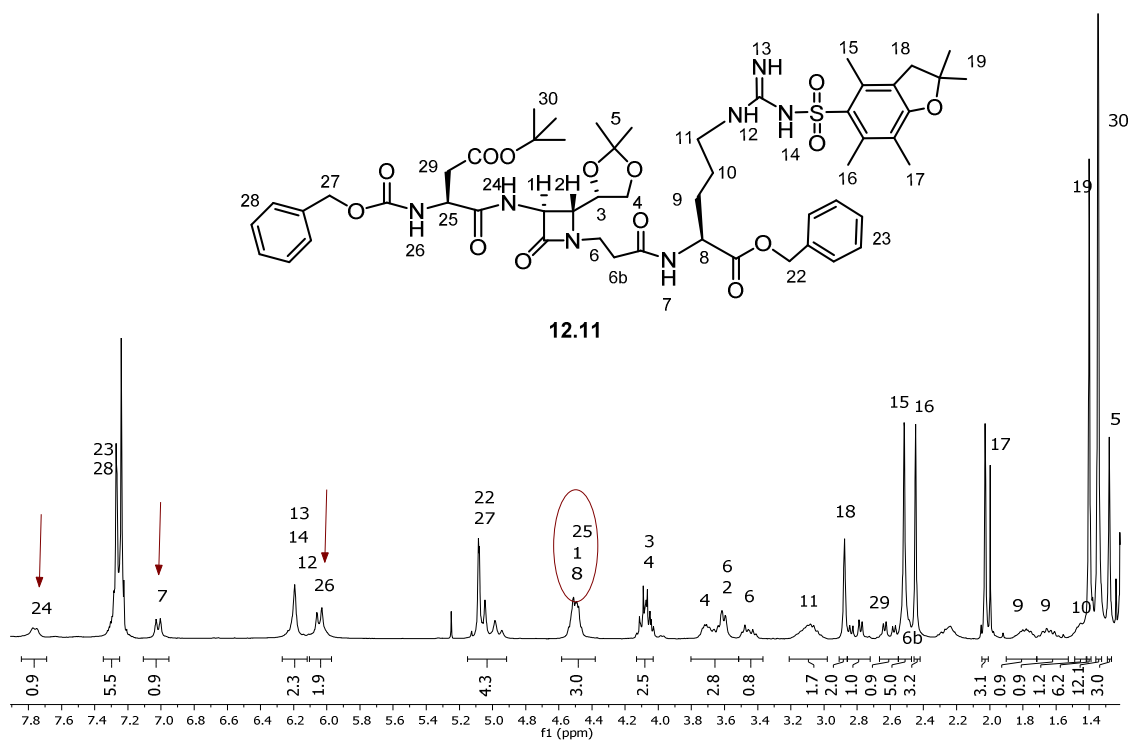


Figura 101. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto 12.11.

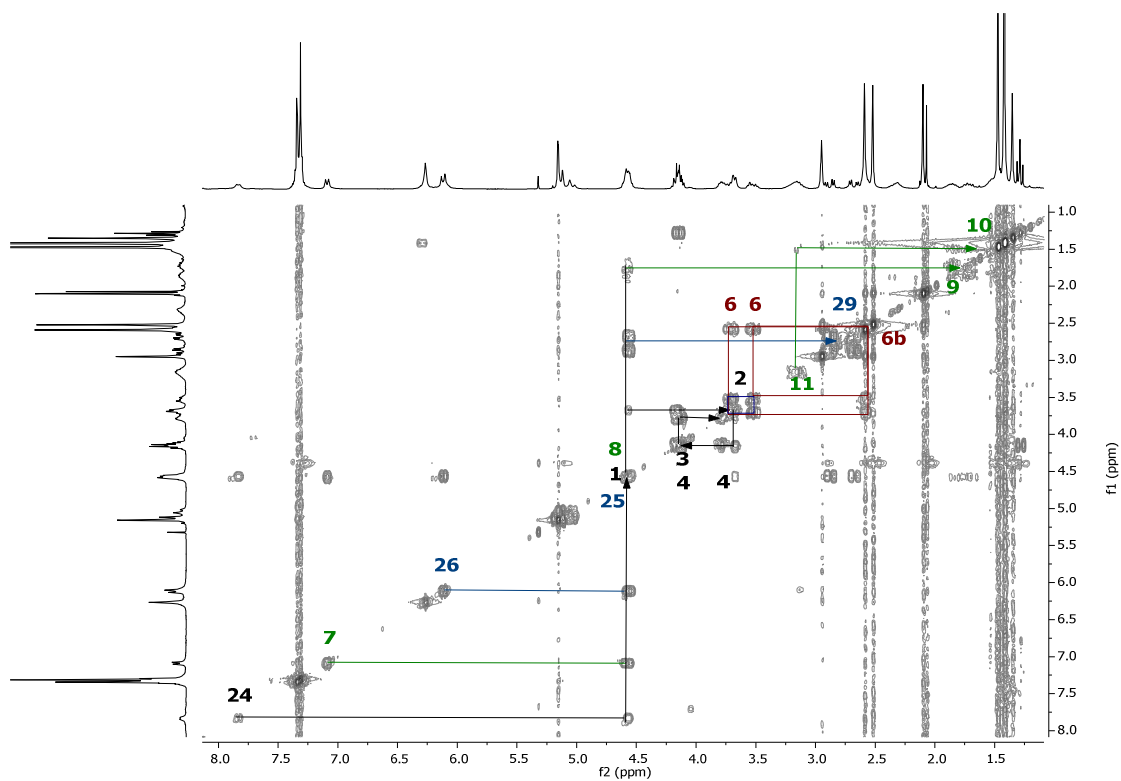
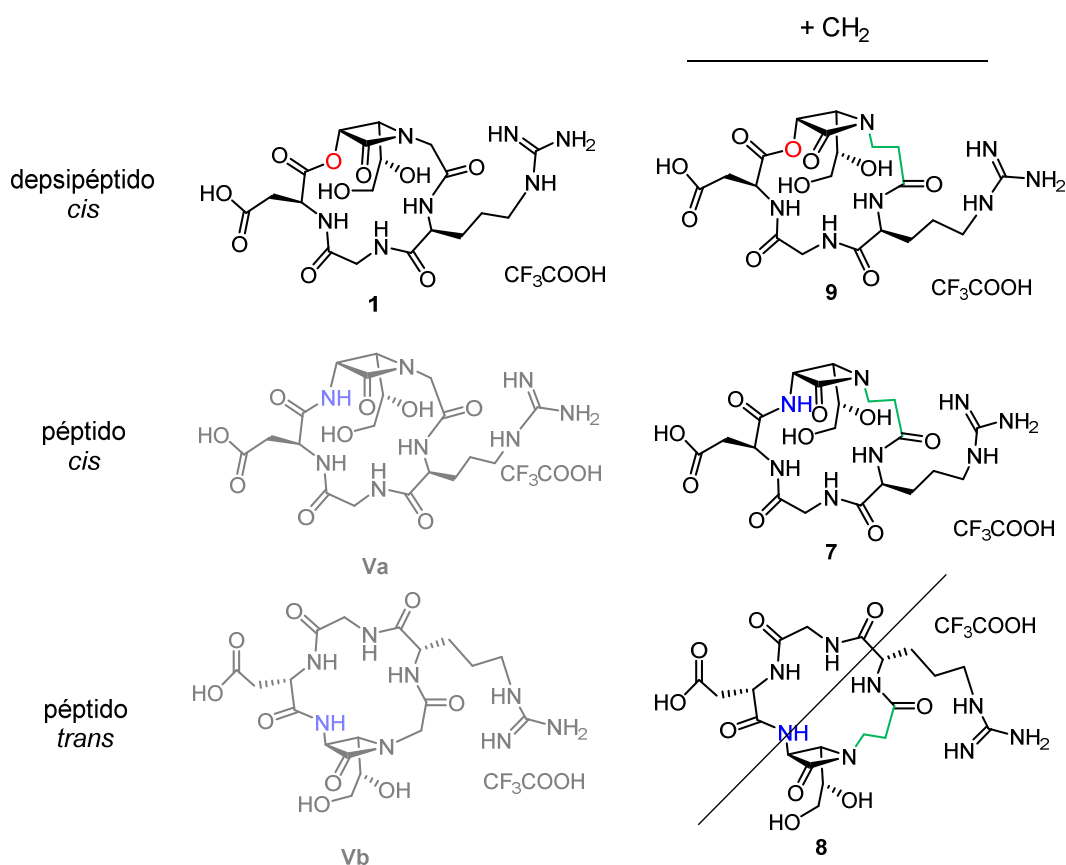


Figura 102. COSY del compuesto 12.11.

### 4.2.3. Análisis de los resultados sintéticos alcanzados y planteamiento de objetivos secundarios

El trabajo sintético realizado hasta la fecha concluyó con la obtención de los pentadepsipéptidos cíclicos **1** y **9** y el pentapéptido cíclico **7**; Es necesario remarcar la imposibilidad para preparar, por un lado, el pentapéptido cíclico **8** de configuración relativa *trans* en la  $\beta$ -lactama, y por otro lado, los tetrapeptidomiméticos cíclicos (**2–5** y **11–14**).



**Figura 103.** Moléculas objetivo sintetizadas.

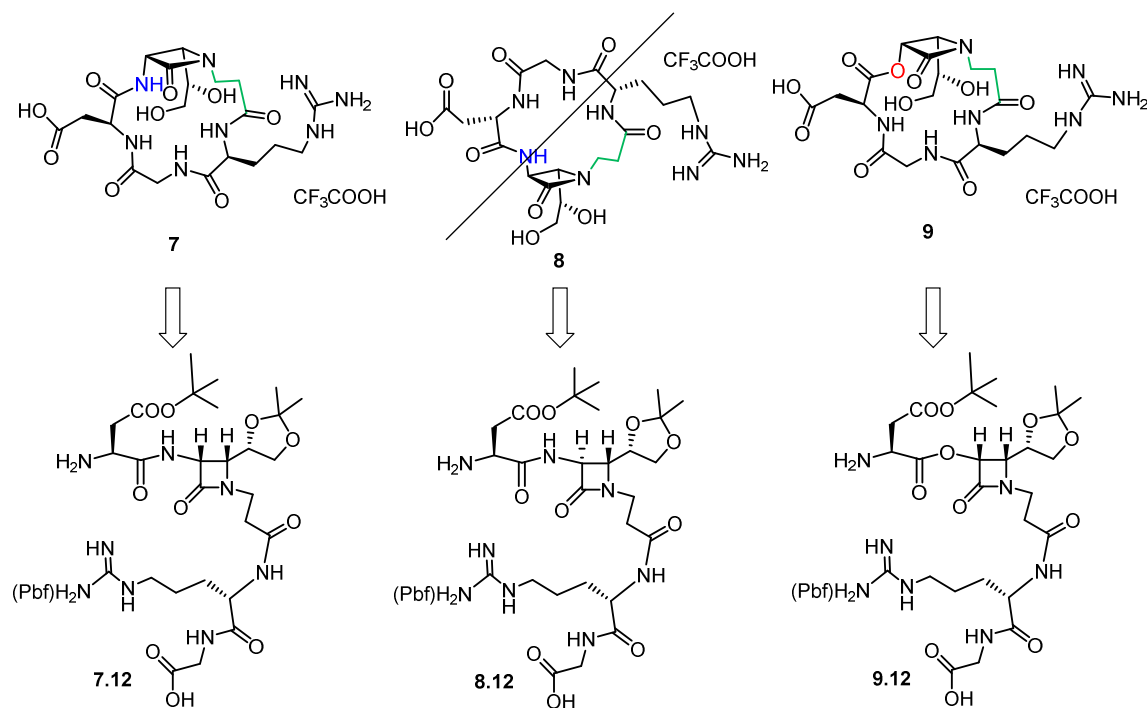
A continuación se comentan algunas razones que pueden explicar estas observaciones.

También se plantearon algunos objetivos secundarios, surgidos durante el desarrollo del trabajo experimental, para complementar el trabajo sintético; objetivos tales como la síntesis de un depsipéptido con el enlace éster ubicado en otra posición de la cadena y la síntesis de compuestos que nos servirán de control negativo en los análisis biológicos.

### 4.2.3.1. Pentapéptido cíclico 8

El primer hecho que llama especialmente la atención en el trabajo sintético llevado a cabo es la imposibilidad de generar el pentapéptido cíclico **8**, de configuración relativa *trans* en la  $\beta$ -lactama y un metileno adicional en su estructura (Figura 103).

Con el fin de determinar las diferencias conformacionales entre los precursores lineales con las cadenas laterales desprotegidas **7.12**, **8.12** y **9.12** (Figura 104); y poder entender así la razón por la que el compuesto de configuración *trans* **8.12** no da producto de ciclación y en cambio sus análogos de configuración *cis* **7.12** y **9.12** sí; se llevo a cabo un análisis teórico de la conformación de los mismos. Para ello se realizó un cálculo “ab initio” empleando el programa GAMESS, versión 1-MAY-2013-(R1), con el nivel teórico B3LYP-631G.<sup>147</sup>



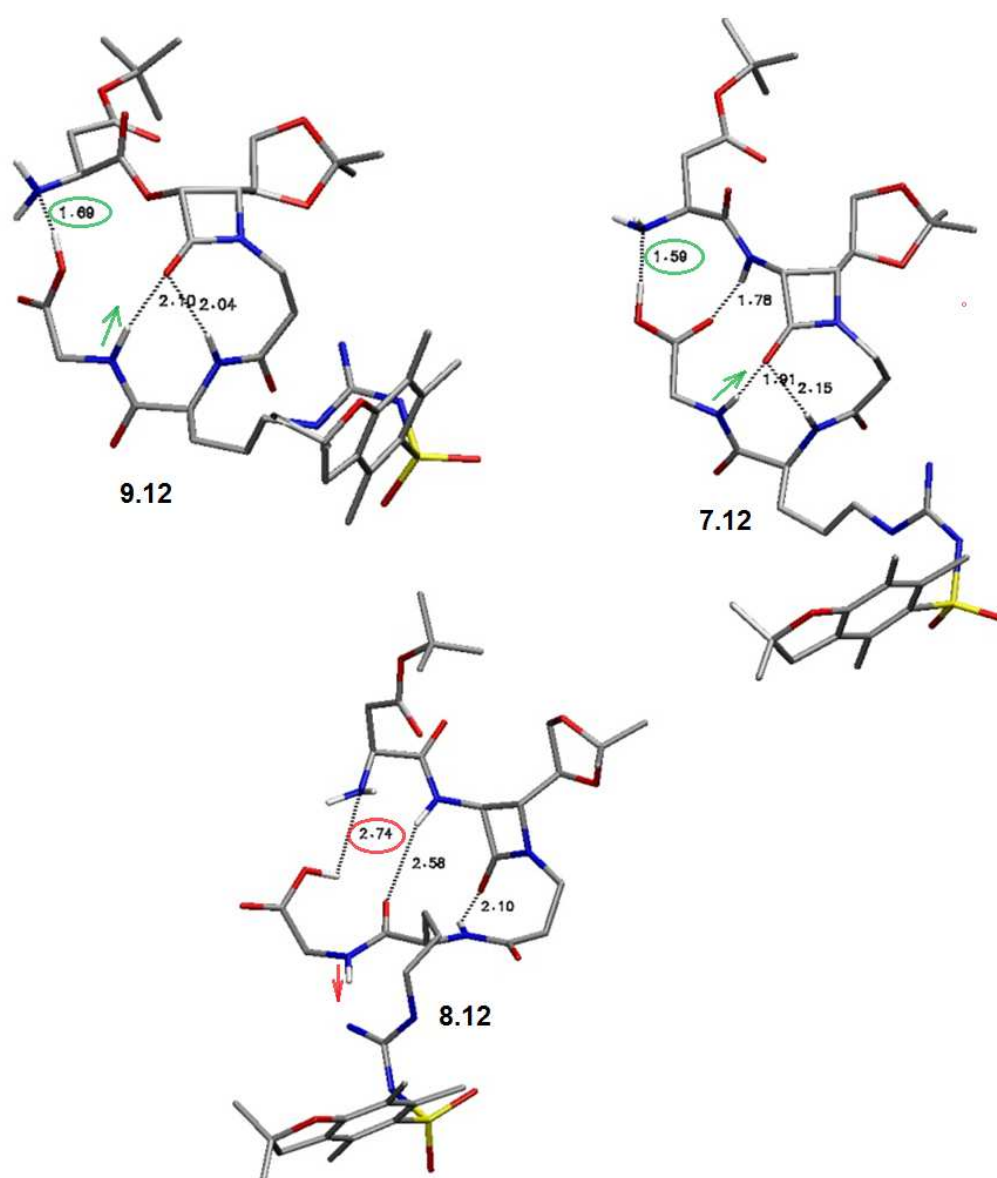
**Figura 104.** Precursores lineales **7.12**, **8.12** y **9.12** y sus estructuras cíclicas **7**, **8** y **9**.

Como se puede observar en la Figura 105 en el caso de los compuestos de configuración relativa *cis* en la  $\beta$ -lactama (**9.12** y **7.12**) se forma un enlace de hidrógeno clave entre el carbonilo de la  $\beta$ -lactama y el hidrógeno de la amina de la glicina (además del enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la  $\beta$ -lactama y el

<sup>147</sup> Becke, A. D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5642.

hidrógeno de la amina de la arginina); que aproxima los extremos de las cadenas a una distancia de 1.69 Å y 1.59 Å respectivamente.

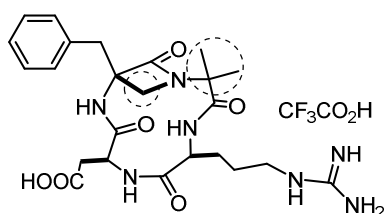
En cambio en el caso del compuesto **8.12** el carbonilo de la  $\beta$ -lactama solamente forma enlace de hidrógeno con la amina de la arginina, quedando unida la amida de la posición C3 de la  $\beta$ -lactama con el carbonilo de la arginina en vez de con el carbonilo de la glicina, así el NH de la glicina queda orientado hacia el exterior. Este hecho hace que los extremos de las cadenas queden a una distancia mayor, 2.74 Å, lo que no favorece al proceso de ciclación.



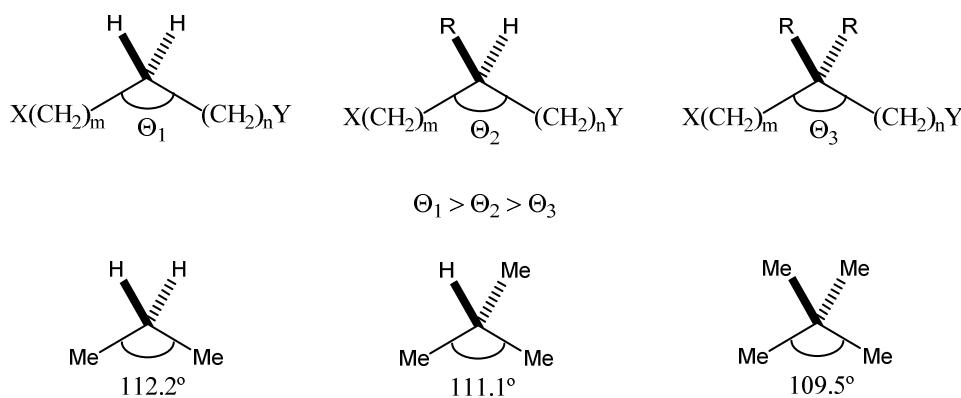
**Figura 105.** Análisis conformacional de los precursores abiertos **9.12**, **7.12** y **8.12**.

### 4.2.3.2. Tetrapéptidos y tetradepsipéptidos

Por otro lado hay que resaltar que ha sido imposible conseguir tetrapeptidomiméticos cíclicos sin el aminoácido glicina. En la bibliografía el único ciclo tetrapeptídico análogo a las estructuras objetivo es el compuesto **IV** sintetizado por el Doctor J. Oyarbide (*Figura 106*).<sup>97</sup> En su estructura hay dos grandes diferencias en comparación con las moléculas tetrapeptídicas objetivo en esta Tesis Doctoral: en primer lugar la  $\beta$ -lactama del compuesto **IV** no tiene sustituyentes en el carbono C4 evitando el impedimento estérico que podrían suponer; y en segundo lugar el aminoácido unido al nitrógeno de la  $\beta$ -lactama es ácido  $\alpha$ -amino isobutírico (Aib) en lugar de glicina, este aminoácido contiene dos metilos en el carbono C $\alpha$  que podrían provocar un efecto Thorpe-Ingold.<sup>148</sup>



**Figura 106.** Molécula **IV** sintetizada por el Doctor Joseba Oyarbide.

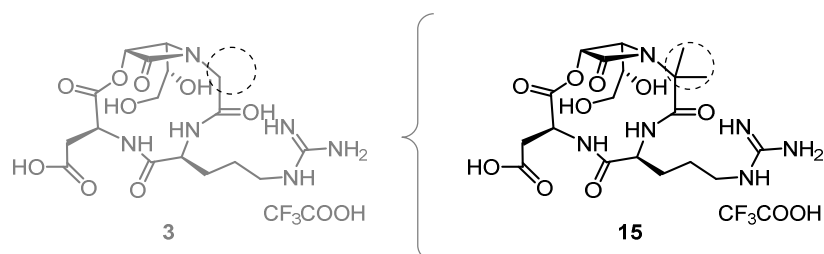


**Figura 107.** Efecto Thorpe-Ingold, reducción del ángulo.

<sup>148</sup> El efecto Thorpe-Ingold explica la correlación entre los ángulos de enlace en carbonos en estructuras de silla abierta con la formación y estabilidad de sus correspondientes productos cíclicos. La sustitución de sustituyentes por unos más voluminosos produce una compresión en el ángulo interno que facilita la ciclación. a) Beesley, R. M.; Ingold, C. K.; Thorpe, J. F.; *J. Chem. Soc., Trans* **1915**, *107*, 1080–1106. b) Levine, M. N., Raines, R. T.; *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2412–2420. Para una revisión actual del efecto: c) Jung, M. E.; Piizzi, G.; *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1735–1766.

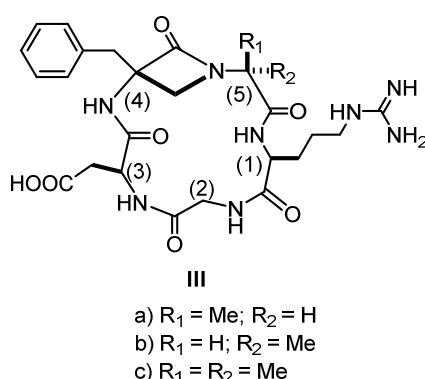


El efecto de Thorpe-Ingold predice el acercamiento de los extremos de la cadena, al introducir sustituyentes en el carbono contiguo al nitrógeno  $\beta$ -lactámico gracias al cambio de ángulo que se produce (*Figura 107*). Por esa razón nos propusimos como objetivo secundario la síntesis de la molécula **15** análoga a la molécula objetivo **3**, pero con los sustituyentes metilo (*Figura 108*).



**Figura 108.** Molécula objetivo **3** y molécula objetivo secundario **15**.

Cabe destacar que en el estudio que realizó el Doctor Oyarbide sobre la influencia que ejerce la doble metilación en dicha posición en el compuesto **III** en la actividad biológica concluyó atribuyendo una mayor actividad al compuesto disustituido **IIIc** (*Figura 109*).<sup>94</sup>



**Figura 109.** Ciclopeptidomiméticos con diferente sustitución en el residuo (5).

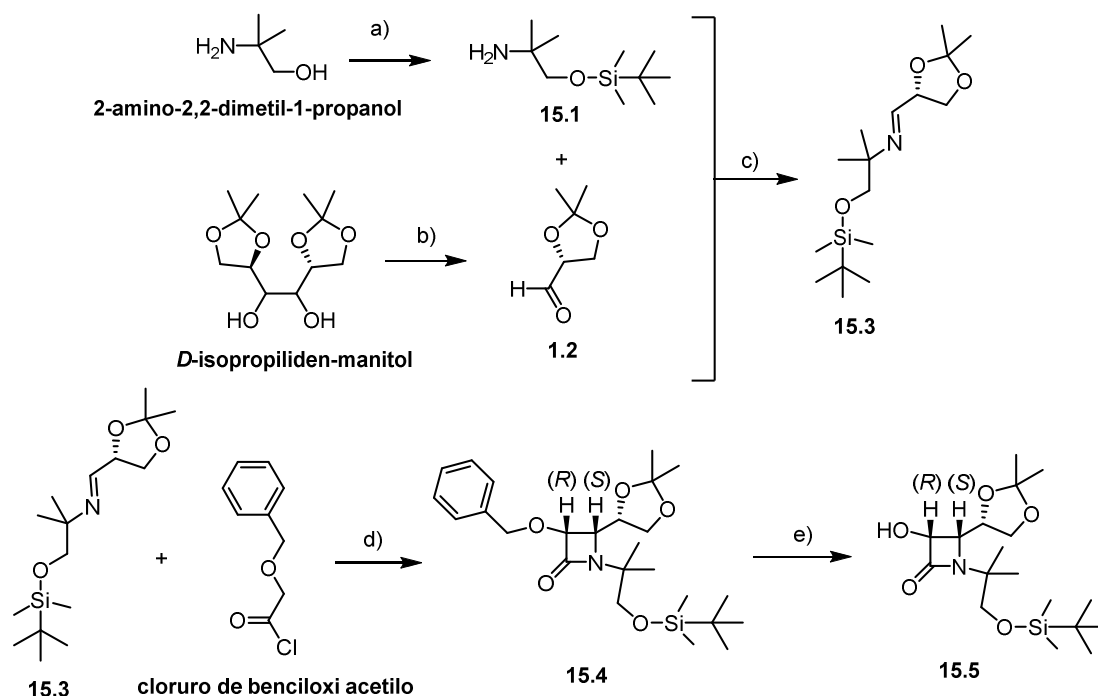
#### 4.2.3.2.1. Síntesis de tetrapéptidos con dos sustituyentes metilo **15**

La síntesis del tetradepsipéptido **15** se inició con la preparación de la  $\beta$ -lactama **15.5** con dos sustituyentes metilo en su estructura.

##### 4.2.3.2.1.1. Síntesis de la $\beta$ -lactama **15.5**

Para la síntesis de la  $\beta$ -lactama **15.5** se siguió el esquema sintético propuesto para la  $\beta$ -lactama **1.5** sustituyendo la etanolamina por el 2-amino-2,2-dimetil-1-propanol para la formación del compuesto imídico. Así la imina **15.3** se hizo reaccionar

con el cloruro de benciloxi acetilo en presencia de TEA dando como resultado el compuesto **15.4**.

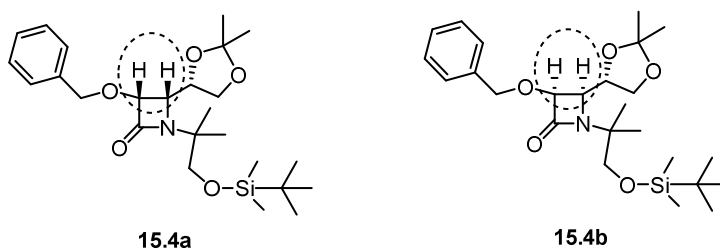


**Esquema 55.** Esquema sintético de la  $\beta$ -lactama **15.5**. a)  $\text{ClSiMe}_2^t\text{Bu}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t. a., 12 h. b)  $\text{NaIO}_4$  sobre gel de sílice,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h. c) tamiz molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h. d) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de  $-78^\circ\text{C}$  a t. a., 16 h. e)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd/C 10%, metanol, reflujo, 1h. (Rto. Global 53%, mezcla de diasterómeros)

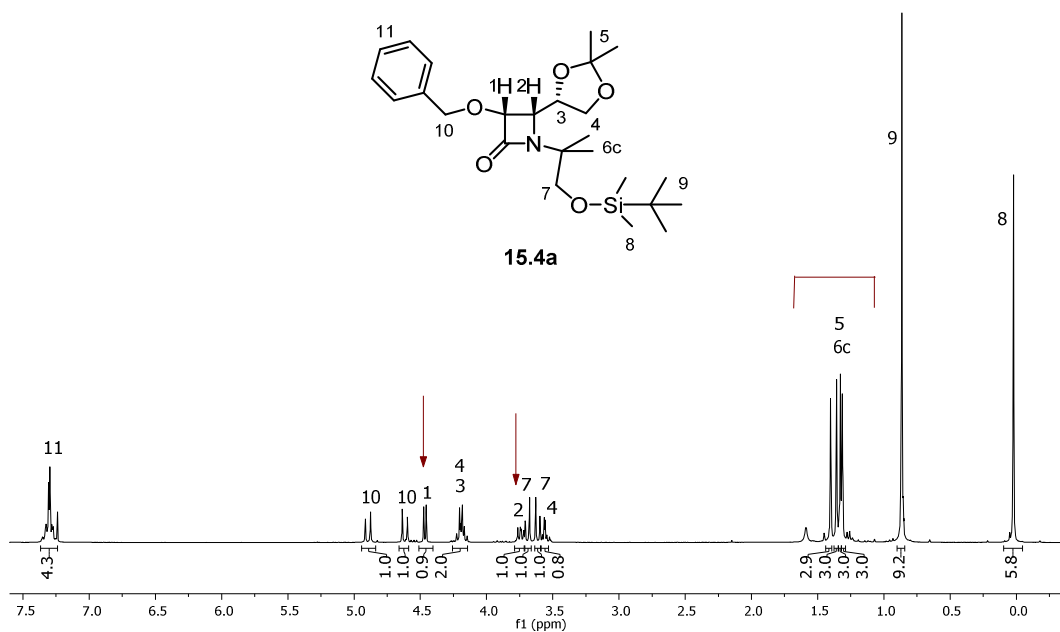
Al purificar el compuesto **15.4** mediante columna de gel de sílice básica se observaron dos productos cuyos  $R_f$  (*Ratio of Front*) son muy similares y por tanto muy complicados de separar.

Estos productos corresponden a los diasterómeros de las dos  $\beta$ -lactamas de configuración *cis* posibles mediante la reacción de Staudinger (3*R*,4*S*/3*S*,4*R* (3/1)).<sup>149</sup> Esta hipótesis se puede confirmar mediante los valores de la constante de acoplamiento entre los protones H1 y H2 de la  $\beta$ -lactama; que en el caso del producto mayoritario corresponde a 5.5 Hz y en el caso del producto minoritario a 5.6 Hz, ambos valores característicos de  $\beta$ -lactamas de la configuración relativa *cis*. Ambos compuestos muestran como se puede ver en las Figuras 101 y 102 las señales correspondientes a los protones H6c de los dos nuevos metilos, a demás de todas las señales características de las  $\beta$ -lactamas.

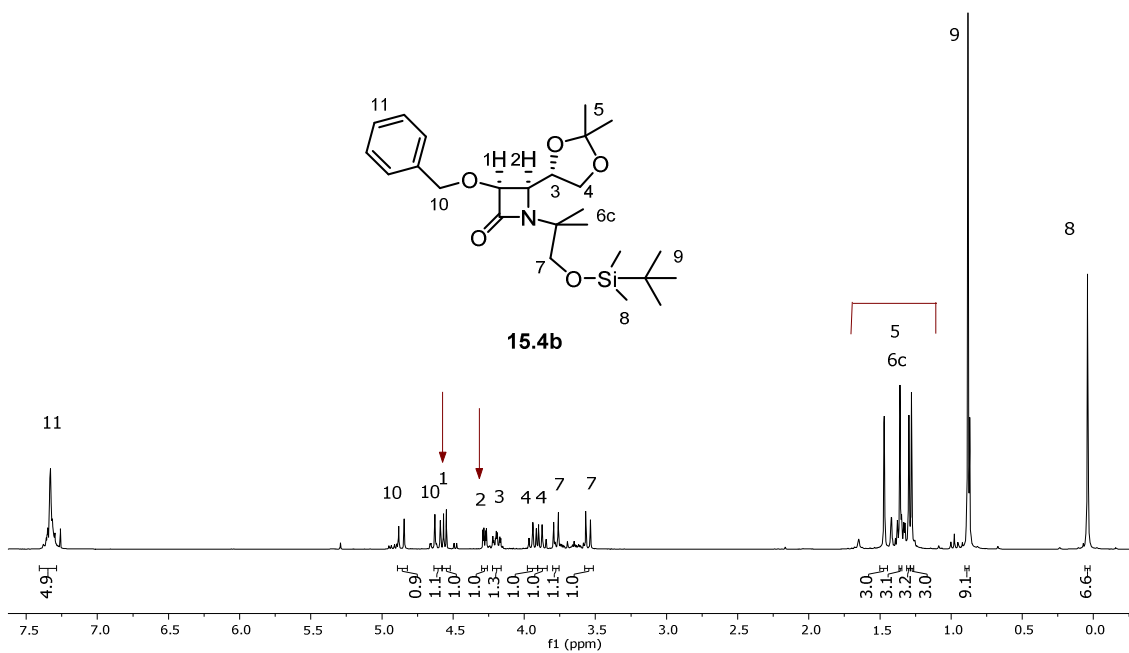
<sup>149</sup> Se ha supuesto que el diasterómero mayoritario es el 3*R*,4*S* ya que el inductor quiral teóricamente promueve la formación de este producto.



**Figura 110.** Diastereómeros *cis* posibles mediante la reacción de Staudinger.



**Figura 111.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **15.4a**, compuesto mayoritario.

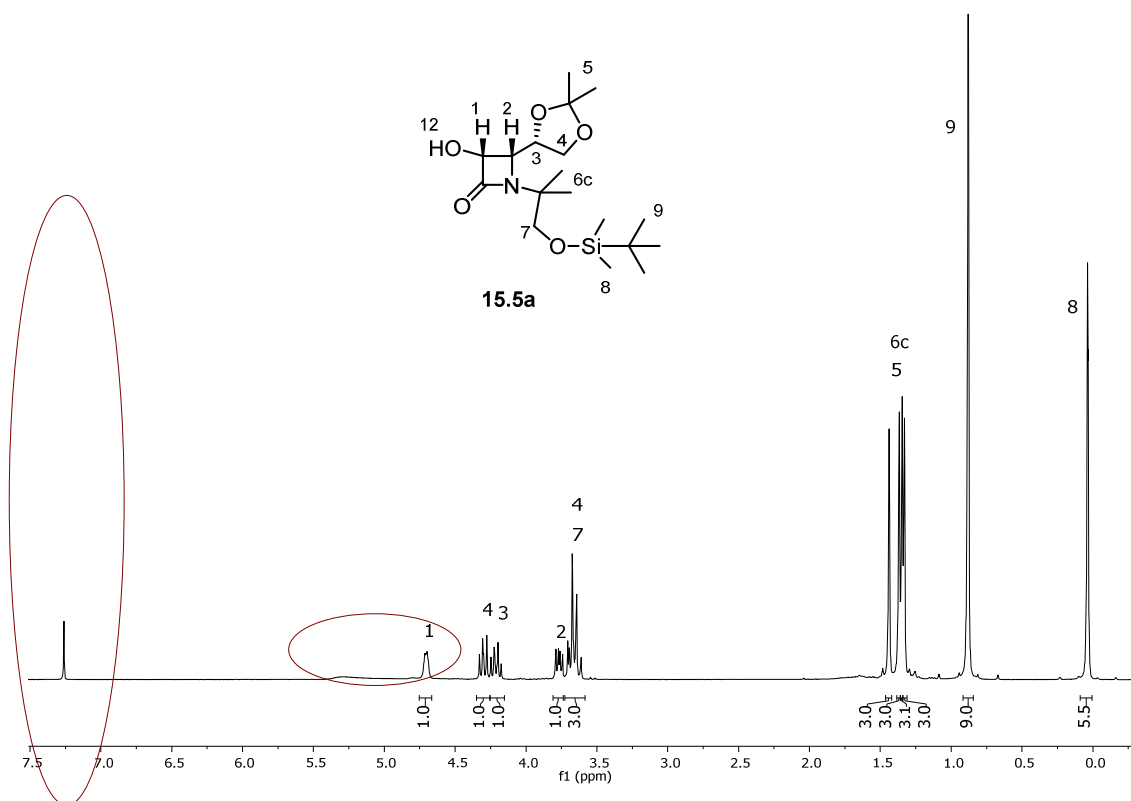


**Figura 112.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **15.4b**, compuesto minoritario.

Nuestra hipótesis sobre lo ocurrido es que el inductor de quiralidad que debería provocar una preferencia hacia la formación del isómero **15.4a** no es tan eficaz a causa del impedimento estérico que provocan los dos metilos.

Al no poderse aislar los diasterómeros de forma pura sin pérdida de rendimiento decidimos seguir adelante con la mezcla de ambos con intención de separarlos más adelante.

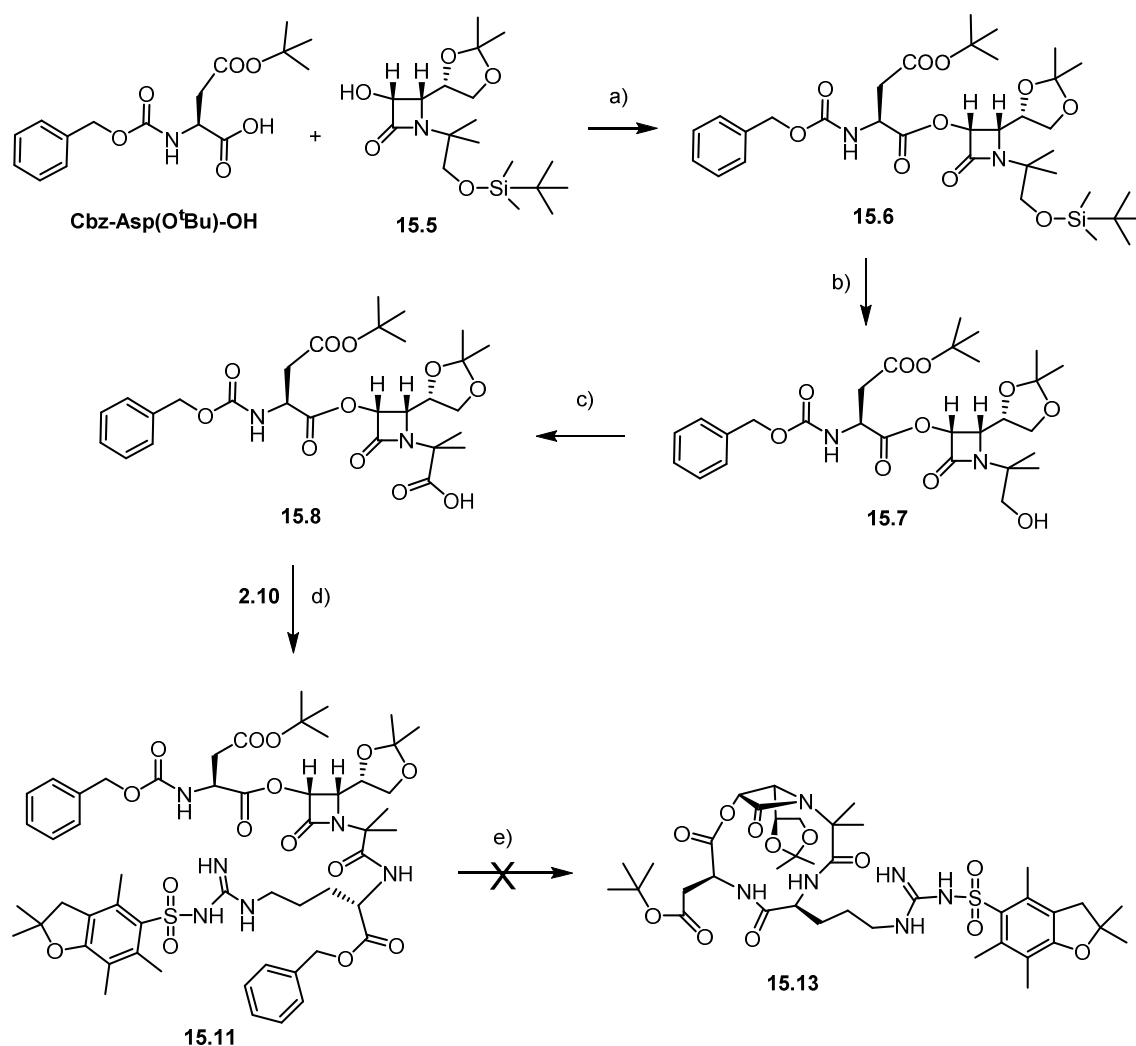
El siguiente paso a realizar fue la hidrogenolisis del grupo benciloxilo del compuesto **15.4** (mezcla de diasterómeros) catalizada por paladio, que dio como resultado el compuesto **15.5** en forma de sólido blanco. La mezcla de diasterómeros se cristalizó en hexano siendo posible la separación de ambos, ya que el diasterómero **15.5a** cristaliza a mayor velocidad que el **15.5b**. Como se puede observar en la *Figura 113* el diasterómero **15.5a** desprotegido se consigue de forma pura.



**Figura 113.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **15.5a** tras su cristalización.

#### 4.2.3.2.1.2. Síntesis del tetrapeptido 15.11 e intentos de ciclación

Una vez preparada la  $\beta$ -lactama **15.5** la síntesis del precursor lineal **15.11** se completó conforme a la secuencia del *Esquema 56*. Para ello se sintetizó el compuesto **15.6** cuya desprotección del grupo sililo y posterior oxidación condujo al ácido carboxílico **15.8**. El acoplamiento de la arginina debidamente protegida **2.10** al compuesto **15.8** dio como resultado el precursor lineal **15.11** con buenos rendimientos.



**Esquema 56.** Síntesis total del compuesto **15.13**. a) 1)  $(\text{CFN})_3$ , piridina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h. 2) TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t. a., 30 min. (Rto. del 86%) b) Fluoruro de piridinio, THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO,  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1), t. a., 4 h (73%). d) EDC·HCl, HOBT, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  t. a., 16 h (70%). e) 1)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{EtOAc}/\text{THF}$  (1/1), t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$ , DMF,  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h.

En las Figuras 114 y 115 se pueden observar las señales correspondientes a los dos enlaces peptídicos que posee la molécula H26 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.90 \text{ ppm}$  y  $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 6.97 \text{ ppm}$ ) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25 y H8). También se pueden observar tanto la señal a campo bajo del protón H1 del C3 de la  $\beta$ -lactama por efecto del enlace éster ( $\delta_{\text{H1}} = 5.77 \text{ ppm}$ ), como las señales a 1.61–1.59 ppm de los metilos introducidos (H6).

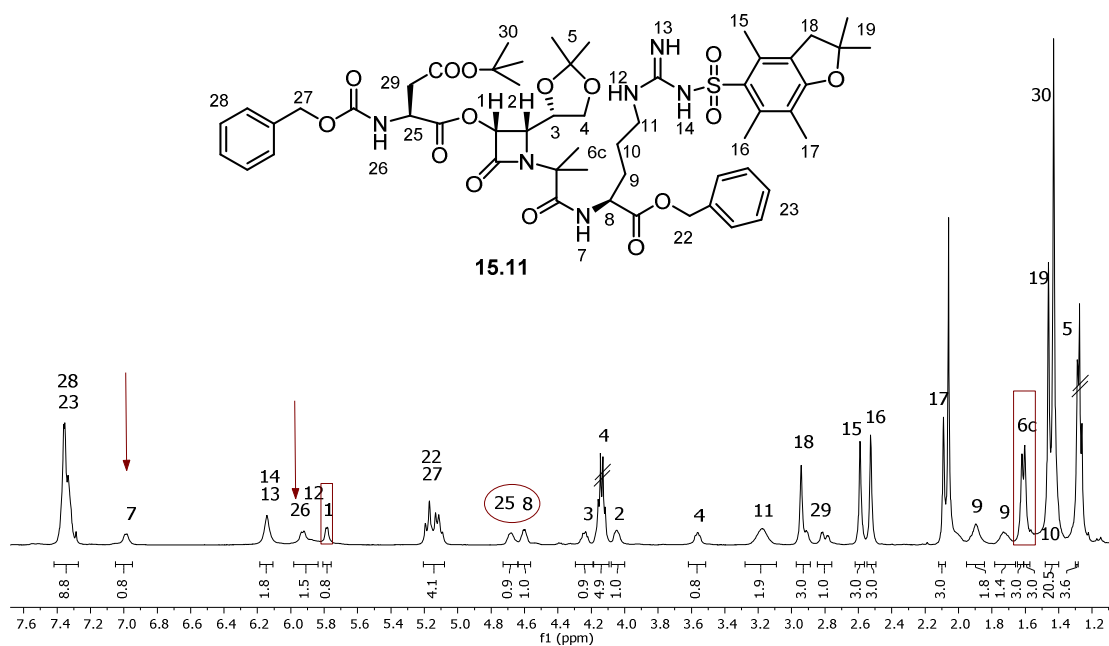


Figura 114. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 15.11.

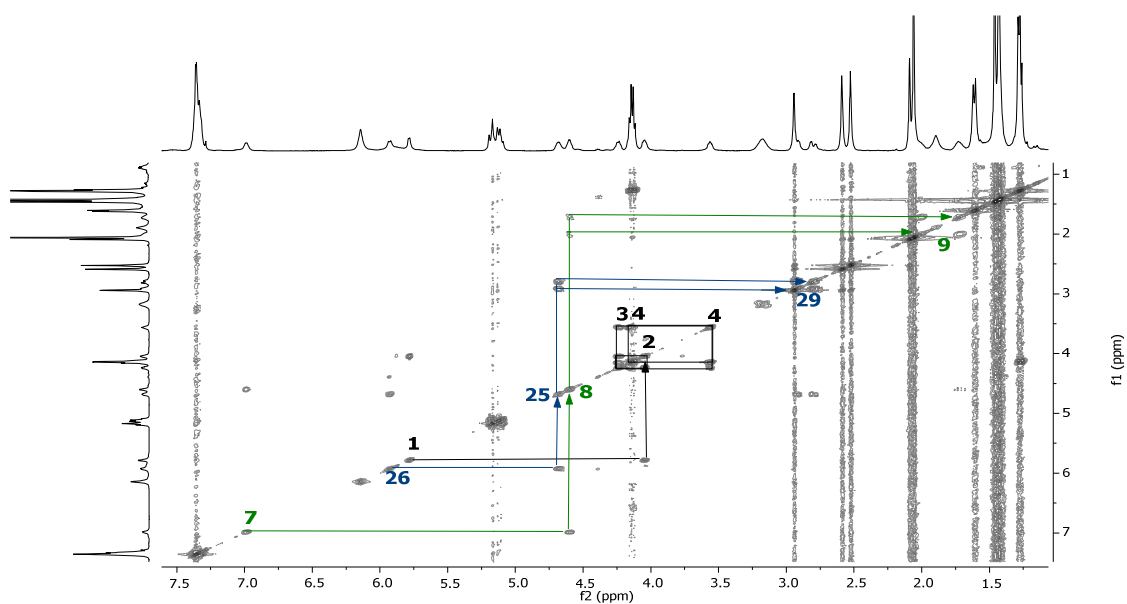


Figura 115. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 15.11.

### 4.2.3.3. Objetivos secundarios surgidos durante la realización del proyecto

#### 4.2.3.3.1. Depsipéptido 16

Hasta este momento el único enlace éster presente en el depsipéptido es el que se forma sobre el C3 de la  $\beta$ -lactama con el carboxilo del ácido aspártico (molécula **1**). Para completar la Tesis Doctoral nos planteamos también realizar la síntesis del compuesto **16** con el enlace éster entre el ácido aspártico y la glicina.

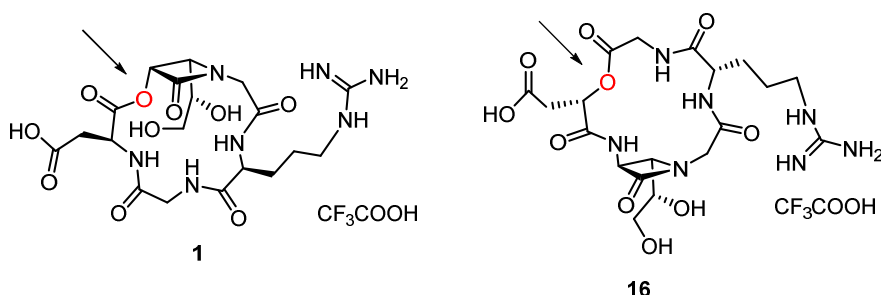


Figura 116. Molécula objetivo **1** y molécula objetivo secundario **16**.

Para ello partimos de la  $\beta$ -lactama *trans* **4.5** basándonos en la hipótesis de que la ciclación de los compuestos con  $\beta$ -lactamas con sustituyentes en posición *trans* es más sencilla a causa de un menor impedimento estérico.

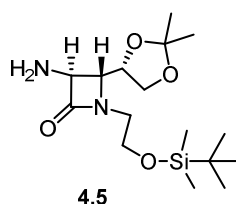
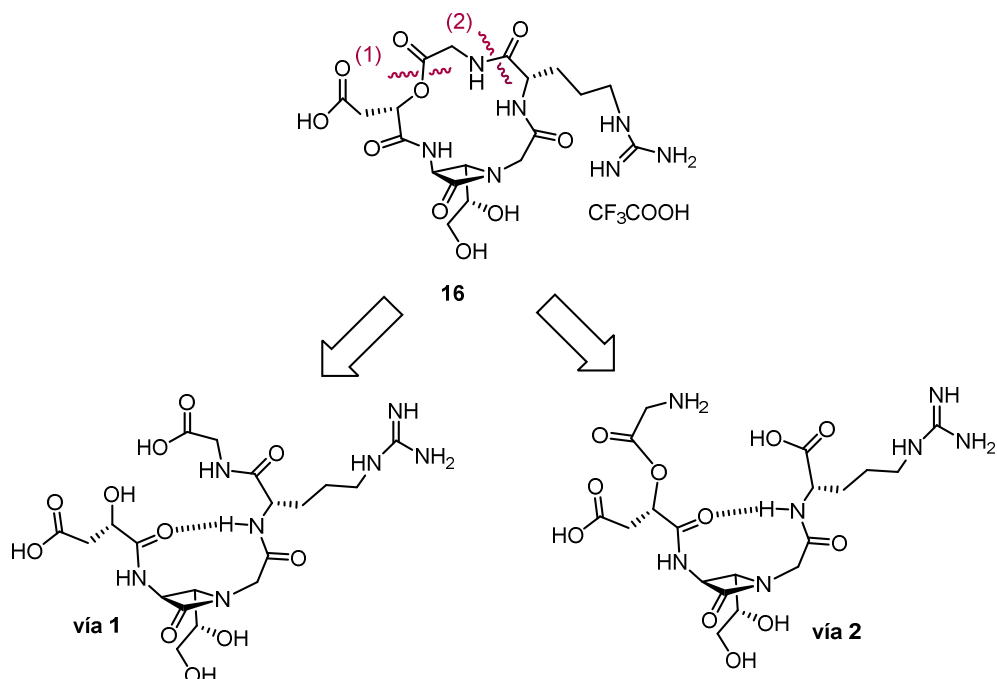


Figura 117.  $\beta$ -lactama **4.5**.

#### 4.2.3.3.1.1. Retrosíntesis

El compuesto **16**, con el enlace éster entre los aminoácido aspártico y glicina, requiere una retrosíntesis diferente a la de los casos anteriormente descritos (*Esquema 57*), ya que mediante la *via 1* seleccionada en los casos anteriores, el enlace que se forma en el cierre del macrociclo es un enlace éster, más inestable y por lo tanto más difícil de generar. Así, para llevar a cabo la síntesis del compuesto **16** se seleccionó la *via 2*, empleando como estructuras de partida la glicina, el hidroxiaácido

del ácido aspártico sintetizado en una etapa previa, la  $\beta$ -lactama **4.5** y la arginina (*Esquema 58*).

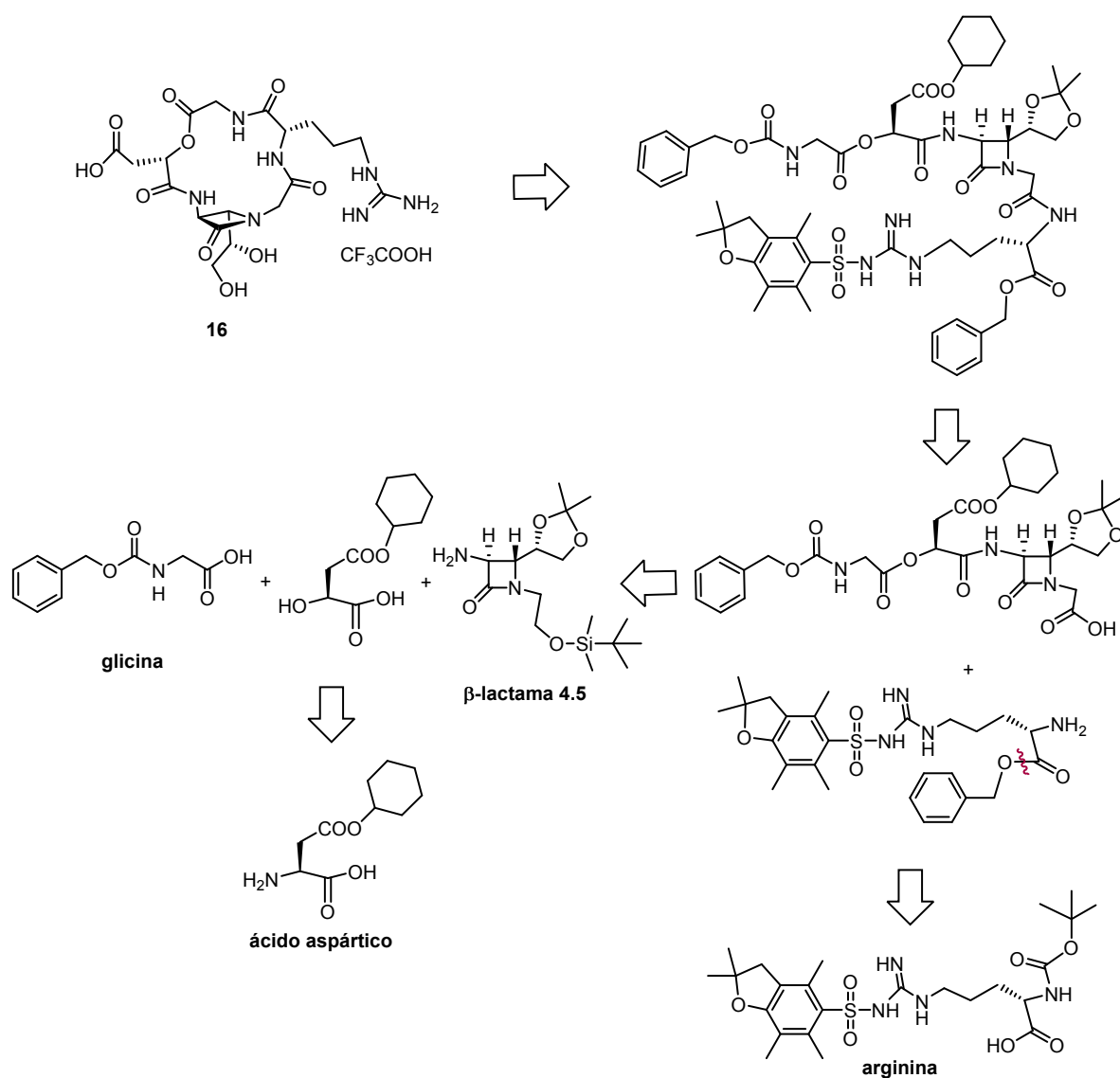


**Esquema 57.** Esquema retrosintético de la etapa de macrociclación del compuesto **16**.

La estrategia de grupo protectores empleada fue la misma que en los casos anteriores exceptuando el carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico se protegerá mediante el éster de ciclohexano en vez el éster *tert*-butílico.<sup>150</sup>

<sup>150</sup> En la reacción de diazotación para la obtención del hidroxiaácido del ácido aspártico, el compuesto está expuesto a un pH ácido (pH = 2) que suele dar lugar a la desprotección parcial del grupo *tert*-butilo; por ello decidimos sustituir el grupo protector por uno más estable en presencia de pH ácidos, el éster de ciclohexano. En lo que a la desprotección de este grupo se refiere, necesitaríamos emplear un ácido más fuerte que el TFA en la etapa final, como podrían ser el HF o el TfOH. Para más información véase la referencia 100 pág. 74.

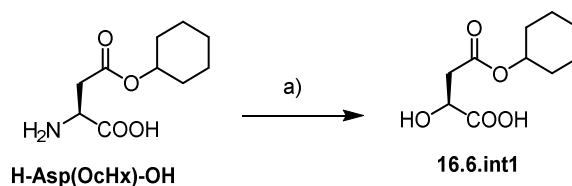




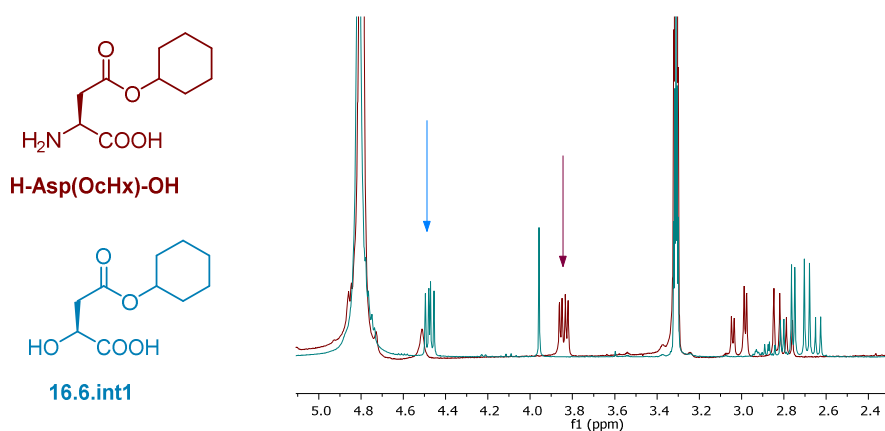
**Esquema 58.** Retrosíntesis general del compuesto **16**.

#### 4.2.3.3.1.2. Síntesis del pentadepsipéptido **16.11** e intentos de ciclación

El primer paso fue sintetizar el hidroxiaácido del ácido aspártico **16.6.int1** mediante una reacción de diazotación<sup>145</sup> (*Esquema 59*). La formación del hidroxiaácido se confirmó mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN, como se observa en la *Figura 118* el protón perteneciente al carbono C $\alpha$  del hidroxiaácido se desplaza hacia un campo más bajo por causa de un mayor desapantallamiento del hidroxilo formado ( $\delta_{\text{H}\alpha(\text{H-Asp}(\text{OCH}_x)\text{-OH})} = 4.65 \text{ ppm} > \delta_{\text{H}\alpha(\text{16.6.int1})} = 3.85 \text{ ppm}$ ).



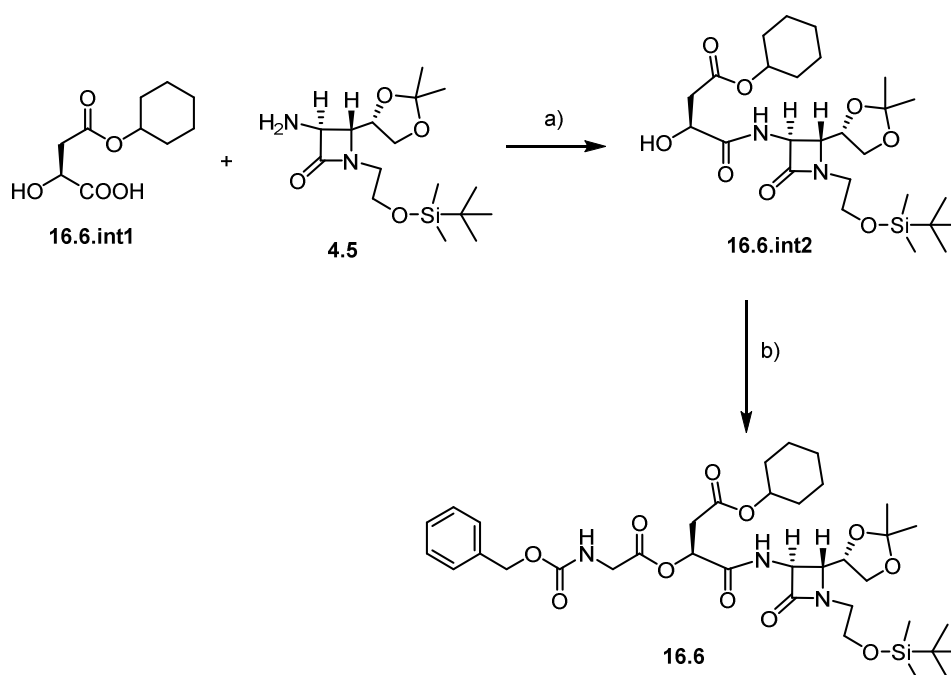
**Esquema 59.** Síntesis del hidroxiaácido del ácido aspártico **16.6.int1**. a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2/8),  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t. a.}$  16 h (95%).



**Figura 118.**  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del H-Asp(OcHx)-OH comercial y el producto **16.6.int1**.

Una vez que todas las estructuras de partida fueron preparadas nos planteamos el acoplamiento del hidroxiaácido **16.6.int1** a la  $\beta$ -lactama **4.5** empleando los agentes de acoplamiento EDC·HCl y HOBT en presencia de TEA. La formación del enlace peptídico se comprobó mediante  $^1\text{H}$ -RMN y se llevó a cabo el acoplamiento de la glicina empleando los agentes de acoplamiento antes utilizados.<sup>151</sup>

<sup>151</sup> En esta ocasión para la formación del enlace éster no fue necesaria la generación del fluoruro de ácido como para el caso del compuesto **1.6** (pág. 79).



**Esquema 60.** Esquema sintético del compuesto **16.6**. a) EDC·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (55%). b) Cbz-Gly-OH, EDC·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (77%).

En las *Figuras 119* y *120* se puede observar por un lado el protón amídico del nuevo enlace formado, H13 ( $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 5.37$  ppm) y su señal de acoplamiento con los protones del C $\alpha$  de la glicina; y por otro lado el protón  $\alpha$  del aspártico (H11) en un campo más bajo que en el resto de los casos debido al desapantallamiento del enlace éster ( $\delta_{\text{H11(16.6)}} = 5.55$  ppm >  $\delta_{\text{H11(1.6)}} = 4.65$  ppm). Además también se pueden observar las señales correspondientes de los protones del nuevo grupo protector H17 y H18 ( $\delta_{\text{H17}} = 4.81\text{--}4.66$  ppm y  $\delta_{\text{H18}} = 1.92\text{--}1.12$  ppm).

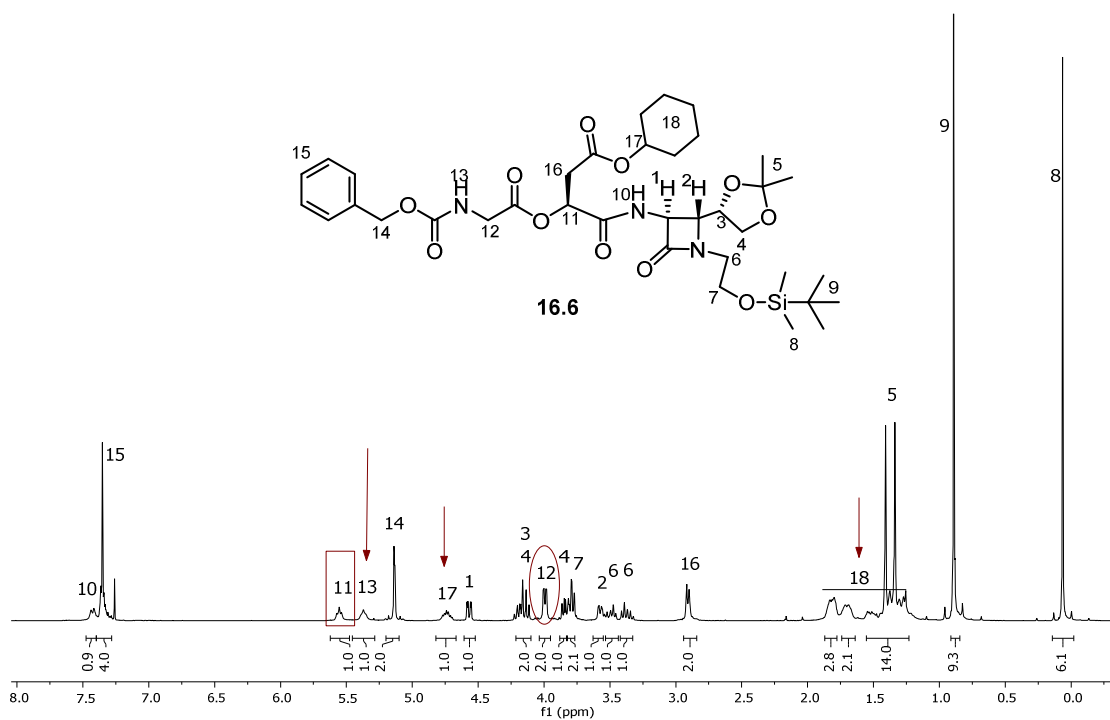


Figura 119. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 16.6.

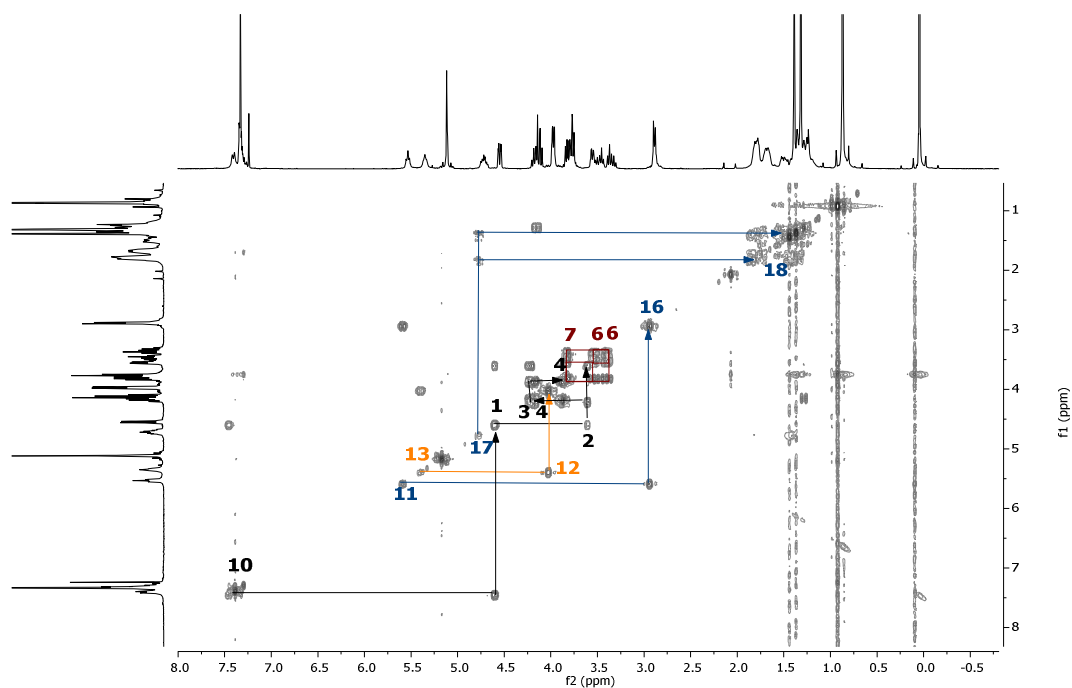
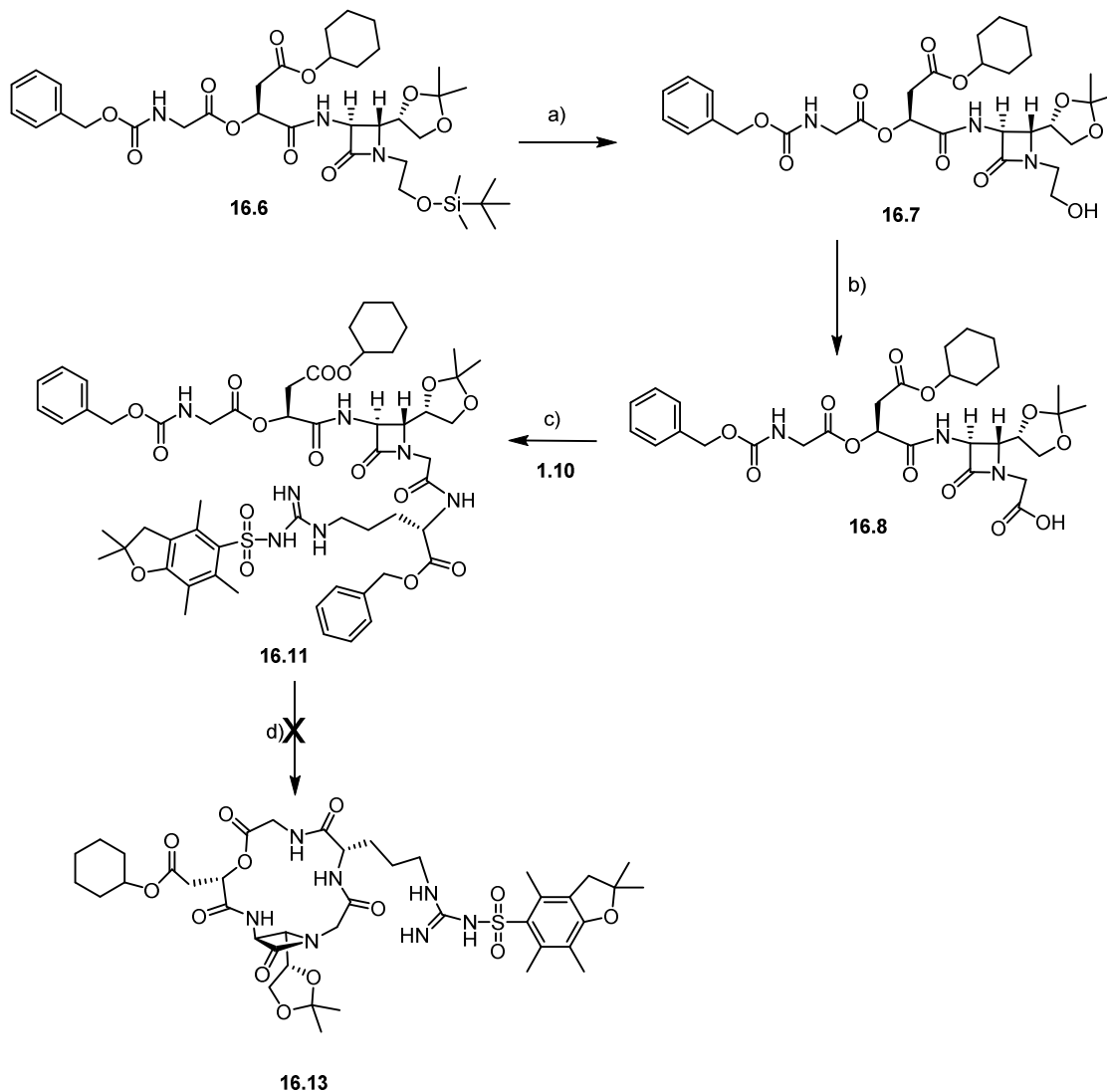


Figura 120. COSY (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 16.6.

El resto de la síntesis se llevó a cabo siguiendo el esquema sintético optimizado durante el proyecto (*Esquema 61*).



**Esquema 61.** Síntesis completa del ciclo **16.13**. a) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%).  
 b) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (74%). c) EDC·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (70%).  
 d) 1) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h. 2) HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h.

En las *Figuras 121–123* se pueden observar las señales correspondientes a los tres enlaces amida, H20, H24 y H7 ( $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 5.81\text{--}5.66$  ppm,  $\delta_{\text{NH-}\beta\text{-lact}} = 7.92$  ppm y  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 7.67$  ppm) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los Ca de los aminoácidos contiguos (H21, H1 y H8). A demás de la señal a campo bajo del protón del Ca del aspártico característica de estar unido a un enlace éster. Este conjunto de señales confirman la obtención del producto **16.11**.

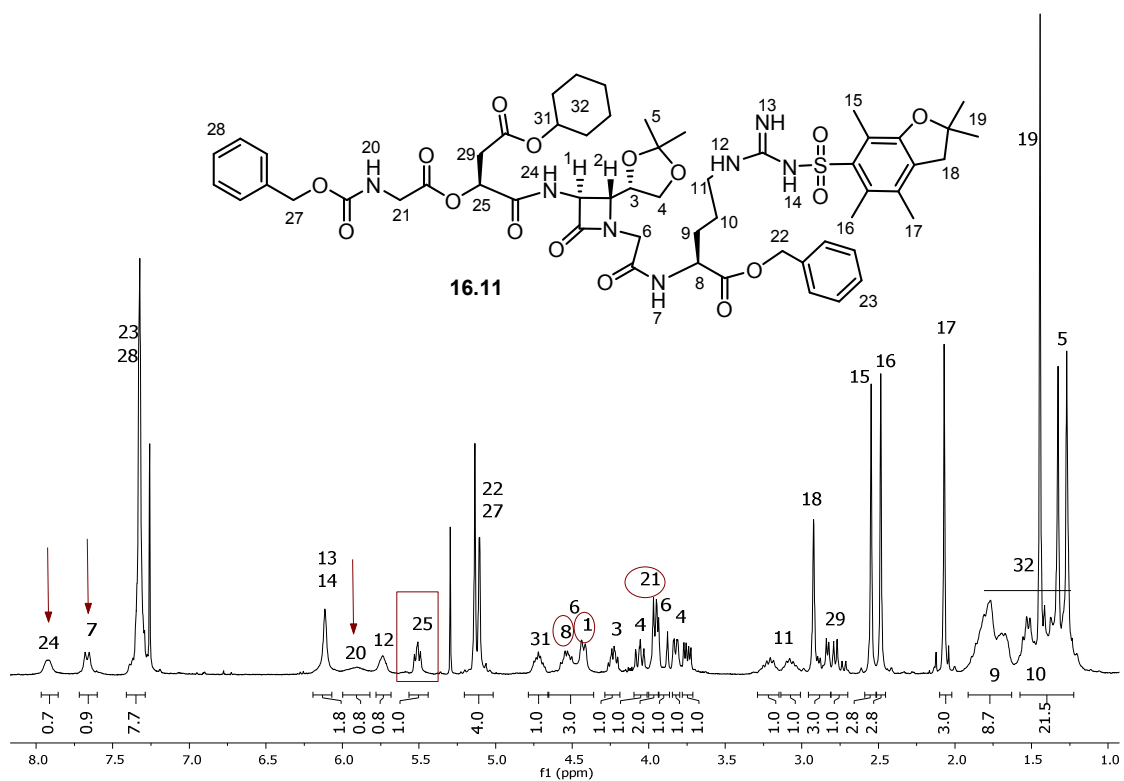


Figura 121. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 16.11.

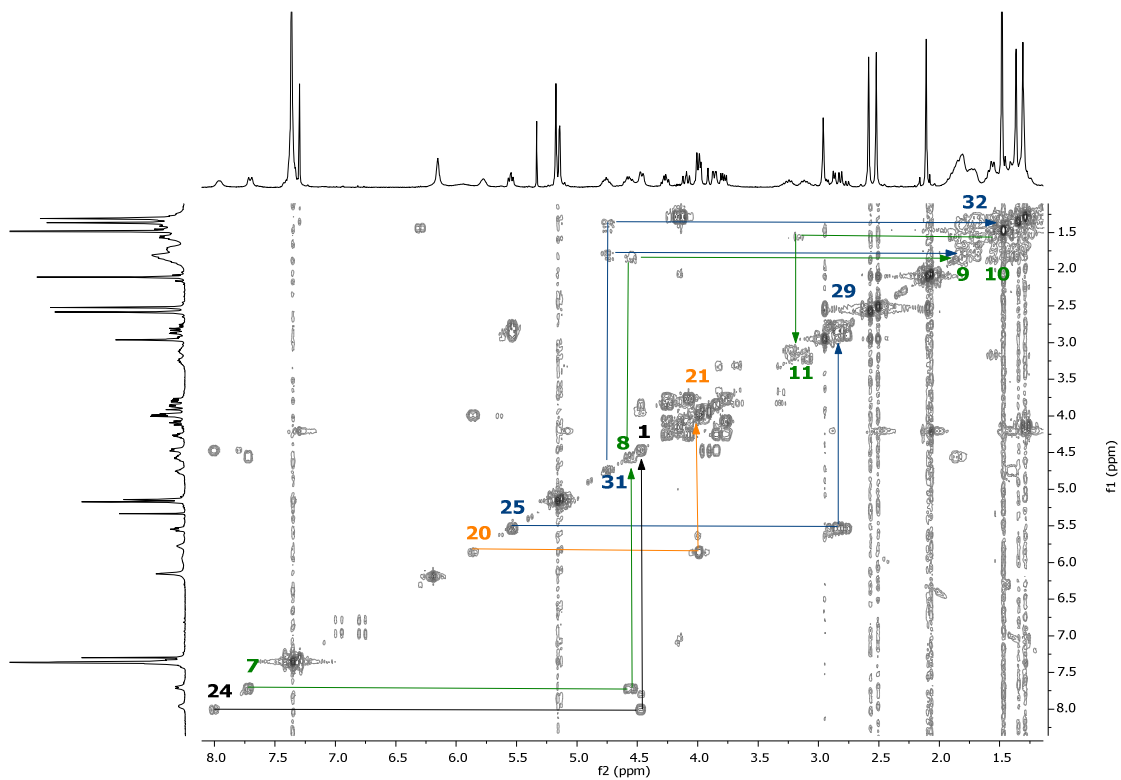
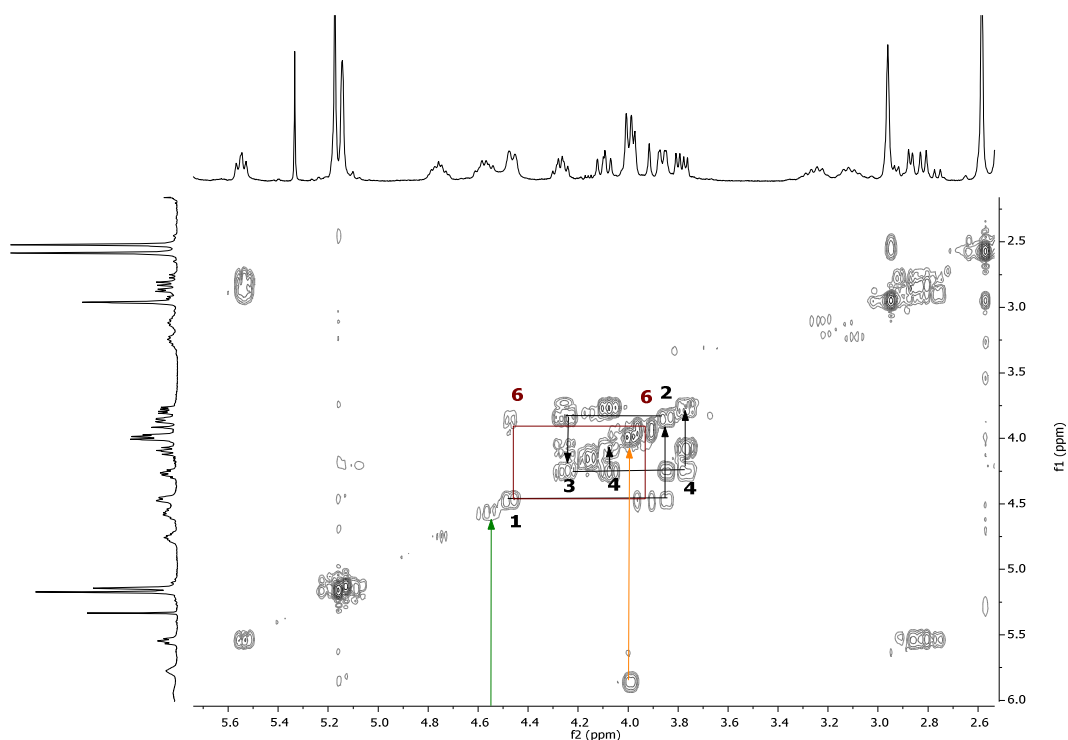


Figura 122. COSY del compuesto 16.11.



**Figura 123.** COSY del compuesto **16.11** aumentado.

El análisis mediante UPLC-MS de nuevo mostró la masa esperada para el precursor **16.11** (masa exacta calculada = 1131.4835; masa exacta calculada (+ H<sup>+</sup>) = 1132.4913; masa (+ H<sup>+</sup>) encontrada = 1132.26 m/z).

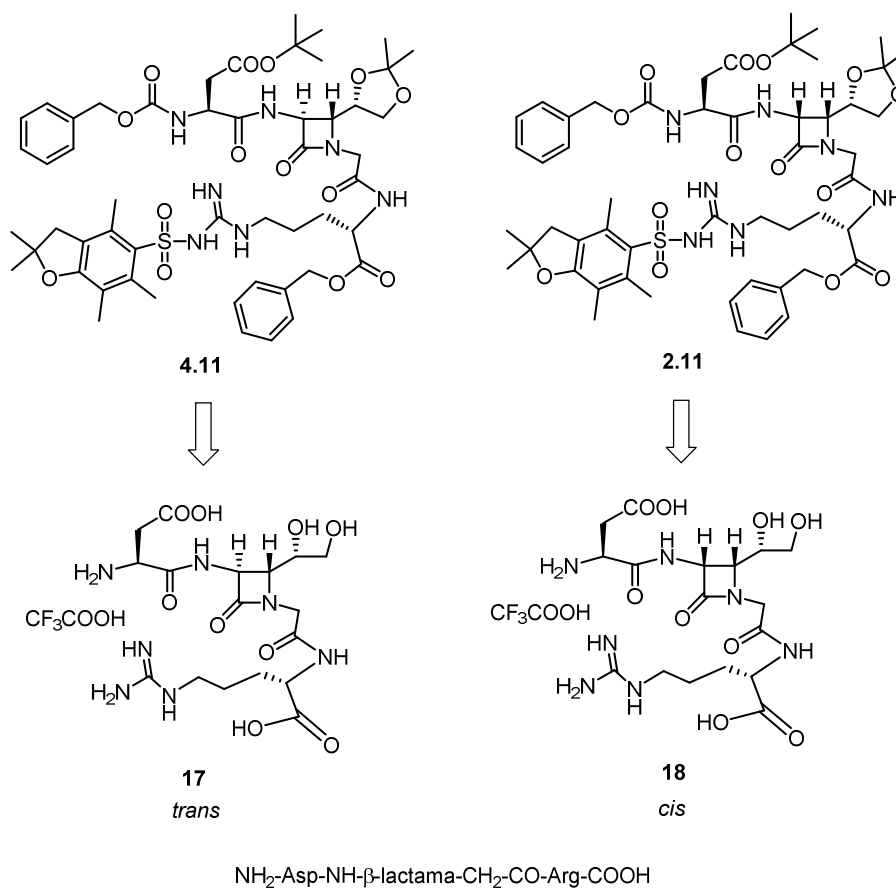
Aunque el precursor lineal **16.11** se consiguió sin problemas, y aún tratándose de un pentaciclo, de nuevo fue imposible generar el producto de ciclación **16.13**.

#### 4.2.3.3.2. Control negativo

Para terminar, también nos pareció interesante sintetizar un par de compuestos con estructuras similares a los objetivos establecidos hasta la fecha pero que no tuvieran la secuencia de reconocimiento RGD en su estructura; de esta manera se podrían emplear como control negativo en las pruebas biológicas.<sup>152,153</sup>

<sup>152</sup> En la bibliografía se encuentran algunos ejemplos del empleo de secuencias modificadas de RGD como control negativo en análisis biológicos. Secuencia **RGE** (arginina-glicina-ácido glutámico): a) Sabra, G.; Vermette, P.; *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 1994–2006. b) Drevelle, O.; Bergeron, E.; Senta, H.; Lauzon, M. A.; Roux, S.; Grenier, G.; Faucheux, N.; *Biomaterials* **2010**, *31*, 6468–6476. La sustitución de la glicina por la  $\beta$ -alanina: c) véase referencia 37a pág. 30. La sustitución de la glicina por la *D*-Alanina o del *L*-aspártico por el *D*-aspártico: d) Pierschbacher, M. D.; Ruoslati, E.; *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17294–17298.

Teniendo en cuenta las moléculas sintetizadas hasta la fecha en el laboratorio, pensamos en sintetizar las moléculas  $\text{NH}_2\text{-Asp-NH-}\beta\text{-lactama-CH}_2\text{-CO-Arg-COOH}$  **17** (*trans*) y **18** (*cis*) ya que disponíamos de sus precursores **2.11** y **4.11**.



**Figura 124.** Nuevas moléculas objetivo **17** y **18**.

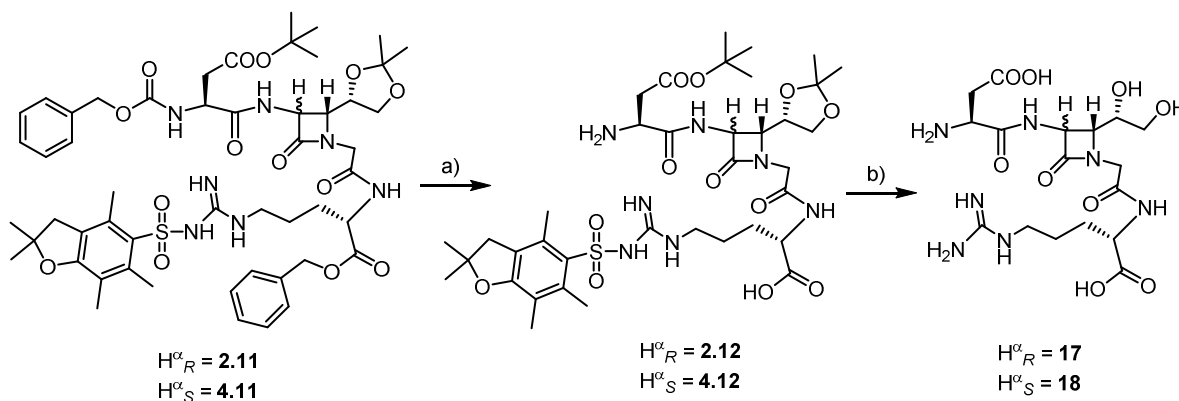
Al eliminar la secuencia RGD sustrayendo la glicina y dejando la cadena abierta en esa posición, suponíamos que los compuestos **17** y **18** iban a carecer de actividad biológica al no poder ser reconocidos por los receptores de integrina.

<sup>153</sup> El uso del control negativo nos parece de vital importancia ya que al estar manejando células vivas podrían producirse errores ambientales que contaminasen las muestras.



#### 4.2.3.3.2.1. Síntesis de las moléculas utilizadas como control negativo

Para la síntesis de las moléculas **17** y **18** partimos de los precursores lineales **2.11** y **4.11** a los que se les realizó una desprotección exhaustiva en dos etapas. En primer lugar se desprotegeron los grupo Cbz y benciloxilo de los extremos mediante una hidrogenolisis catalizada por paladio en atmosfera de hidrógeno; y en segundo lugar se desprotegeron el resto de los grupos protectores en medio ácido empleando anhídrido de TFA y Et<sub>3</sub>SiH.



**Esquema 62.** Síntesis de los compuestos de control negativo **17** y **18**. a) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. b) Et<sub>3</sub>SiH, Anhídrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h. (Rto. global del 75%)

Ambos productos se consiguieron en forma de sólido blanco puro tras precipitación con diisopropil éter.

Sus estructuras se confirmaron mediante espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN (*Figuras 125–128*) y UPLC-MS (*Tabla 15*).

**Tabla 15.** UPLC-MS de los compuestos **17** y **18**.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ H <sup>+</sup> )	Masa encontrada (m/z) (+ H <sup>+</sup> )
<b>17</b>	475.2027	476.2105	476.2107
<b>18</b>	475.2027	476.2105	426.2100

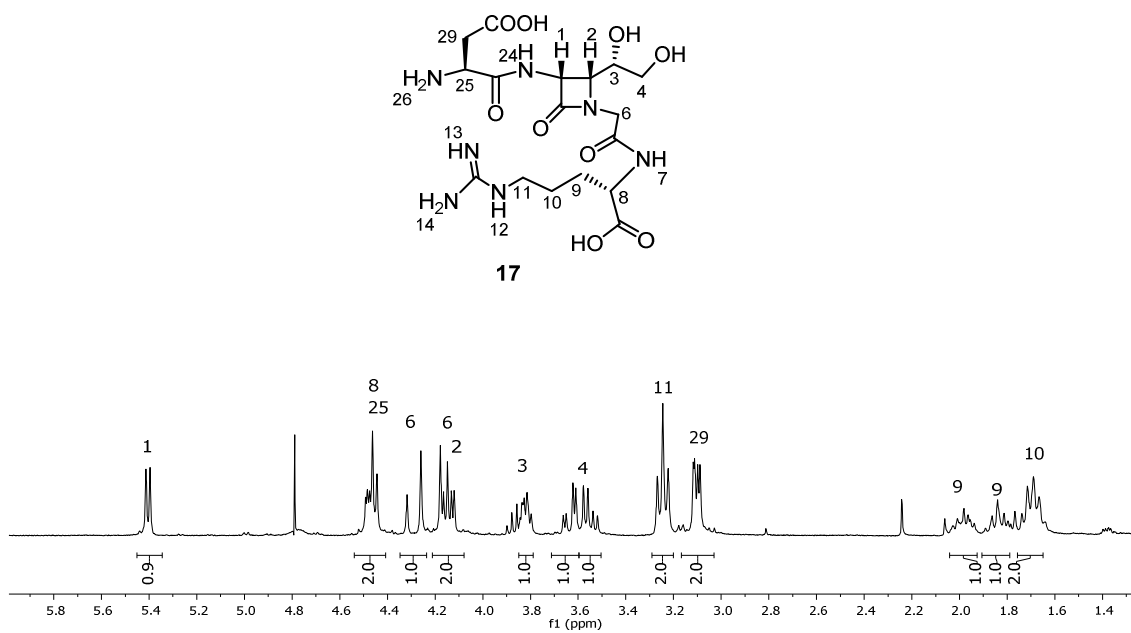


Figura 125. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto 17.

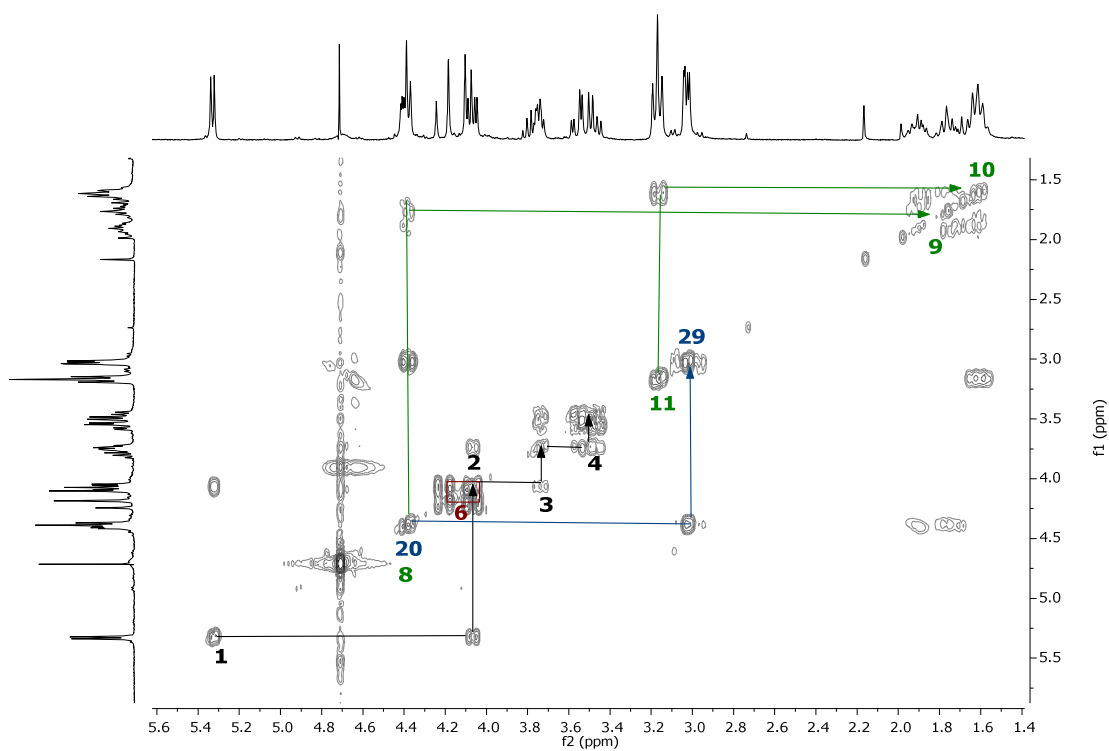


Figura 126. COSY del compuesto 17.

## Resultados y discusión

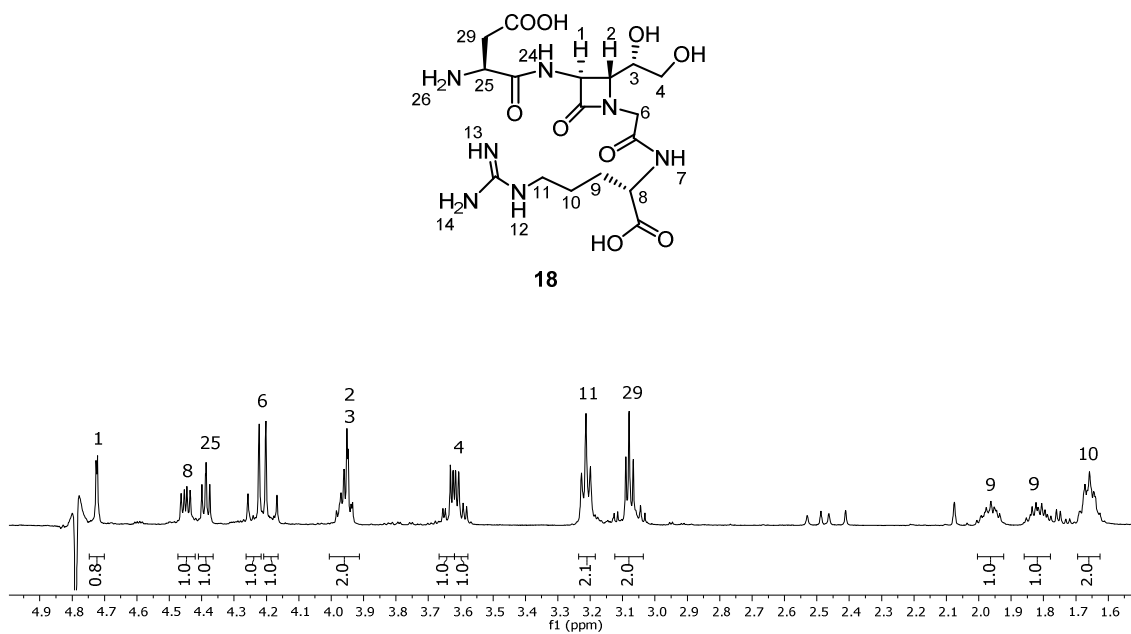


Figura 127. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto 18.

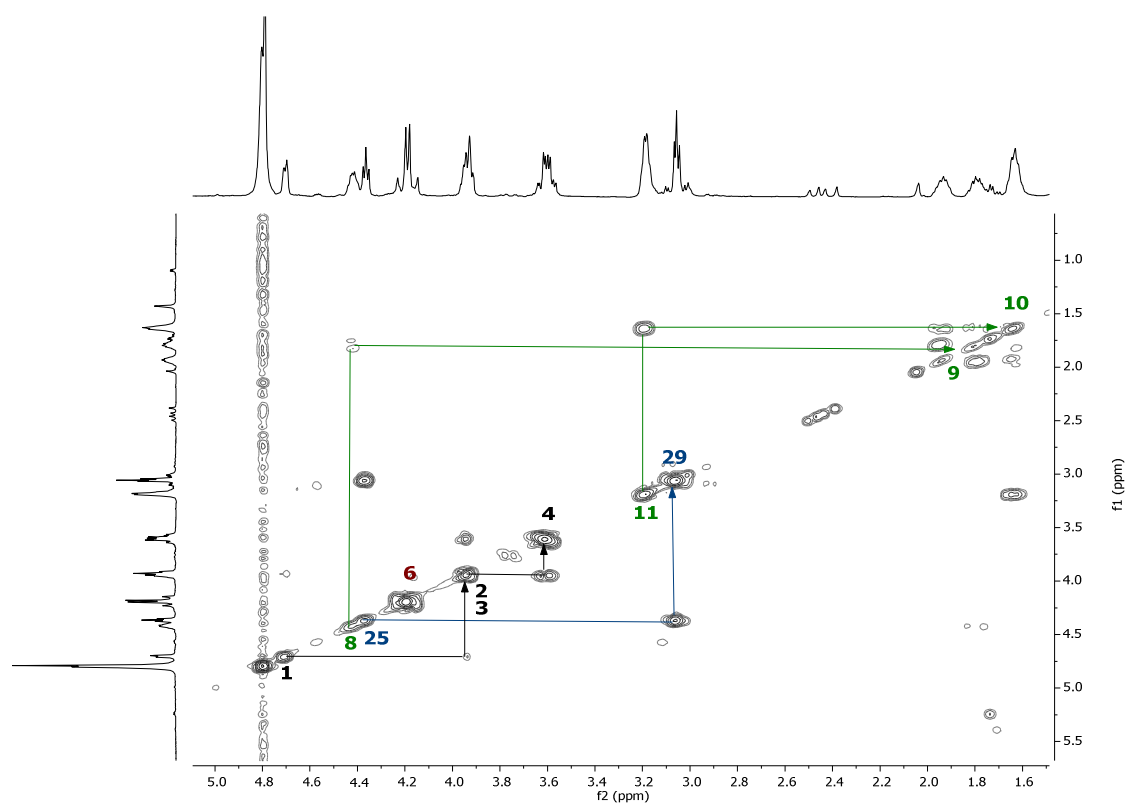


Figura 128. COSY del compuesto 18.

## 4.2.4. Evaluación de la actividad biológica

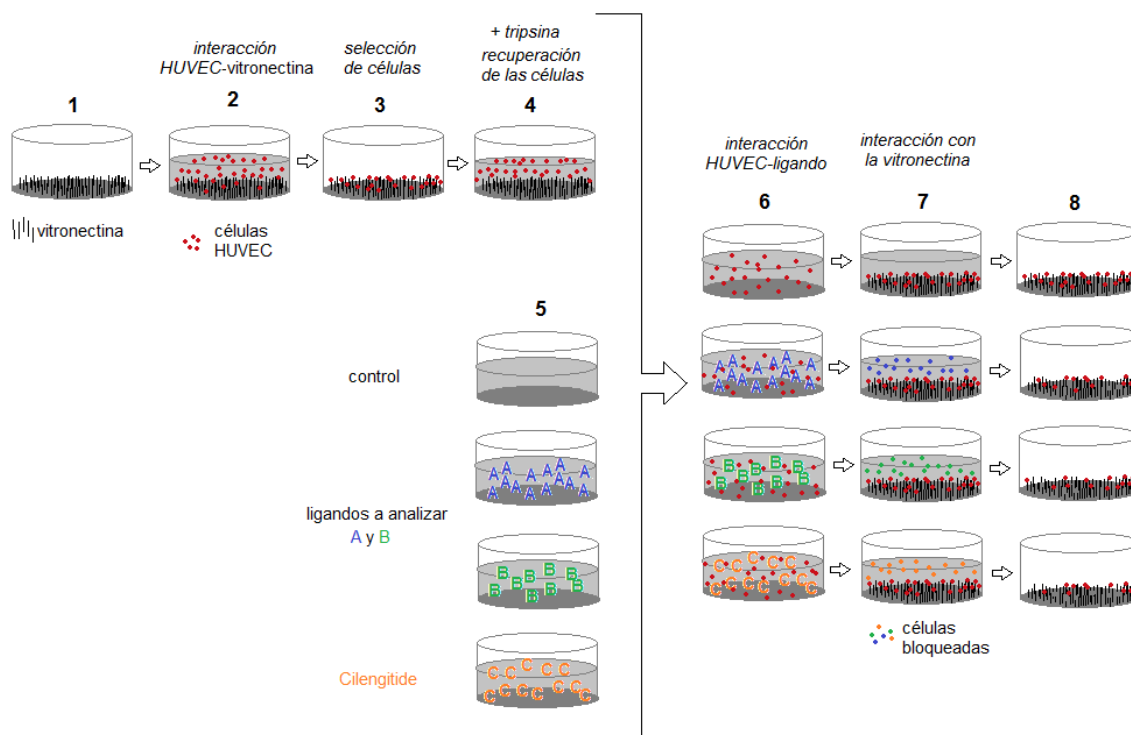
### 4.2.4.1. Evaluación del nivel de adhesión, determinación de la afinidad

Una de las formas más comunes de evaluar la actividad inhibitoria de un ligando sintético es determinar el nivel de adhesión<sup>154</sup> que tiene el ligando con el receptor a estudiar y la capacidad del ligando sintético de desplazar al ligando natural ocupando su lugar.

Para conseguir esta información (en valores de  $IC_{50}$ )<sup>52</sup> se cultivan células HUVEC humanas que sobreexpresan el receptor  $\alpha_v\beta_3$  en placas con la superficie funcionalizada con vitronectina, ligando natural de dicha integrina, asegurando que las células que se adhieran a la placa contienen el receptor a estudiar (*pasos 1–3, Esquema 63*). A continuación se liberan las células de la placa empleando tripsina, una enzima proteolítica que rompe la interacción ligando-receptor (*paso 4*), y se colocan en placas de cultivo conteniendo diferentes concentraciones conocidas de los ligando a estudiar (*paso 5–6*); provocando que los ligandos sintéticos interaccionen con la integrina. Transcurrido un tiempo, esta disolución que contiene tanto los ligando sintéticos como las células con los receptores, se añade sobre una nueva placa funcionalizada otra vez con vitronectina (*paso 7*); en esta ocasión solamente quedarán adheridas a la placa las células cuyos receptores no hayan quedado bloqueados por los ligandos sintéticos (*paso 8*). Calculando la cantidad de células adheridas se podrá saber la preferencia del receptor por un ligando u otro.

---

<sup>154</sup> Kawaguchi, M.; Hosotani, R.; Ohishi, S.; Fujii, N.; Tulachan, S. S.; Koizumi, M.; Toyoda, E.; Masui, T.; Nakajima, S.; Tsuji, S.; Ida, J.; Fujimoto, K.; Wada, M.; Doi, R.; Imamura, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 711–717.



**Esquema 63.** Análisis de adhesión de los compuesto A y B en comparación con el Cilengitide (C).  
Medición de la interacción ligando-receptor, competencia con el ligando natural.

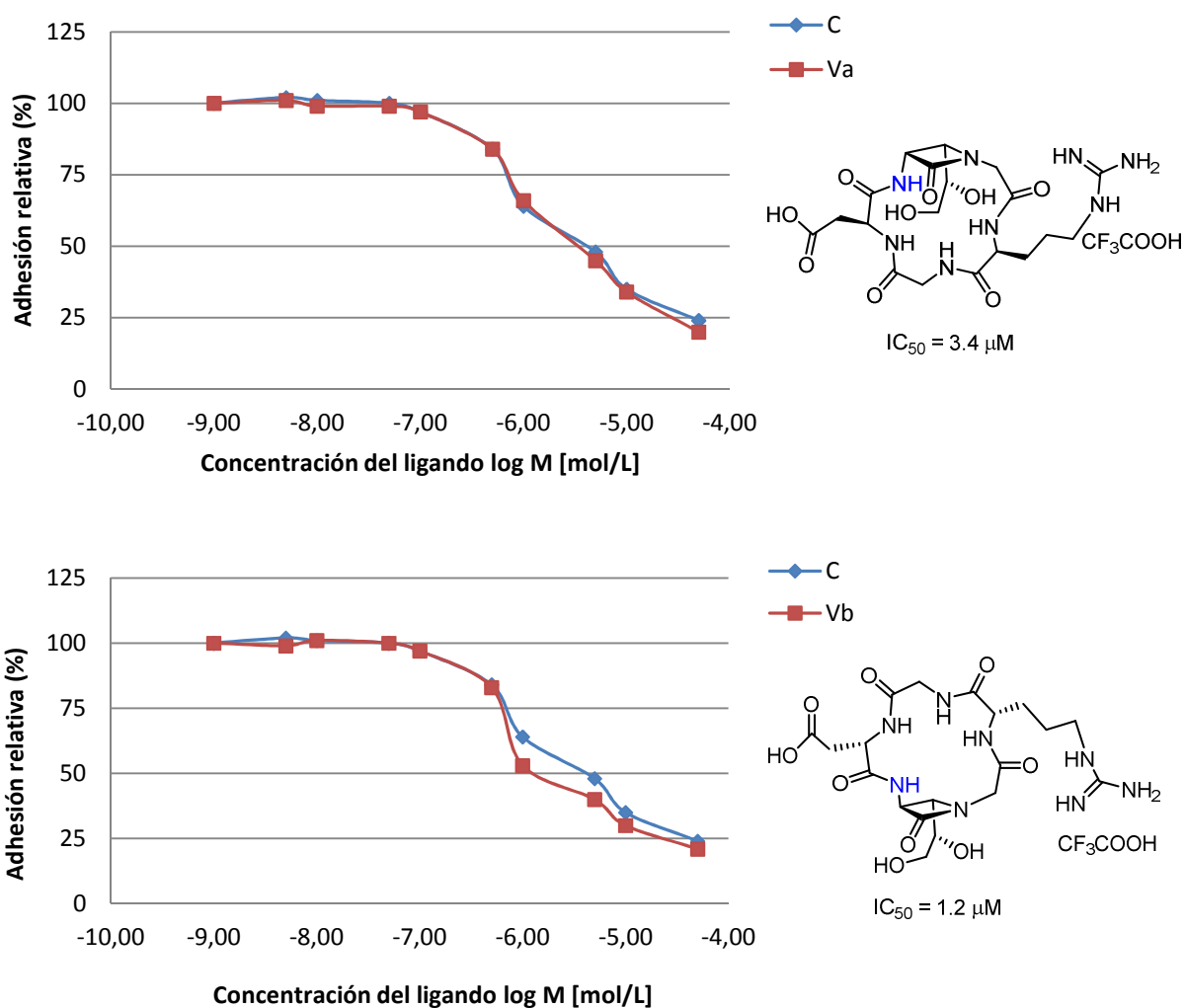
#### 4.2.4.1.1. Evaluación del nivel de adhesión de los ciclos 1, 7 y 9

Una vez que fueron sintetizadas las moléculas objetivo **1**, **7** y **9** llevamos a cabo un análisis de adhesión comparando los resultados con los de las moléculas **Va**, **Vb** y **C** (Cilengitide). El ensayo se realizó en los laboratorios de la empresa Genetadi S. L., por los Doctores José Luis Castrillo, Silvia Ávila y Antonio Laso.

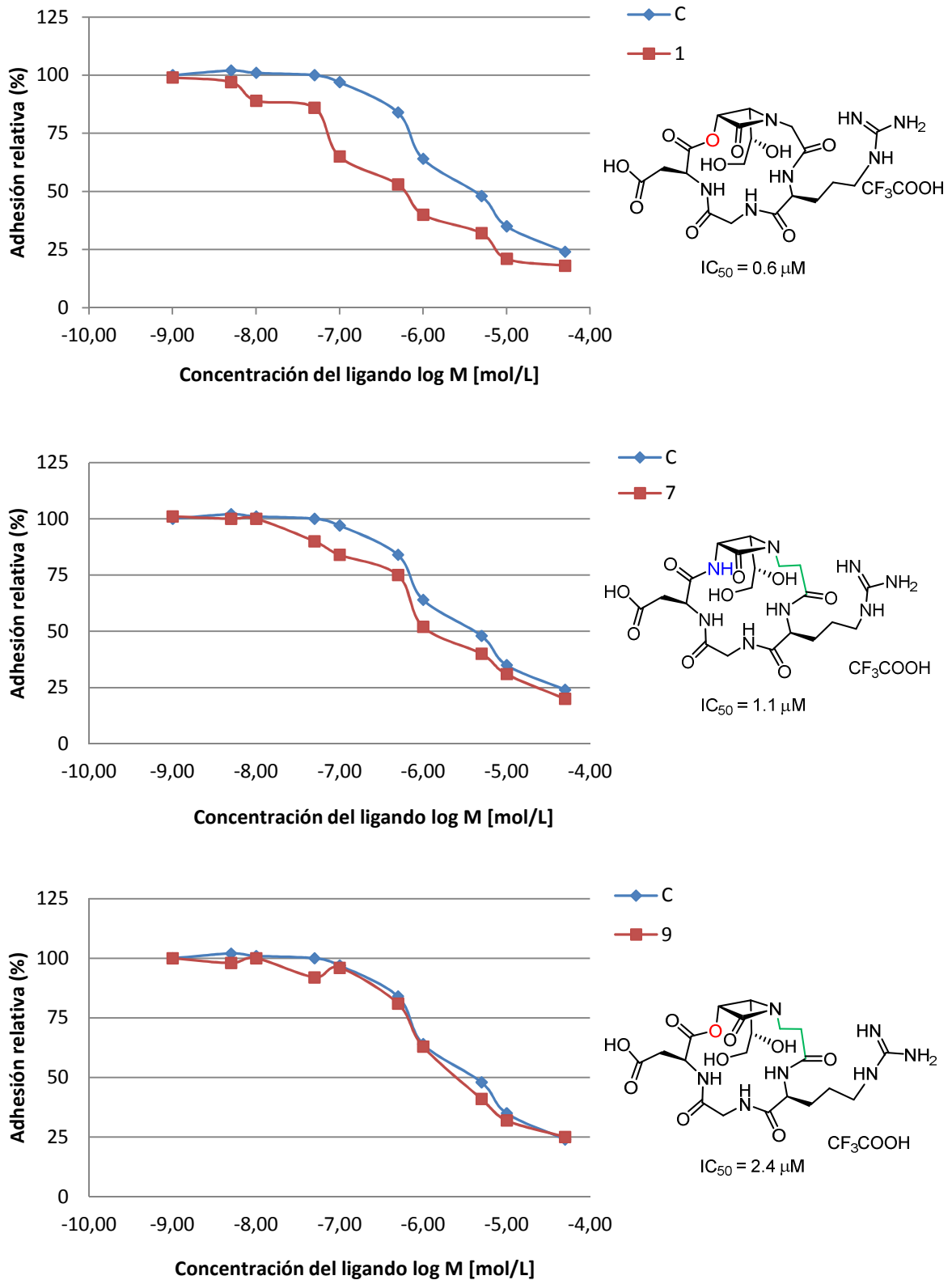
En la *Tabla 16* se muestran los valores que indican la preferencia del receptor por los compuestos sintetizados (a distintas concentraciones conocidas); donde un valor de 100 unidades determina una preferencia total por la vitronectina, y un valor de 0 unidades el desplazamiento total del ligando natural por el sintético. En los gráficos de la *Figura 130* se representan los valores anteriores y se compara cada caso con la molécula de control positivo Cilengitide.

**Tabla 16.** Resultados del análisis de adhesión realizado a los compuestos **C**, **Va**, **Vb**, **1**, **7** y **9** a distintas concentraciones conocidas.

concentración		<b>C</b>	<b>Va</b>	<b>Vb</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
[M]	log (M)						
1,00E-09	-9,00	100	100	100	99	100	101
5,00E-09	-8,30	102	101	99	97	98	100
1,00E-08	-8,00	101	99	101	89	100	100
5,00E-08	-7,30	100	99	100	86	92	90
1,00E-07	-7,00	97	97	97	65	96	84
5,00E-07	-6,30	84	84	83	53	81	75
1,00E-06	-6,00	64	66	53	40	63	52
5,00E-06	-5,30	48	45	40	32	41	40
1,00E-05	-5,00	35	34	30	21	32	31
5,00E-05	-4,30	24	20	21	18	25	20



**Figura 129.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **Va** y **Vb**, y su comparación con Cilengitide (IC<sub>50</sub> = 4.2 μM).



**Figura 130.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **1**, **7** y **9**; y su comparación con Cilengitide ( $IC_{50} = 4.2 \mu$ M).

En todos los casos, el nivel del desplazamiento del ligando natural que muestran los compuestos sintetizados en nuestro grupo de investigación, es del mismo orden o superior al que muestra la molécula Cilengitide. En el caso de los compuestos sintetizados durante la presente Tesis Doctoral, **1**, **7** y **9** (*Figura 130*), los valores de  $IC_{50}$  son notablemente más bajos indicando un mayor desplazamiento; siendo claramente superior en el caso del depsipéptido **1** ( $IC_{50} = 0.6 \mu M$ ).

En lo que a la flexibilidad se refiere, en el caso de los depsipéptidos, una cierta flexibilidad es contraproducente; siendo el compuesto ligeramente más flexible **9** menos afín que su análogo más rígido **1**. En cambio, en el caso de los peptidomiméticos, un aumento de la flexibilidad en el compuesto **7** en comparación con su análogo más rígido **Va**, ayuda a la molécula a interactuar de forma más efectiva con el receptor.

Podemos concluir pues, por un lado, que los cambios conformacionales generados con la introducción de un enlace éster en la estructura del macrociclo han mejorado la capacidad de interacción ligando sintético-receptor, dando lugar a una conformación más efectiva que inhibe en mayor grado la adhesión del ligando natural vitronectina. Y por otro lado, que cuando más cerca se está de la conformación con interacción efectiva una mayor rigidez es beneficiosa; en cambio, si la conformación que adopta el macrociclo no es la óptima, como en el caso del péptido **Va**, una cierta flexibilidad es favorable.

La limitación de este ensayo es que una interacción ligando-receptor no tiene porque inducir una única respuesta biológica; es más, una sola interacción, normalmente, desencadena una cascada de respuestas bioquímicas y fisiológicas variadas a diferentes niveles de complejidad y organización.

Al estudio que relaciona la actividad de un ligando con su estructura se le denomina SAR (*Structure Affinity Relationship*); pero ya en el año 1992 Richard A. Glennon refinó el término SAR separándolo en dos componentes:<sup>155</sup>

- 1) **SAFIR**: se limita al ensamblaje ligando-receptor al nivel de afinidad/reconocimiento. Esta Información se conoce mediante el estudio de adhesión y describe si el ligando interacciona o no con el receptor y en qué medida.

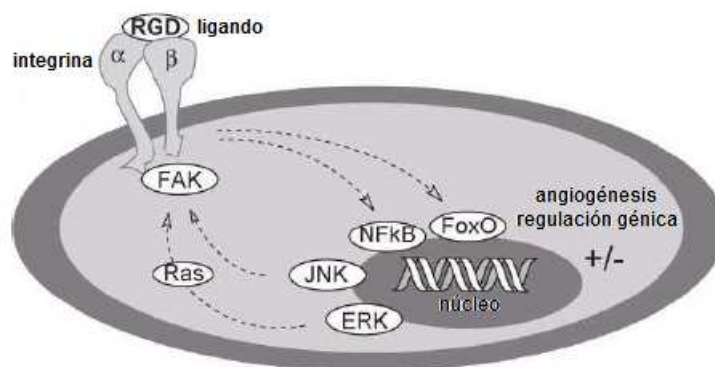
---

<sup>155</sup> Glennon, R. A.; *Drug Dev. Res.* **1992**, *26*, 251–274.



- 2) **SAR:** determina la actividad funcional, es decir, el tipo de respuesta biológica que se desencadena tras el acoplamiento.

Resumiendo, un buen ligando tiene que ser capaz no solo de presentar buena actividad de reconocimiento (actividad o potencia) si no también de generar los cambios adecuados en el receptor una vez unido (eficacia).<sup>8</sup>



**Esquema 64.** Esquema general de un compuesto con la integrina y la transducción de la señal al interior de la célula.

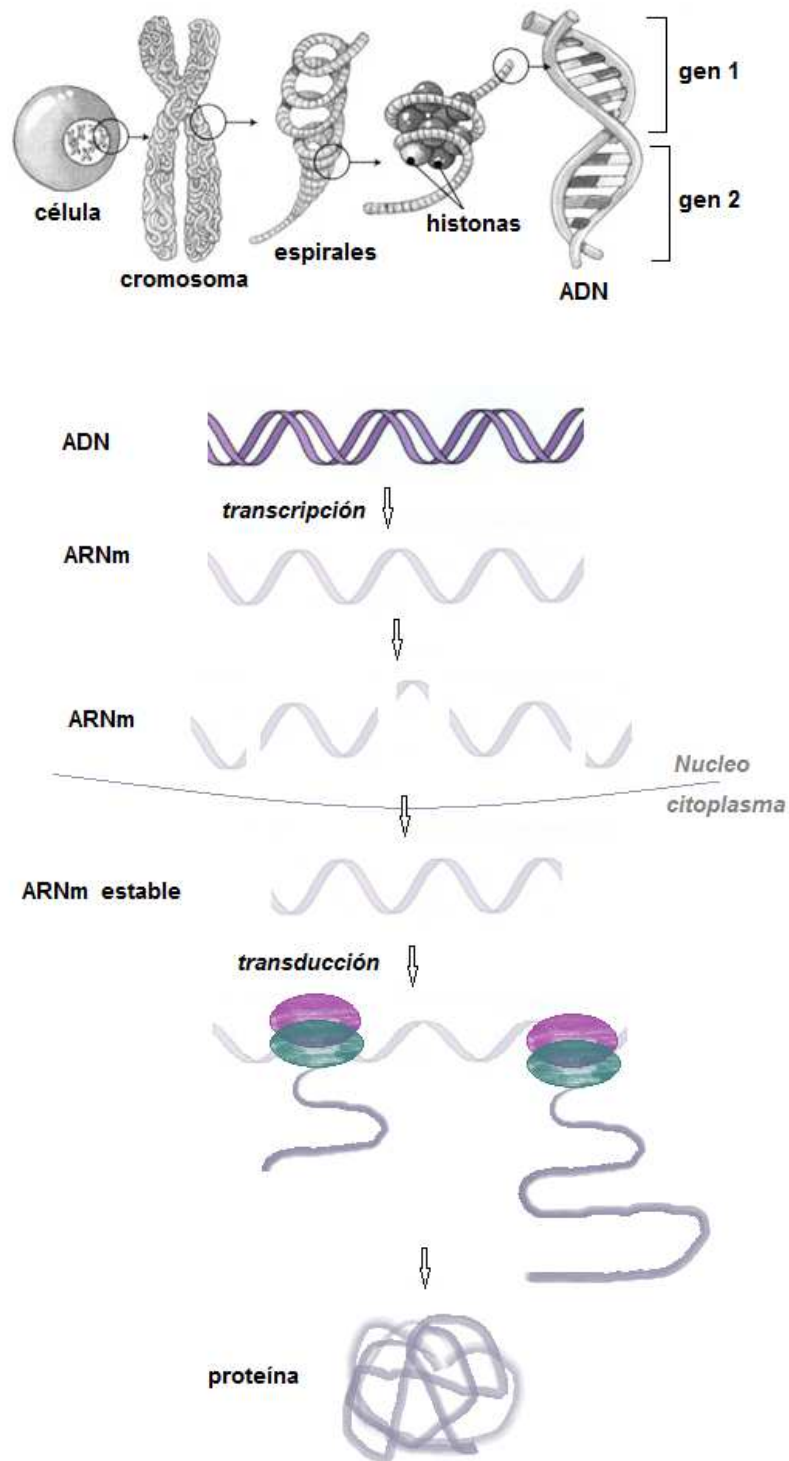
#### 4.2.4.2. Evaluación de la expresión génica, determinación de la eficacia

Es muy importante desarrollar un bioensayo eficaz que sea rápido y relevante, a poder ser “in vitro”, que nos dé información no solo de la adhesión del ligando si no que también dé la respuesta biológica que éste provoca.

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. La identificación de variaciones en la expresión génica es una de las áreas de la biomedicina y de la genética que más se ha desarrollado en los últimos años y se ha sugerido que cada tipo de tejido posee un perfil de expresión propio y específico.

La expresión génica es la transformación de la información codificada en el ADN en proteínas (*Esquema 65*). En el ADN está codificada toda la información del cuerpo en forma de genes y cuando es necesario crear una nueva proteína comienza la transcripción de los genes en su ARN complementario gracias a la enzima ADN

polimerasa. Una vez que se ha creado el ARN se pierden los fragmentos que no codifican información y se sintetiza la proteína mediante el proceso de transducción.<sup>156</sup>



Esquema 65. Expresión génica, síntesis proteica.

<sup>156</sup> Para más información sobre la biosíntesis proteica: Devlin, T. M.; *Bioquímica*, 4ª edición, Reverté, Barcelona 2004.

Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Los genes se expresan o no dependiendo de la función de la célula y existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se “encienden” o se “apagan” en diferentes momentos de la vida de un organismo. Por tanto, cada célula en cada momento tiene una tarea diferente por lo que expresará (hará copia) de los genes que van a crear la proteína encargada de llevar a cabo esa función. Analizando el ARNm de la célula podremos ver qué genes son los que se han expresado, y por lo tanto que procesos se han puesto en marcha.

En este sentido, el análisis por *microarrays*<sup>157</sup> es una técnica estandarizada para el análisis de la expresión génica que permite el estudio de perfiles de expresión global, traduciéndolos en datos cuantificables y analizables empleando técnicas de bioinformática y análisis de datos. Esta técnica ha revolucionado la manera de entender las enfermedades desde su diagnóstico hasta su tratamiento. Algunos autores apuestan incluso que los perfiles de expresión génica serán, en un futuro, herramientas de uso clínico que permitirán pronósticos más ajustados a la realidad de cada caso concreto, llevándonos a tomar decisiones basadas en las características moleculares de cada tumor.<sup>158</sup>

Se ha utilizado para determinar la actividad angiogénica y por tanto, está siendo utilizada durante estos últimos años como técnica complementaria para el estudio de diferentes tipos de enfermedades como el cáncer.<sup>159</sup>

En resumen, la llamada micromatriz multigénica o *microarray* es una técnica que permite la evaluación simultánea de un importante número de genes o incluso del

---

<sup>157</sup> Para más información ver las revisiones completas: a) Hayes, D. N.; Meyerson, M.; *Microarray Approaches to Gene Expression Analysis*. En *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian*, 2ª edición; Coleman, W. B.; Tsongalis, G. J.; New York **2006**, 121–165. b) Schaffrath, B.; Bosio, A.; *Gene arrays*. En *Principles of immunopharmacology*, 2ª edición; Nijkamp, F. P.; Parnham, M. J.; Basilea, **2005**, 197–213. c) Kumar, R. M.; *Am. J. Infect. Dis.* **2009**, *5*, 207–218.

<sup>158</sup> Bhattacharya, S.; Mariani, T. J.; *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 855–861.

<sup>159</sup> a) Dyrskjøt, L.; Dalsgaard-Sørensen, K.; Stampe-Ostenfeld, M.; Birkenkamp-Demtroder, K.; Thorsen, K.; Andersen, C. L.; Kruhøffer, M.; Jensen, J. L.; Ørntoft, T. F.; *DNA Microarrays and Genetic Testing*. En *Molecular Diagnostic*, 2ª edición; Patrinos, G. P.; Ansorgen, W. J.; London, **2010**, 247–267. b) Algunos ejemplos: Cavill, R.; Sidhu, J. K.; Kilarski, W.; Javerzat, S.; Hagerdon, M.; Ebbels, T. M. D.; Bikfalvi, A.; Keun, H. C.; *J. Proteome. Res.* **2010**, *9*, 3126–3134. c) Saidi, A.; Javerzat, S.; Bellahcene, A.; De Vos, J.; Bello, L.; Castronovo, V.; Deprez, M.; Loiseau, H.; Bikfalvi, A.; Hagerdon, M.; *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 2187–2198.

genoma completo en un único experimento, dándonos información sobre los mecanismos que se ponen en funcionamiento en un momento determinado.

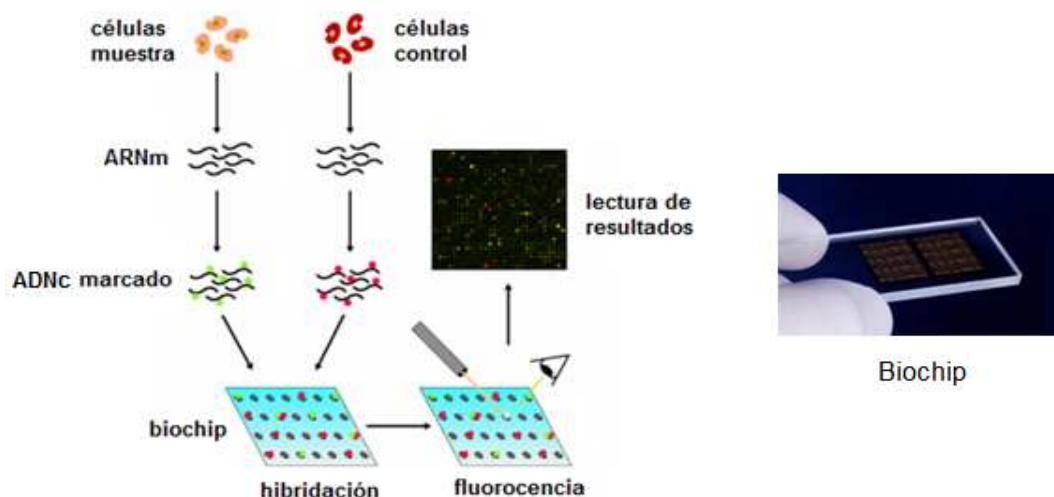
Un ejemplo claro de la necesidad de analizar la respuesta biológica de cada interacción ligando-receptor y no solo su reconocimiento se describe en la referencia 97 y lo detallamos a continuación:

Una vez ensayada la capacidad de inhibición de la adhesión del ligando natural vitronectina, de las moléculas **IIIc**, **IV** y **Vb** (*apartado 2.5.2.1*, pág. 46), y de haber determinado que su inhibición era similar; se estudió el efecto de dicha interacción mediante un estudio de activación génica (*Esquema 67*). El análisis cualitativo simultáneo de todas las expresiones génicas humanas por *microarray* de ADNc,<sup>160</sup> 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.

Para realizar el experimento se hizo reaccionar a células HUVEC endoteliales humanas con los compuestos a estudiar y trascurrido un tiempo se extrajo el ARNm de las células (*Esquema 66*). Este ARNm se trató para conseguir el ADN complementario marcado y se añadió a un biochip de ADN que contiene fragmentos de ARN pertenecientes a los genes que queremos estudiar, de una manera ordenada y conocida. Las hebras de ADNc marcadas añadidas se hibridaron entonces con sus hebras de ARN complementarias, y solo con sus complementarias, dando una señal fluorescente; de esta manera se pudo saber que hebras de ADNc había en la mezcla y por lo tanto que genes se habían expresado en las células con receptores integrina al ponerse en contacto con nuestros ligandos sintéticos.

---

<sup>160</sup> Existen tres tipos principales de *microarrays*: 1) *microarrays* de ADN o de hibridación genómica comparada, que nos permite evaluar el número de copias de cada gen existente en cada célula así como la presencia de mutaciones; 2) *microarrays* de proteínas; 3) *microarrays* de ARN o de ADN complementario, que se basa en la detección de ARN mensajeros específicos presentes en una muestra biológica en un determinado momento. Véase referencia 157.



**Esquema 66.** Ensayo de análisis cualitativo de la expresión génica de células HUVEC por *microarray* de ADNc.

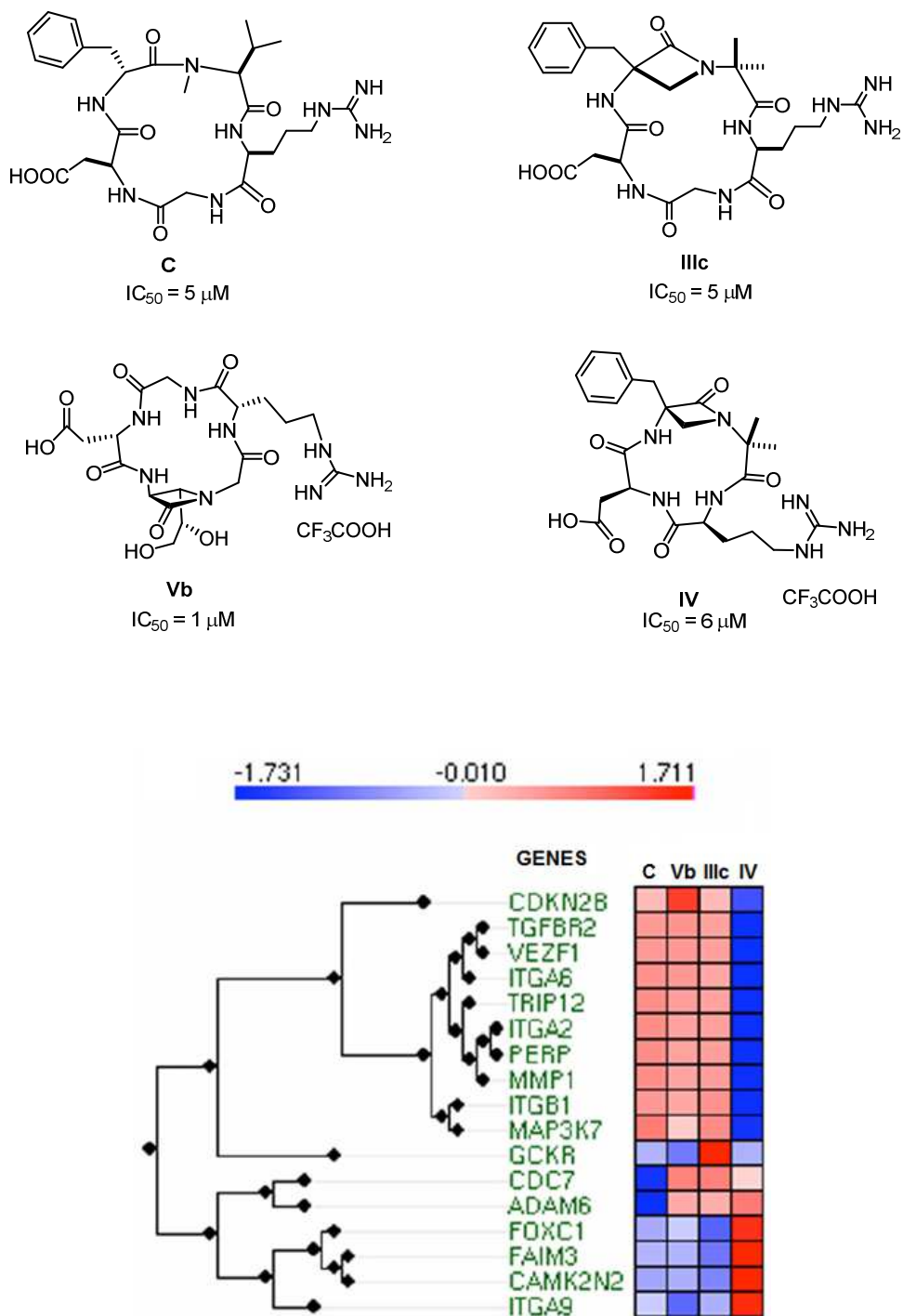
Para realizar un estudio adecuado se seleccionó un set específico de genes relacionados con la angiogénesis y la adhesión celular, que en nuestro caso fueron 17 genes (*Esquema 67*).<sup>161</sup>

En el presente experimento diez de estos genes fueron activados (color rojo) y siete fueron inhibidos (color azul) después del tratamiento con el Cilengitide. Un comportamiento similar presentaron los compuesto **IIIc y Vb**, ambos pentapéptidos cíclicos, activando y desactivando prácticamente los mismos genes (*Esquema 67*). Estos compuestos actúan como antagonistas de la angiogénesis.

En lo que al análisis génico de la molécula **IV**, el tetrapéptido cíclico, se refiere, la respuesta biológica que desencadenó el ligando resultó ser la opuesta aunque los resultados en el test de adhesión fueran similares. Por ello podemos decir que aunque los pentapéptidos analizados son antagonistas de la angiogénesis el tetrapéptido **IV** es un agonista del proceso angiogénico.

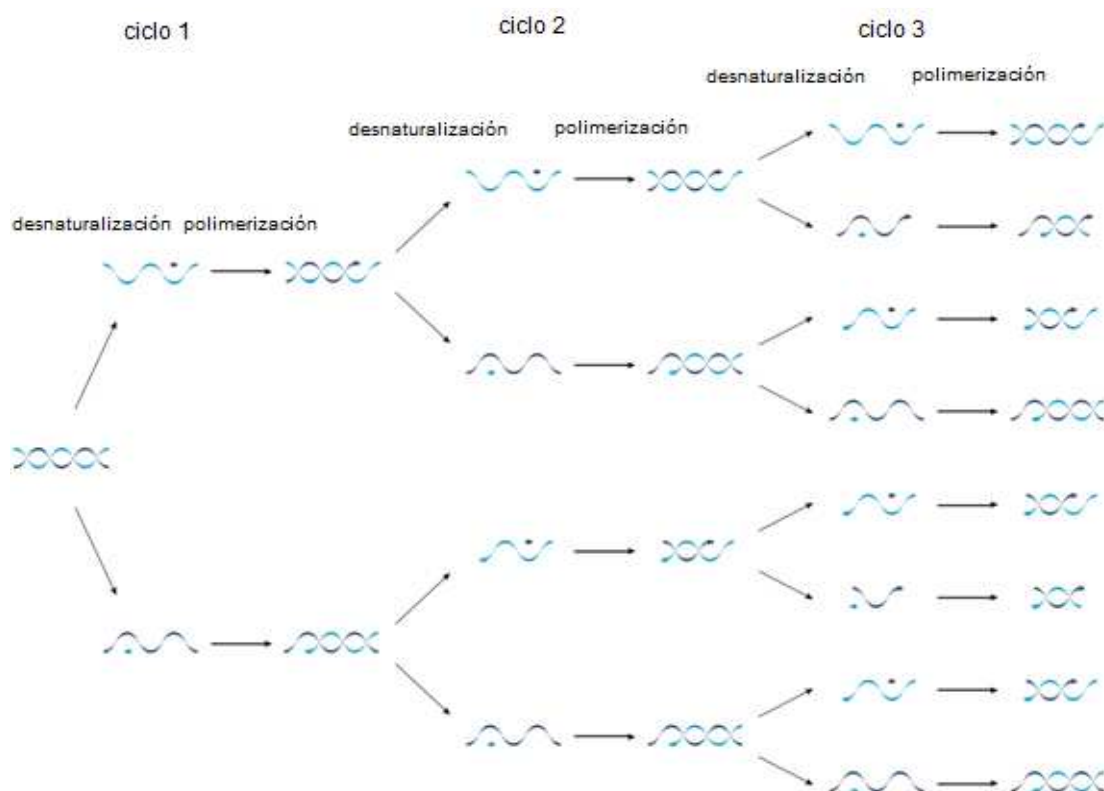
De acuerdo con estas consideraciones otro de los objetivos planteados en esta memoria es el análisis de expresión génica de los compuestos sintetizados durante el proyecto.

<sup>161</sup> Costouros, N. G.; Libutti, S. K.; *Expert Opin. Biol. Ther.* **2002**, 2, 545-556.



**Esquema 67.** Resultado de análisis de expresión génica donde el compuesto **C** es Cilengitide; **Vb** y **IIIc** son pentapéptidos RGD y **IV** es el tetrapéptido que carece de glicina.

Además, para confirmar los datos conseguidos mediante el análisis por *microarrays* de ADNc se realizó un experimento de PCR cuantitativo (*quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR*) más exacto, que consiste en replicar las hebras de RNA que nos interesan, multiplicando la señal recibida. Mediante este experimento se estudia no solo si los genes analizados se han inhibido o activado, si no que también, en qué medida.<sup>162</sup>



**Figura 131.** Análisis cuantitativo mediante qRT-PCR, multiplicación de la señal.

<sup>162</sup> El análisis por qRT-PCR es una técnica ampliamente empleada para la validación de los datos conseguidos mediante *microarray*. Morey, J. S.; Ryan, J. C.; Van Dolah, F. M.; *Biol. Proced. Online* **2006**, *8*, 175–193.

#### 4.2.4.2.1. Evaluación de la expresión génica de los ciclos 1, 7 y 9 y moléculas de control negativo 17 y 18

Una vez que fueron sintetizadas las moléculas objetivo **1, 7 y 9**, y las moléculas de control negativo **17 y 18**, llevamos a cabo un análisis de expresión génica mediante la técnica de *microarray* de ADNc, comparando los resultados con los de las moléculas **Va, Vb y C** (Cilengitide). El ensayo se realizó en los laboratorios de la empresa Genetadi S. L., por los Doctores José Luis Castrillo, Silvia Ávila y Antonio Laso empleando un *array* de CGH y expresión génica G2505-B.

Para ello se prepararon disoluciones con una concentración de  $10^{-2}$  nM de todas las moléculas a analizar con las que se trataron separadamente cultivos de células HUVEC durante 48 horas. A continuación se extrajo el ARNm que se había transcrito como consecuencia de su tratamiento con la molécula a estudiar y se trató hasta conseguir su ADNc correspondiente marcado fluorescentemente. El ADNc marcado se añadió al biochip (G2505-B) haciendo posible el análisis cualitativo simultáneo de todas las expresiones génicas humanas.<sup>163</sup>

La fluorescencia consecuencia de la hibridación entre las hebras complementarias se recogió prestando especial atención a los 17 genes que se conoce que están relacionados con la angiogénesis y la adhesión celular.<sup>164</sup>

Como se puede observar en la *Tabla 17* todas las moléculas estudiadas tienen en mayor o menor medida el mismo tipo de respuesta biológica que el Cilengitide (**C**); por lo que podemos decir que todas ellas son antagonistas del proceso de angiogénesis.<sup>165</sup>

---

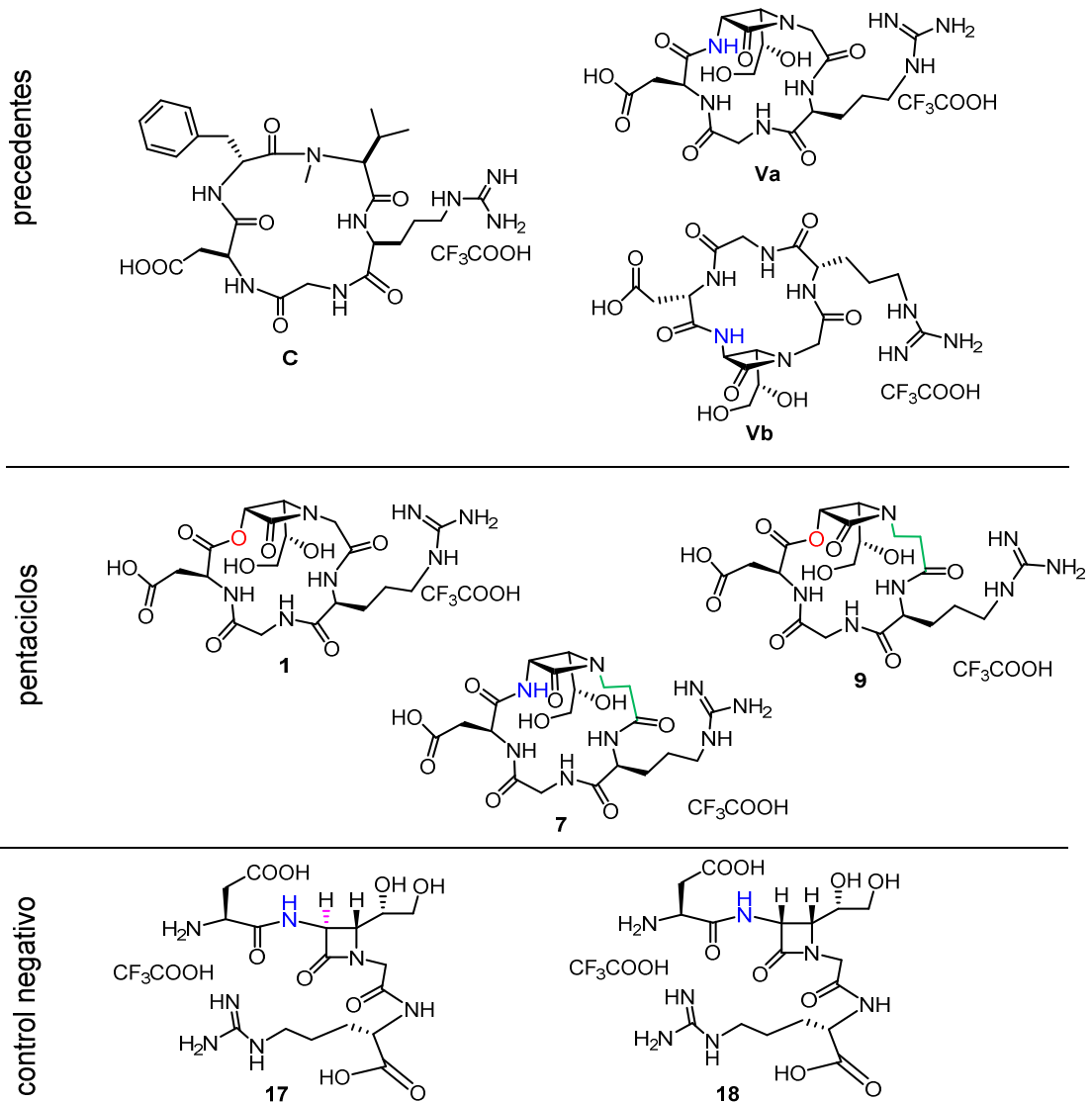
<sup>163</sup> Con intención de confirmar que la inhibición del proceso angiogénico no se da por la muerte por apoptosis de las células cultivadas en presencia de los compuestos sintetizados, se llevó a cabo la validación del método analítico midiendo la expresión génica de las proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis AATYK, Bax y Bcl-2. No se observó cambios significativos en ninguno de los dos genes tras 72 horas; por lo que se puede concluir que no tiene lugar la muerte de las células por apoptosis. a) Tomomura, M.; Morita, N.; Yoshikawa, F.; Konishi, A.; Akiyama, H.; Furuichi, T.; Kamiguchi, H.; *Neuroscience* **2007**, *148*, 510–521. b) Ding, J.; Zhang, Z.; Roberts, G. J.; Falcone, M.; Miao, Y.; Shao, Y.; Zhang, X. C.; Andrews, D. W.; Lin, J.; *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28749–28763.

<sup>164</sup> El análisis fue realizado a 20500 genes humanos y en total se detectó la activación de 230/217 genes y la inhibición de 90/62 genes.

<sup>165</sup> Los datos numéricos de la tabla se encuentran en el apartado *Anexo* pág. 508.



**Tabla 17.** Resultados de expresión génica de *microarray* de ADNc. Orden según su actividad **1>9>Vb>Va>7.**



	C	Va	Vb	1	7	9	17	18
CDKN2B	-	-	+	-	-	-	-	-
TGFBR2	-	-	-	+	-	-	-	-
VEZF1	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGA6	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIP12	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGA2	-	-	-	-	-	-	-	-
PERP	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP1	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGB1	-	-	-	-	-	-	-	-
MAP3K7	+	-	-	+	-	-	-	-
GCKR	-	-	-	-	-	-	-	-
CDC7	-	-	+	+	-	-	-	+
ADAM6	-	-	-	-	-	-	-	-
FOXC1	-	-	-	-	-	-	-	-
FAIM3	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMK2N2	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGA9	-	-	-	-	-	-	-	-

Las diferencias encontradas entre las moléculas sintetizadas y la falta de correlación en los resultados en algunas ocasiones en 3 genes (CDC7, ADAM6 y FAIM3) de los 17 estudiados en comparación con Cilengitide, demuestran la alta especificidad de la actividad celular *in vivo* una vez que se produce la adhesión ligando-receptor.

En lo que a la potencia se refiere hay que comentar que las molécula **1** seguida de la **9**, ambos depsipéptidos, son las moléculas más eficaces; superando tanto al Cilengitide como a las moléculas **Va** y **Vb** sintetizadas con anterioridad en nuestro grupo de investigación. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en el test de adhesión y indican que, el cambio de conformación que se genera al cambiar el patrón de enlaces de hidrógeno del macrociclo, crean una estructura más afín a la conformación activa de la secuencia RGD (*Ester scan*).

Las moléculas **7** y **9**, ciclopeptidomiméticos ligeramente más flexibles gracias al metileno añadido, muestran una inhibición de la expresión génica del mismo orden o moderadamente inferior a la de sus análogos con un metileno menos **Va** y **1**, respectivamente. En el caso de los depsipéptidos, compuestos más activos **1** y **9**, los datos del test de la adhesión coinciden con los datos de la eficacia a nivel génico; es decir, cuando más rígido es el macrociclo mayor interacción y mayor eficiencia. En el caso de los peptidomiméticos, compuestos menos activos **Va** y **7** (y por lo tanto compuestos con una estructura menos afín), el compuesto **7**, no muestra una eficiencia superior a la del compuesto **Va** como era de esperar por su test de adhesión. Por lo que podemos concluir que aunque el compuesto **7**, más flexible, se adapte mejor al receptor, su eficacia una vez unido es ligeramente menor.

Este hecho confirma que, aunque los test de adhesión son útiles para analizar si se produce una interacción ligando-receptor o no, no son definitivos a la hora de evaluar la eficiencia del ligando. Para obtener resultados fiables es preciso realizar un análisis de expresión génica.

Por otro lado las moléculas de control negativo **17** y **18**, aún no teniendo la secuencia de reconocimiento RGD en su estructura, son capaces de interactuar con la integrina mostrando una ligera inhibición del proceso, no esperada, y que nos llama especialmente la atención.

La razón de esta inesperada actividad puede deberse a que la  $\beta$ -lactama sea capaz de ejercer la suficiente restricción conformacional, gracias a los enlace de hidrógeno que se crean, dirigiendo las cadenas laterales y los grupos de reconocimiento, ácido carboxílico y guanidina, en la dirección y distancia adecuadas.

Viendo que la  $\beta$ -lactama es capaz de actuar como un grupo de restricción eficaz, se abre un nuevo abanico de posibilidades en el diseño de inhibidores con este tipo de estructuras. Las moléculas de cadena abierta tienen grandes ventajas si se comparan con sus análogas cíclicas; por un lado, se consiguen con mayor rendimiento al reducir el número de etapas y en concreto la etapa de ciclación; y por otro lado, son moléculas más versátiles sintéticamente hablando; ya que al eliminar la etapa de ciclación se eliminan también las limitaciones sintéticas que impone esta reacción.

#### 4.2.4.2.2. Comprobación de los resultados mediante qRT-PCR

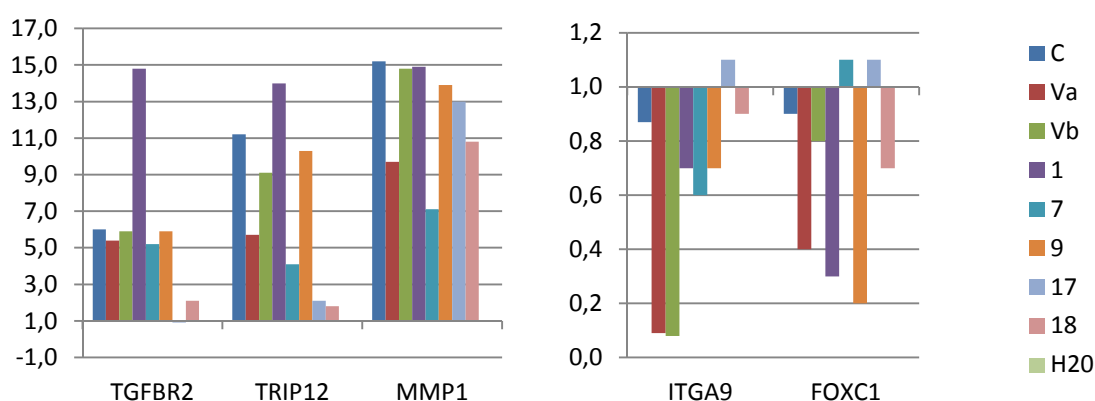
Para comprobar los datos obtenidos en el *microarray* se llevó a cabo un análisis de **qRT-PCR** para todas las moléculas objetivo centrándonos en los genes TGBR2, TRIP12, MMP1, ITGA9 y FOXC1; los datos se recogieron en la *Tabla 18*.

El análisis mediante qRT-PCR consiste en multiplicar las señales fluorescentes que se van a recibir replicando las hebras de ARN. Gracias a esta multiplicación los datos recogidos van a resultar cuantificables y más fiables. En esta técnica se emplea como control una muestra con células que no han estado en contacto con ningún ligando (*entrada H<sub>2</sub>O*) y se valora como 1.0 la intensidad de señal recibida para cada gen. De esta manera, si el ligando sintético objetivo activa un gen y este se expresa sintetizando más ARNc del que tendría la muestra control, el valor de la señal recibida sería mayor a 1.0; en cambio, si el ligando sintético objetivo inhibe dicho gen, el valor de la señal recibida será menor a 1.0.

En este caso los datos del qRT-PCR coinciden con los datos del *microarray*, se activan y se inhiben los mismos genes y en la misma medida en ambos experimentos siendo el depsipéptido **1** el ligando más eficaz; por lo que podemos concluir que el experimento de *microarray* es fiable.

**Tabla 18.** Resultados del qRT-PCR.

Compuesto	TGFBR2	TRIP12	MMP1	ITGA9	FOXC1
<b>C</b>	6.0	11.2	15.2	0.9	0.9
<b>Va</b>	5.4	5.7	9.7	0.1	0.4
<b>Vb</b>	5.9	9.1	14.8	0.1	0.8
<b>1</b>	14.8	14.0	14.9	0.7	0.3
<b>7</b>	5.2	4.1	7.1	0.6	1.1
<b>9</b>	5.9	10.3	13.9	0.7	0.2
<b>17</b>	0.9	2.1	13.0	1.1	1.1
<b>18</b>	2.1	1.8	10.8	0.9	0.7
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0



#### 4.2.4.2.3. Supervivencia de las células

Hay que añadir que al realizar este tipo de test, en donde se provoca la interacción entre ligandos sintéticos y las células, otro dato que se puede medir es la supervivencia de las células frente a este tipo de compuestos, con lo que podemos hacernos una idea de su toxicidad.

Para ello se cultivan las células HUVEC en placas *petri* en presencia de los compuestos sintéticos y se sigue su desarrollo mediante microscopio.<sup>166</sup>

Como se puede observar en la *Tabla 19*, los compuestos cíclicos sintetizados muestran una supervivencia celular del mismo orden que el Cilengitide; los compuestos de cadena abierta en cambio, muestran una supervivencia notablemente mayor, por lo que podemos concluir que son menos tóxicos. Hay que resaltar que la molécula **9**, segunda molécula más activa, muestra una toxicidad menor al resto de las moléculas activas.

<sup>166</sup> Para el recuento de células se emplea la cámara de Naubauer, una cámara adaptada a un microscopio con una cuadrícula de dimensiones conocidas en donde se contarán las células previamente diluidas.

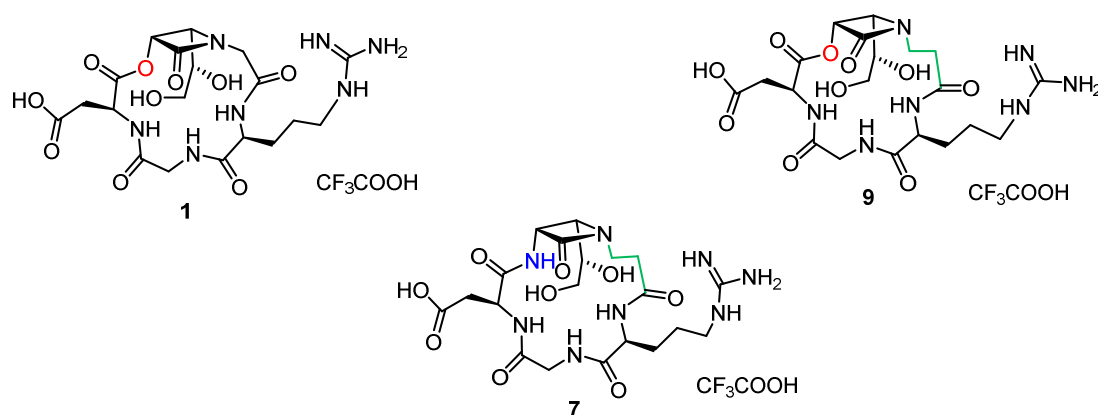
**Tabla 19.** Supervivencia de las células frente a los ligandos sintéticos.

Compuesto	Supervivencia celular %
Agua	100
Cilengitide	65
<b>1</b>	60
<b>7</b>	65
<b>9</b>	70
<b>17</b>	85
<b>18</b>	95

#### 4.2.5. Análisis conformacional de las moléculas conseguidas

Tras sintetizar los diferentes miméticos de ciclopeptidos RGD se realizó un análisis conformacional de dichos compuestos.

En nuestro caso, el análisis se llevó a cabo con las sales trifluoroacéticas de los ciclos de los productos **1**, **7** y **9**, 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.



**Figura 132.** Pentapeptidomiméticos sintetizados.

##### 4.2.5.1. Deriva térmica, enlaces de hidrógeno

El análisis mediante RMN es particularmente eficaz para el estudio conformacional de péptidos; por ello, para la determinación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, se realizó un estudio de <sup>1</sup>H-RMN en el que se calcularon los ángulos diedros del enlace amida gracias a las constantes de acoplamiento entre el protón

amídico y el protón del C $\alpha$  del aminoácido ( $J_{HC\alpha-NH}$ ) empleando la ecuación de Karplus.<sup>167</sup>

Una vez asignadas las señales de los espectros, se registraron espectros a diferentes temperaturas (entre 278 K y 303 K con intervalos de 5 K) en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) y se calcularon los coeficientes térmicos ( $\Delta\delta(NH)/\Delta T$ ) de los protones amida de los diferentes ciclos para saber si aquellos participan o no en enlaces de hidrógeno intramoleculares.<sup>63g</sup>

En agua, el valor límite del coeficiente térmico para que un NH amídico participe en un enlace de hidrógeno intramolecular es de  $-4$  ppb/K.<sup>168</sup> 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.

En las *Tablas 20–22* se muestran los valores del desplazamiento químico en ppm de los diferentes NH amídicos y sus correspondientes coeficientes térmicos.<sup>169,170</sup>

En la *Tabla 20* se observa que solo la argnina presenta un valor del coeficiente térmico de  $-3.06$  ppb/K que indica que la amida forma un enlace de hidrógeno en la molécula **1**.

En la *Tabla 21* encontramos un valor del coeficiente de  $-4.24$  ppb/K que podría indicar que el hidrógeno de la amida de la  $\beta$ -lactama de la molécula **7** esté formando un enlace de hidrógeno débil.

La molécula **9**, *Tabla 22*, no muestra evidencias de ningún enlace de hidrógeno.

---

<sup>167</sup> Las constantes de acoplamiento entre protones vecinos dependen del ángulo diedro entre los enlaces C-H de los átomos implicados. La ecuación de Karplus proporciona la dependencia de la constante de acoplamiento con el ángulo diedro. a) Karplus, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871. b) Karplus, M.; *J. Chem. Phys.* **1960**, *64*, 1793–1798. c) Karplus, M.; *J. Chem Phys.* **1959**, *30*, 11–15.

<sup>168</sup> Cierpicki, T.; Otlewski, J.; *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 249–261.

<sup>169</sup> Las moléculas más flexibles **9**, y en menor medida la **7**, muestran las señales de los hidrógenos amídicos desdobladas por las diferentes conformaciones estables que adoptan ambos macrociclos en disolución. Para realizar el cálculo de coeficientes se seleccionaron las señales mayoritarias.

<sup>170</sup> El cálculo realizado con las señales minoritarias proporciona resultados similares.

**Tabla 20.** Deriva térmica del compuesto 1.

Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Asp]	8.938	8.889	8.845	8.799	8.754	d 7.9	-9.16
NH[Gly]	8.195	8.131	8.076	8.018	7.966	m	-11.42
NH[Arg]	8.027	8.012	7.998	7.981	7.966	m	-3.06

**Tabla 21.** Deriva térmica del compuesto 7.

Amida	Desplazamiento químico (ppm)						Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K	303K		
NH[Asp]	8.907	8.873	8.838	8.803	8.766	8.734	d 7.4	-6.98
NH[Gly]	8.736	8.707	8.679	8.649	8.619	8.592	m	-5.79
NH-β-lact	8.345	8.325	8.307	8.284	8.260	8.240	d 8.7	-4.24
NH[Arg]	8.043	8.004	7.967	7.926	7.889	7.855	d 8.9	-7.58

**Tabla 22.** Deriva térmica del compuesto 9.

Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Asp]	8.837	8.792	8.757	8.738	8.690	d 8.1	-6.96
NH[Gly]	8.718	8.674	8.642	8.624	8.580	t 8.3	-6.52
NH[Arg]	8.569	8.513	8.467	8.437	8.380	d 8.6	-9.08

#### 4.2.5.2. Modelización de las estructuras

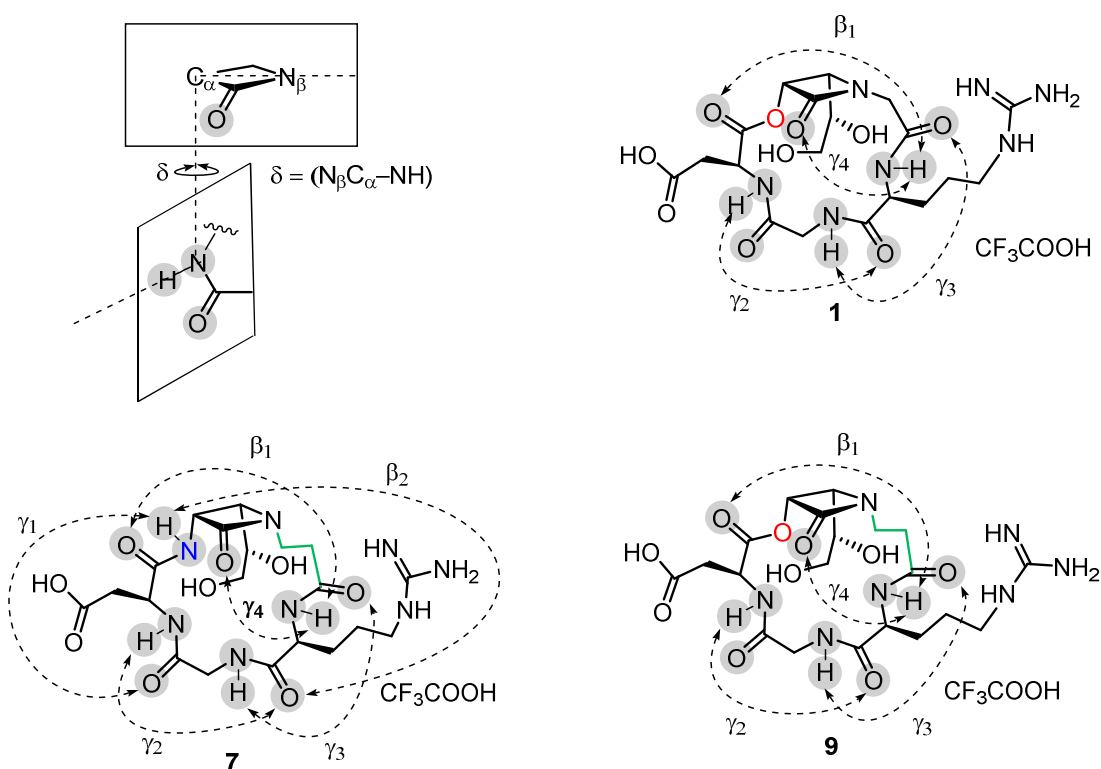
Usando estos datos como punto de partida en cálculos de modelización molecular se obtuvieron las poblaciones de los distintos conformeros en disolución.

Para ello se siguió el método *simulated annealing*<sup>171</sup> realizando una dinámica libre a 1000 K durante 10 ps y se fue enfriando hasta 300 K durante 30 ps aplicando las

<sup>171</sup> Daures, X.; Gademan, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393–2404.

restricciones conformacionales. Se realizaron 100 estructuras de los pseudopéptidos **1**, **7** y **9**. Las simulaciones se efectuaron empleando el programa X-PLOR-NIH 2.32.<sup>172</sup>

De las 100 estructuras resultantes se seleccionaron aquellas que cumplían 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.



**Figura 133.** Definición de los signos según los ángulos pseudodiedros ( $\delta$ ) y enlaces de hidrógeno posibles.

<sup>172</sup> Schwieters, C. D.; Kuszewski, J.; Clore, G. M.; *Prog. Nucl. Magn. Spectrosc.* **2006**, *48*, 47–62.



## Resultados y discusión

**Tabla 23.** Análisis de *clusters* del compuesto 1. Ángulos pseudodiedros ( $\delta$ ) y distancias CO...HN (Å)

Número de Estruct.	$\delta = (N_{\beta}C_{\alpha}-NH)$				Distancia CO...HN (Å)			
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\beta_1$
43	118.5	53.7	-74.0	122.8	2.7	4.5	2.8	3.5
36	121.8	52.2	73.1	123.7	4.3	5.1	3.1	3.4
12	-149.3	71.5	83.3	126.1	4.3	5.0	3.2	3.2
5	125.2	60.9	95.6	-127.7	4.4	4.9	3.4	2.9
4	-18.4	61.3	-63.0	-8.2	2.7	4.5	3.1	2.6

**Tabla 24.** Análisis de *clusters* del compuesto 7. Ángulos pseudodiedros ( $\delta$ ) y distancias CO...HN (Å)

Número de Estruct.	$\delta = (N_{\beta}C_{\alpha}-NH)$				Distancia CO...HN (Å)					
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\beta_1$	$\beta_2$
46	7.0	66.0	-80.5	65.3	3.6	3.0	4.3	3.7	2.2	3.1
31	11.1	73.3	75.2	102.9	3.5	4.3	5.0	3.4	1.8	4.0
13	14.0	95.7	-41.1	112.7	3.3	2.6	4.1	2.3	2.4	3.1
6	15.7	94.5	114.5	-123.7	3.3	4.7	4.9	2.5	1.6	4.9
4	11.2	89.1	-9.5	-79.2	3.3	3.3	3.9	3.6	2.2	3.9

**Tabla 25.** Análisis de *clusters* del compuesto 9. Ángulos pseudodiedros ( $\delta$ ) y distancias CO...HN (Å).

Número de Estruct.	$\delta = (N_{\beta}C_{\alpha}-NH)$				Distancia CO...HN (Å)			
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\beta_1$
23	146.1	-69.2	-66.7	101.7	5.0	3.8	2.5	5.9
14	150.7	78.8	-59.9	112.3	3.9	4.1	2.6	5.8
13	153.7	-63.3	68.3	102.0	4.0	4.6	2.5	5.8
12	-154.3	89.1	92.4	-58.8	4.8	4.8	2.5	5.7
9	150.9	86.3	70.2	120.2	4.9	4.7	2.5	5.8
9	163.2	79.8	102.3	-156.0	4.9	4.9	2.4	5.3
6	-161.0	71.8	-67.8	93.1	3.9	4	2.7	6.7
6	-156.3	93.5	-33.7	-158.4	4.1	4.2	2.4	5.6
6	3.0	88.8	30.4	90.8	4.3	4.9	3.7	2.7
4	159.8	75.3	-37.6	-160.8	3.7	4.3	2.4	5.2
3	1.4	-112.9	-2.5	86.1	3.9	4.9	4.5	3.2

El compuesto **1**, *Tabla 23*, muestra dos conformaciones mayoritarias muy similares entre sí, donde la única diferencia apreciable es el signo del ángulo pseudodiedro de la glicina. En la conformación mayoritaria la glicina se encuentra orientada hacia atrás y en el otro caso hacia delante. Por otro lado hay que resaltar que la distancia  $\gamma_4$  ( $CO_{\beta\text{-lact}} \cdots HN_{\text{Arg}}$ ) es de 2.8–3.1 Å, distancia característica de un enlace de hidrógeno;<sup>173</sup> por lo que podemos concluir que el enlace de hidrógeno que hemos observado en el estudio de <sup>1</sup>H-RMN es el que forman el hidrógeno amídico de la arginina con el carboxilo de la  $\beta$ -lactama formando un giro  $\gamma$ .

En el caso del compuesto **7**, *Tabla 24*, además del cambio de orientación de la glicina se observa un cambio en el ángulo en la arginina. Estas dos conformaciones mayoritarias presentan una barrera energética mayor, no son convertibles a temperatura ambiente, y por esta razón se detectan ambas mediante <sup>1</sup>H-RMN.<sup>174</sup> En lo que al posible enlace de hidrógeno que se detecta mediante <sup>1</sup>H-RMN se refiere, podría tratarse del  $\beta_2$ , formado entre el hidrógeno amídico de la  $\beta$ -lactama y el carbonilo de la arginina (3.1 Å).

El compuesto **9**, *Tabla 25*, muestra una gran dispersión de conformaciones, no habiendo ninguna claramente mayoritaria; y en donde los ángulos pseudodiedros de todos los enlaces amida cambian de signo presentando todas las combinaciones posibles. Esta dispersión de conformaciones se observa experimentalmente en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN por el desdoblamiento de las señales amídicas.<sup>174</sup>

#### 4.2.5.3. Modelización de la interacción RGD/Integrina $\alpha_v\beta_3$ (*Docking*)

Una vez estudiada las posibles conformaciones que adoptan los diferentes compuestos, procedimos a realizar un estudio teórico de interacción con el centro activo de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Para realizar los estudios de *docking* se utilizó el programa *Autodock 4.1*. Se repitió el cálculo 100 veces y se agruparon en *clusters* en función de la energía.

Para realizar el *docking* se empleó el dominio extracelular *1I5g* sacado de la base de datos *Protein Data Bank*.<sup>76</sup>

<sup>173</sup> Los puentes de hidrógeno poseen una longitud de enlace característica entre 2.5 y 4 Å que depende de la geometría y de la distribución electrónica de los grupos moleculares implicados. En este caso, en los enlaces de hidrógeno entre amidas la distancia es de  $2.9 \pm 0.1$  Å.

<sup>174</sup> Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN registrados a diferentes temperaturas se encuentran en el apartado *Anexo* pág. 509.

A continuación se presentan la distribución de *clusters* de las moléculas cíclicas **Va**, **Vb**, **1**, **7** y **9** en función de su energía y población. Además se representan los *clusters* con mayor población y de menor energía; y se determinan las interacciones de la conformación más probable con el centro activo de la integrina.

Como se puede observar en las *Figuras 134–138*, en todos los casos encontramos energías de enlace negativas para todas las conformaciones posibles, por lo que la interacción ligando-receptor se da con facilidad. En lo que a la distribución se refiere en todos los casos se observan poblaciones superiores a 13 resultados, sumando más del 50% del total de las conformaciones en menos de 5 estructuras (exceptuando la molécula **Vb**).

En la mayoría de los *clusters* representados se observa una buena correlación; donde el carbonilo del ácido aspártico interactúa con el átomo de calcio 4001 de la subunidad  $\beta$  (próximo a la Ser123 y a la Ala218), situando el grupo básico guanidina de la arginina orientado hacia una zona de la subunidad  $\alpha$  cargada negativamente gracias a los residuos de Asp150, Asp218 y Ala149. De esta manera ambas cadenas de la integrina quedan unidas.

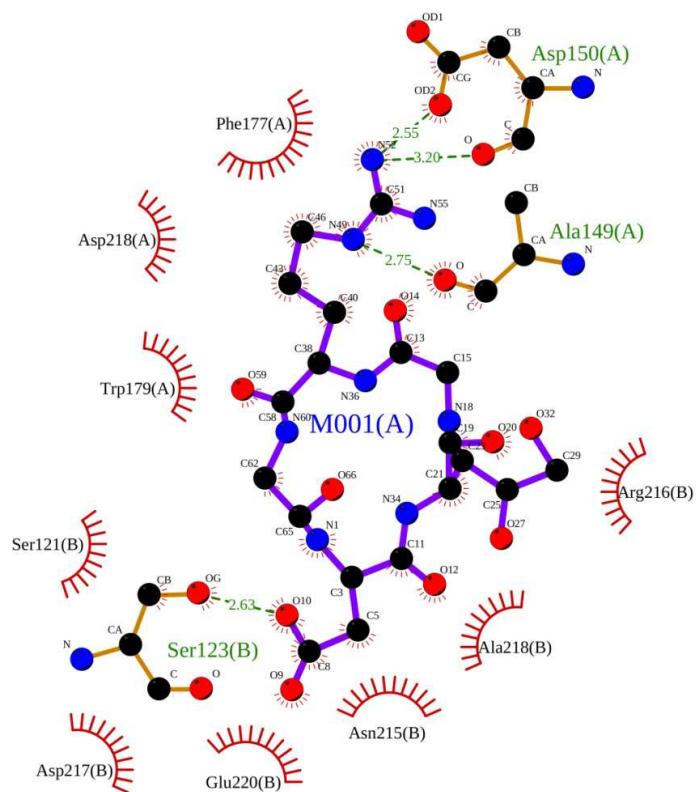
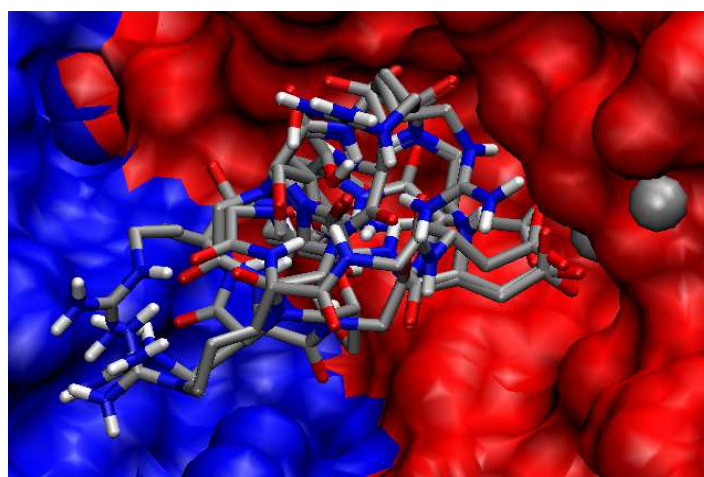
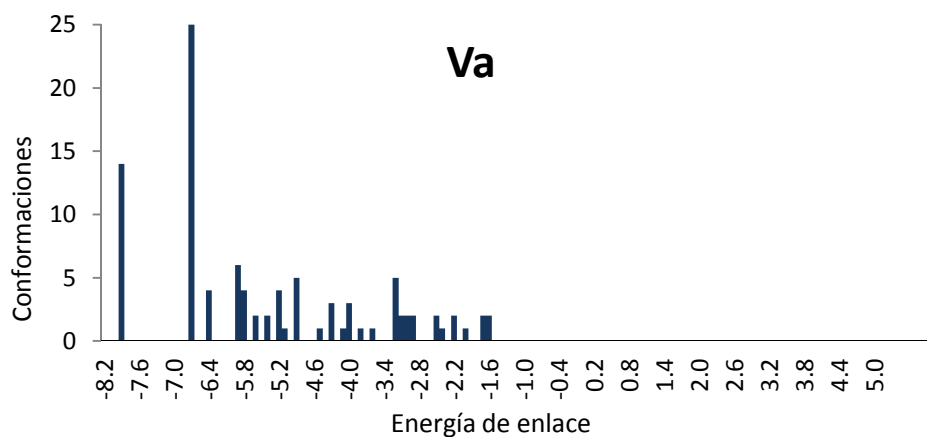


Figura 134. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto Va.

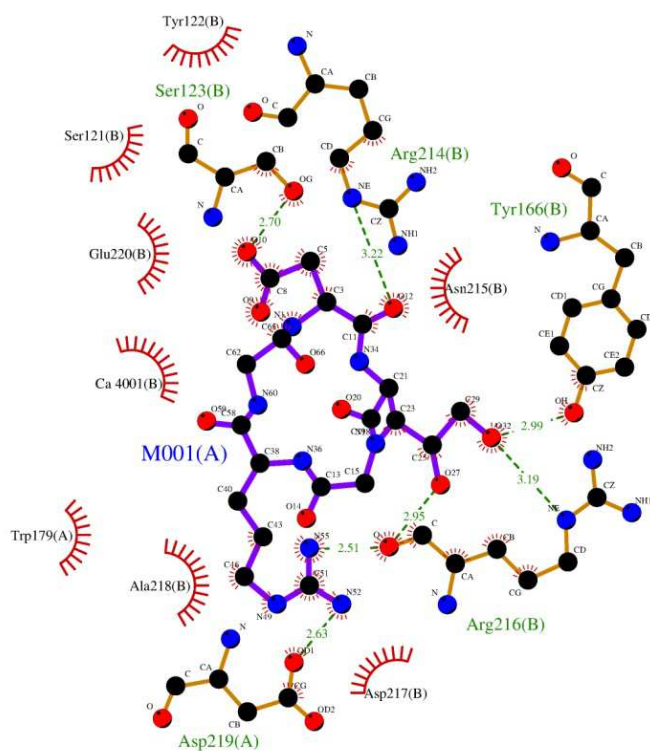
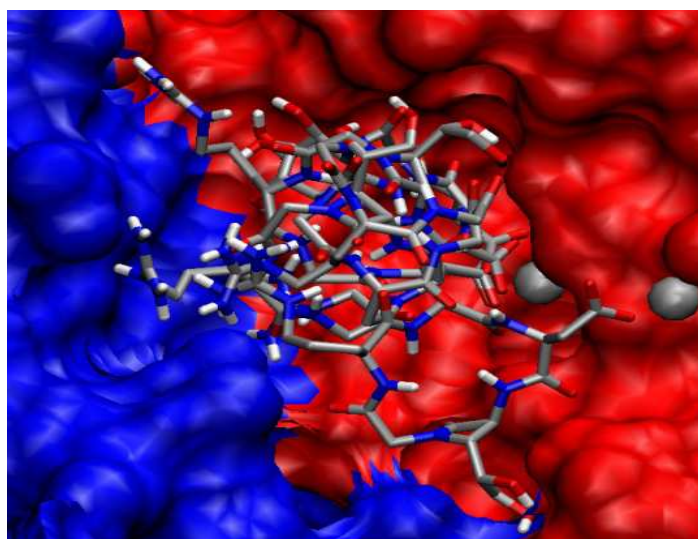
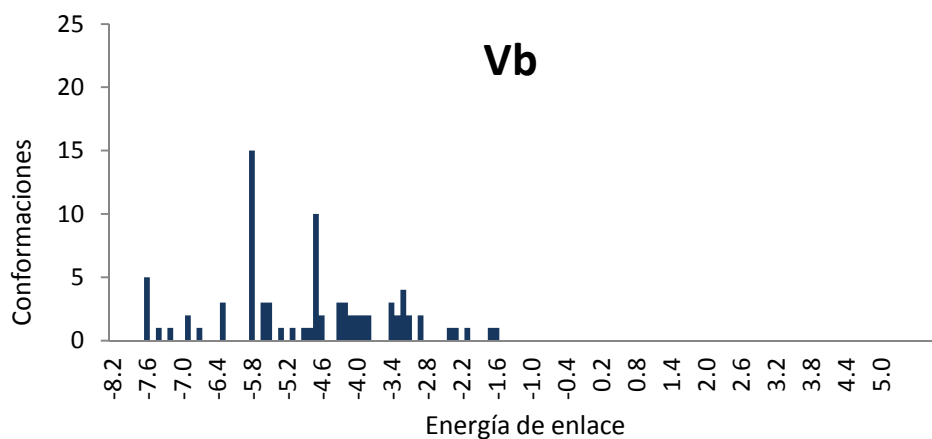


Figura 135. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto **Vb**.

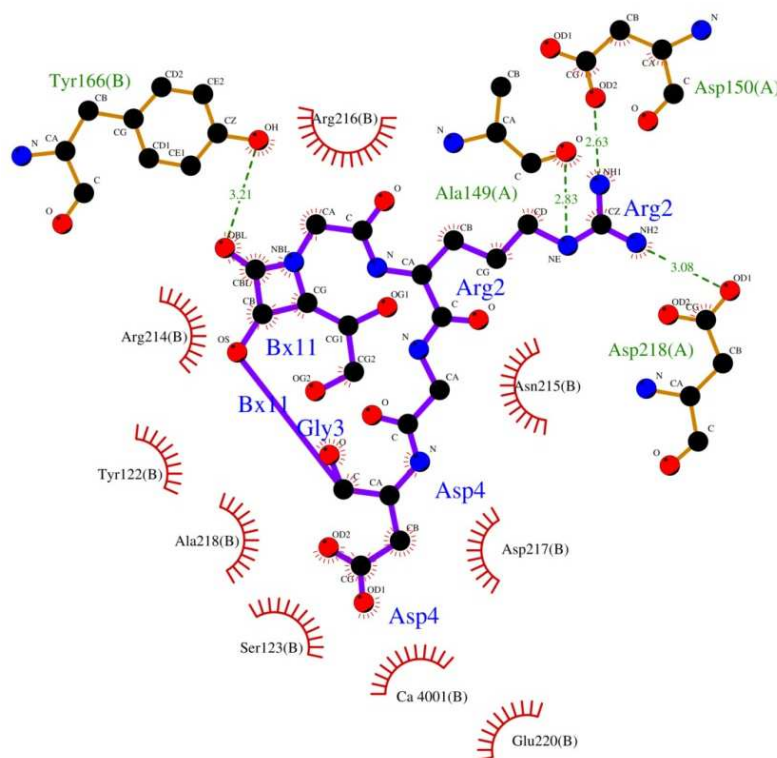
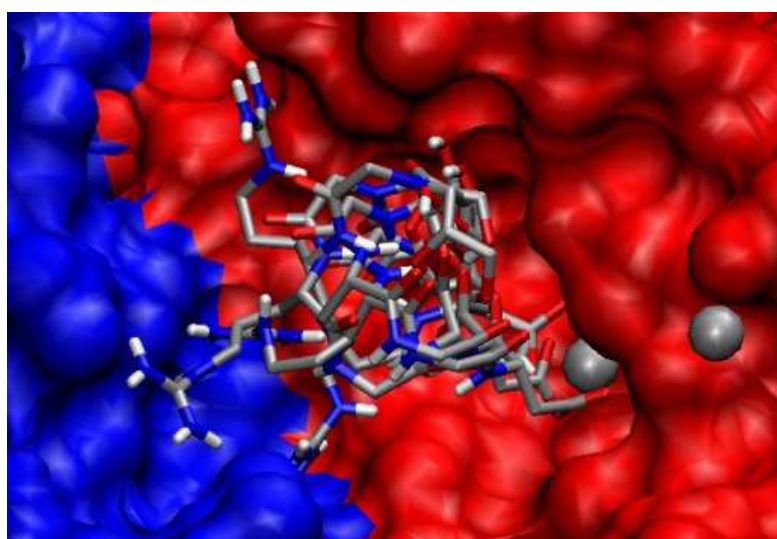
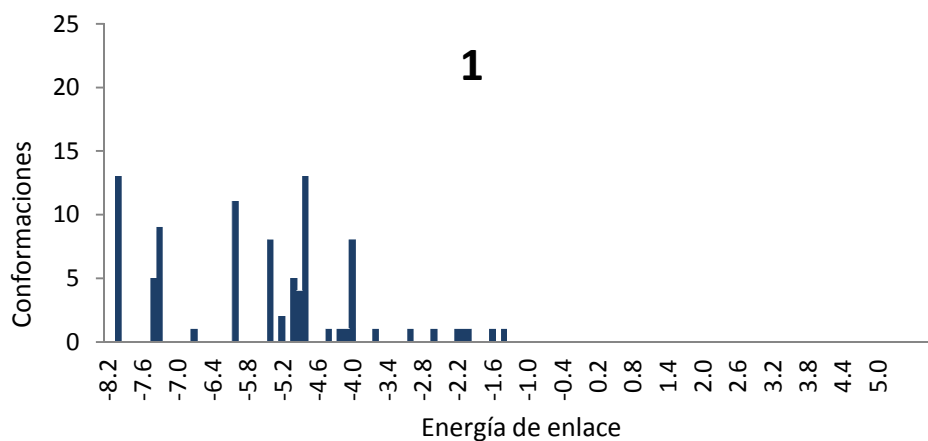


Figura 136. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 1.

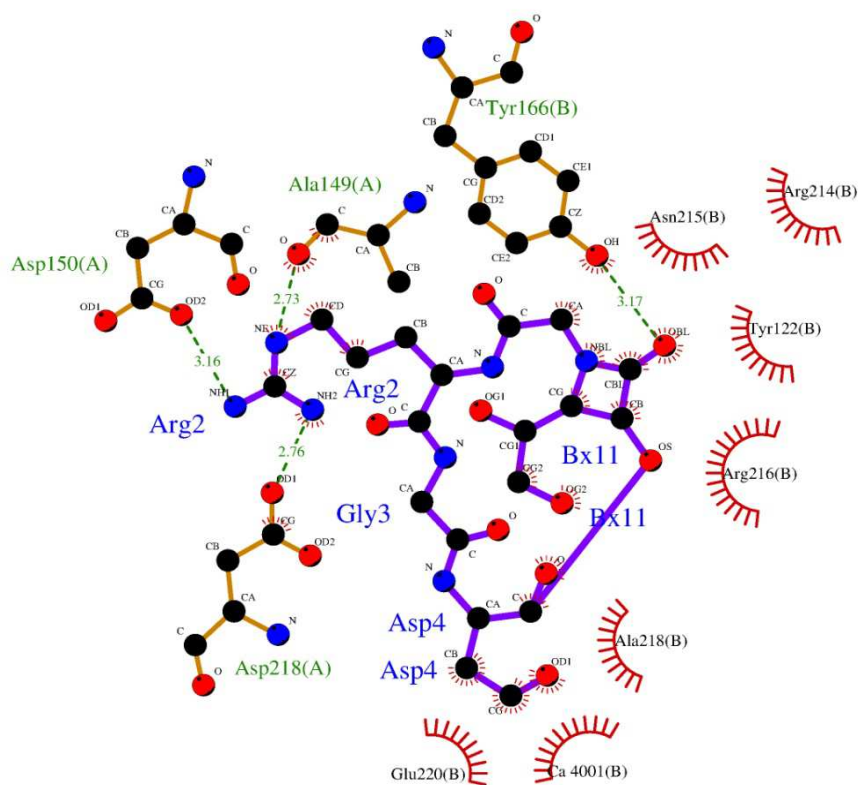
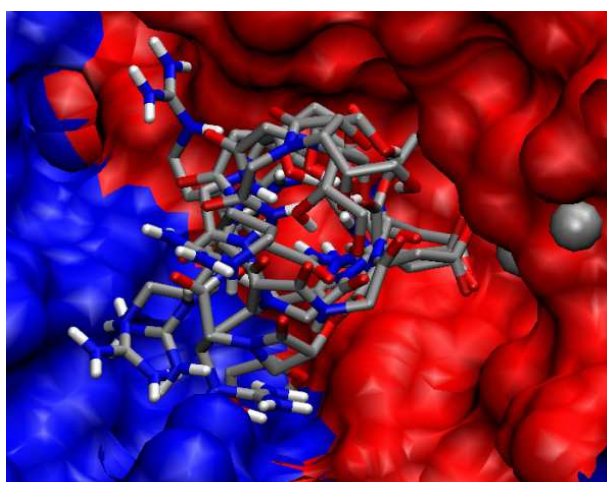
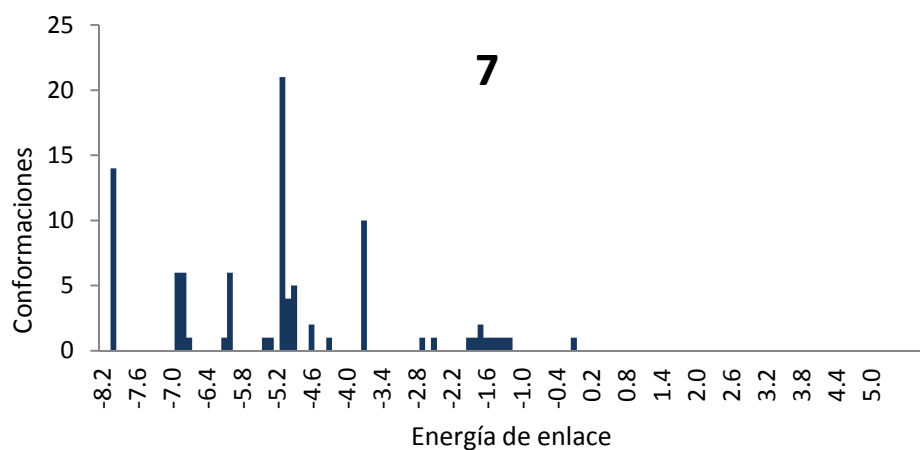


Figura 137. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 7.

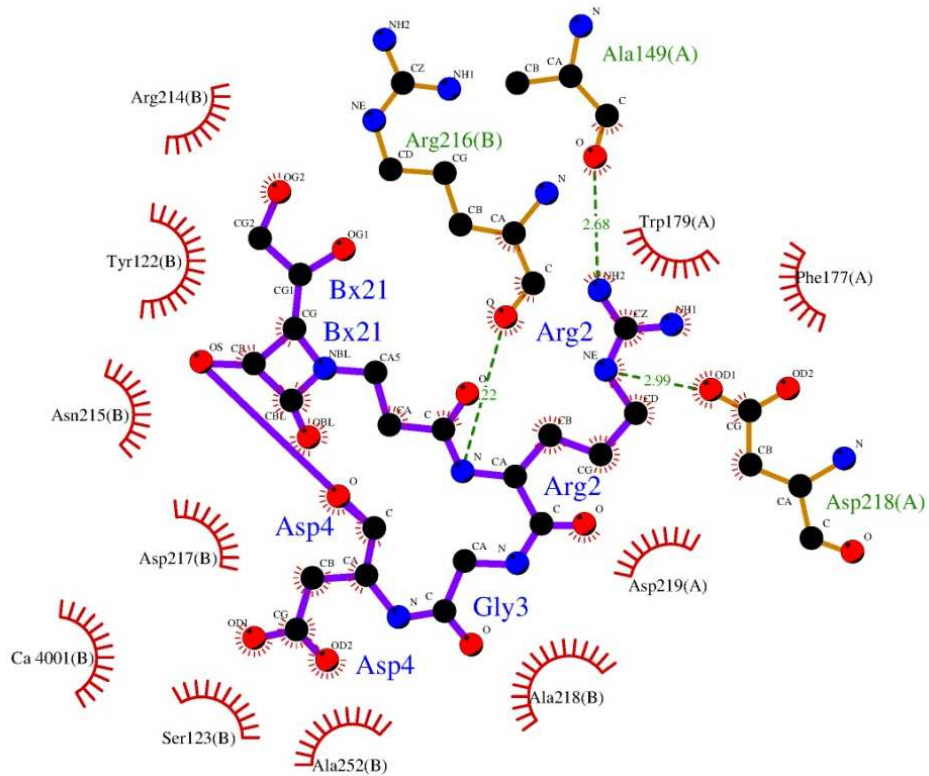
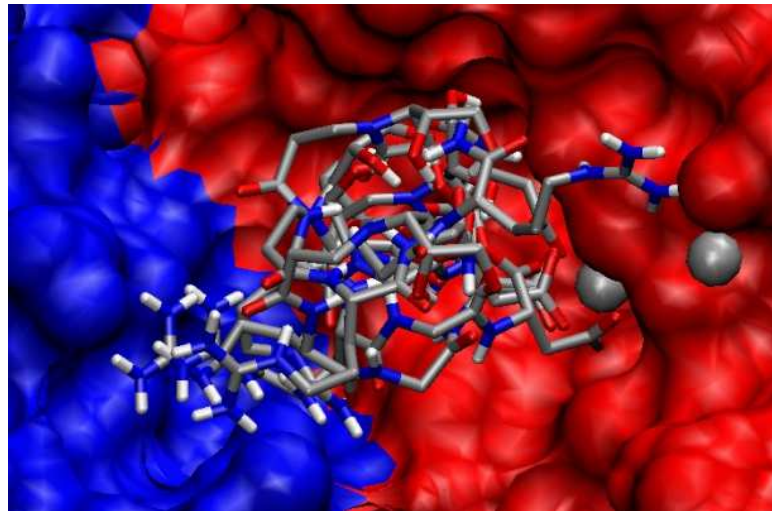
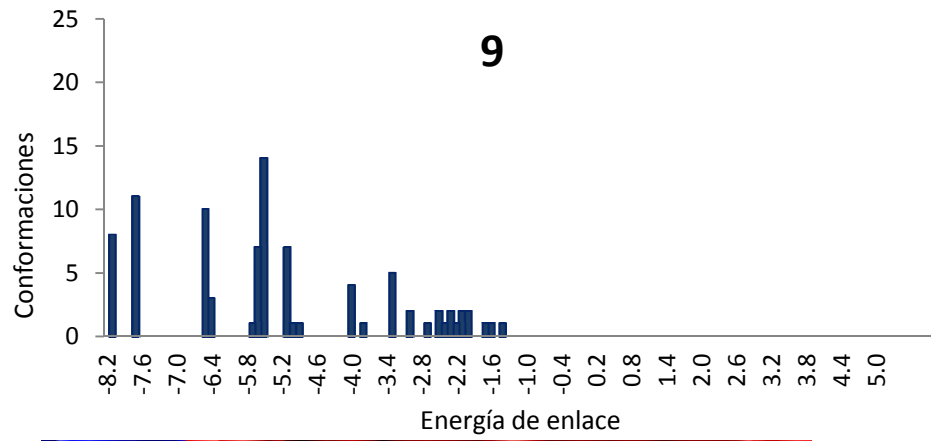


Figura 138. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 9.



#### 4.2.6. Comparación entre los análisis biológicos teóricos y experimentales

A continuación se calcularon las energías de enlace y de torsión y se determinaron los valores de energía de disociación teóricos ( $K_i$ )<sup>40</sup> para las moléculas **1**, **7** y **9**. Estos valores se compararon con los de las moléculas **Va**, **Vb** y Cilengitide y se contrastaron con los resultados experimentales conseguidos en el test de adhesión y el análisis de la expresión génica.

**Tabla 26.** Energías de enlace y de torsión y  $K_i$  de los compuestos cíclicos **Va**, **Vb**, **1**, **7** y **9**. Comparación de los resultados teóricos y experimentales.

Compuesto	Energía de enlace (Kcal)	Energía de torsión (Kcal)	$K_i$ ( $\mu$ M)	Orden de la capacidad inhibitoria			
				teórico	experimental		
					adhesión <sup>175</sup>		expresión génica <sup>176</sup>
					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	orden	
<b>Va</b>	-7.91	+2.98	1.58	4	3.38	5	4
<b>Vb</b>	-7.63	+2.98	2.56	5	1.23	4	3
<b>1</b>	-8.04	+2.98	1.27	3	0.61	1	1
<b>7</b>	-8.10	+2.98	1.15	2	1.12	2	5
<b>9</b>	-8.18	+2.98	1.01	1	2.46	3	2

Como se puede observar en la *Tabla 26* los resultados teóricos predicen un alto grado de interacción entre los ligandos sintéticos y la integrina  $\alpha_v\beta_3$  ( $K_i < 3 \mu$ M), prediciendo correctamente una leve mayor interacción para el caso de los miméticos sintetizados durante este proyecto (los depsipeptidomiméticos **1** y **9** y el peptidomimético **7**).<sup>177</sup>

<sup>175</sup> Para determinar el orden de la capacidad inhibitoria experimental según el test de adhesión se ha empleado el valor del IC<sub>50</sub> calculado.

<sup>176</sup> Para determinar el orden de la capacidad inhibitoria experimental según el test de expresión génica se han comparado los valores numéricos relativos del resultado del experimento.

<sup>177</sup> El Cilengitide muestra un valor de  $K_i$  teórico de 14 nM, valor más bajo dado que la estructura de la integrina se ha calculado mediante la cristalización del receptor en interacción con el Cilengitide.

En cuanto a la flexibilidad, aunque los resultados son muy semejantes, el estudio de *docking* predice una ligera mayor adaptación al receptor para los compuestos más flexibles **7** y **9**. En el caso del peptidomimético **7** esta mayor afinidad ligando/receptor coincide con los resultados de adhesión experimentales obtenidos; en cambio, en el caso de los depeptidos **1** y **9**, el nivel de afinidad es el inverso.

Hay que resaltar que aunque ni el test de adhesión ni los cálculos teóricos son capaces de predecir al 100% la eficacia real de cada compuesto, en el caso de los compuestos cíclicos sintetizados, la concordancia entre los datos teóricos y experimentales es elevada.

#### **4.2.7. Nuevos Objetivos**

Vistos los resultados biológicos de las moléculas acíclicas empleadas como “control negativo”, sin unidad de reconocimiento RGD, nos replanteamos nuevos objetivos y decidimos sintetizar una biblioteca de miméticos de cadena abierta análogos a los compuestos cíclicos conseguidos que presentaremos en el *Capítulo 2*.

## *CÁPITULO 2*

---

### **Miméticos de cadena abierta**



## ***Introducción del capítulo 2***

---



## 5. Capítulo 2: miméticos de cadena abierta

Establecidos los objetivos iniciales de la Tesis Doctoral, surgen otros en la dinámica de ensayos del planteamiento original. Un resultado inesperado, dentro de los ensayos de expresión génica, nos condujo a mitad del trabajo experimental a un conjunto de nuevos objetivos que nos parecieron importantes.

La expresión de esos nuevos objetivos queda plasmada en el presente capítulo.

### 5.1. Introducción

Como se ha descrito en el apartado de *Resultados y Discusión* de el capítulo 2, los miméticos de cadena abierta sin estructura formal RGD, compuestos por Asp- $\beta$ -lactama-Arg **17** y **18** muestran una actividad inhibitoria con un perfil de activación/desactivación similar al de los compuestos cíclicos descritos, aunque de menor magnitud que el Cilengitide y el resto de moléculas cíclicas sintetizadas en esta Tesis.

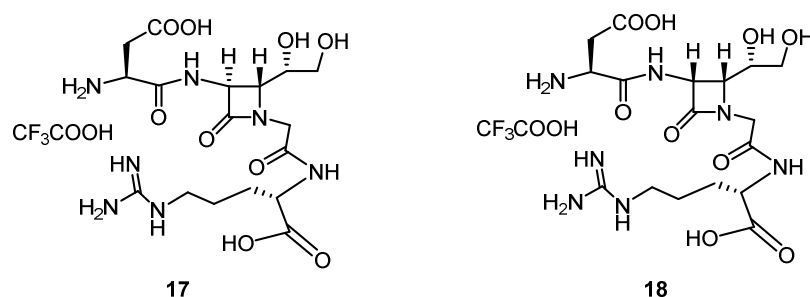
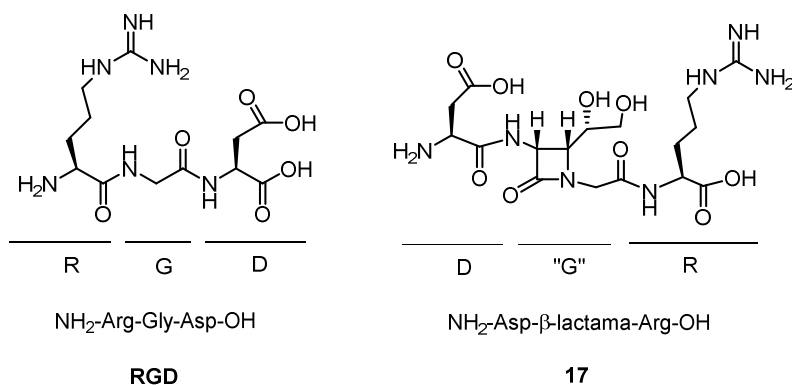


Figura 139. Miméticos de cadena abierta **17** y **18**.

Este hecho es interesante ya que no se esperaba actividad alguna en estas moléculas a causa de la rotura de la unidad de reconocimiento RGD. Analizando los resultados dedujimos que la  $\beta$ -lactama es un elemento estructural que puede inducir suficiente **restricción conformacional** dirigiendo los grupos de reconocimiento de manera adecuada sin necesidad del macrociclo, siendo posible su reconocimiento por los receptores en ausencia de la secuencia RGD.

La estructura de los compuestos de cadena abierta diseñados se podría considerar como una estructura **inversa de RGD**, donde la  $\beta$ -lactama juega el papel de mimético de la glicina.

Un péptido inverso,<sup>178</sup> es un isómero del péptido al que representa cuya dirección de la secuencia de aminoácidos es la inversa. Los péptidos inversos, al tener una disposición espacial similar al de sus isómeros, pueden tener una actividad del mismo orden o incluso superior a la de los ligando naturales a los que representan.<sup>179</sup>



**Figura 140.** Comparación entre la estructura **RGD** y la molécula **17**. Estructura inversa.

Estas moléculas, de presentar respuestas génicas similares a las moléculas sintetizadas en el *Capítulo 2* de la presente Tesis Doctoral, contarán con una gran ventaja: son más sencillas de sintetizar y se consiguen con mejores rendimientos. Además, este tipo de moléculas son más versátiles sintéticamente hablando, ya que se podrían realizar los cambios que se consideren oportunos sin tener en cuenta las limitaciones que impone la etapa de ciclación.

<sup>178</sup> Goodman, M.; Chorev, M.; *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 1–7.

<sup>179</sup> Algunos ejemplos de péptidos inversos de la estructura RGD: a) Liu, Y.; Mei, L.; Yu, Q.; Zhang, Q.; Gao, H.; Zhang, Z.; He, Q.; *Amino Acid* **2015**, *47*, 2533–2539. b) Trabocchi, A.; Menchi, G.; Danieli, E.; Bianchini, F.; Potenza, D.; Cini, N.; Bottoncetti, A.; Raspanti, S.; Pupi, A.; Guarna, A.; *Amino Acids* **2010**, *38*, 329–337.



## ***Objetivos del capítulo 2***

---



## 5.2. Objetivos del capítulo 2

### 5.2.1. Síntesis de miméticos de cadena abierta de los ligandos naturales de la integrina $\alpha_v\beta_3$

En este capítulo se continua con la síntesis y estudio conformacional y biológico de compuestos miméticos de los ligandos naturales de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ ; para poder controlar el proceso de la angiogénesis, inhibiéndolo, e influyendo de esta manera el crecimiento y la propagación de tumores cancerosos. Pero esta vez las moléculas objetivo son miméticos de cadena abierta.

La inesperada demostración de actividad de los compuestos de cadena abierta **17** y **18** nos llevó a plantearnos la síntesis de una pequeña biblioteca de miméticos con esta clase de estructuras en aras de estudiar la generalidad de dichos compuestos y sus posibilidades inhibitorias. Para ello nos propusimos como objetivo sintetizar análogos de cadena abierta de las moléculas cíclicas que habíamos conseguido; y decidimos sintetizar tanto tetrapéptidos sin glicina (**19–21**) como sus análogos pentapeptídicos con glicina (**22–26**) descritos en el *Esquema 68*.

### 5.2.2. Evaluación biológica

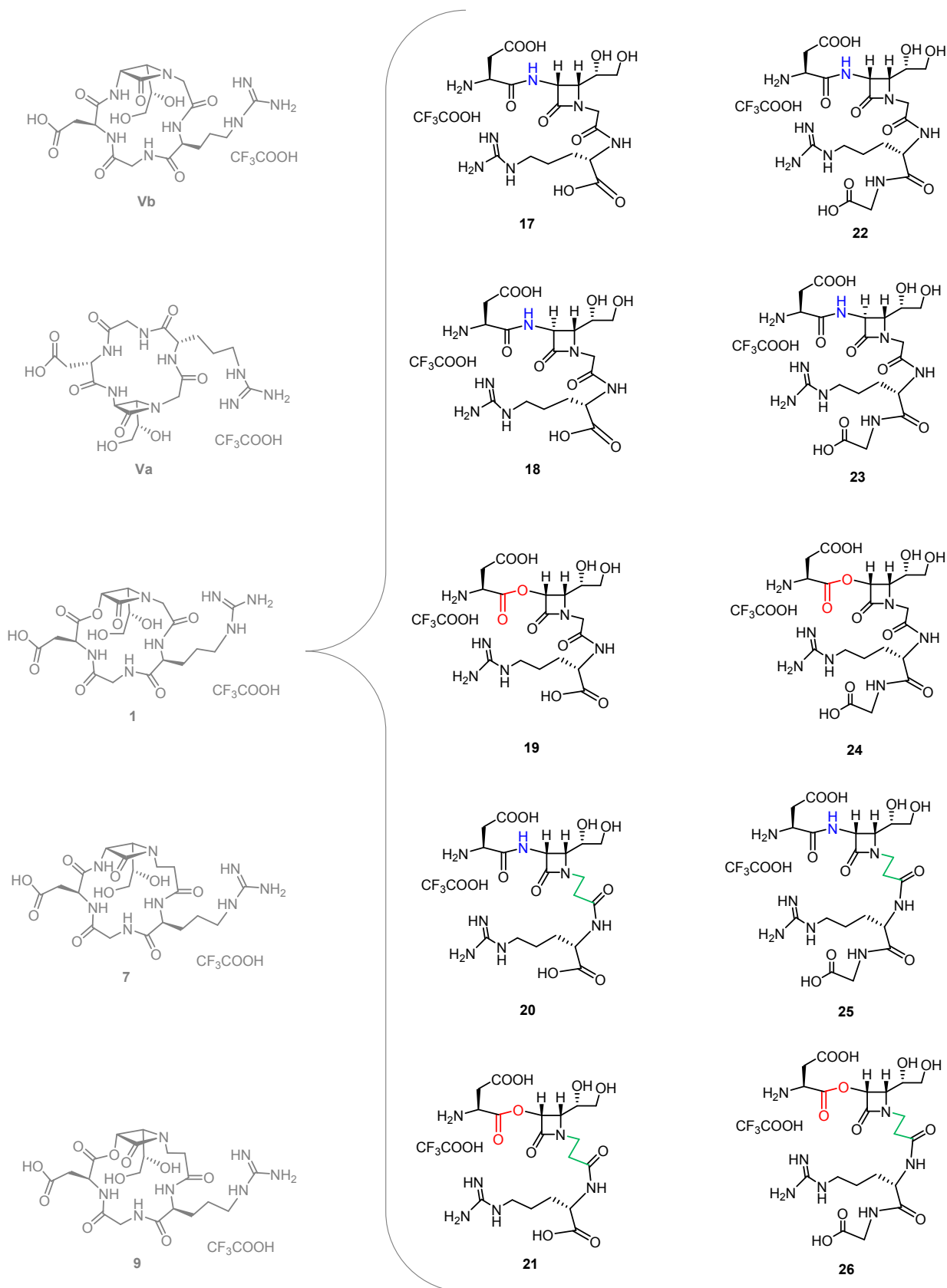
Una vez sintetizadas y caracterizadas todas estas moléculas su actividad biológica será evaluada mediante un análisis de expresión génica cualitativo para determinar su capacidad de inhibir la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Este experimento se realizará mediante la técnica de *microarrays* de ADNc empleando células endoteliales HUVEC humanas. Los datos obtenidos se confirmarán mediante un análisis de expresión génica cuantitativo mediante la técnica de la PCR y se compararán con los resultados obtenidos anteriormente en el experimento de *array*. Además también se realizará un test de la inhibición de la adhesión cásico y se medirá la supervivencia de las células.

### 5.2.3. Estudio conformacional

Con el fin de aproximarnos a las conformaciones mayoritarias en disolución de los ciclopéptidos se llevará a cabo un análisis conformacional mediante cálculos teóricos restringidos a través de mediciones de  $^1\text{H-RMN}$  y posteriores estudios mediante *docking* de interacción con el receptor.

Este estudio conformacional permitiría, por un lado, estudiar la conformación que adoptan los peptidomiméticos sintetizados, determinando así la disposición espacial de los grupos de interacción con el receptor; y por otro lado, nos permitiría estudiar la interacción del compuesto con el centro activo de la integrina, dándonos información sobre la relación estructura/actividad.

## Objetivos



**Esquema 68.** Moléculas anteriormente sintetizadas en el grupo de investigación **Va** y **Vb**. Moléculas sintetizadas en el *Capítulo 1* **1**, **7**, **9**, **17** y **18**. Moléculas objetivo del *Capítulo 2* **19–26**.



## ***Resultados y discusión del capítulo 2***

---





### 5.3. Resultados y discusión

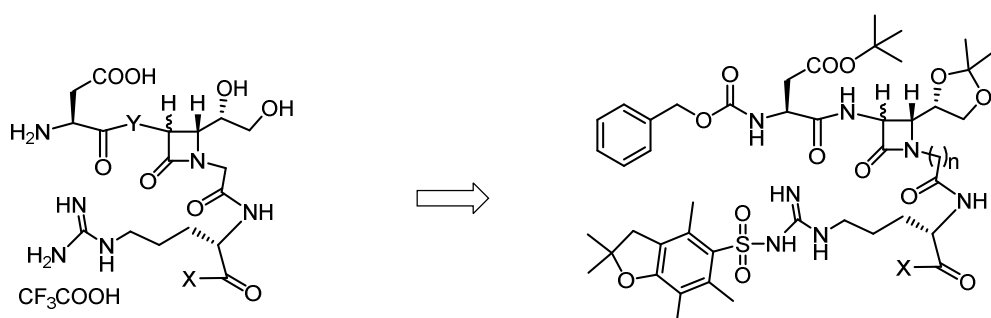
En el siguiente apartado se detalla paso a paso, siguiendo el esquema descrito en el apartado de *Objetivos* del *Capítulo 2*, el trabajo experimental realizado durante la síntesis de los compuestos de cadena abierta.

A continuación se expone el análisis conformacional de las moléculas objetivo preparadas y para terminar, se detallan los resultados biológicos obtenidos en los ensayos de expresión génica.

#### 5.3.1. Plan de síntesis

Para la síntesis de las moléculas objetivo **22** y **23** se pensó en partir de los compuestos **2.8** y **4.8** respectivamente, a los que se les acoplaría el dímero arginina-glicina **1.10**, consiguiendo así los precursores lineales **22.11** y **23.11** (*Esquema 70*).

Para sintetizar las moléculas objetivo **19–21** y **24–26**, se pensó en partir de los precursores lineales sintetizados en el *Capítulo 2*, **3.11**, **11.11**, **13.11**, **1.11**, **7.11** y **9.11** respectivamente (*Esquema 69*).



X = OH, Y = O, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **19**  
 X = OH, Y = NH, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **20**  
 X = OH, Y = O, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **21**  
 X = NH-Gly-OH, Y = NH, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **22**  
 X = NH-Gly-OH, Y = NH, n = 1, H<sup>α<sub>S</sub></sup>: **23**  
 X = NH-Gly-OH, Y = O, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **24**  
 X = NH-Gly-OH, Y = NH, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **25**  
 X = NH-Gly-OH, Y = O, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **26**

X = OBn, Y = O, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **3.11**  
 X = OBn, Y = NH, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **11.11**  
 X = OBn, Y = O, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **13.11**  
 X = NH-Gly-OBn, Y = NH, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **22.11**  
 X = NH-Gly-OBn, Y = NH, n = 1, H<sup>α<sub>S</sub></sup>: **23.11**  
 X = NH-Gly-OH, Y = O, n = 1, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **1.11**  
 X = NH-Gly-OBn, Y = NH, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **7.11**  
 X = NH-Gly-OBn, Y = O, n = 2, H<sup>α<sub>R</sub></sup>: **9.11**

**Esquema 69.** Retrosíntesis de los compuestos de cadena abierta.

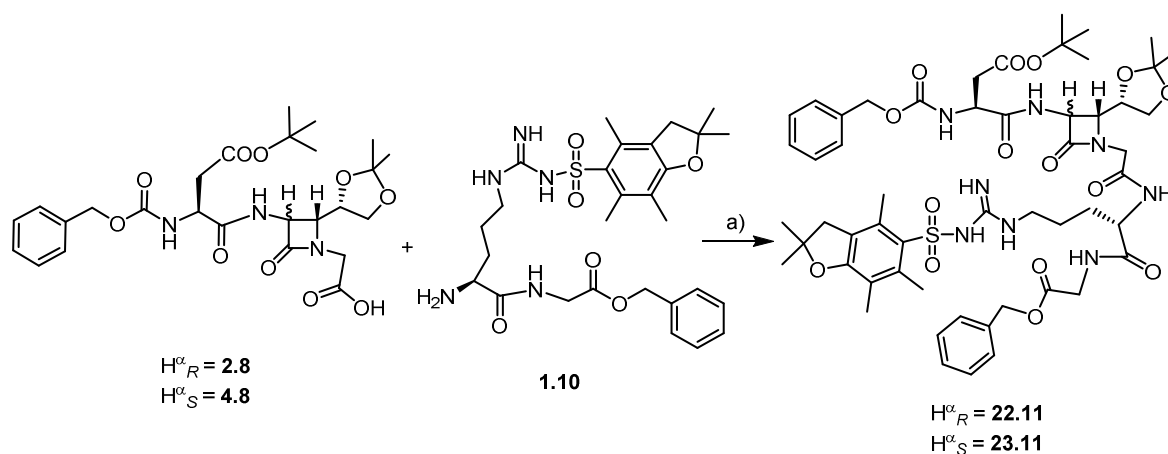
Para la obtención de los productos objetivo finales se pensó en la desprotección de los precursores mediante dos reacciones consecutivas: en primer lugar la eliminación de los grupos benciloxilo y Cbz mediante hidrogenólisis catalizada

por paladio y en segundo lugar la desprotección del resto de los grupo protectores en medio ácido empleando anhídrido de TFA y Et<sub>3</sub>SiH.

### 5.3.2. Síntesis de los miméticos de cadena abierta

#### 5.3.2.1. Síntesis de los precursores lineales 22.11 y 23.11

El acoplamiento entre los Cbz-Asp-NH-β-lactamas-CH<sub>2</sub>-COOH **2.8** (*cis*) y **4.8** (*trans*) con la arginina **1.10** se llevó a cabo empleando los agentes de acoplamiento EDC·HCl y HOBT en presencia de TEA, dando como resultado los precursores lineales **22.11** y **23.11**, en ambos casos en forma de sólido blanco tras su purificación mediante columna de gel de sílice ácida.



**Esquema 70.** Formación de los precursores **22.11** y **23.11**. a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (70–76%).

En las *Figuras 141–149* se pueden observar las señales correspondientes a los protones de los cuatro enlaces amida que poseen ambas moléculas (H26, H24, H7 y H20) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los Cα de los aminoácidos contiguos (H25, H1, H8 y H21).

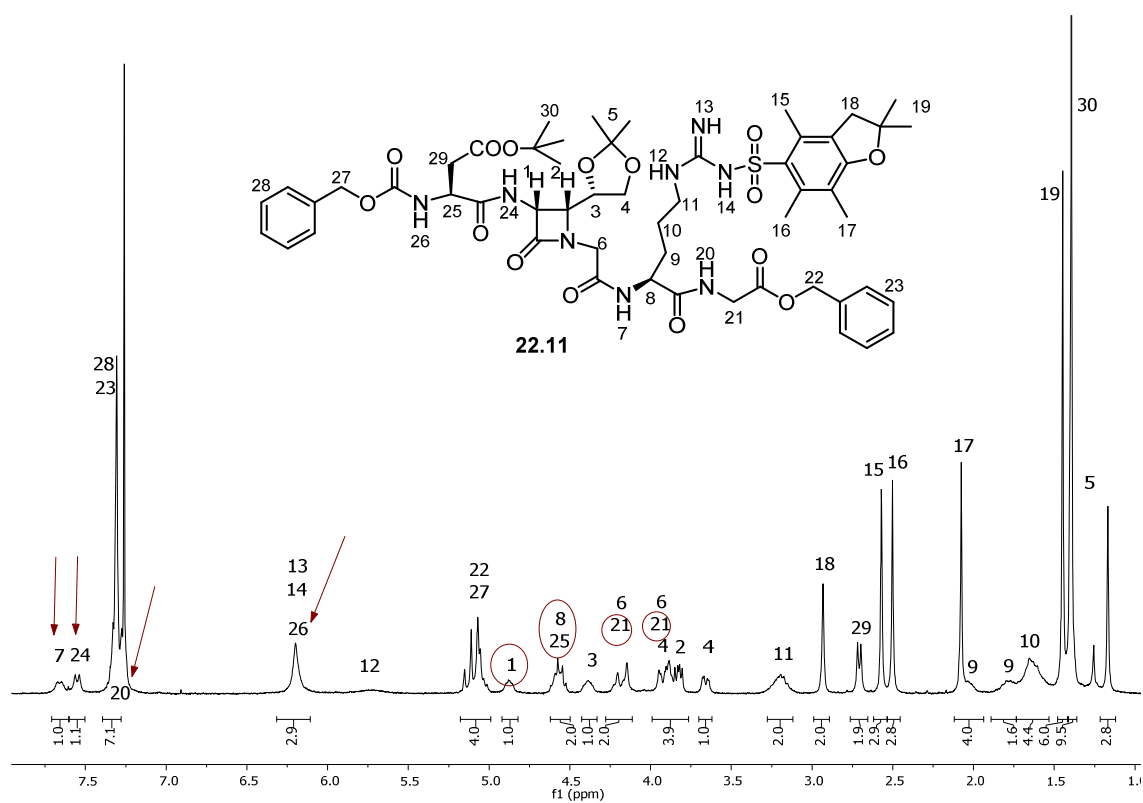


Figura 141. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 22.11.

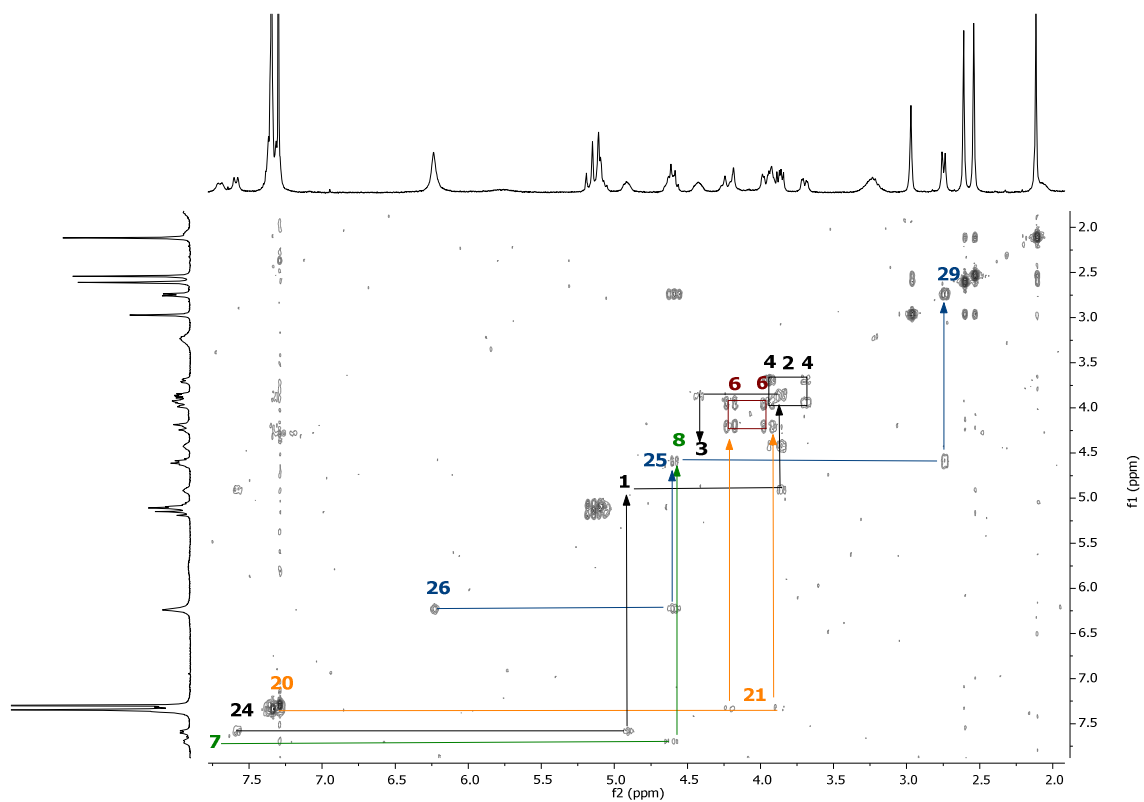


Figura 142. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 22.11.

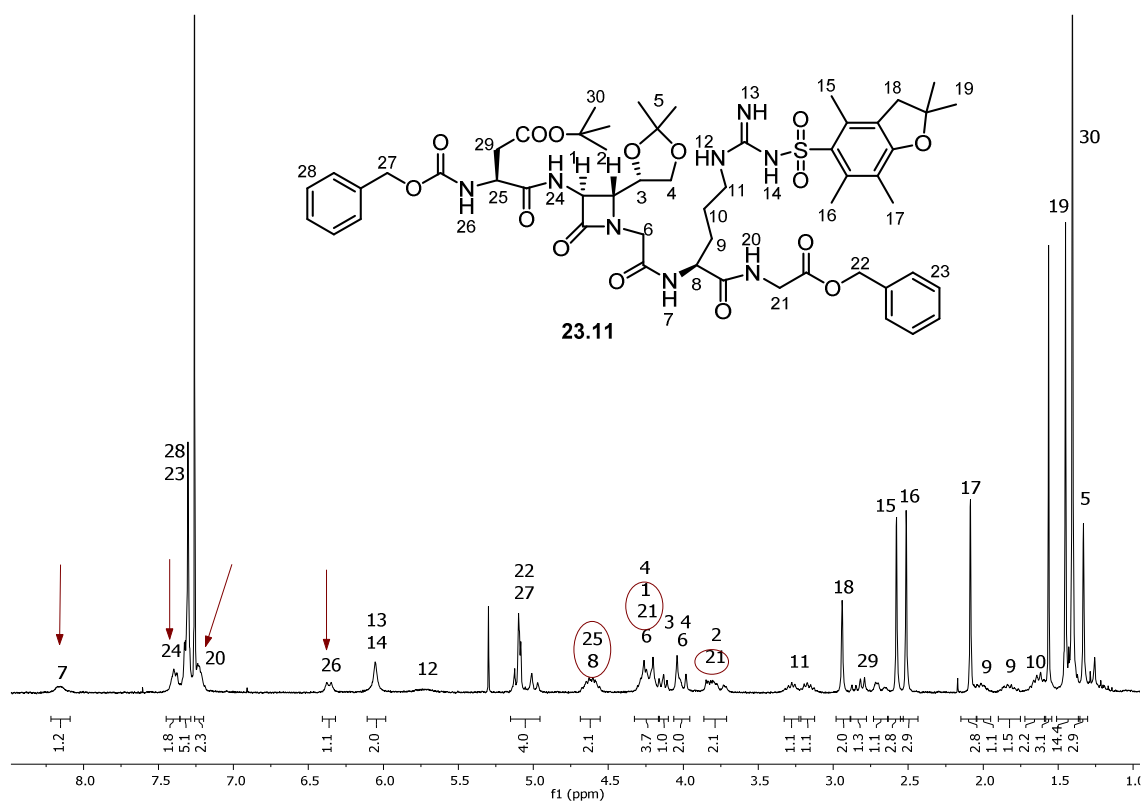


Figura 143. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **23.11**.

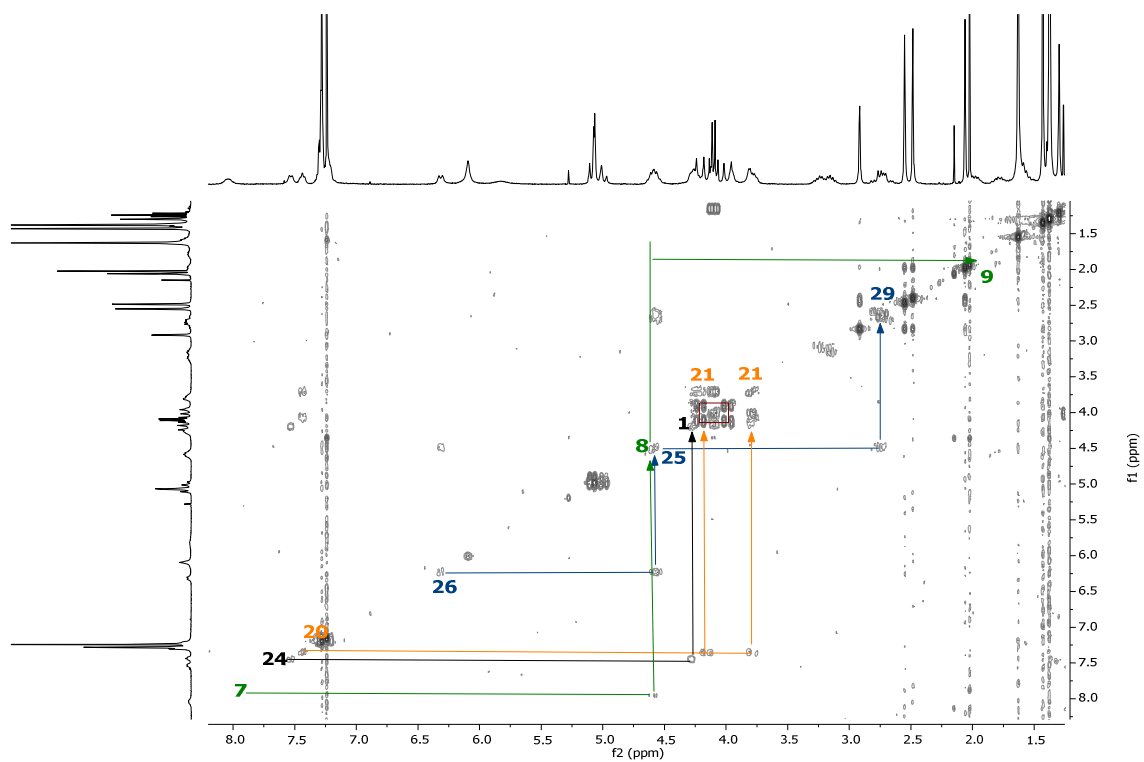
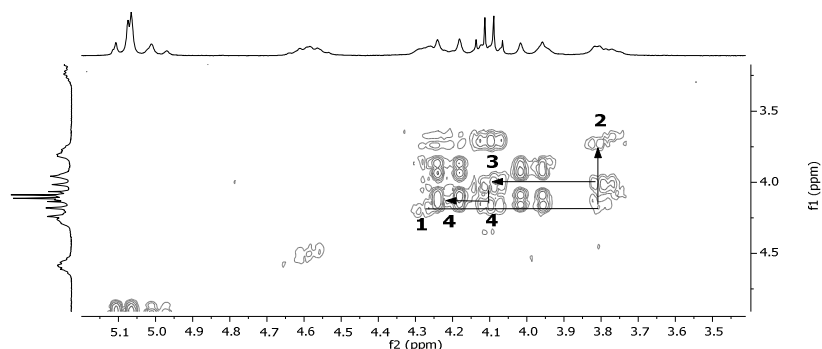


Figura 144. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **23.11**.



**Figura 145.** COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **23.11** aumentado.

### 5.3.2.2. Obtención de los péptidos de cadena abierta **20**, **22**, **23** y **25**

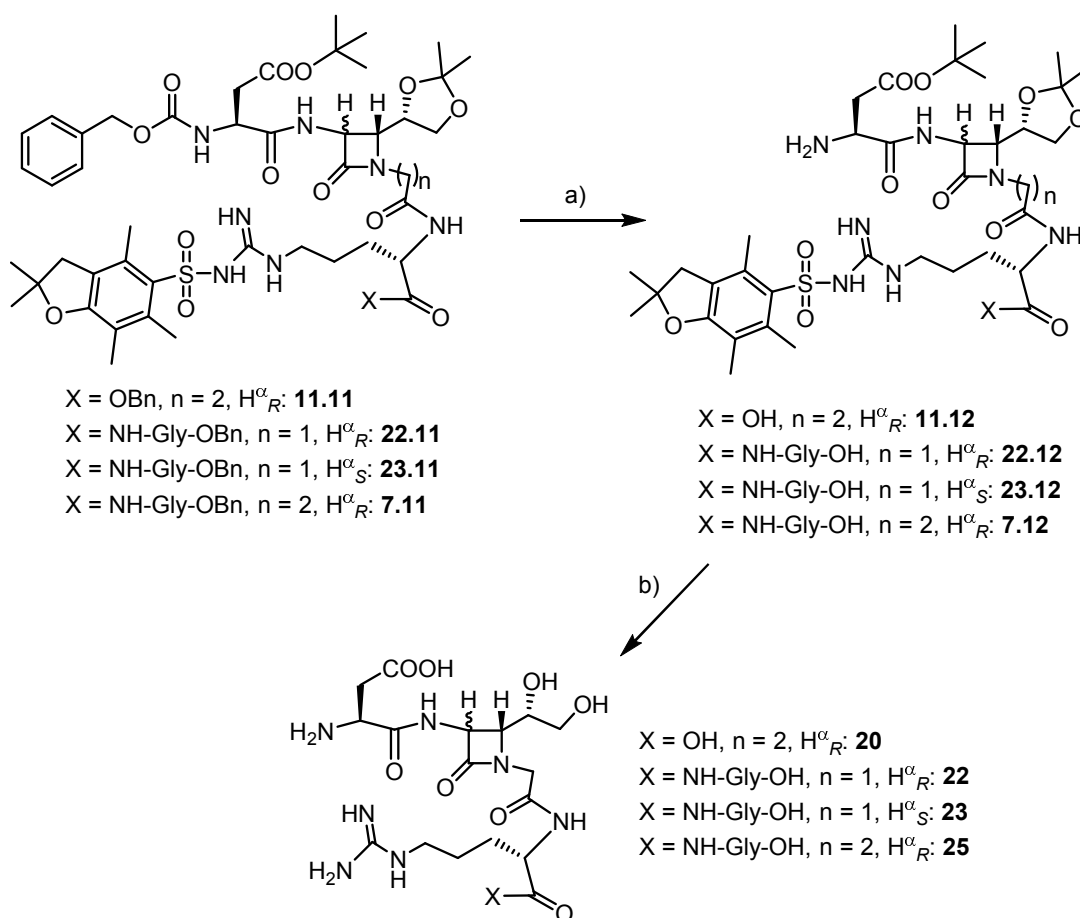
En primer lugar se llevó a cabo la desprotección de los peptidomiméticos sin enlaces éster. Para ello se siguió el procedimiento sintético empleado en el caso de los péptidos **17** y **18** partiendo de los compuestos **11.11**, **22.11**, **23.11** y **7.11**; es decir, en primer lugar se llevó a cabo la eliminación de los grupos benciloxilo y Cbz mediante hidrogenolisis catalizada por paladio y en segundo lugar la desprotección del resto de los grupo protectores en medio ácido empleando anhídrido de TFA y  $\text{Et}_3\text{SiH}$ .

Todos los productos se consiguieron en forma de sólido blanco tras su precipitación con diisopropil éter y se caracterizaron mediante RMN (*Figuras 146–153*).

Las masas exactas encontradas resultaron coincidir con las masas esperadas en todos los casos:

**Tabla 27.** UPLC-MS de los compuestos **20**, **22**, **23** y **25**.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ $\text{H}^+$ )	Masa encontrada (m/z) (+ $\text{H}^+$ )
<b>20</b>	489.2183	490.2257	490.2257
<b>22</b>	532.2241	533.2319	533.2322
<b>23</b>	532.2241	533.2319	533.2324
<b>25</b>	546.2398	547.2476	547.2473



**Esquema 71.** Desprotección exhaustiva y obtención de los productos objetivo **20**, **22**, **23** y **25**. a)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t. a., 16 h. b)  $\text{Et}_3\text{SiH}$ , Anhídrido de TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 4\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h. (Rto. global del 75%)

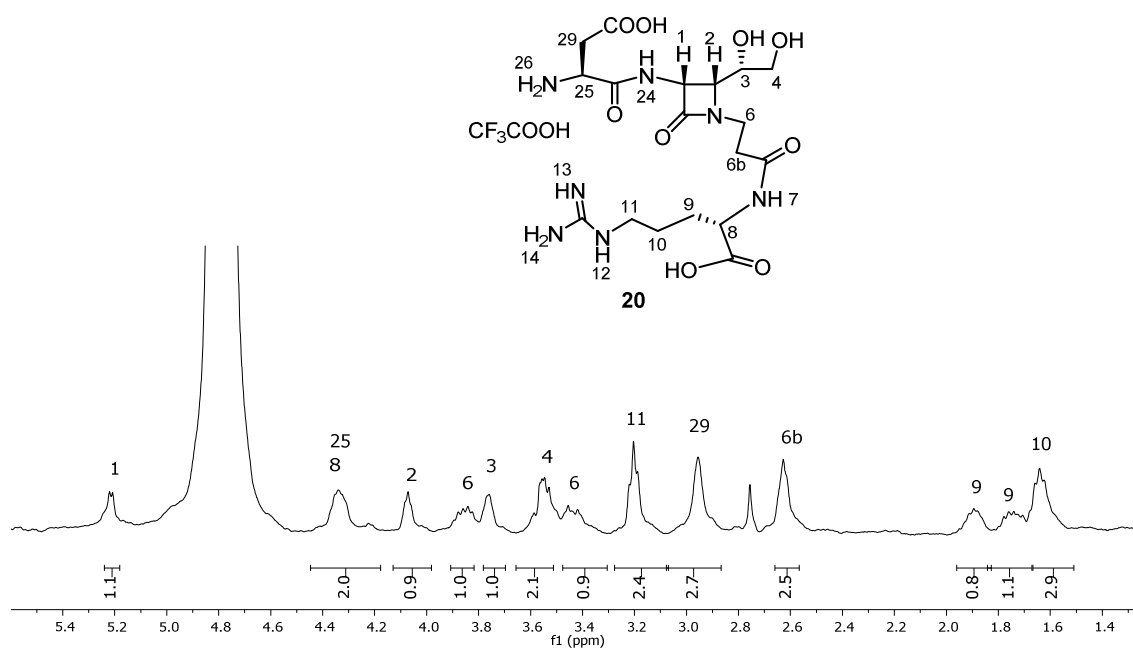


Figura 146. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **20**.

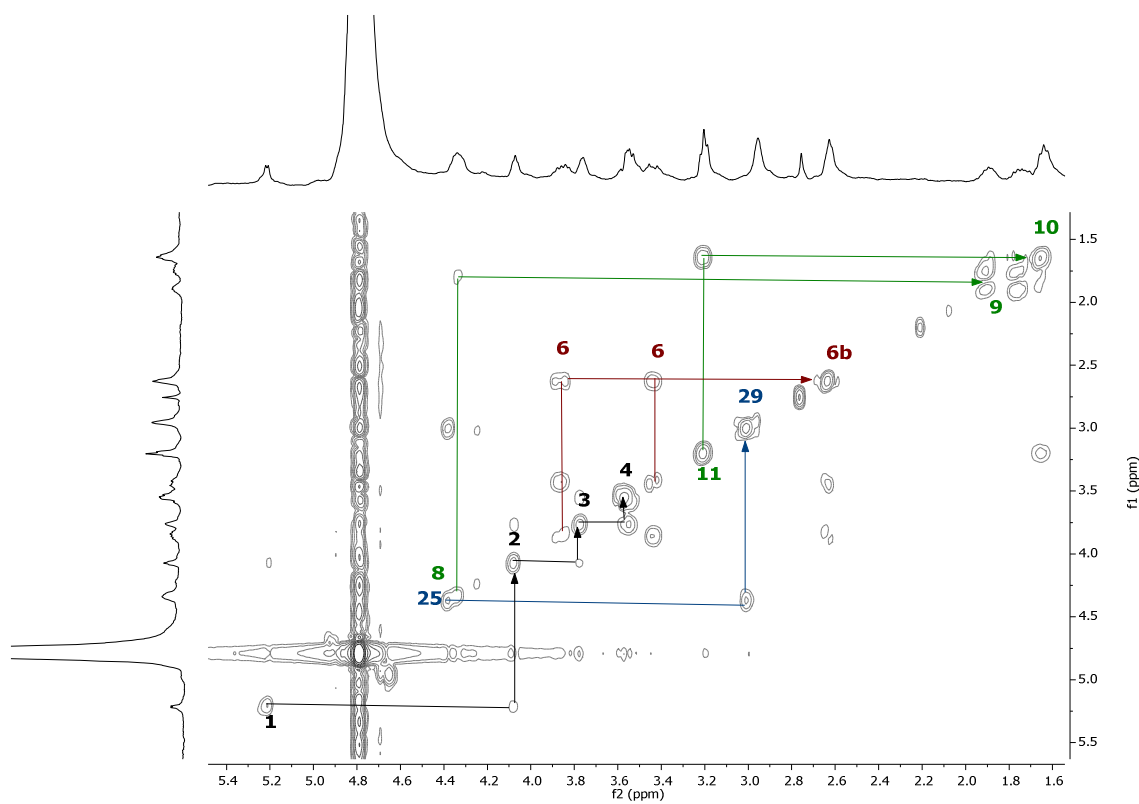


Figura 147. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **20**.

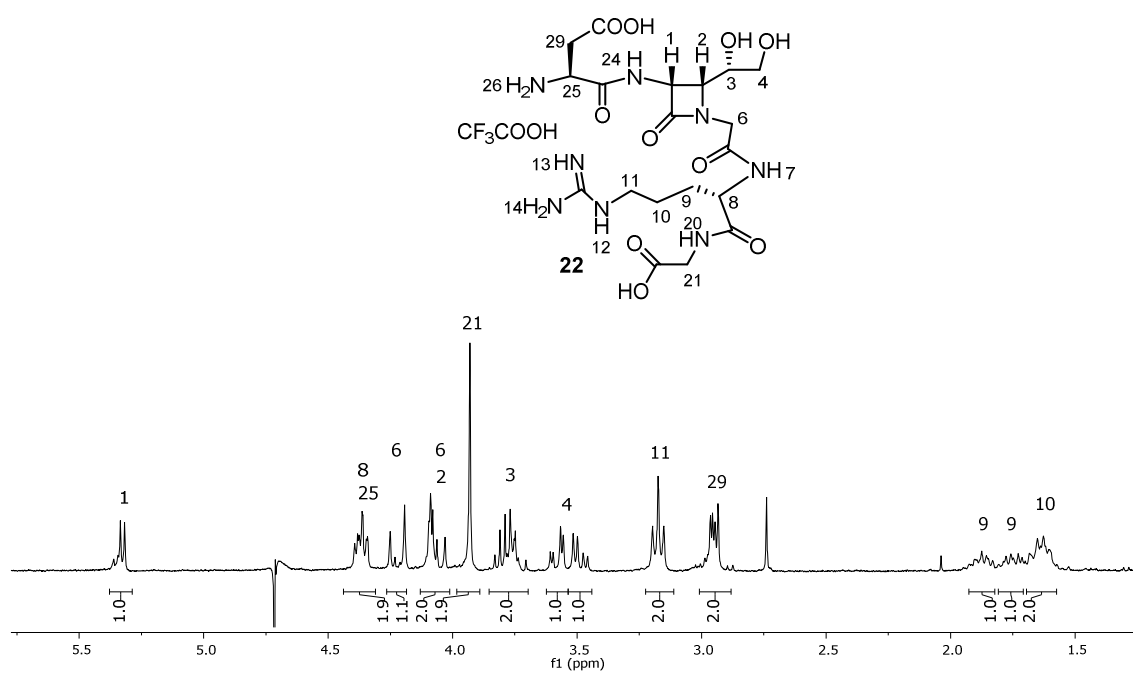


Figura 148. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **22**.

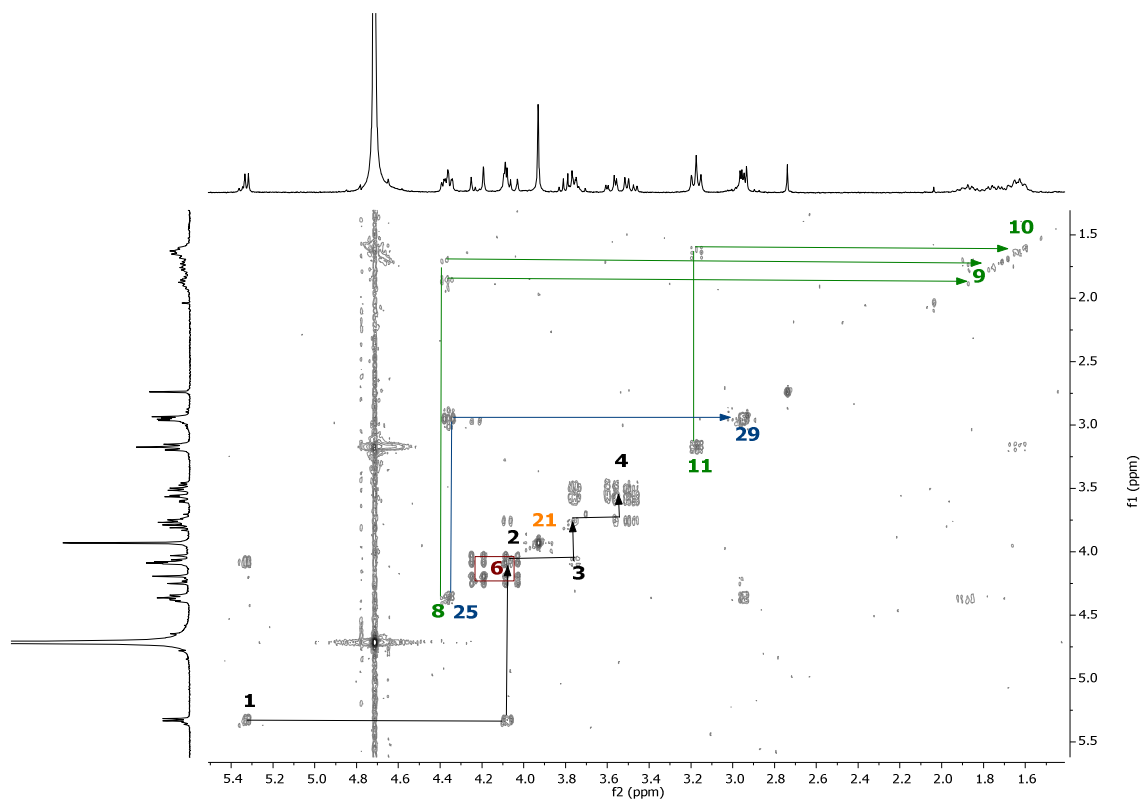


Figura 149. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **22**.



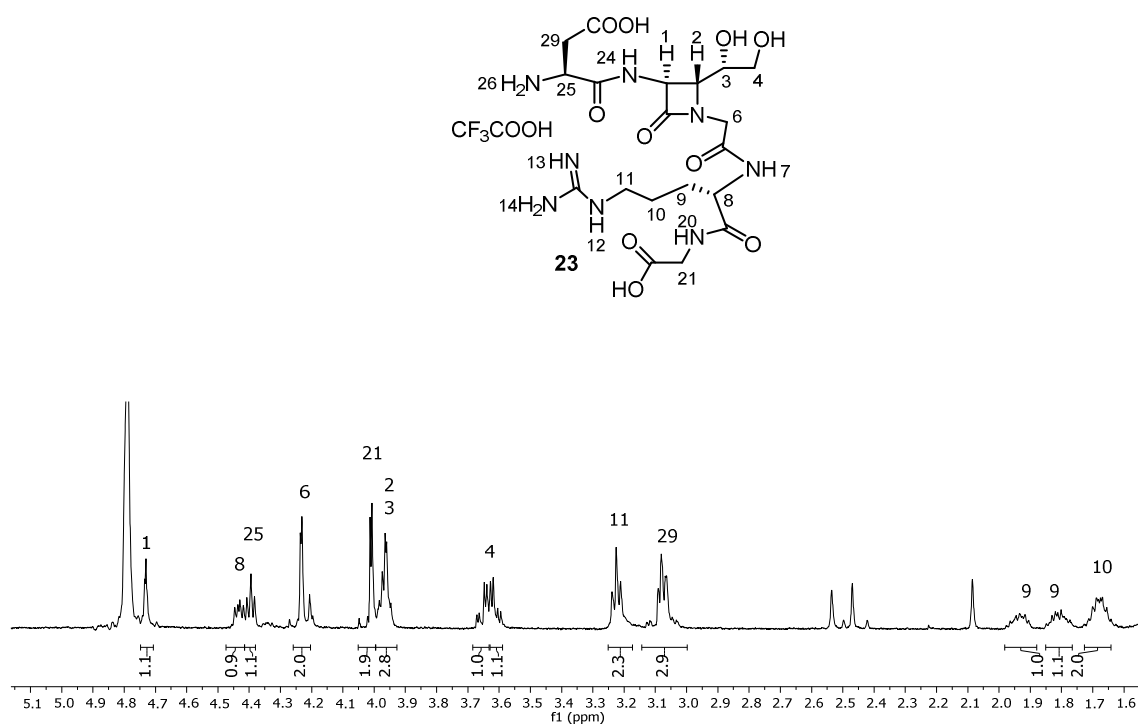


Figura 150. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **23**.

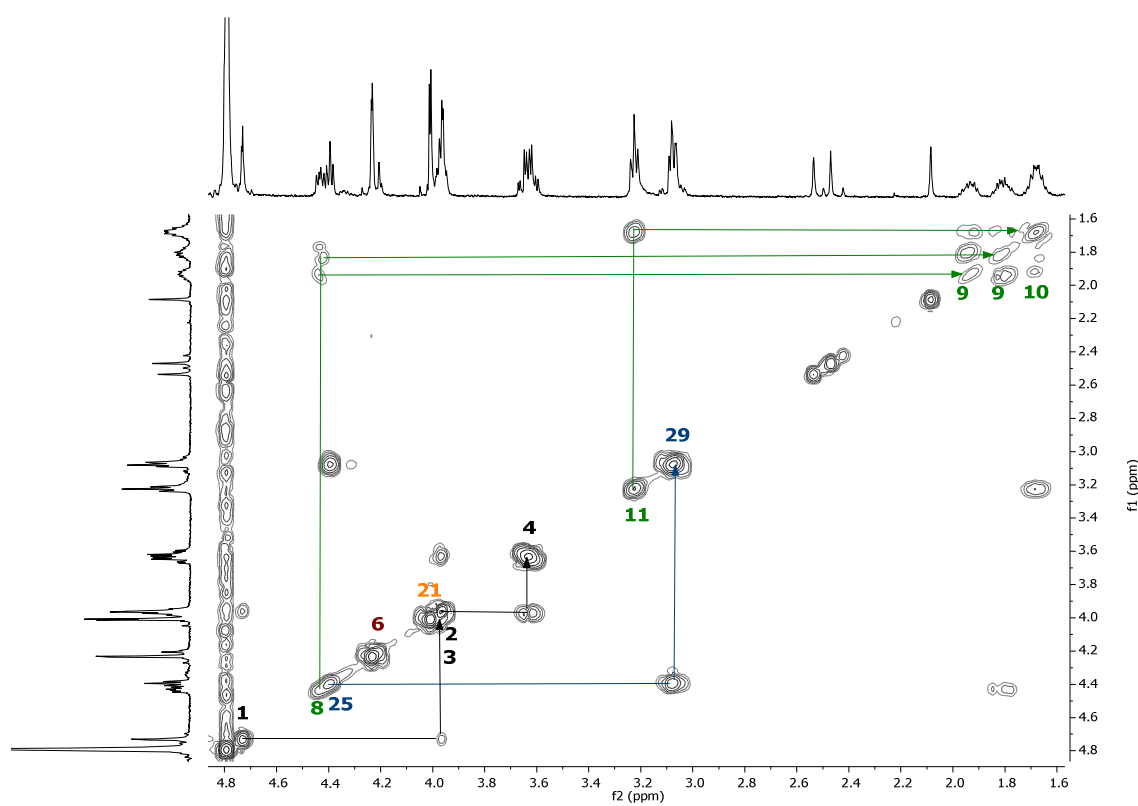


Figura 151. COSY (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **23**.

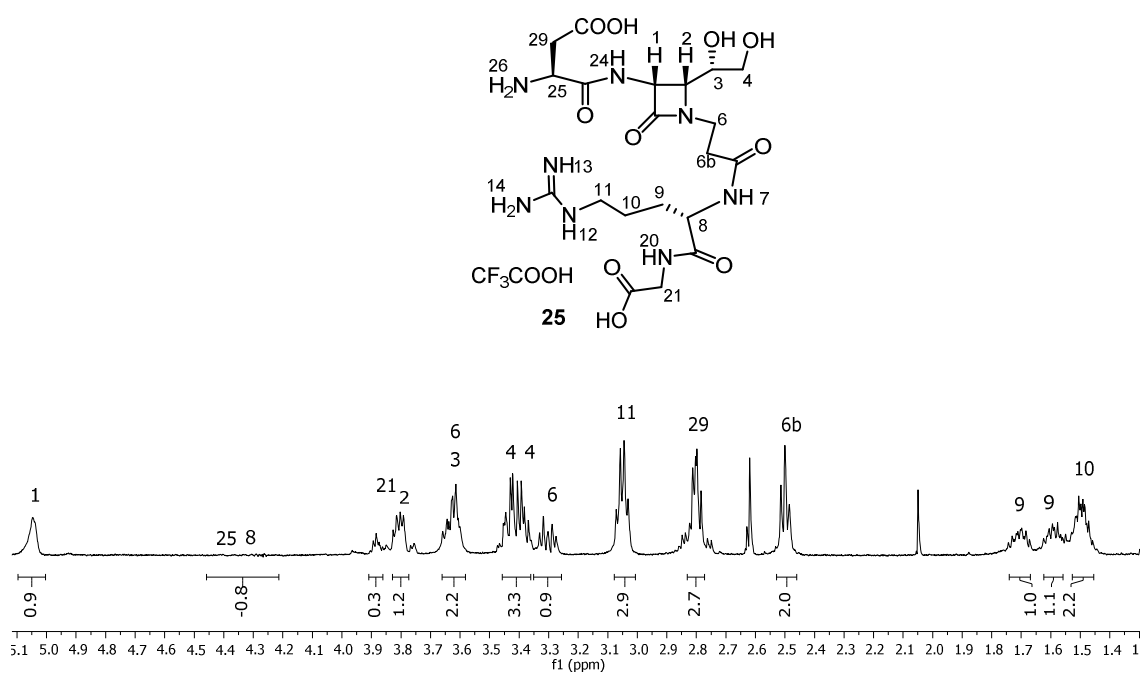


Figura 152. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 25.

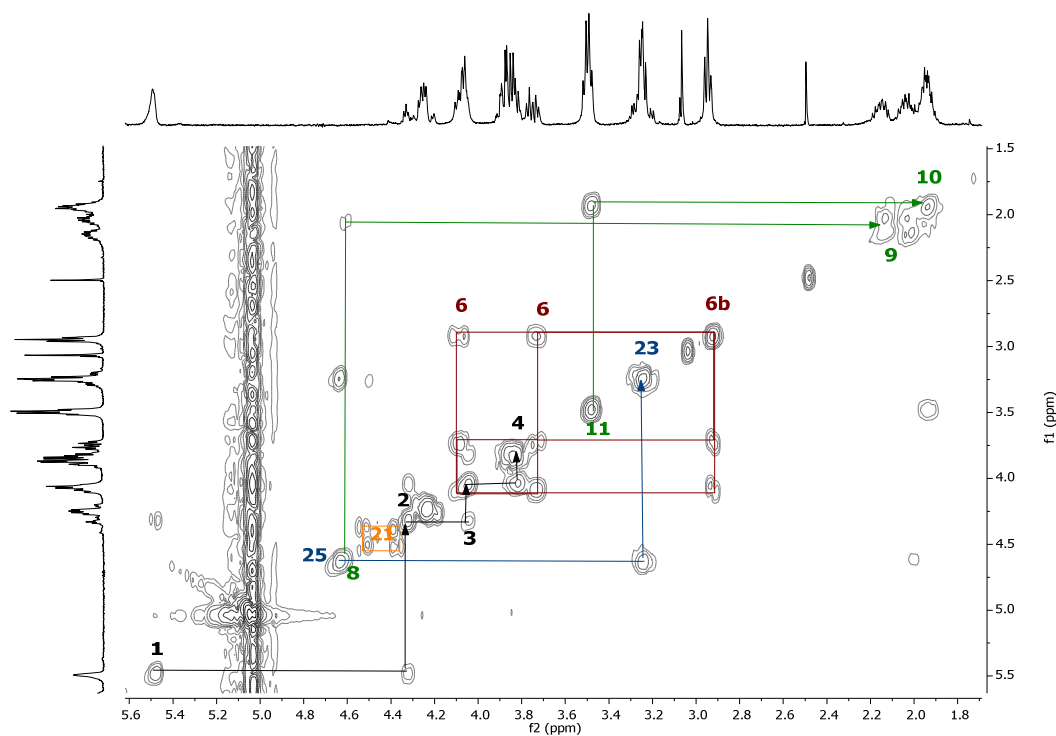
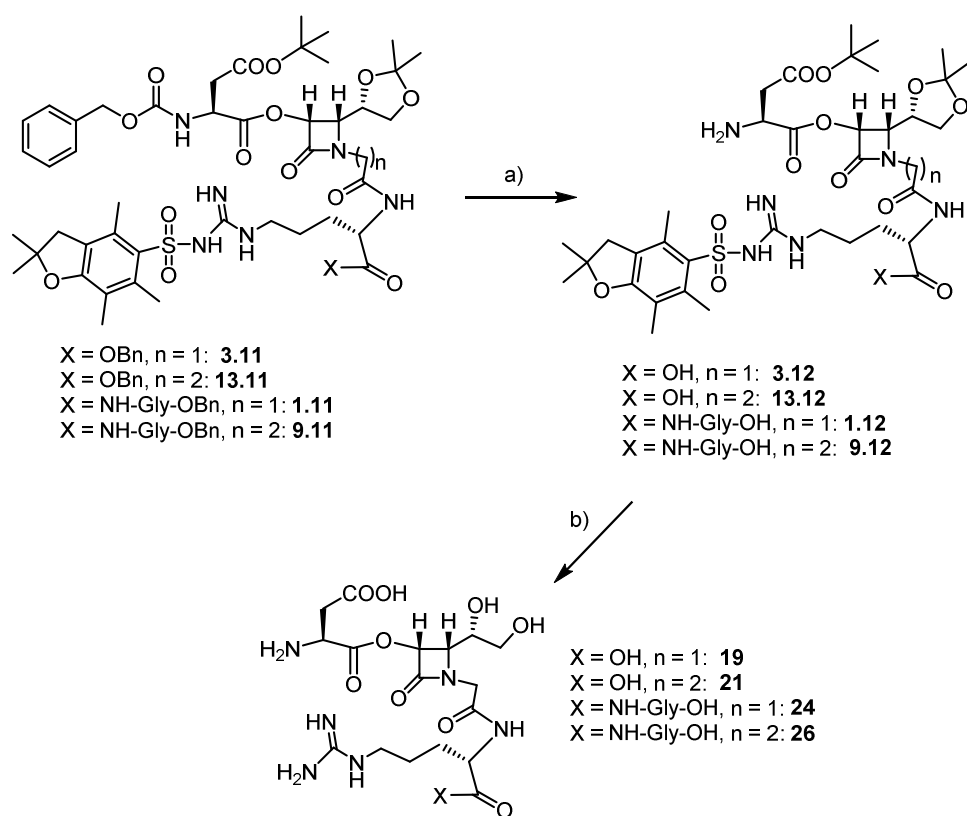


Figura 153. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 25.

### 5.3.2.3. Obtención de los depsipéptidos de cadena abierta 19, 21, 24 y 26

La desprotección de los depsipéptidos lineales **3.11**, **13.11**, **1.11** y **9.11** se realizó siguiendo el esquema sintético de los peptidomiméticos pero empleando como disolvente EtOAc/THF (1/1) en la etapa de hidrogenolisis para evitar la ruptura del enlace éster.



**Esquema 72.** a) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOAc/THF (1/1), t. a., 16 h. b) Et<sub>3</sub>SiH, Anhídrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h. (Rto. global del 75%, con una pureza menor al 80%)

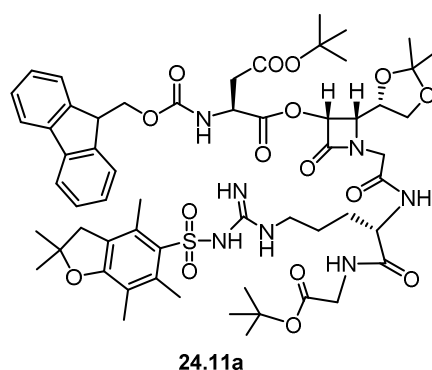
Aunque todos los productos finales se obtuvieron como producto mayoritario, se pudo observar que contenían fragmentos resultado de la rotura del enlace éster, obteniéndose los productos con una pureza inferior al 80% en todos los casos. Los productos se intentaron purificar sin éxito mediante cromatografía HPLC de fase reversa y finalmente se decidió cambiar la estrategia de grupos protectores.

#### 5.3.2.3.1. Cambio de ruta sintética del depsipéptido 24

Para comprobar la eficacia de una nueva ruta sintética con modificación de los grupos protectores se optó por comenzar con la síntesis del pentadepsipéptido **24**.

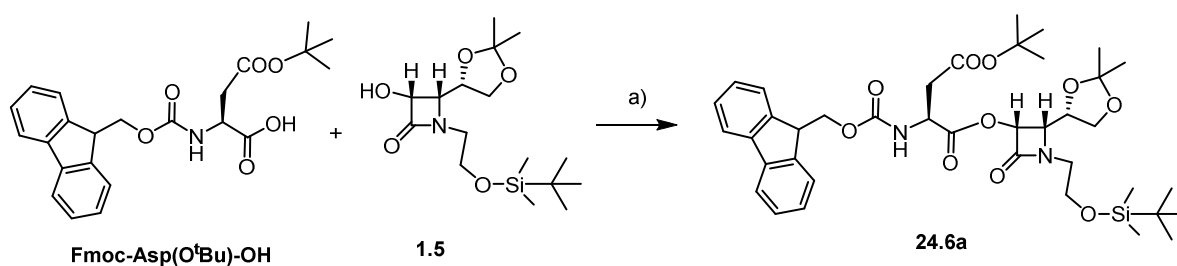
### 5.3.2.3.2. Grupos protectores Fmoc y *tert*-butilo

En un primer lugar se decidió sintetizar la molécula **24**, cambiando los grupos protectores de los extremos, Cbz y benciloxilo, por otros grupos que no requiriesen ser desprotegidos mediante hidrogenolisis. Para ello se seleccionó el grupo protector Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo) para proteger el grupo amino del ácido aspártico y el grupo *tert*-butilo para proteger el ácido carboxílico de la glicina; de esta manera se obtendría el precursor lineal **24.11a**. El grupo Fmoc se podría desproteger en medio básico y a continuación el resto de los grupos protectores en medio ácido.



**Figura 154.** Precursor lineal de la molécula objetivo **24**.

La síntesis se comenzó generando el fluoruro de ácido del Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH comercial empleando fluoruro de cianurilo para su posterior acoplamiento con la β-lactama **1.5**. La reacción trascurrió sin problemas obteniéndose el compuesto **24.6a** con un rendimiento del 90% y sin necesidad de purificación posterior.



**Esquema 73.** Esquema de la síntesis del compuesto **24.6a**. a) 1) (CFN)<sub>3</sub>, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15 °C, 1 h. 2) TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t. a., 30 min. (Rto. global del 90%)

La formación del compuesto **24.6a** se comprobó mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN; en las *Figuras 155* y *156* se puede observar el desplazamiento a campo bajo del protón del C3 de la β-lactama, H1 (δ<sub>H1</sub> = 5.74 ppm), a demás de las señales

correspondientes al grupo Fmoc introducido ( $\delta_{\text{Fmoc}} = 7.82\text{--}7.27$  ppm,  $\delta_{\text{CH}_2(\text{Fmoc})} = 4.47\text{--}4.31$  ppm y  $\delta_{\text{aromCH}(\text{Fmoc})} = 4.22$  ppm).

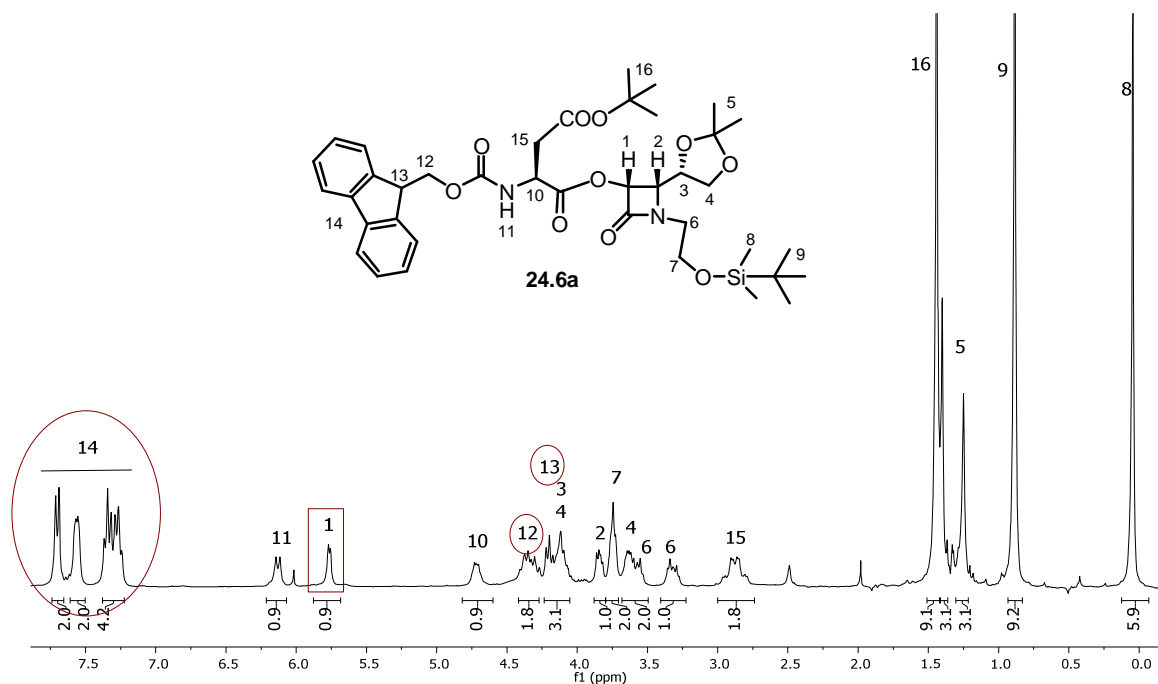


Figura 155. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24.6a**.

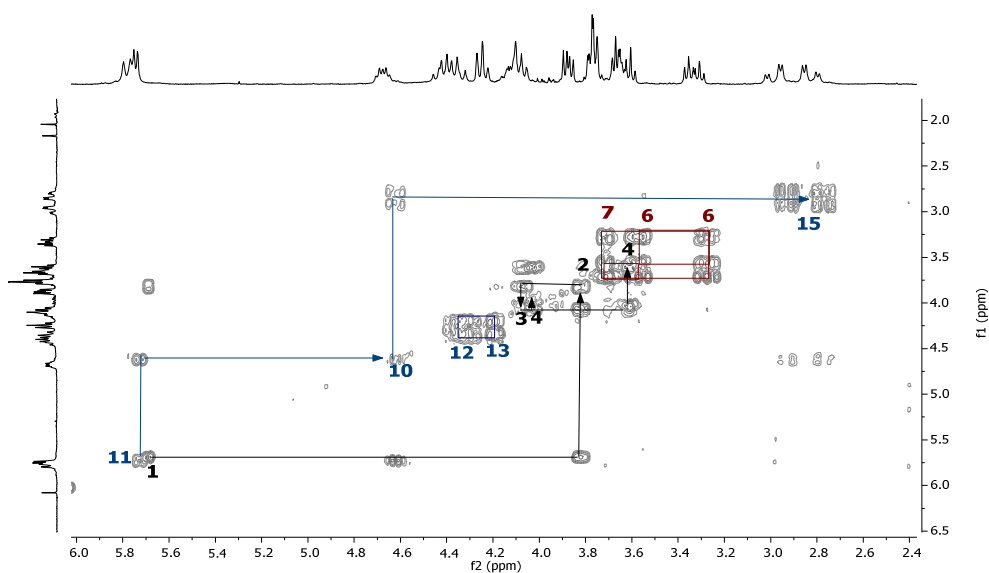
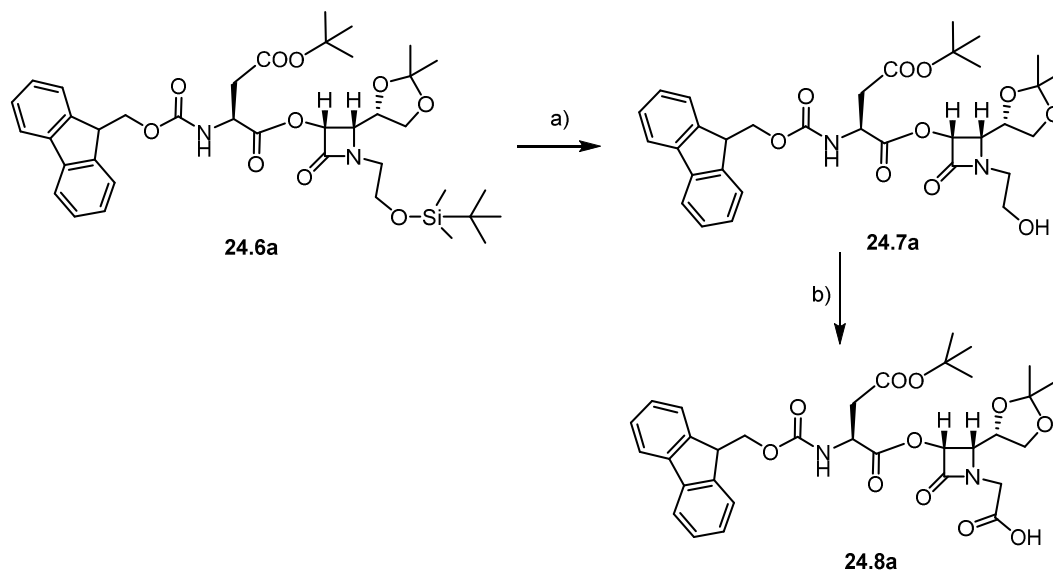


Figura 156. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24.6a**.

A continuación se desprotegió el grupo sililo con  $(\text{HF})_x\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  y el grupo alcohol resultante se oxidó con BAIB y TEMPO obteniéndose el compuesto **24.8a** con un

rendimiento global del 67% (inferior a los casos anteriores) como se describe en el Esquema 74.



**Esquema 74.** Desprotección del grupo TBDMS y oxidación del alcohol. a) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). b) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1), t. a., 4 h (70%).

La formación del compuesto **24.8a** se comprobó mediante <sup>1</sup>H-RMN. En la *Figura 157* se puede observar la desaparición de las señales H8 y H9 del grupo sililo (1.00–0.00 ppm), así como la desaparición del H7 ( $\delta_{H7(24.6a)} = 3.77$  ppm) y el desplazamiento de las señales de los protones H6, ahora unidos a un ácido carboxílico, hacia un campo bajo ( $\delta_{H6(24.6a)} = 3.70$ – $3.57$  y  $3.33$  ppm <  $\delta_{H6(24.8a)} = 4.47$ – $4.24$  y  $4.13$ – $3.98$  ppm).

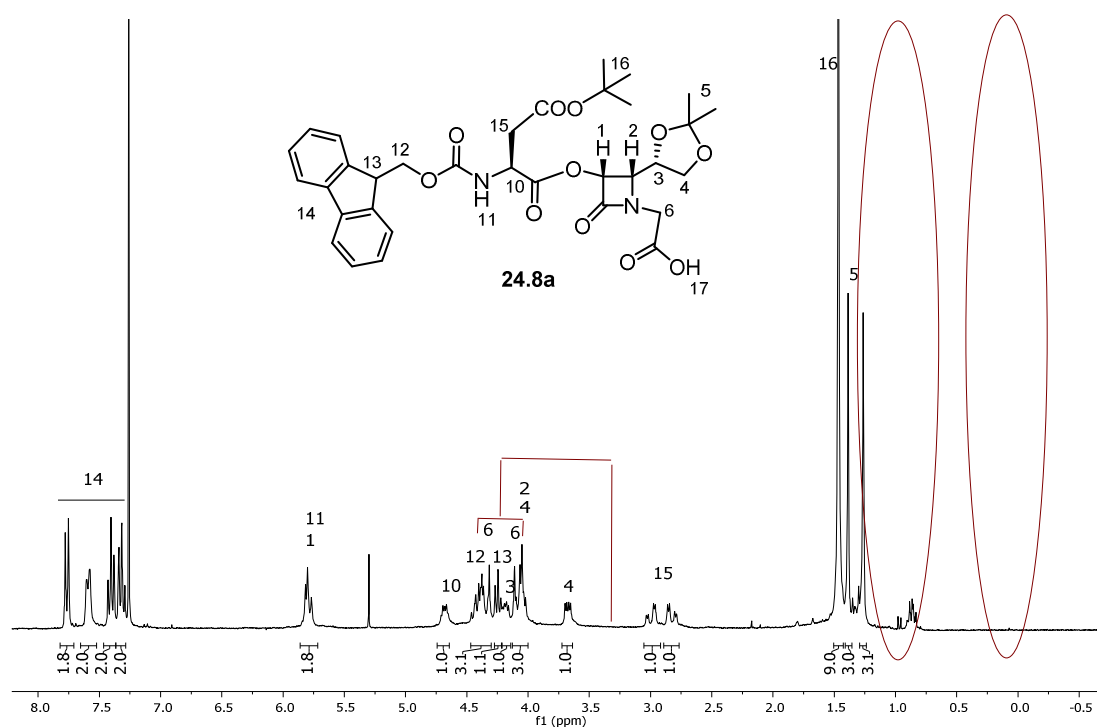
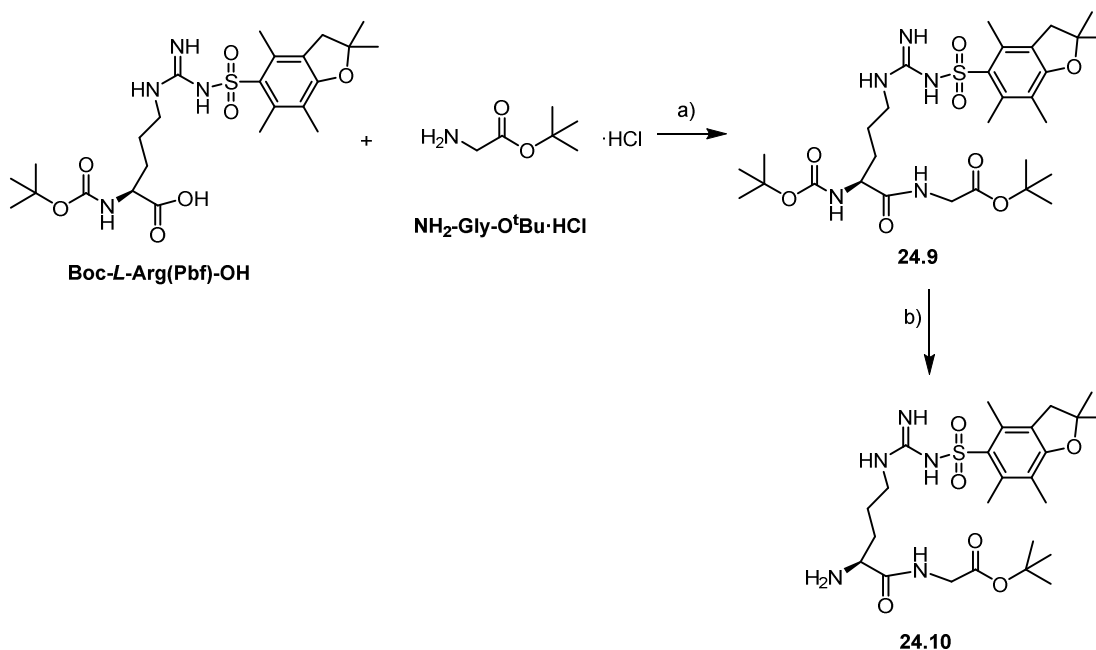


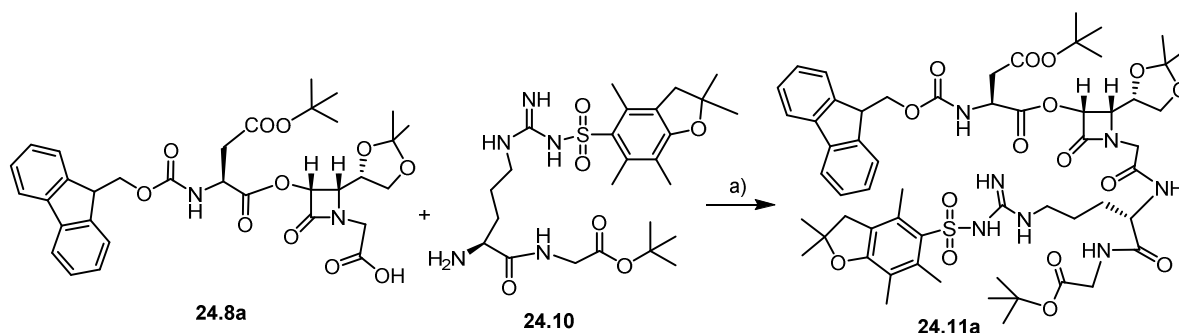
Figura 157. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 24.8a.

El siguiente paso a realizar fue el acoplamiento del compuesto 24.8a con la arginina que posee el grupo carboxilo protegido mediante un éster *terc*-butílico. Para ello, se preparó la arginina en una etapa previa. El compuesto 24.10 se consiguió en forma de sólido blanco con un rendimiento global del 81% siguiendo el Esquema 75.



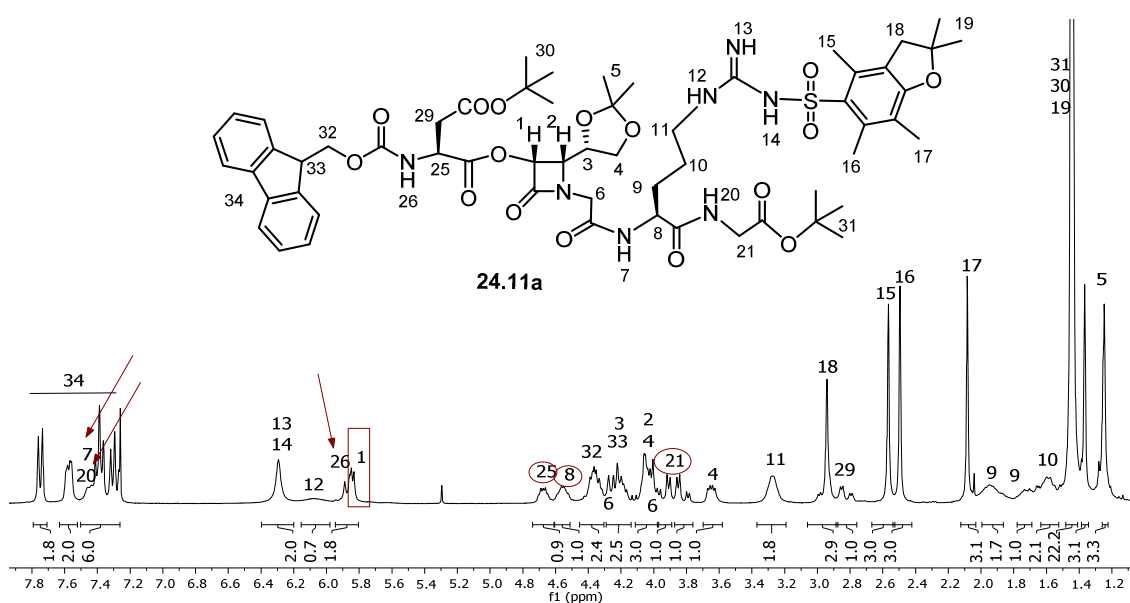
Esquema 75. Formación del dímero arginina-glicina 24.10. a) EDC-HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h. b) HCOOH, t. a., 5 h. (Rto. global del 81%)

El acoplamiento entre el compuesto **24.8a** y **24.10** se llevó a cabo empleando los agentes de acoplamiento EDC-HCl y HOBT en presencia de TEA; consiguiendo el precursor lineal que buscábamos **24.11a** con un rendimiento del 65%, cabe destacar que este rendimiento fue inferior al de los acoplamientos previos entre el dímero Arg-Gly y el grupo carboxilo de la  $\beta$ -lactama.



**Esquema 76.** Síntesis del precursor lineal **24.11a**. a) EDC-HCl, HOBT, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t. a.}$ , 16 h (65%).

La formación del compuesto **24.11a** se confirmó mediante  $^1\text{H}$ -RMN; en las Figuras 158–160 se pueden observar las señales pertenecientes a los tres enlaces amida que posee la molécula H26, H7 y H20 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.87$ ,  $\delta_{\text{NH[Arg]}}$  y  $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.99\text{--}7.28$ ) así como sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H8 y H21). También se puede ver el protón H1 del C3 de la  $\beta$ -lactama a un campo bajo ( $\delta_{\text{H1}} = 5.84$ ), característica propia de estar unido a un enlace éster.



**Figura 158.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24.11a**.



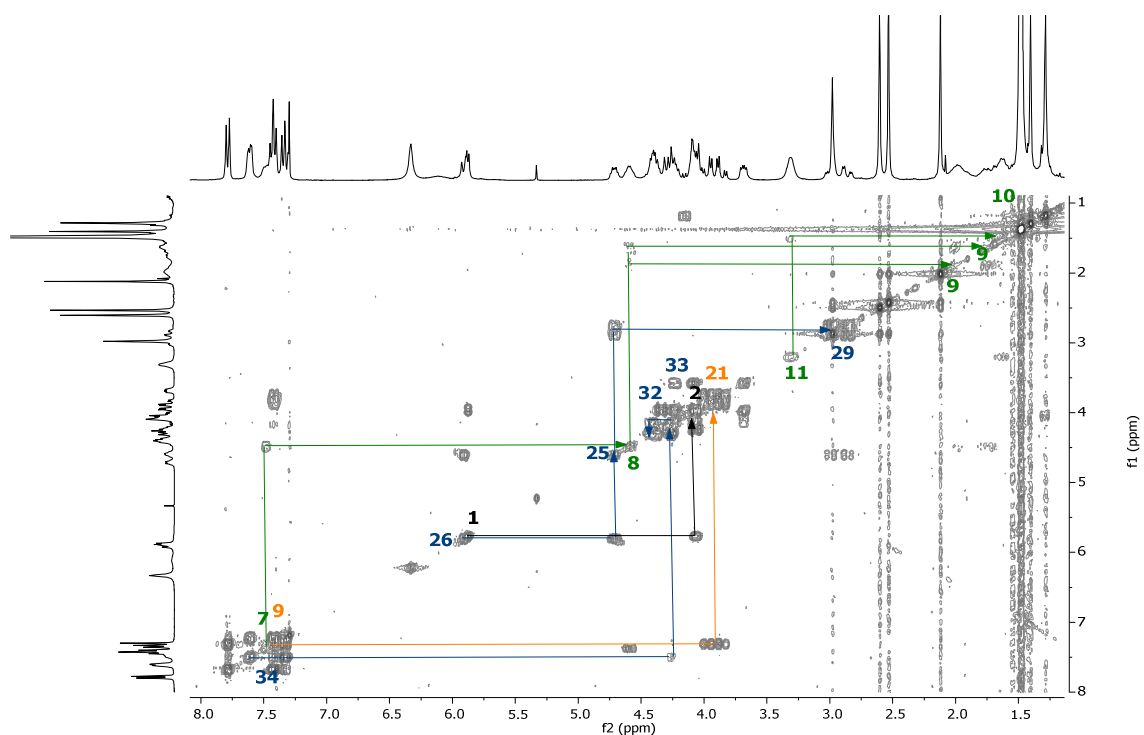


Figura 159. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 24.11a.

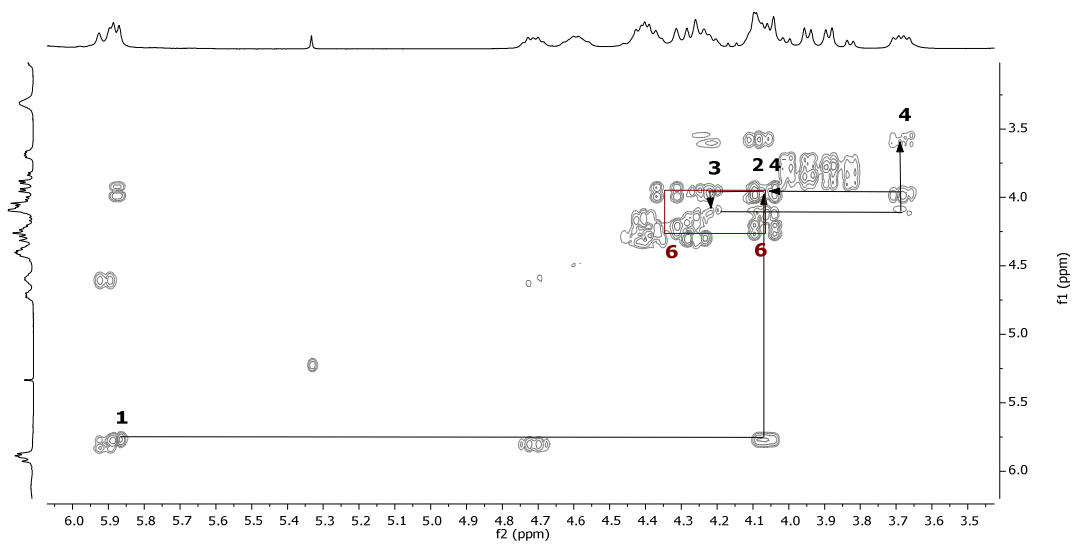
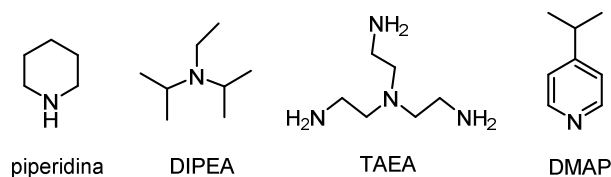


Figura 160. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) aumentado del compuesto 24.11a.

La desprotección del grupo Fmoc<sup>180</sup> se llevó a cabo disolviendo el compuesto **24.11a** en DMF en presencia de piperidina. Pero el resultado fue la ruptura del enlace éster entre el ácido aspártico y la β-lactama. Visto esto, se pensó en cambiar el tipo de base con la intención de encontrar una que fuera capaz de desproteger el grupo Fmoc pero que no pudiera hidrolizar el enlace éster del depsipéptido; para ello se seleccionaron diferentes bases con características distintas.<sup>100</sup>

**Tabla 28.** Bases empleadas en la desprotección del grupo Fmoc.



Entrada	Base	Equiv.	Disolvente	Tiempo	Resultado
1	Piperidina	2	DMF	15 min	Rotura del éster
2	DIPEA	2 + 2	MeCN	24 + 48 h	Producto de partida
3	TAEA <sup>181</sup>	2	MeCN	15 min	Rotura del éster
4	DMAP	2 + 2	MeCN	24 + 48 h	Producto de partida

Visto que no fue posible desproteger el grupo Fmoc sin provocar la fractura del éster se optó por cambiar el grupo protector.

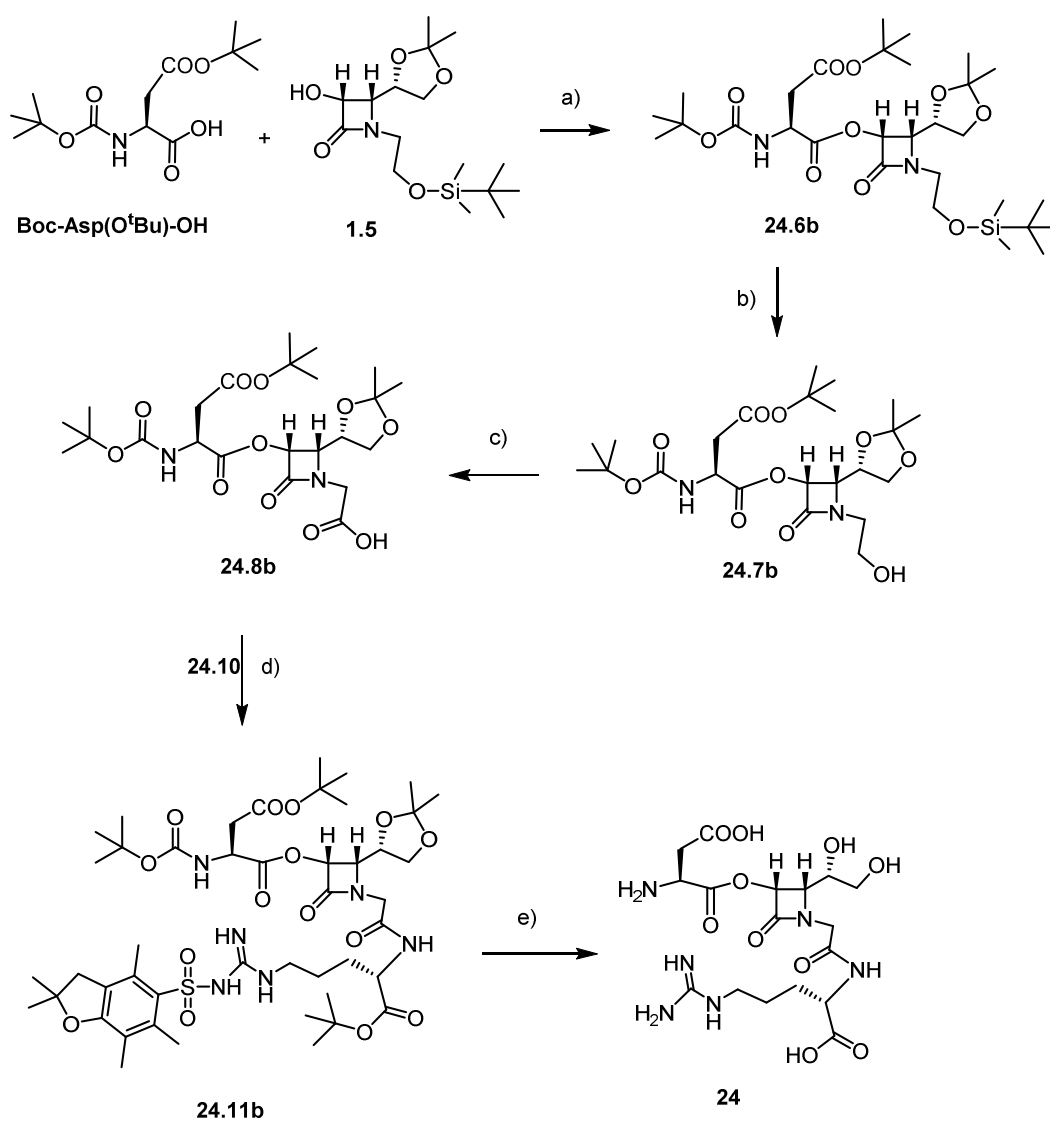
### 5.3.2.3.3. Grupos protectores Boc y *terc*-butilo

En esta ocasión se sustituyó en grupo protector Fmoc por el grupo Boc, con intención de realizar una única desprotección final en medio ácido donde se desprotegerían todos los grupos en una única etapa.

Para ello se desarrolló la ruta sintética descrita en el *Esquema 77*, comenzando con la activación del Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH comercial y su acoplamiento con la β-lactama **1.5**. A continuación se sintetizó el compuesto **24.8b** mediante la desprotección del grupo sililo y posterior oxidación del alcohol; que condujo al compuesto **24.11b** tras su acoplamiento con la arginina **24.10**.

<sup>180</sup> Wasserman, H. H.; Petersen, A. K.; Xia, M.; *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6771–6784.

<sup>181</sup> Fisher, M. J.; Overman, L. E.; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1447–1459.



**Esquema 77.** Síntesis completa del compuesto **24**. a) 1) (CFN)<sub>3</sub>, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15 °C, 1 h. 2) TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t. a., 30 min. (Rto. global del 90%) b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (78%). d) EDC·HCl, HOBt, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (76%). e) Et<sub>3</sub>SiH, Anhídrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h (80%).

La formación del compuesto **24.11b**, que se obtuvo sin problemas y con buenos rendimientos, se confirmó mediante  $^1\text{H-RMN}$ . En las *Figuras 161–165* se pueden observar las señales correspondientes a los tres enlaces amida que posee la molécula H26, H7 y H20 ( $\delta_{\text{NH[Asp]}} = 5.49$ ,  $\delta_{\text{NH[Arg]}} = 7.44$  y  $\delta_{\text{NH[Gly]}} = 7.36$ ) así como sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H8 y H21). También se puede ver el protón H1 del C3 de la  $\beta$ -lactama a un campo bajo ( $\delta_{\text{H1}} = 5.80$ ), característica propia de estar unido a un enlace éster.

Para terminar se desprotegió el precursor **24.11b** empleando TFA y  $\text{Et}_3\text{SiH}$  y esta vez sí se consiguió el producto **24** deseado de forma pura y con un buen rendimiento global.

La masa exacta encontrada resultó coincidir con las masa esperada:

**Tabla 29.** UPLC-MS del compuesto **24**.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ H <sup>+</sup> )	Masa encontrada (m/z) (+ H <sup>+</sup> )
<b>24</b>	533.2082	534.2160	534.2163

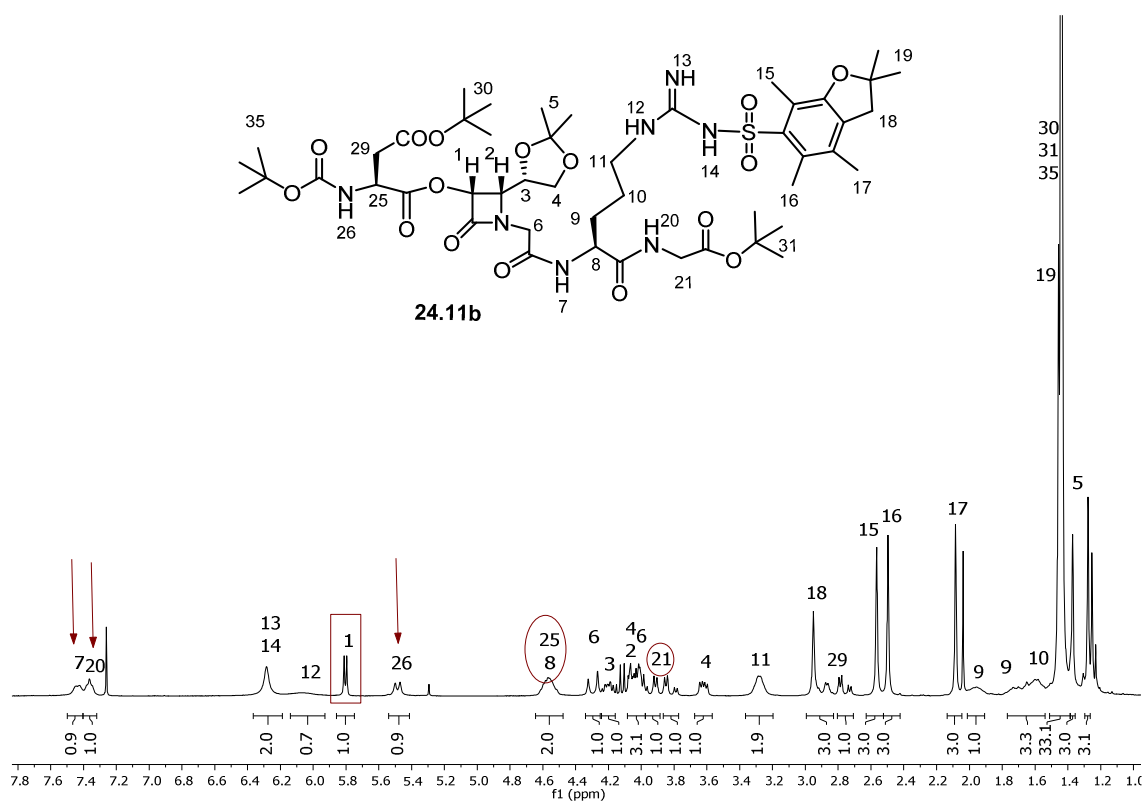


Figura 161. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24.11b**.

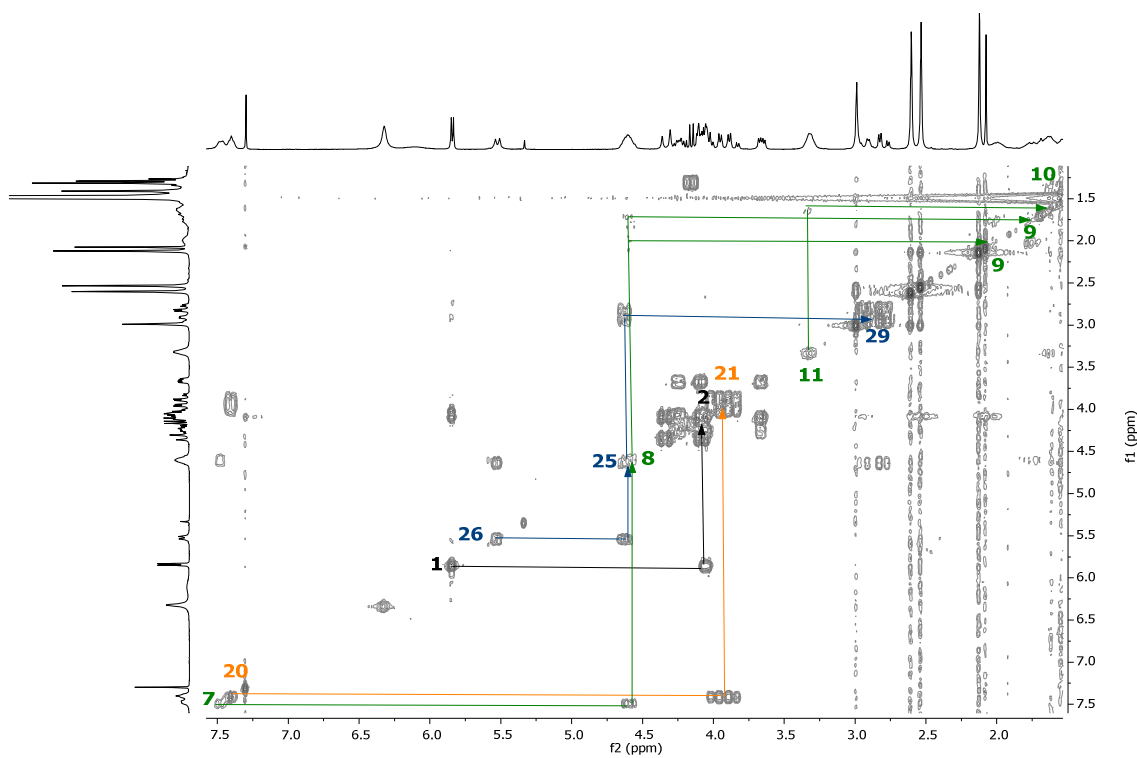


Figura 162. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24.11b**.

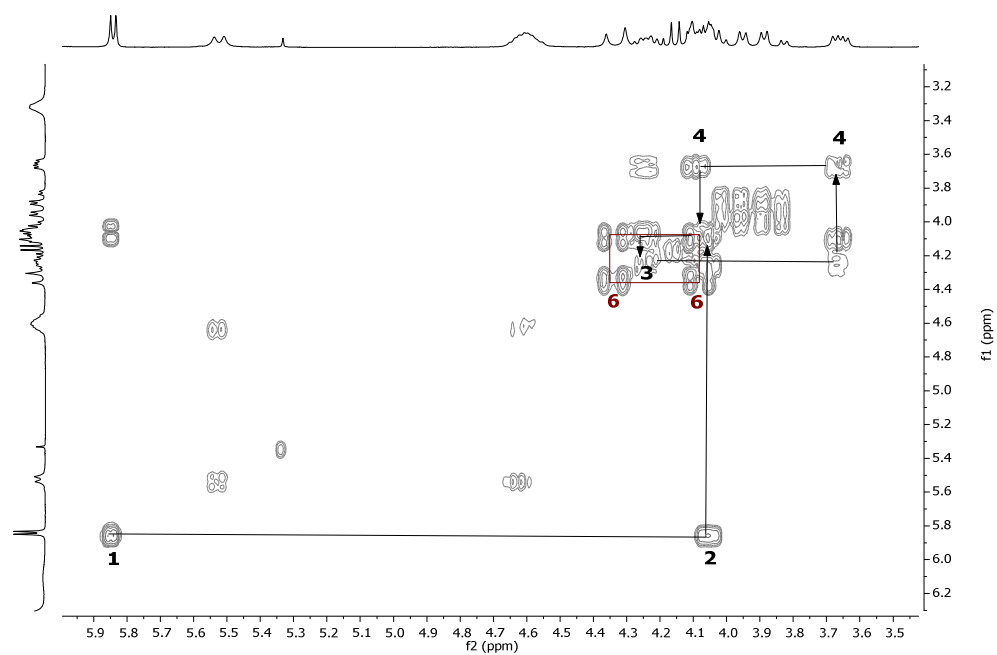


Figura 163. COSY (CDCl<sub>3</sub>) aumentado del compuesto 24.11b.

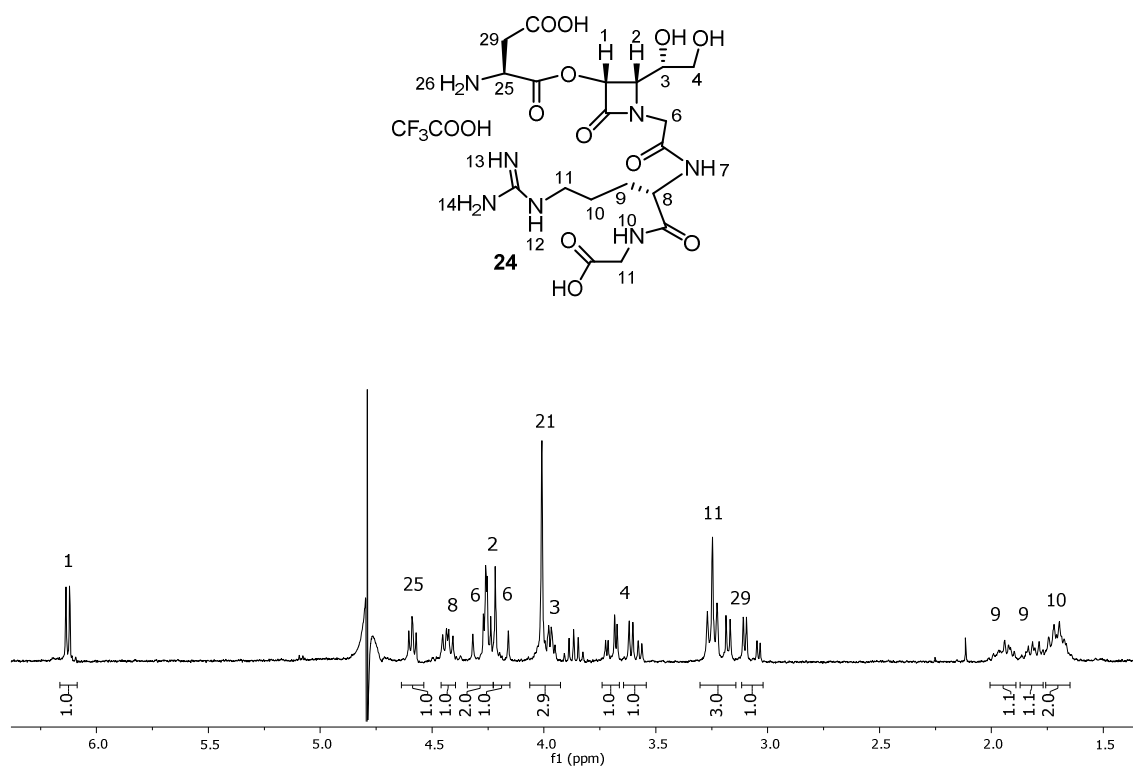


Figura 164. Espectro <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 24.

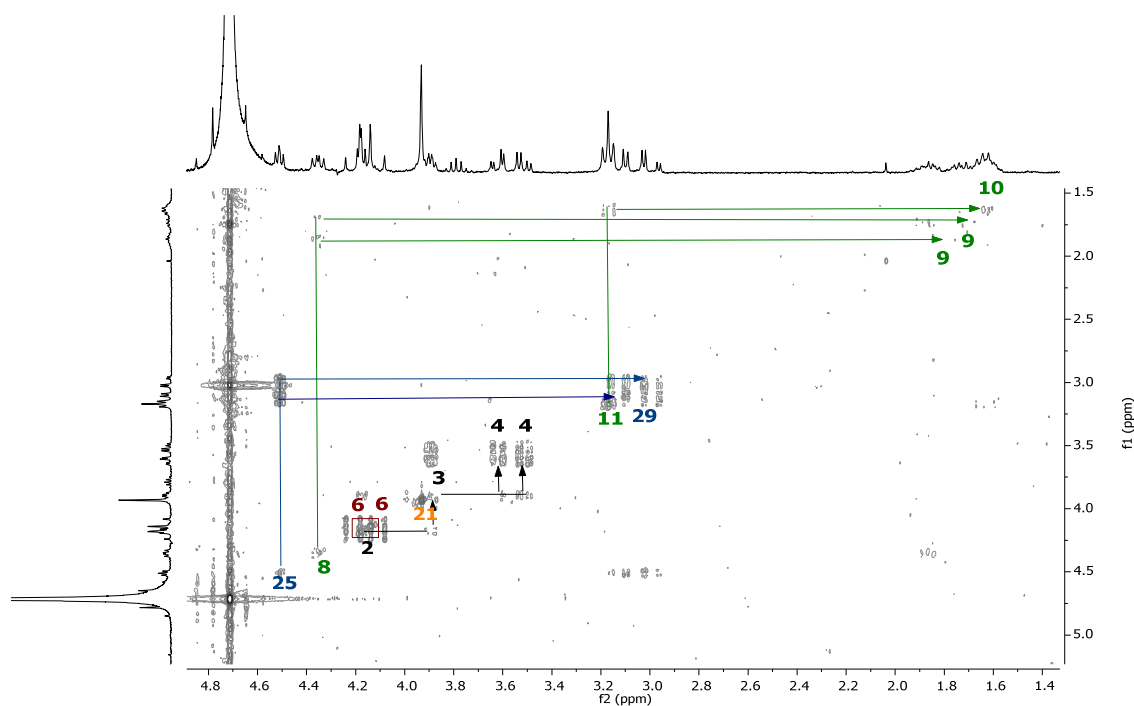
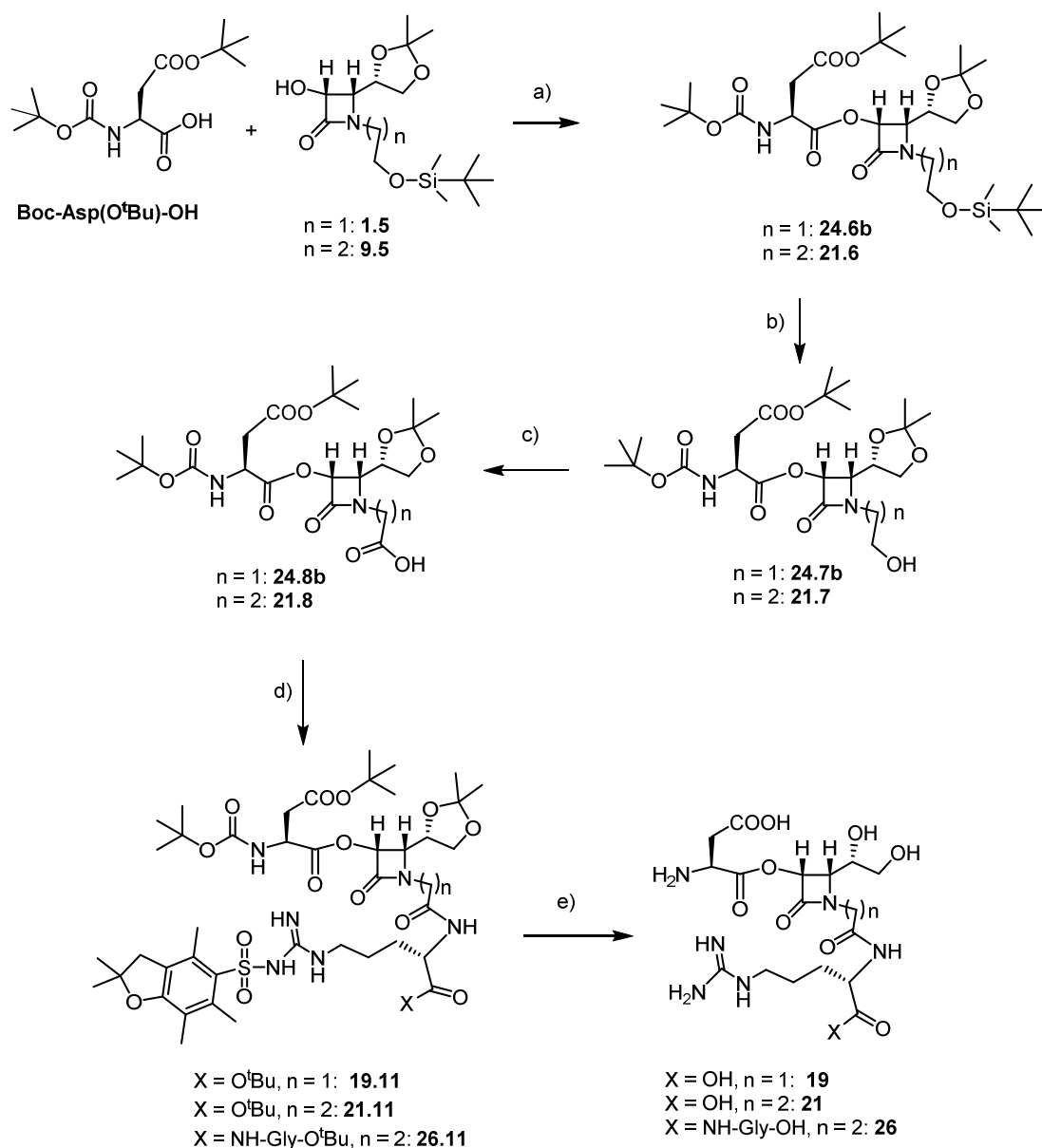


Figura 165. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **24**.

#### 5.3.2.3.4. Obtención de los depsipéptidos de cadena abierta **19**, **21** y **26**

Visto los buenos resultados obtenidos con los grupos protectores Boc y *terc*-butilo para el caso de la molécula **24**, se aplicó idéntico procedimiento a la síntesis de las moléculas objetivo **19**, **21** y **26** siguiendo el mismo esquema sintético (*Esquema 78*).



**Esquema 78.** Síntesis completa de los compuestos **19**, **21** y **26**. a) 1) (CFN)<sub>3</sub>, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15 °C, 1 h. 2) TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t. a., 30 min. (Rto. global del 88–90%) b) Fluoruro de piridinio, THF, 0 °C → t. a., 3 h (96%). c) BAIB, TEMPO, MeCN/H<sub>2</sub>O (1/1), t. a., 4 h (77–78%). d) **24.10** o NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu, EDC·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → t. a., 16 h (67–70%). e) Et<sub>3</sub>SiH, Anhídrido de TFA, H<sub>2</sub>O, 0 °C → 4 °C, 16 h (80%).



La formación de todas las moléculas se confirmó mediante espectroscopía de RMN (*Figuras 166–177*). En los espectros de todos los precursores lineales se observan las señales correspondientes a los enlaces amida de cada molécula (H26 y H7 para el caso de **19.11** y **21.11**; y H26, H7 y H21 para el caso de **26.11**) y sus correspondientes señales de cruce con los protones de los C $\alpha$  de los aminoácidos contiguos (H25, H1 y H8).

Las masas exactas encontradas resultaron coincidir con las masas esperadas en todos los casos:

**Tabla 30.** UPLC-MS de los compuestos **19**, **21** y **26**.

Compuesto	Masa exacta calculada	Masa exacta calculada (+ H <sup>+</sup> )	Masa encontrada (m/z) (+ H <sup>+</sup> )
<b>19</b>	476.1867	477.1945	477.1942
<b>21</b>	490.2023	491.2101	491.2103
<b>26</b>	547.2238	548.2316	548.2319

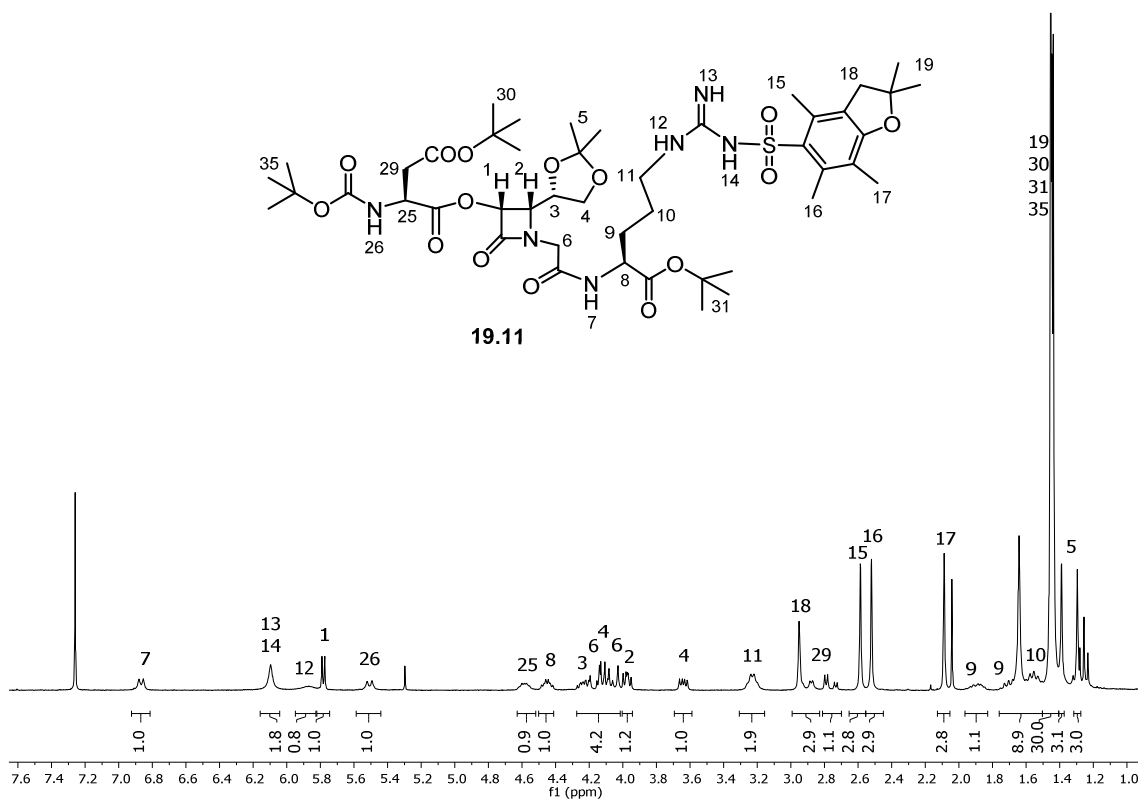


Figura 166. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 19.11.

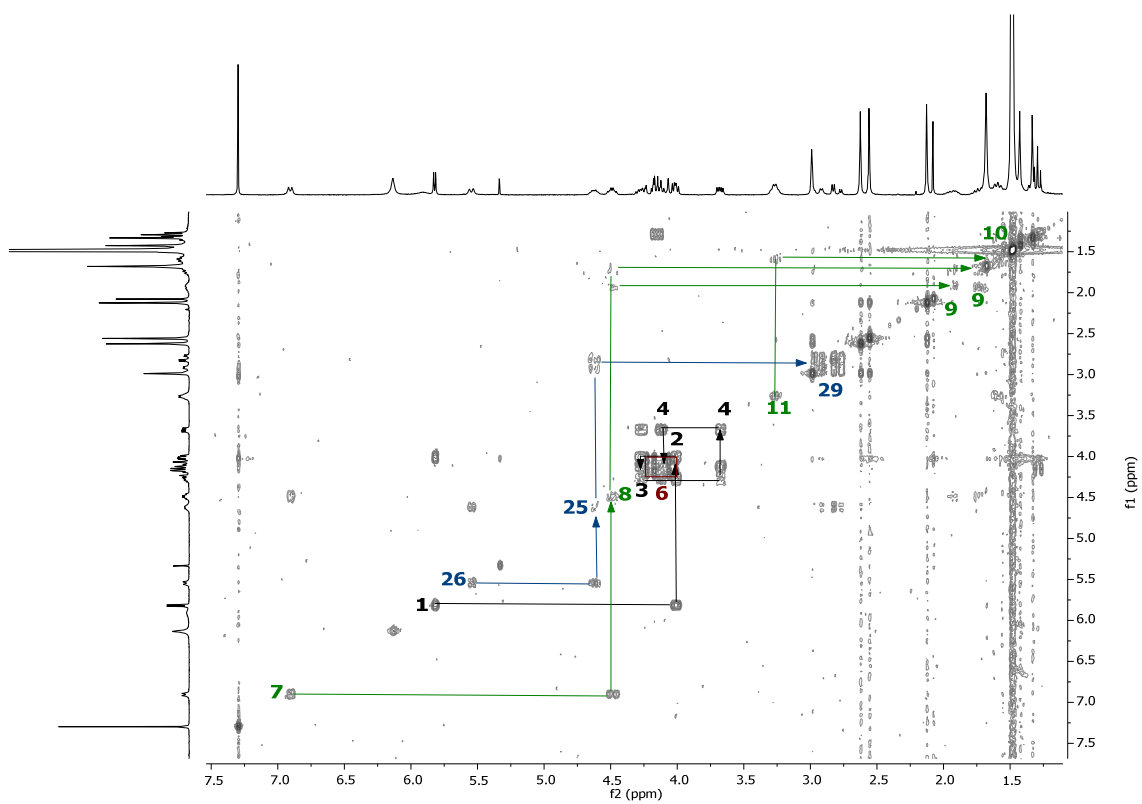


Figura 167. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 19.11.

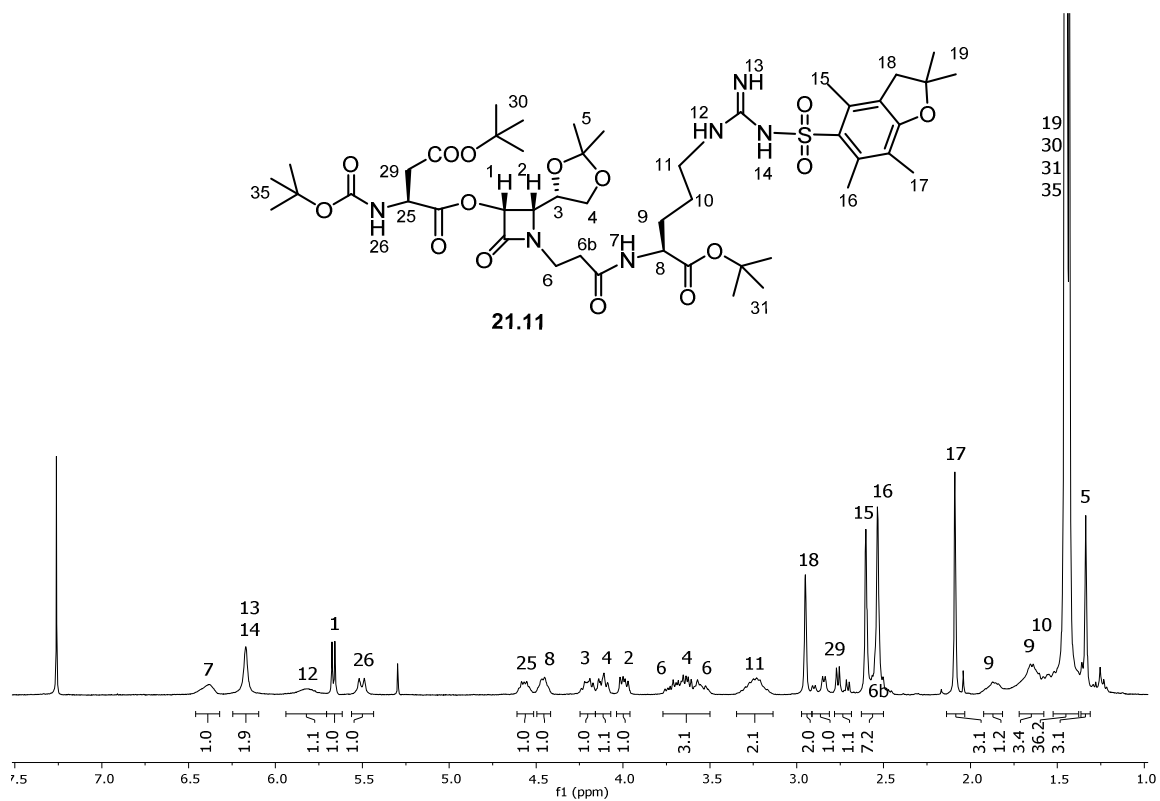


Figura 168. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 21.11.

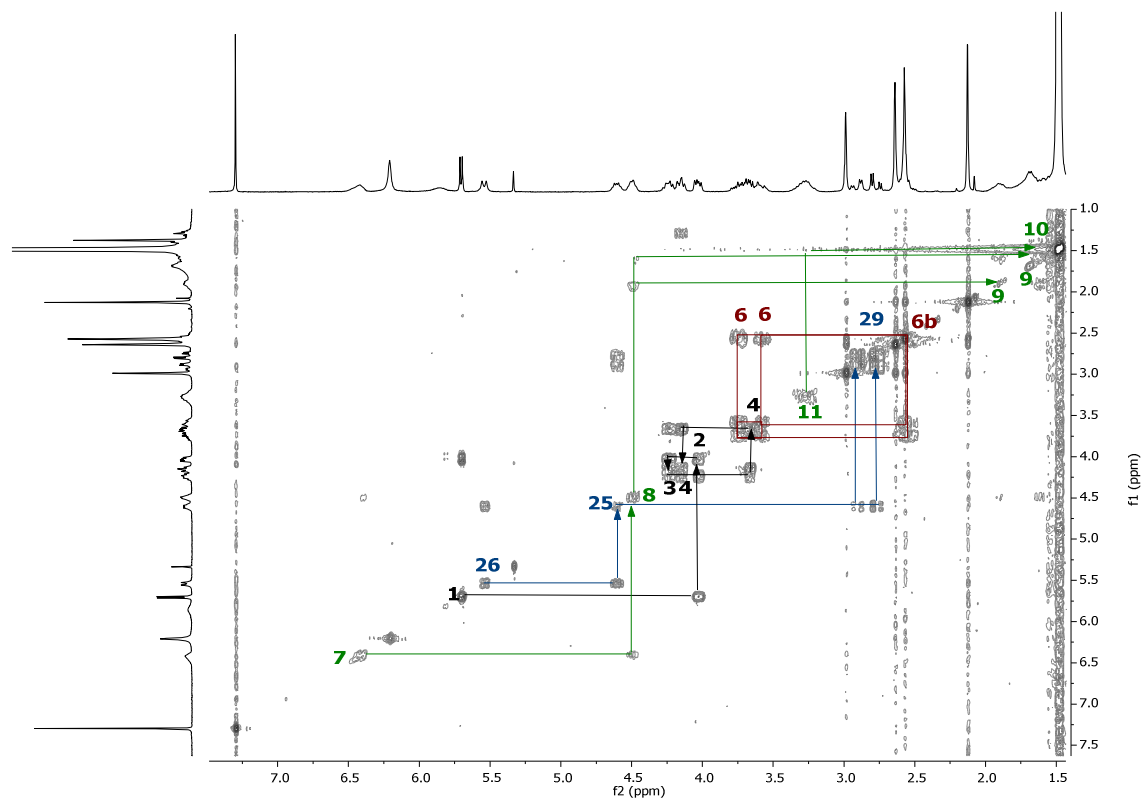


Figura 169. CCOSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 21.11.

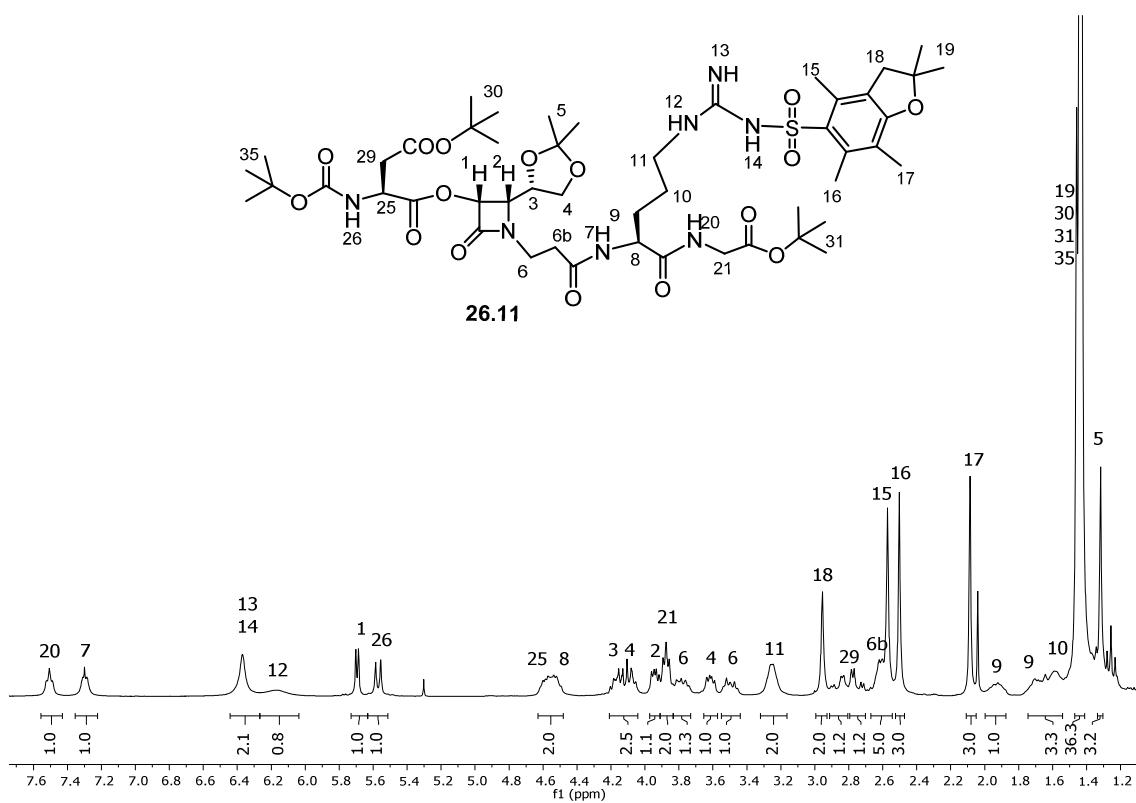


Figura 170. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 26.11.

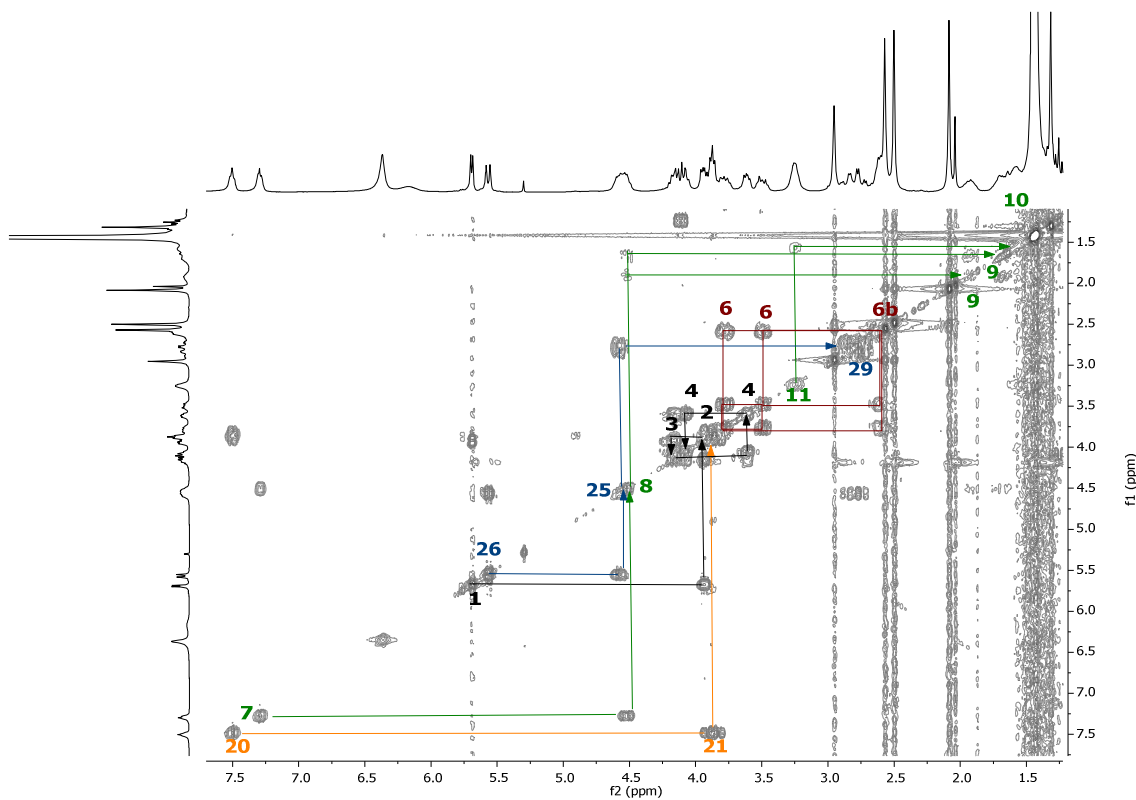


Figura 171. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 26.11.

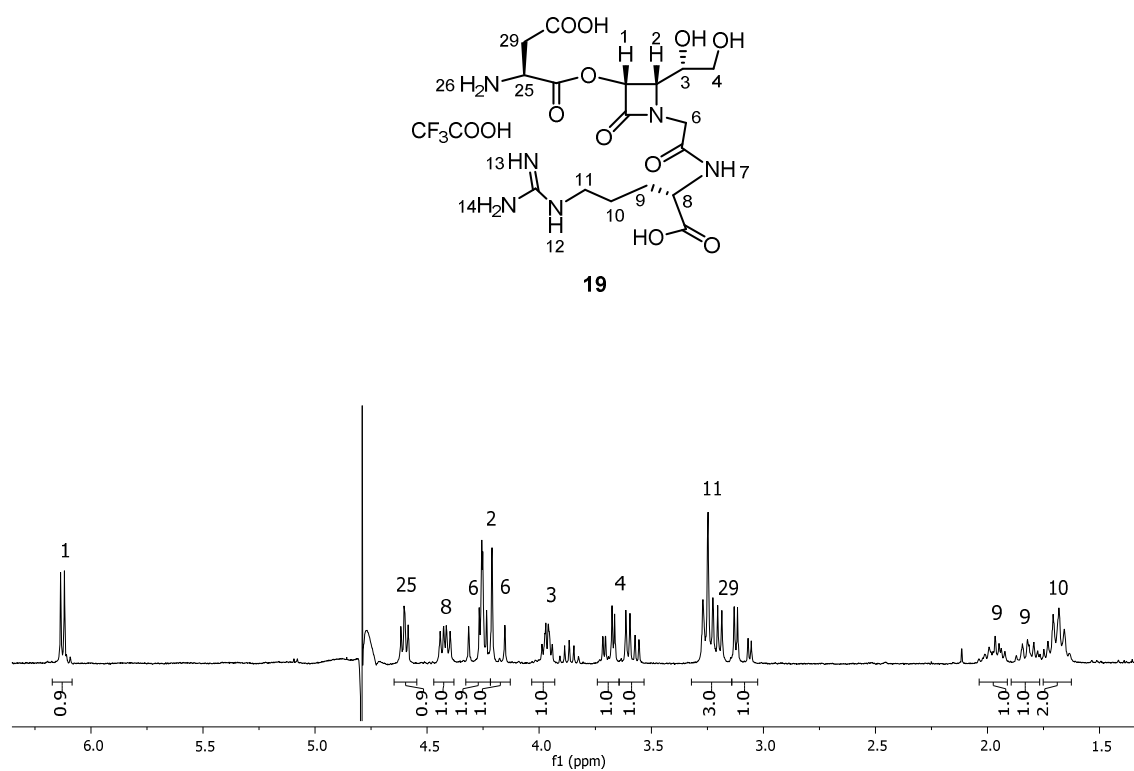


Figura 172. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **19**.

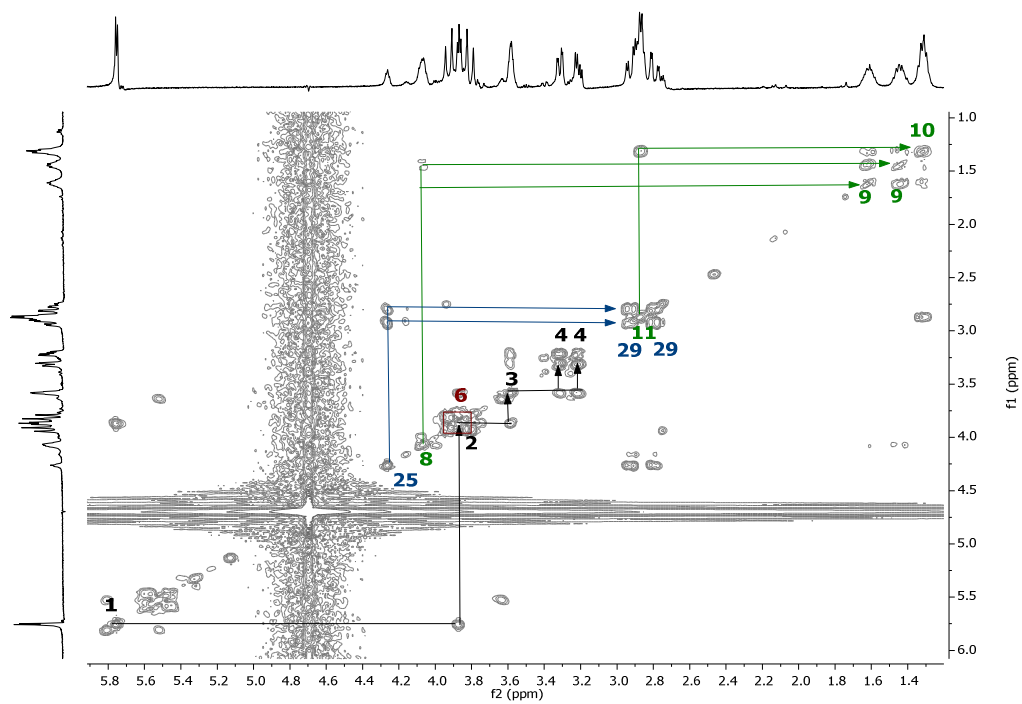


Figura 173. COSY (CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **19**.

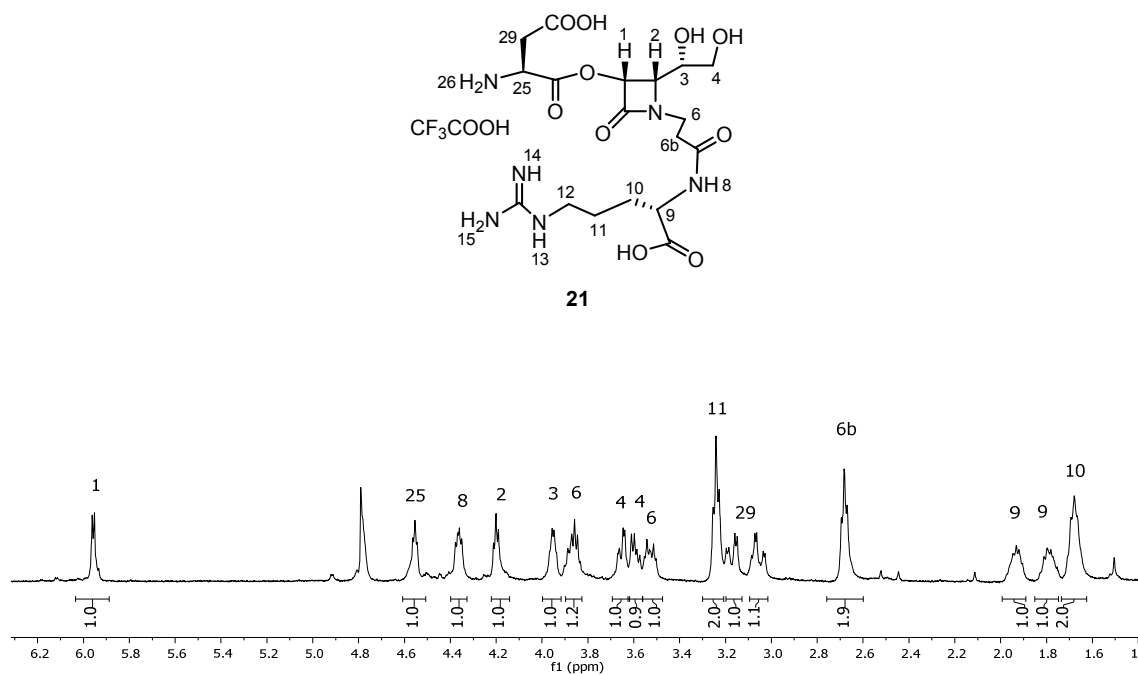


Figura 174. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **21**.

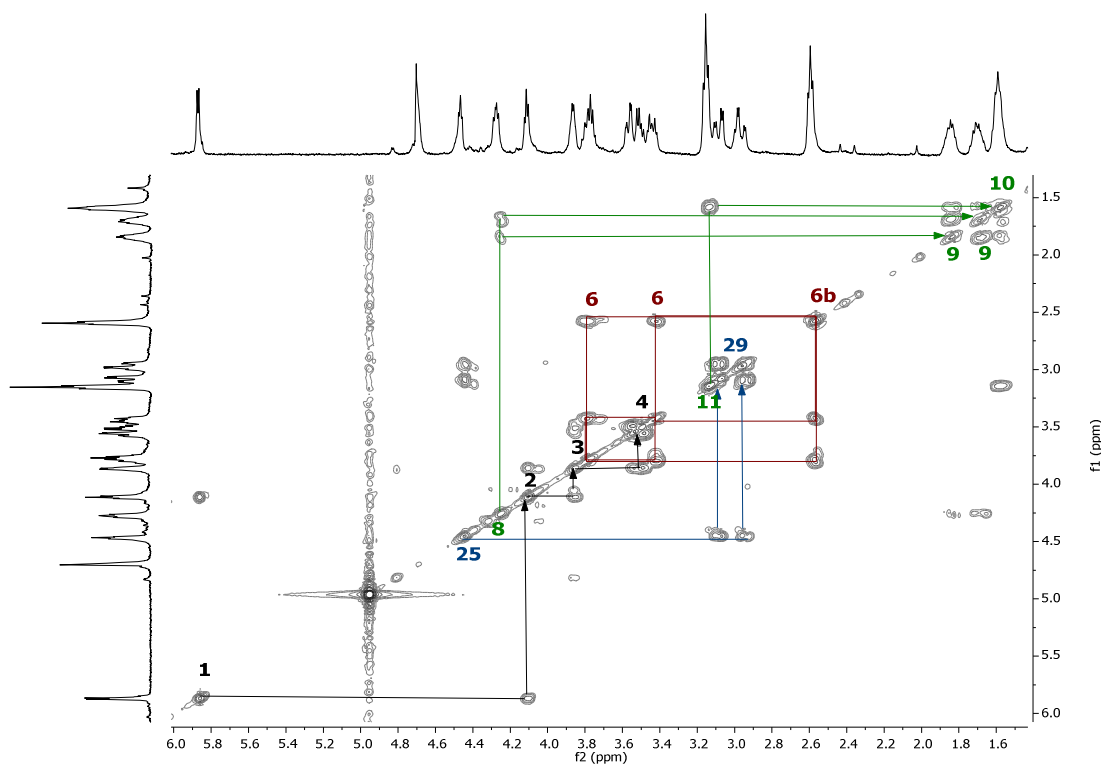


Figura 175. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **21**.

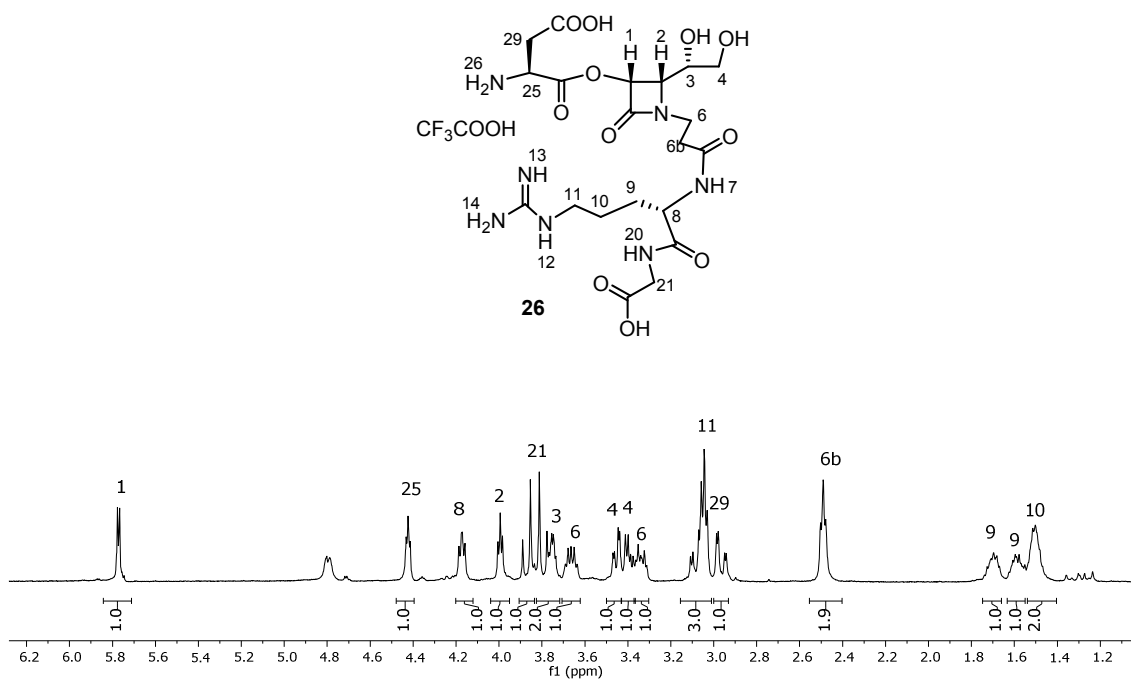


Figura 176. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **26**.

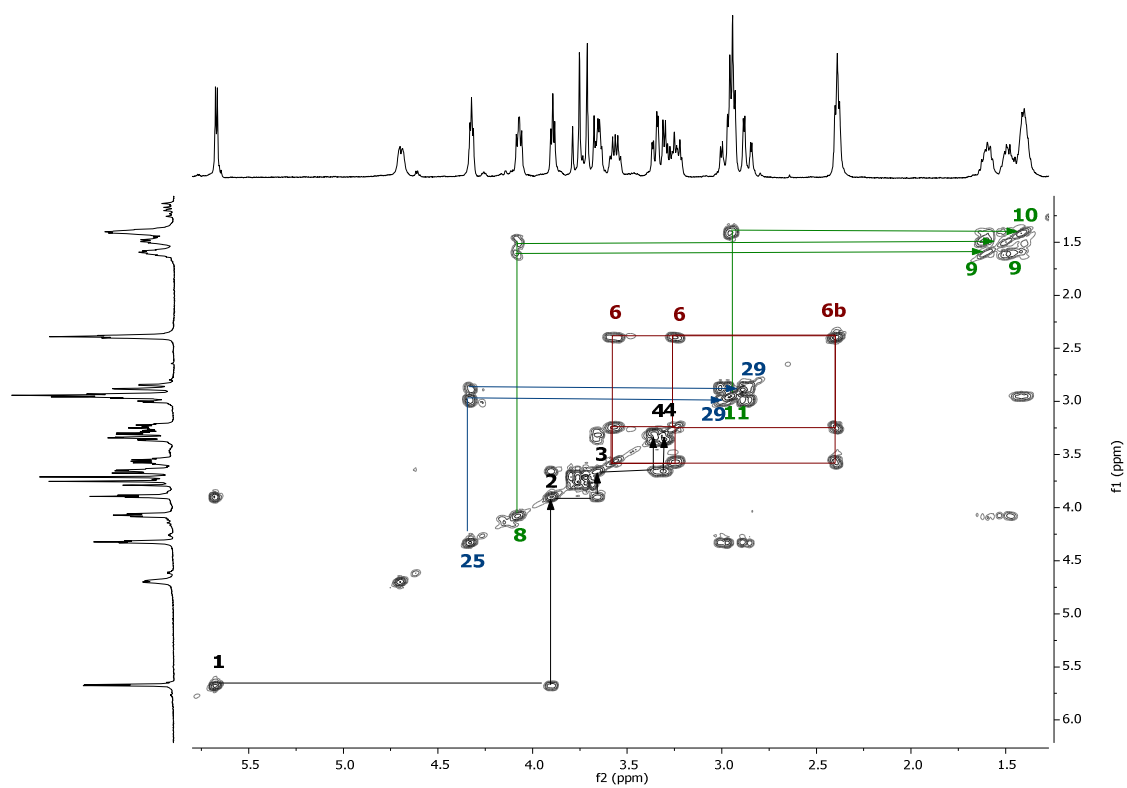


Figura 177. COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **26**.

### 5.3.3. Evaluación de la actividad biológica

#### 5.3.3.1. Evaluación del nivel de adhesión

Una vez sintetizadas las moléculas de cadena abierta **19–26**, junto con las empleadas como control negativo **17** y **18** (*capítulo 1*); se llevó a cabo un estudio sobre la preferencia del receptor entre el ligando sintético y la vitronectina o “test de adhesión”.

**Tabla 31.** Resultados del análisis de adhesión realizado a los compuestos tetrapeptídicos **17, 18, 19, 20** y **21** a distintas concentraciones conocidas y su comparación con el Cilengitide.

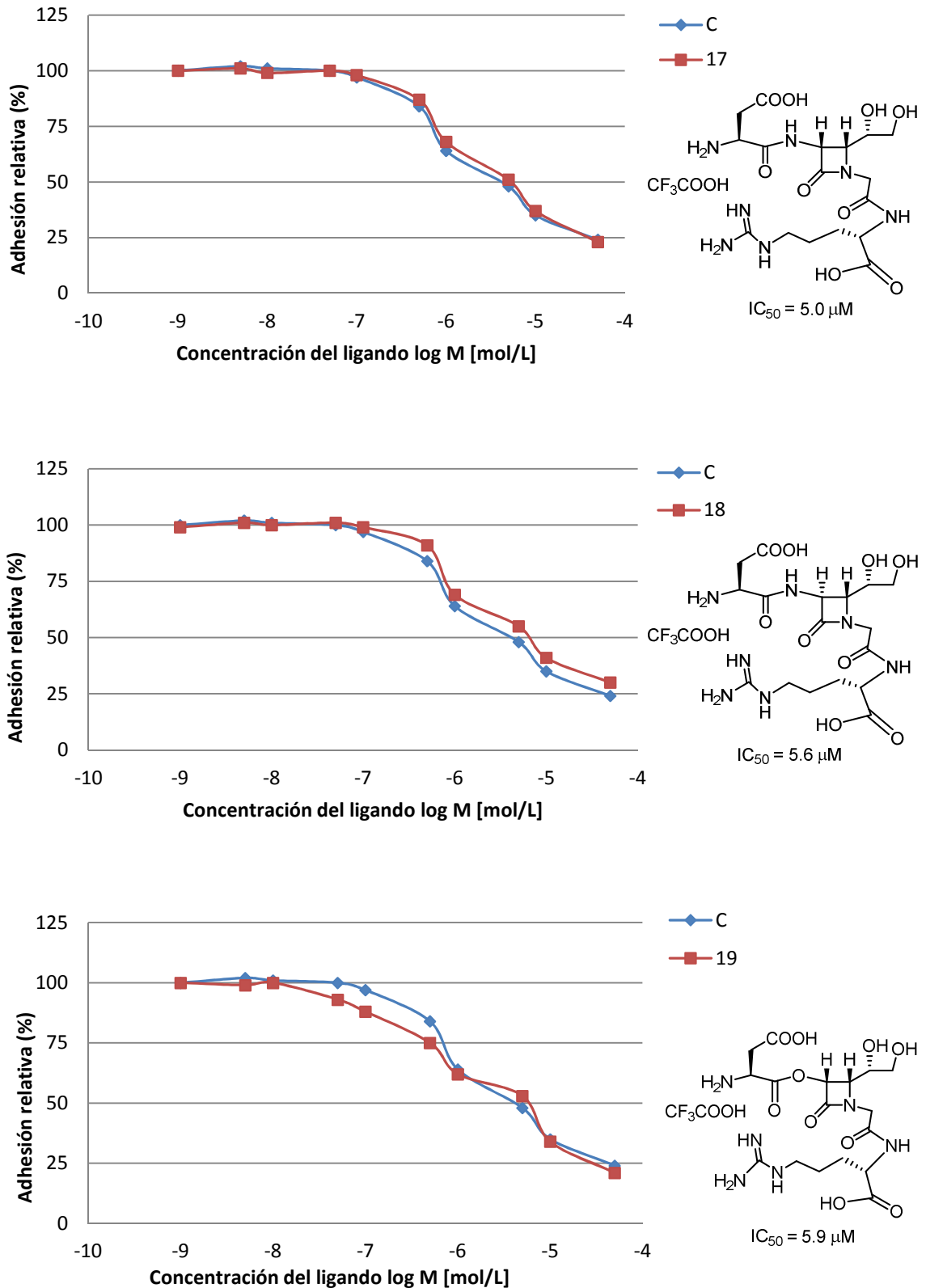
concentración		C	17	18	19	20	21
[M]	log (M)						
1,00E-09	-9,00	100	100	99	100	101	101
5,00E-09	-8,30	102	102	101	99	100	98
1,00E-08	-8,00	101	101	100	100	98	95
5,00E-08	-7,30	100	100	101	93	98	95
1,00E-07	-7,00	97	97	99	88	100	84
5,00E-07	-6,30	84	84	91	75	88	72
1,00E-06	-6,00	64	64	69	62	69	71
5,00E-06	-5,30	48	48	55	53	56	64
1,00E-05	-5,00	35	35	41	34	39	39
5,00E-05	-4,30	24	24	30	21	31	19

**Tabla 32.** Resultados del análisis de adhesión realizado a los compuestos pentapeptídicos **22, 23, 24, 25** y **26** a distintas concentraciones conocidas y su comparación con el Cilengitide.

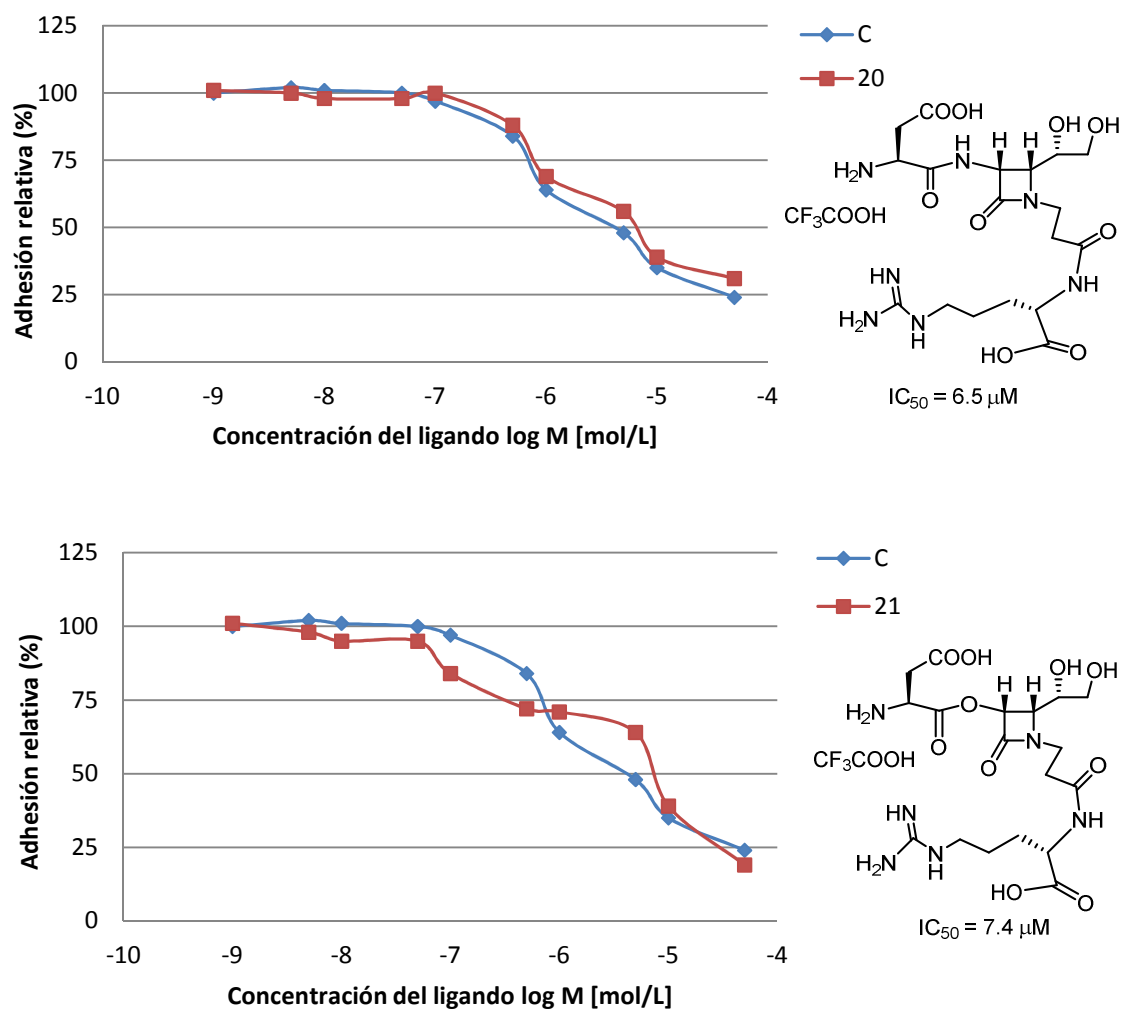
concentración		C	22	23	24	25	26
[M]	log (M)						
1,00E-09	-9,00	100	100	100	99	100	100
5,00E-09	-8,30	102	100	101	100	101	100
1,00E-08	-8,00	101	99	100	100	100	101
5,00E-08	-7,30	100	100	99	101	99	99
1,00E-07	-7,00	97	98	100	99	96	100
5,00E-07	-6,30	84	99	81	87	82	84
1,00E-06	-6,00	64	70	73	88	62	71
5,00E-06	-5,30	48	58	54	74	32	52
1,00E-05	-5,00	35	25	34	51	29	28
5,00E-05	-4,30	24	27	24	48	21	23



## Resultados y discusión

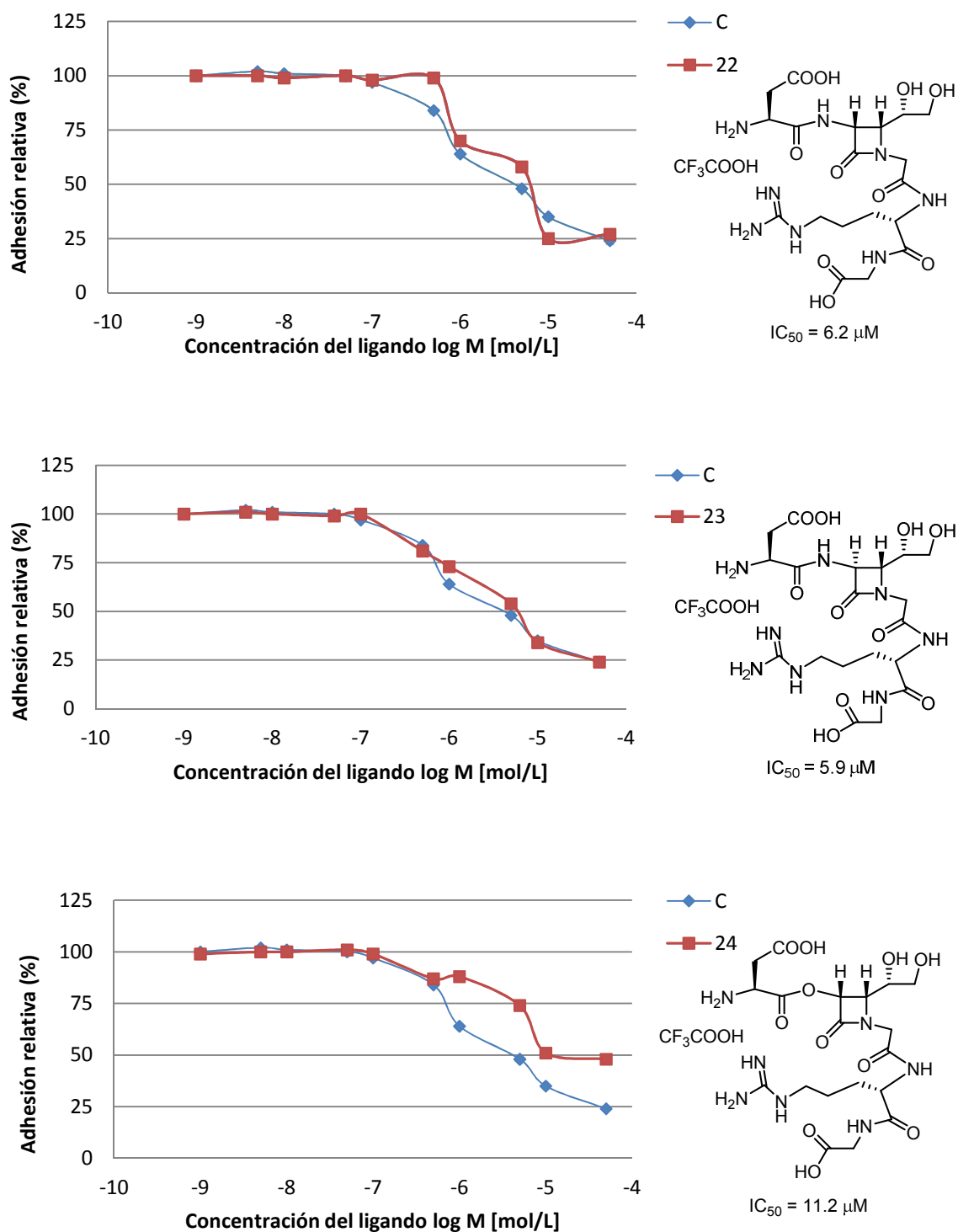


**Figura 178.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **17**, **18** y **19**; y su comparación con Cilengitide ( $IC_{50} = 4.2 \mu M$ ).

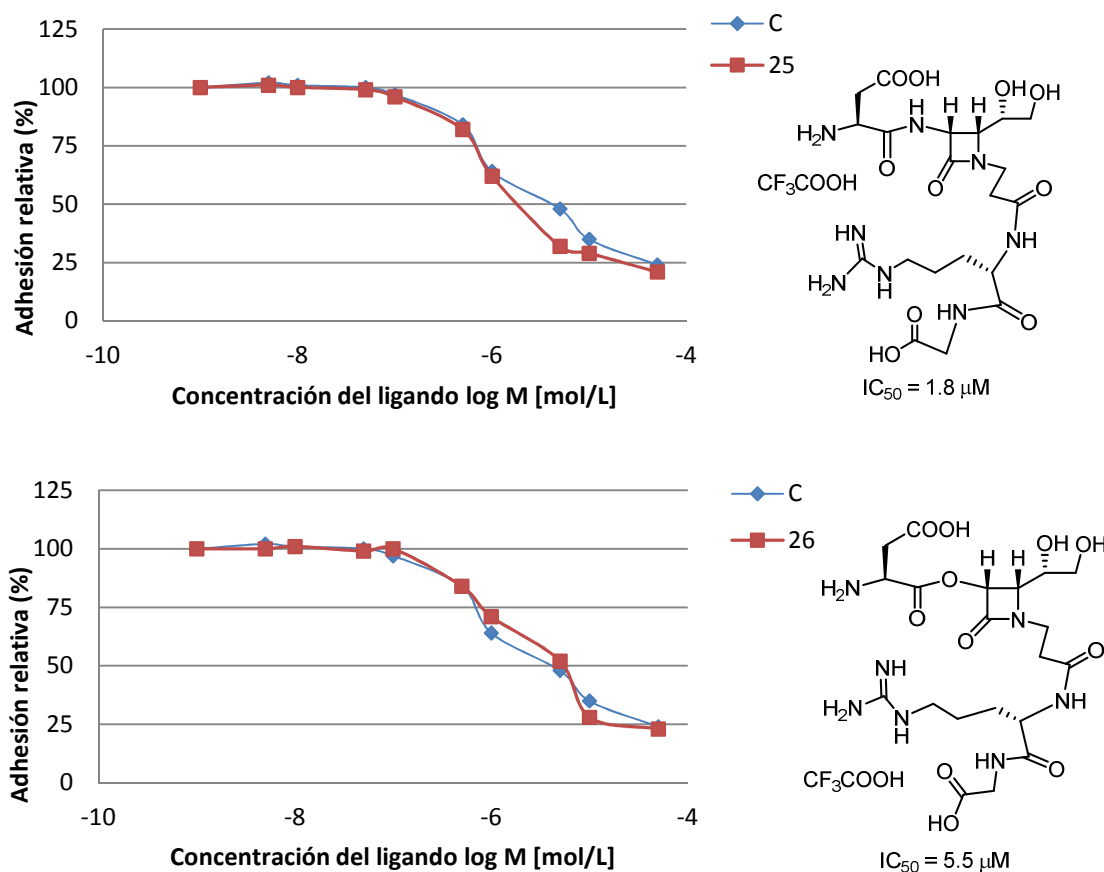


**Figura 179.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **20** y **21**; y su comparación con Cilgintide ( $IC_{50} = 4.2 \mu M$ ).

## Resultados y discusión



**Figura 180.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **22**, **23** y **24**; y su comparación con Cilengitide (IC<sub>50</sub> = 4.2 μM).



**Figura 181.** Representación de la adhesión del ligando vitronectina al receptor en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **25** y **26**; y su comparación con Cilengitide (IC<sub>50</sub> = 4.2 μM).

En todos los casos, exceptuando la molécula **21**, **22** y **24**, el comportamiento del ligando sintético es similar al del cilengitide; siendo incluso ligeramente superior en el caso de las moléculas **19**<sup>182</sup> y **25** (valores similares a los de los compuestos cíclicos).

Según este estudio, la mayor parte de las moléculas de cadena abierta, aún sin contener la secuencia de reconocimiento RGD formal, son capaces de interactuar con el receptor  $\alpha_v\beta_3$  desplazando el ligando natural. Esto quiere decir que la  $\beta$ -lactama podría estar produciendo una restricción conformacional suficiente orientando las cadenas hacia la conformación bioactiva, y creando un peptidomimético inverso que interactúa adecuadamente con el receptor.

<sup>182</sup> Aunque el valor del IC<sub>50</sub> de la molécula **19** (IC<sub>50</sub> = 5.9 μM) es superior al del Cilengitide (IC<sub>50</sub> = 4.2 μM), el gráfico muestra valores de concentración requerida inferiores en todos los valores medidos presentando en ese punto una singularidad.

Hay que tener en cuenta que, como ya se ha visto, una interacción ligando-receptor similar, no implica una respuesta biológica similar. Para analizar el tipo de respuesta es necesario realizar un análisis de la expresión génica.

### 5.3.3.2. Evaluación de la expresión génica de los compuestos de cadena abierta

Una vez que tuvimos las moléculas objetivo **19–26** sintetizadas llevamos a cabo un análisis de expresión génica mediante la técnica de *microarray* de ADNc, comparando los resultados con los de las moléculas **Va**, **Vb** y **C** (Cilengitide) y las moléculas objetivo del *Capítulo 1* **1**, **7**, **9**, **17** y **18**.

La fluorescencia consecuencia de la hibridación entre las hebras complementarias se recogió prestando especial atención a los 17 genes descritos como relacionados con la angiogénesis y la adhesión celular.

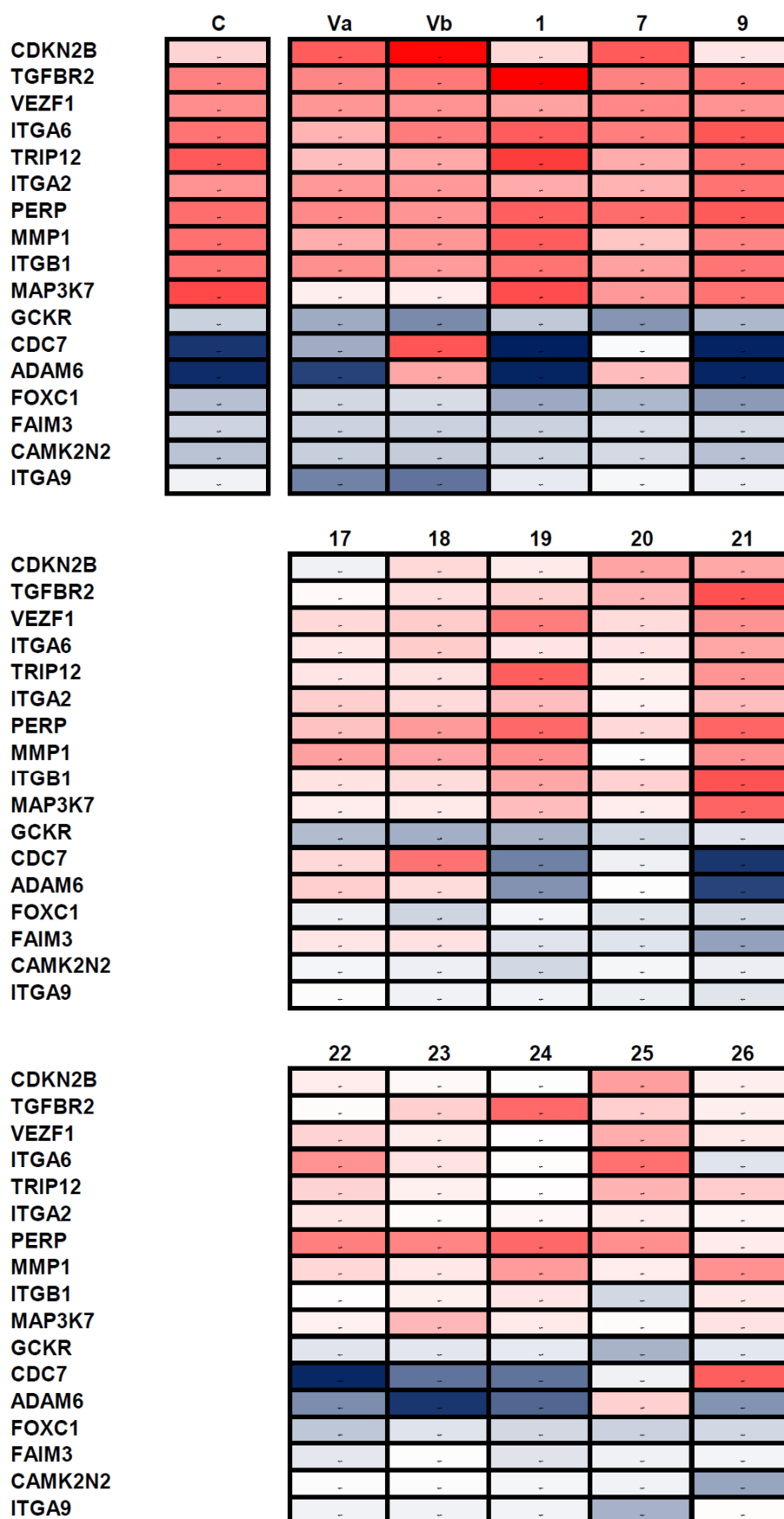
Como se puede observar en la *Tabla 33* todas las moléculas estudiadas tienen en mayor o menor medida el mismo tipo de respuesta biológica que el Cilengitide (C); por lo que podemos decir que todas ellas son antagonistas del proceso de angiogénesis.

Lo primero que resalta del análisis es que los compuestos cíclicos presentan mayor respuesta biológica que los compuestos de cadena abierta, por lo que deducimos, por un lado, que la estructura RGD es importante para que el reconocimiento ligando/receptor se produzca; y por otro lado, que una mayor rigidez en las estructuras impuesta por el anillo  $\beta$ -lactámico es beneficiosa si la conformación que se fija es afín al receptor como en el caso de la depsipéptido objetivo **1**.

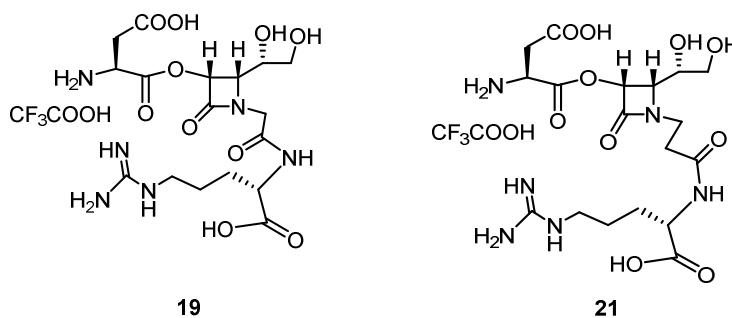
Por otro lado los tetrapeptidomiméticos de cadena abierta (**17–21**) presentan en general mayor potencia que sus análogos pentapeptídicos (**22–26**). Este hecho nos lleva a pensar que la glicina del extremo de la cadena entorpece el acercamiento del ligando al receptor.

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica muestran una actividad de los compuestos de cadena abierta muy inferior, en la mayoría de los casos, a la que era de esperar por los resultados del test de adhesión. Por lo que podemos concluir, que los compuestos sin secuencia de reconocimiento RGD sí son capaces de interactuar con el receptor pero no desencadenan la respuesta biológica deseada. No son tan eficientes.

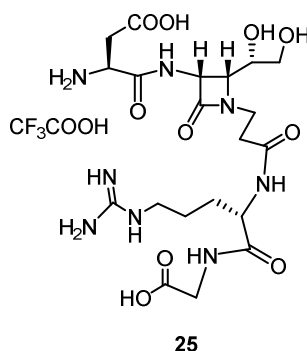
Tabla 33. Resultados de expresión génica de *microarray* de ADNc.



Hay que añadir en cambio que entre las moléculas de cadena abierta se encuentran varias excepciones interesantes como son los depsipéptidos **19** y **21**. El depsipéptido con un metileno añadido, **21**, llega incluso a mostrar una actividad biológica del mismo orden que las moléculas cíclicas. Hay que resaltar que ambas moléculas tienen importantes ventajas sintéticas (como la eliminación de la etapa de ciclación y la desprotección final en una única etapa) y se consiguen con mayores rendimientos en comparación con los compuestos cíclicos.



Entre los pentapeptidomiméticos también destaca ligeramente la actividad de la molécula **25**, péptido con el metileno añadido en la cadena lateral de la  $\beta$ -lactama, pero su capacidad inhibitoria no es del orden de los compuestos **19** y **21**.



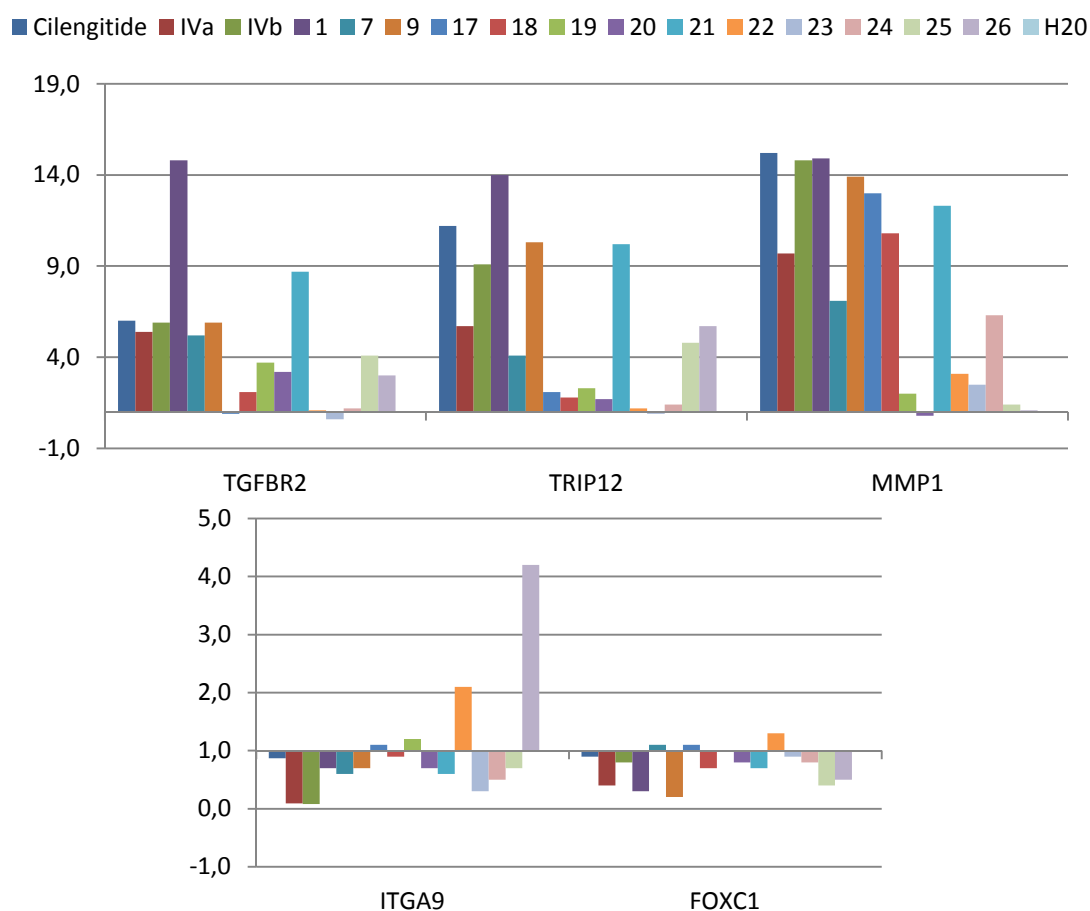
### 5.3.3.3. Comprobación de los resultados mediante qRT-PCR

Como en el *Capítulo 1*, para comprobar los datos obtenidos en el *microarray* se llevó a cabo un análisis de qRT-PCR para todas las moléculas objetivo centrándonos en los genes TGBR2, TRIP12, MMP1, ITGA9 y FOXC1; los datos se recogen en la *Tabla 34*.

De nuevo los datos de la qRT-PCR coinciden con los datos del *microarray*, se activan y se inhiben los mismos genes y en la misma medida en ambos experimentos; por lo que podemos concluir que el experimento de *microarray* es fiable.

**Tabla 34.** Resultados gráficos de la qPCR de las moléculas Cilengitide, Va, Vb, 1, 7, 9, 17–26.

Compuesto	TGFBR2	TRIP12	MMP1	ITGA9	FOXC1
<b>Cilengitide</b>	6,0	11,2	15,2	0,9	0,9
<b>Va</b>	5,4	5,7	9,7	0,1	0,4
<b>Vb</b>	5,9	9,1	14,8	0,1	0,8
<b>1</b>	14,8	14,0	14,9	0,7	0,3
<b>7</b>	5,2	4,1	7,1	0,6	1,1
<b>9</b>	5,9	10,3	13,9	0,7	0,2
<b>17</b>	0,9	2,1	13,0	1,1	1,1
<b>18</b>	2,1	1,8	10,8	0,9	0,7
<b>19</b>	3,7	2,3	2,0	1,2	1,0
<b>20</b>	3,2	1,7	0,8	0,7	0,8
<b>21</b>	8,7	10,2	12,3	0,6	0,7
<b>22</b>	1,1	1,2	3,1	2,1	1,3
<b>23</b>	0,6	0,9	2,5	0,3	0,9
<b>24</b>	1,2	1,4	6,3	0,5	0,8
<b>25</b>	4,1	4,8	1,4	0,7	0,4
<b>26</b>	3,0	5,7	1,1	4,2	0,5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0





### 5.3.3.4. Supervivencia de las células

También se midió la supervivencia de las células frente a los compuestos sintetizados para determinar su toxicidad. Como se puede observar en la 0, de nuevo, los compuestos de cadena abierta muestran una toxicidad menor que sus análogos cíclicos, incluyendo los compuestos de cadena abierta más activos **19**, **21** y **25**.

**Tabla 35.** Resultados de la supervivencia celular frente a los compuestos sintéticos.

Compuesto cíclico	Supervivencia celular %	Compuesto de cadena abierta	Supervivencia celular %
Agua	100	<b>17</b>	85
Cilengitide	65	<b>18</b>	95
<b>Vb</b>	65	<b>19</b>	90
<b>1</b>	60	<b>20</b>	85
<b>7</b>	65	<b>21</b>	85
<b>9</b>	70	<b>22</b>	90
		<b>23</b>	90
		<b>24</b>	80
		<b>25</b>	90
		<b>26</b>	85

### 5.3.4. Análisis conformacional de las moléculas de cadena abierta

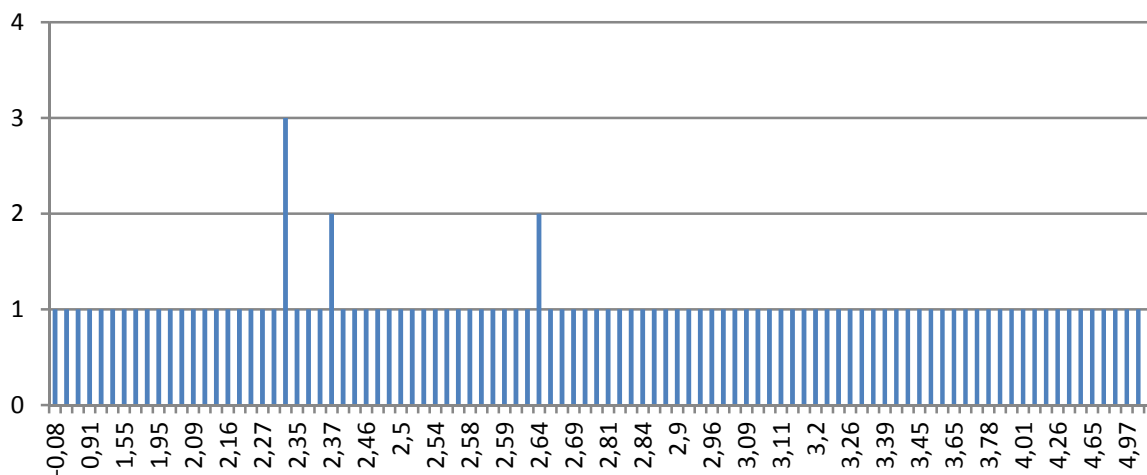
#### 5.3.4.1. Deriva térmica, enlaces de hidrógeno y modelización de las estructuras

Como en el caso de las moléculas cíclicas, se llevó a cabo un análisis mediante RMN de los enlaces de hidrógeno intramoleculares presentes en las moléculas de cadena abierta. Se calcularon los coeficientes térmicos de los protones amida registrando espectros de  $^1\text{H}$ -RMN entre 278 K y 303 K en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1), pero en este caso no se encontraron evidencias de la existencia de enlaces de hidrógeno.<sup>183</sup>

Las estructuras se modelizaron introduciendo como única restricción los ángulos diedros calculados empleando los valores de la constante de acoplamiento de

<sup>183</sup> Los resultados del análisis se encuentran recogidos en el apartado *Anexo* pág. 512.

los hidrógenos amídicos. Pero a diferencia del caso de los compuestos cíclicos, esta vez no fue posible agrupar las estructuras en *clusters* similares.



**Figura 182.** Ejemplo de la distribución de *clusters* de las 100 estructuras resultantes de los compuestos de cadena abierta y sus energías. Compuesto de mayor actividad biológica, **21**.

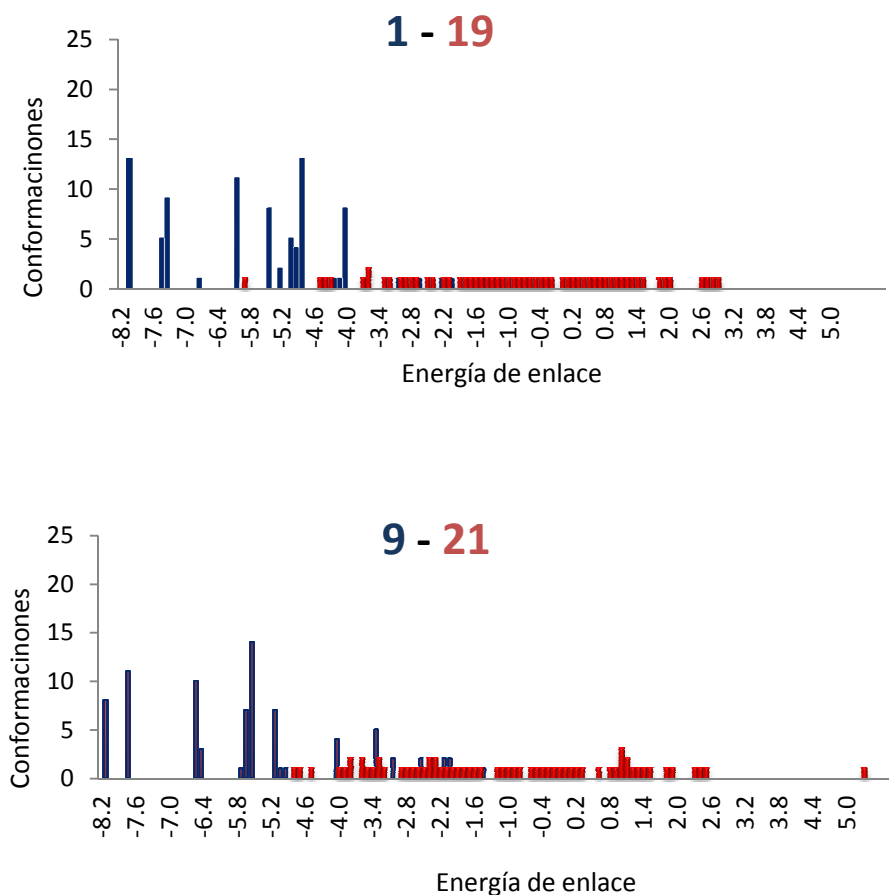
Podemos decir, por lo tanto, que las estructuras de los compuestos de cadena abierta sintetizados poseen un alto grado de libertad conformacional, es decir, no poseen una conformación mayoritaria, son flexibles.

#### 5.3.4.2. Modelización de la interacción ligando/Integrina $\alpha_v\beta_3$ (*Docking*)

Aún no habiendo hallado conformaciones mayoritarias posibles en los compuestos de cadena abierta, procedimos a realizar un estudio teórico de interacción con el centro activo de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Se determinó la distribución de *clusters*, pero a diferencia de las moléculas cíclicas, entre las conformaciones de los compuestos de cadena abierta no se encuentran agrupaciones (*Figura 183*). Además, estos compuestos muestran energías de enlace más altas manifestando incluso valores positivos propios de una interacción

nula para la mitad de las conformaciones. Este hecho se da tanto para las moléculas de cadena abierta más activas como para las menos activas.<sup>184</sup>



**Figura 183.** Distribución de *clusters* de las moléculas de cadena abierta más activas, **19** y **21**, y su comparación con sus análogas cíclicas.

A demás, en los compuestos de cadena abierta no se aprecia un comportamiento general claro de interacción; y el carbonilo del ácido aspártico interactúa tanto con el átomo de calcio 4003 como con el átomo de calcio 4001 y en muchas ocasiones no enlazan ambas subunidades de la integrina.

Hay que cometar que el método empleado para calcular las conformaciones mayoritarias de los péptidos y las relaciones interacción ligando/receptor-actividad no es el más adecuado porque, en primer lugar, el alto grado de libertad conformacional que presentan los compuestos de cadena abierta dificulta la determinación de la conformación de mínima energía, tanto en disolución como en contacto con el

<sup>184</sup> La distribución de *clusters* y representación de los *clusters* mayoritarios de menor energía se encuentran en el apartado *Anexo* pág. 518.

receptor; reduciendo la capacidad del programa de realizar predicciones. Y en segundo lugar, hay que tener en cuenta que los datos que poseemos sobre la estructura del receptor  $\alpha_V\beta_3$  se obtuvieron mediante la cristalización de la integrina en contacto con el cilengitide, compuesto cíclico;<sup>76</sup> la integrina podría adoptar otra disposición tridimensional diferente de la que no tenemos conocimiento en presencia de los compuestos de cadena abierta.

### **5.3.5. Comparación entre los análisis biológicos teóricos y experimentales**

A continuación se calcularon las energías de enlace y de torsión y se determinaron los valores de energía de disociación teóricos ( $K_i$ ) para las moléculas **17–26** (*Tabla 36* y *Tabla 37*). Estos valores se compararon con los de las moléculas cíclicas (*Tabla 26*) y se contrastaron con los resultados experimentales conseguidos en el test de adhesión y el análisis de la expresión génica.

En el caso de los compuestos de cadena abierta los cálculos teóricos no son capaces de predecir el comportamiento del ligando, aportando valores muy alejados de los resultados del test de adhesión experimental, que tampoco concuerdan con la potencia de la respuesta biológica final. Mientras que el test de adhesión revela que todos los ligando sintéticos interaccionan con el receptor a un nivel similar, (salvo alguna excepción), el cálculo de energías predice diferencias mucho mayores.

Los cálculos teóricos también son erróneos en el caso de los compuestos de cadena abierta más activos **19** y **21**; aunque sí parece acertar en el caso del compuesto **25**. Tampoco se observan distinciones entre los compuestos sin el aminoácido de glicina en la estructura **17–21** y los compuestos que sí lo poseen **22–26**.

## Resultados y discusión

**Tabla 36.** Energías de enlace, torsión y valores de  $K_i$  de los tetrapeptidomiméticos de cadena abierta **17–21**. Comparación de los resultados teóricos y experimentales.

Compuesto sin Gly	Energía de enlace (Kcal)	Energía de torsión (Kcal)	$K_i$ (nM)	Orden de la capacidad inhibitoria			
				teórico	experimental		
					adhesión <sup>175</sup>		expresión génica <sup>176</sup>
					IC <sub>50</sub> (μM)	orden	
<b>17</b>	-5.48	+5.07	95.45	3	5.01	2	5
<b>18</b>	-5.99	+5.37	40.56	1	6.61	4	4
<b>19</b>	-5.94	+5.37	44.60	2	5.89	1 <sup>182</sup>	2
<b>20</b>	-5.18	+5.37	159.16	4	6.46	3	3
<b>21</b>	-4.86	+5.67	272.59	5	7.41	5 <sup>185</sup>	1

**Tabla 37.** Energías de enlace, torsión y valores de  $K_i$  de los pentapeptidomiméticos de cadena abierta **22–26**. Comparación de los resultados teóricos y experimentales.

Compuesto con Gly	Energía de enlace (Kcal)	Energía de torsión (Kcal)	$K_i$ (nM)	Orden de la capacidad inhibitoria			
				teórico	experimental		
					adhesión <sup>175</sup>		expresión génica <sup>176</sup>
					IC <sub>50</sub> (μM)	orden	
<b>22</b>	-6.46	+6.26	18.42	2	6.17	4	2
<b>23</b>	-5.75	+6.26	61.00	3	5.89	3	4
<b>24</b>	-5.74	+6.86	74.79	5	11.22	5	3
<b>25</b>	-7.00	+6.56	7.44	1	1.82	1	1
<b>26</b>	-6.70	+6.26	62.34	4	5.49	2	5

<sup>185</sup> La curva de adhesión no sigue el patrón del Cilengitide, siendo menos activo en concentraciones más elevadas.



## ***CONCLUSIONES***

---

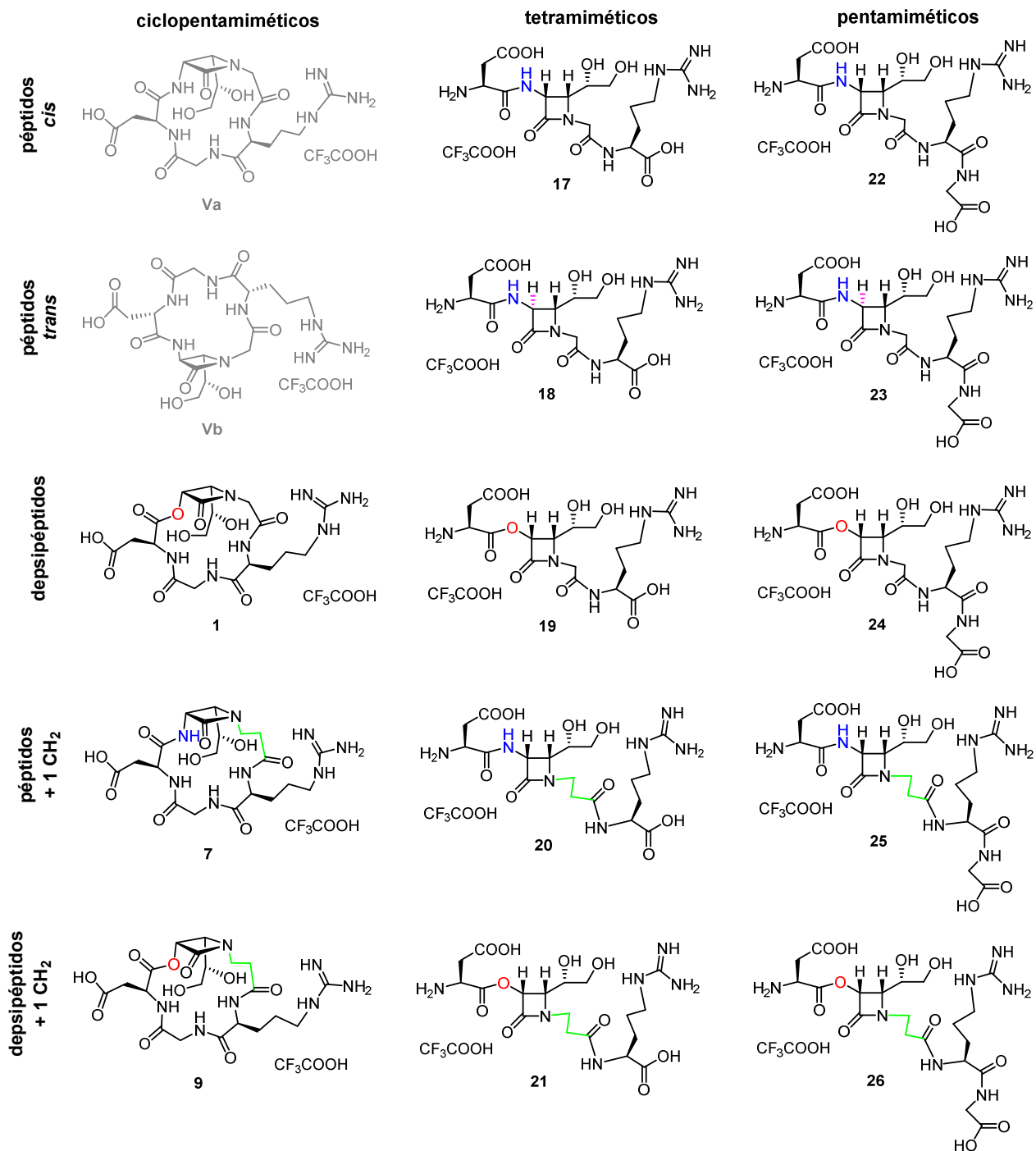




## 6. Conclusiones

- 1) Se ha desarrollado un procedimiento sintético eficaz para la síntesis de peptidomiméticos y depsipeptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos tanto cíclicos como de cadena abierta, posibilitando la preparación de la librería de compuestos de la *Tabla 38*.
- 2) Se han sintetizado por primera vez depsipéptidos  $\beta$ -lactámicos con estructura RGD cíclicos que han resultado demostrar mayor eficiencia en la inhibición del proceso angiogénico llevado a cabo por la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .
- 3) En el caso de los depsipéptidos, se ha podido ver que una mayor rigidez en el anillo da como resultado una interacción más efectiva. En los peptidomiméticos el resultado observado ha sido el inverso.
- 4) Hemos podido comprobar que las moléculas que no poseen estructura RGD definida presentan actividades más bajas. Aún así, entre los peptidomiméticos de cadena abierta preparados hemos descubierto algunos casos con actividades similares a los compuestos cíclicos más activos. Estos miméticos constan de grandes ventajas como mayor simpleza y versatilidad sintética.
- 5) Se ha demostrado que el análisis del nivel de adhesión no es suficiente para valorar la actividad biológica de un ligando RGD, y que un análisis de la respuesta biológica es necesario, siendo útil para este objetivo el análisis de la expresión génica.
- 6) Se ha observado que un análisis teórico de la interacción ligando-receptor no revela datos significativos para el caso de compuestos de cadena abierta.
- 7) No se ha podido comprobar la generalidad del carácter agonista de los tetrapéptidos cíclicos RD sin glicina frente al proceso de angiogénesis debido a que todos los intentos de síntesis realizados han sido fallidos.

Tabla 38. Moléculas sintetizadas durante la presente Tesis Doctoral.



## ***PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL***

---



## 7. Procedimiento experimental

En este apartado se especificarán los materiales, métodos y técnicas experimentales empleados, así como los procedimientos de síntesis de las moléculas preparadas en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

### 7.1. Materiales, métodos generales y técnicas empleadas

#### 7.1.1. Materiales

Los reactivos químicos de partida y disolventes se adquirieron en las siguientes casas comerciales: *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Acros Organics*, *Merck*, *Scharlau*, *Panreac*, etc. y fueron utilizados sin previa purificación salvo que se indique lo contrario. Los reactivos se almacenaron según las especificaciones de la casa comercial.

Los disolventes utilizados como eluyentes en cromatografía de columna fueron de calidad extra pura (*Scharlau*) y se utilizaron sin purificaron previa.

Los disolventes anhidros empleados en las reacciones se prepararon empleando técnicas habituales.<sup>186</sup> El diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y el acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) se secaron por destilación sobre hidruro cálcico mientras que el tolueno se destiló sobre sodio hilado. El tetrahidrofurano (THF) y el dietil éter ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) fueron de la casa comercial *Scharlau* (pureza para HPLC) y se anhidrizaron mediante una columna de secado (*Pure Solv. It.*). El resto de disolventes (MeOH, EtOH,  $^i\text{PrOH}$ , acetona,...) se adquirieron con calidad de grado sintético y se emplearon sin secado previo.

Las destilaciones se llevaron a cabo mediante procedimientos ordinarios de destilación a presión atmosférica. De forma general, la eliminación de los disolventes de reacción, así como los disolventes provenientes de extracciones y columnas cromatográficas, se efectuó a presión reducida en rotavapores *Büchi R-110*, *R-200* y *R-210*.

---

<sup>186</sup> Perrin, D. D., Perrin, D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*, 2ª Edición 1989, Pergamon Press, Oxford.

## 7.1.2. Métodos generales

### 7.1.2.1. Condiciones de reacción

Todas las reacciones que requieren condiciones anhidras se han realizado bajo atmósfera de nitrógeno o argón, en sistemas de vidrio secados previamente a altas temperaturas empleando un calefactor; para mantener una atmósfera inerte se han usado técnicas convencionales de transferencia mediante jeringa y cánula.

Las reacciones que requirieron calefacción se llevaron a cabo en un sistema provisto de refrigeración sobre una placa calefactora con baño de aceite y control de temperatura con *termopar*. Para las reacciones llevadas a cabo a baja temperatura se emplearon baños termostatzados de <sup>1</sup>PrOH en aparatos refrigeradores *Huber T100 E*. Cuando en la parte experimental se indica temperatura ambiente (t. a.) se refiere a la temperatura usual del laboratorio (20–25 °C).

### 7.1.2.2. Seguimiento de las reacciones

El seguimiento de las reacciones se efectuó de varias maneras, dependiendo de la reacción. Como norma general se empleó la cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice soportada sobre placas de aluminio (TLC) (*Merck, Kieselgel 60 F-254*) y su revelado se realizó con luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  y  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) y por calefacción en contacto con una de las siguientes disoluciones reveladoras: i) disolución de ácido fosfomolibdico (2.5 g), nitrato de cerio y amonio (1.0 g) y una disolución acuosa al 6% de ácido sulfúrico (100 mL) en agua (470 mL); ii) disolución de permanganato potásico (3.0 g), carbonato potásico (20.0 g) y una disolución acuosa de hidróxido sódico al 5% (5 mL) en agua (300 mL).

En otras ocasiones fue necesario el empleo de técnicas espectroscópicas o espectrométricas como el análisis de aliquotas mediante RMN o el IR.

### 7.1.2.3. Purificación de los productos

La purificación de los productos de reacción se llevó a cabo a través de cromatografía *flash* en columna, utilizando gel de sílice *Merck 60 230–400 mesh* (0.040–0.063 mm) como fase estacionaria. En los casos en los que la inestabilidad de los productos lo requirió, se empleó gel de sílice básica como fase estacionaria. El gel de sílice básico se preparó por agitación mecánica de la gel de sílice ácida comercial en 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 horas. Como fase móvil se emplearon mezclas de disolventes en las proporciones indicadas.

También se emplearon técnicas de purificación más básicas como la precipitación y el triturado, o la cristalización empleando mezclas de disolvente hexano/acetato de etilo o diisopropil éter. En caso de purificación por precipitación el sólido obtenido se centrifugó a 6.000 revoluciones durante 4 minutos empleando una centrifugadora de *Hettich (Universal 320)*.

### 7.1.3. Técnicas empleadas

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

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron registrados en espectrómetros *Bruker Advance DPX 300 MHz* (75 MHz para  $^{13}\text{C}$ -RMN) y *Bruker Advance Ultrashield 500 MHz* (125 MHz para  $^{13}\text{C}$ -RMN). 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  $\delta = 7.26$  ppm para  $^1\text{H}$ -RMN y  $\delta = 77.16$  ppm para  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Las constantes de acoplamiento  $J$  vienen dadas en Hz. Para la descripción de las señales se han utilizado las siguientes abreviaturas: s (singlete), m (multiplete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), dd (doble doblete), dt (doble triplete), dq (doble cuadruplete), td (triple doblete), tt (tripletriplete), ddd (doble doble doblete) y bs (señal ancha). La localización de los protones en cada aminoácido se ha indicado mediante el empleo de superíndices ( $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{H}^\beta$ ,  $\text{H}^\gamma$  y  $\text{H}^\delta$ ); del mismo modo se han nombrado los protones pertenecientes a las posiciones C3 y C4 de las  $\beta$ -lactamas ( $\text{H}^\alpha$  y  $\text{H}^\beta$  respectivamente). Para indicar la isomería de los protones se ha empleado subíndices ( $\text{H}_\text{S}$  y  $\text{H}_\text{R}$ ).

La asignación de las señales se realizó mediante experimentos de RMN 2D (COSY, HSQC...).

El procesado y edición de los espectros registrados se realizó mediante el programa *MestReNova*.

#### **7.1.4. Polarimetría, puntos de fusión, IR y pesada**

Los valores de rotación óptica fueron medidos con un polarímetro *Jasco P-200* y se expresan como valores específicos  $[\alpha]$  (longitud de onda empleada: línea D del sodio), con indicación del disolvente y la concentración utilizada (g/100 mL).

Los espectros de IR fueron registrados en el espectrómetro modelo *Alpha-P de Bruker*.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato *Büchi SMP-20*. Hay que destacar que los productos más complejos sintetizados durante la tesis muestran rangos de punto de fusión más amplios de lo habitual dada su capacidad por formar agregados, y que con el aumento del tamaño del péptido se detecta la descomposición del producto antes de llegar al punto de fusión. Por esta razón solo se han detallado los puntos de fusión de las moléculas más pequeñas.

Durante el proceso sintético y de caracterización las muestras se pesaron en balanzas de precisión (*Sartorius MC410S*, 4 decimales con 1 mg de incertidumbre); para la obtención de las disoluciones a evaluar genéticamente, se emplearon en cambio, balanzas más específicas (*Sartorius TE64*, 0.1 mg de incertidumbre).

##### **7.1.4.1. Masa y pureza de los compuestos**

La medición de la masa exacta de los compuestos finales se realizó por inyección directa en un espectrómetro de masas (HRMS) con un analizador de tiempo de vuelo (*Waters, LCT Premier XE, TOF*) con 3 ppm de exactitud en la determinación de las masas.

La masa del resto de los compuestos se calculó mediante *ACQUITY UPLC (Waters)* con un detector de masas de triple cuadrupolo (TQD).

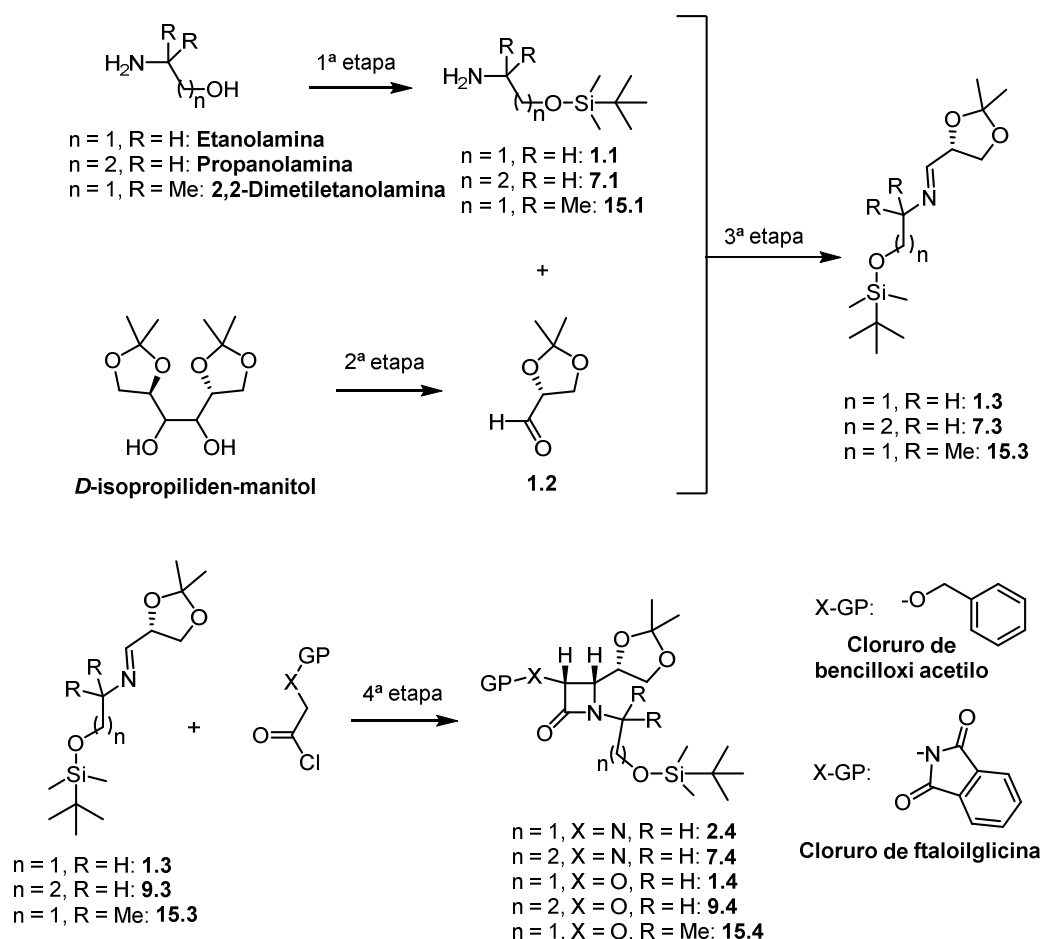
La pureza de los compuestos se ha determinado por *UPLC (Sistema ACQUITY UPLC)*.



## 7.2. Síntesis experimental

### 7.2.1. Síntesis de las estructuras de partida (*building blocks*)

#### 7.2.1.1. Síntesis de las $\beta$ -lactamas 2.4, 7.4, 1.4, 9.4, 15.4 mediante la reacción de Staudinger



#### Procedimiento general

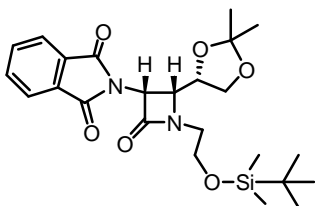
**1ª Etapa:** Sobre una disolución del aminoalcohol (1 equiv., 0.2 mol) y TEA (2 equiv., 56 mL, 0.4 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (275 mL) y en atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota una disolución de  $^t\text{BuMe}_2\text{SiCl}$  (1 equiv, 30.1 g, 0.2 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (275 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se lavó con una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 x 200 mL), se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 200 mL) y se lavó con una disolución saturada de  $\text{NaCl}$  (2 x 200 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se evaporó a presión

reducida obteniendo el aminoalcohol sililado que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación con un rendimiento superior al 95%.

**2ª Etapa:** En un matraz flameado y bajo atmosfera de nitrógeno se enfrió a 0 °C una suspensión de 9 g de periodato sódico sobre sílica gel en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (30 mL). A esta mezcla se le añadió una suspensión de 1,2:5,6-Di-*O*-isopropiliden-*D*-manitol (1 equiv., 1.4 g, 4.0 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (3 equiv., 1.01 g, 12 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (12 mL). La reacción se mantuvo a 0 °C, bajo intensa agitación, durante 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se filtró sobre una placa y se lavó la sílica gel con más CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3 x 10 mL). El disolvente se evaporó a presión reducida tras lo cual se obtuvo el aldehído **1.2** que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación y con un rendimiento del 80%.

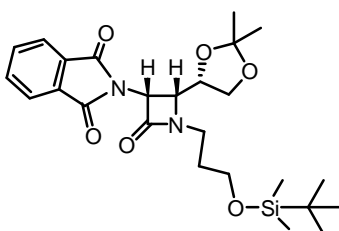
**3ª y 4ª etapas:** Sobre una disolución del (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído (**1.2**) (1.1 equiv., 0.79 g, 6.1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (30 mL) y a 0 °C se adicionó el aminoalcohol sililado correspondiente (1 equiv., 6.0 mmol) y tamiz molecular (4 Å). La mezcla de reacción fue agitada durante 60 minutos a la misma temperatura. Pasado ese tiempo, y habiendo comprobado por <sup>1</sup>H-RMN la formación de la imina; se adicionó, vía cánula, a otro matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución se enfrió a -78 °C y se añadió TEA (2 equiv., 1.7 mL, 12.0 mmol). A continuación se adicionó gota a gota y a la misma temperatura una disolución del cloruro de ácido (1.1 equiv., 6.1 mmol) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (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 añadió agua (30 mL), la fase orgánica se decantó, se lavó sucesivamente con una disolución 0.1 M de HCl (2 x 30 mL) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 mL) y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La evaporación del disolvente a presión reducida dio lugar a la correspondiente β-lactama que fue convenientemente purificada mediante cromatografía líquida sobre gel de sílice básica (eluyente en gradiente hexano 100% → EtOAc/hexano (5/95)).

**(3R,4R)-3-Ftalimidoil-1-[2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (2.4):**



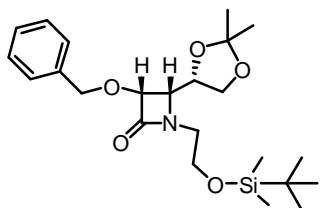
La ftalimidoil- $\beta$ -lactama **2.4** fue sintetizada a partir de la (*Z,S*)-*N*-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metiliden]-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etilamina **1.3**, preparada por reacción entre la 2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etilamina **1.1** (1.00 g, 6.0 mmol) y el (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído **1.2** (0.79 g, 6.1 mmol), y posterior reacción con la cetena del cloruro de ftaloilglicina (1.40 g, 6.1 mmol). Rendimiento global: 2.19 g (77%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -19.42$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 2985, 2930, 2884, 2857, 1768, 1720.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.97–7.66 (4H, m, arom.); 5.32 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 5.3$  Hz); 4.34 (1H, dt,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 3.96 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz); 3.90–3.80 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}$ ); 3.76–3.64 (2H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ , N- $\text{CH}_2$ ); 3.50–3.37 (2H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ , N- $\text{CH}_2$ ); 1.40 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.26 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 0.91 (9H, s, Si- $^t\text{Bu}$ ); 0.09 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 167.0, 163.1, 134.6, 131.3, 123.7, 109.8, 75.9, 65.8, 61.5, 59.6, 54.7, 44.1, 26.5, 25.6, 24.9, 18.0, -5.6, -5.7.

**(3R,4R)-3-Ftalimidoil-1-[3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (7.4):**



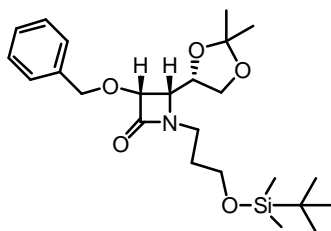
La ftalimidoil- $\beta$ -lactama **7.4** fue sintetizada a partir de la (*Z,S*)-*N*-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metiliden]-3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propilamina **7.3**, preparada mediante la reacción de la 3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propilamina **7.1** (1.14 g, 6.0 mmol) y el (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído **1.2** (0.79 g, 6.1 mmol), y posterior reacción de la imina formada con la cetena del cloruro de ftaloilglicina (1.40 g, 6.1 mmol). Rendimiento global: 1.82 g (62%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -18.55$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 2983, 2929, 2884, 2855, 1765, 1720.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.93–7.68 (4H, m, arom.); 5.32 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 5.2$  Hz); 4.36 (1H, dt,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz); 3.90 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 3.73 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}$ ,  $J = 6.1$  Hz); 3.69 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz); 3.65–3.47 (2H, m, N- $\text{CH}_2$ ); 3.44 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz); 2.09–1.76 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 1.39 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.25 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 0.90 (9H, s, Si- $^t\text{Bu}$ ); 0.07 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 166.9, 162.9, 134.6, 131.1, 123.7, 109.7, 75.7, 65.7, 61.3, 60.6, 54.4, 39.6, 30.5, 26.6, 25.8, 25.0, 18.1, -5.5.

**(3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-1-[2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (1.4):**



La BnO-β-lactama **1.4** fue sintetizada a partir de la (*Z,S*)-*N*-[[2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metiliden]-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etilamina **1.3**, preparada por reacción de la de la 2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etilamina **1.1** (1.0 g, 6.0 mmol) y el (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído **1.2** (0.79 g, 6.1 mmol), y posterior reacción con la cetena del cloruro de benciloxiacetilo comercial (1 mL, 6.1 mmol). Rendimiento global: 1.88 g (72%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -45.89$  ( $c = 0.5$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2985, 2953, 2928, 2856, 1761. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.43–7.25 (5H, m, arom.); 4.91 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.7$  Hz); 4.72–4.53 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph y H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 4.32 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 4.14 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 3.79 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 6.0$  Hz); 3.71 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact],  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.63 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 3.60–3.49 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.35 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.7$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.90 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 167.7, 137.0, 128.4, 127.9, 127.7, 109.4, 80.5, 77.2, 72.8, 66.8, 60.9, 59.9, 43.5, 26.8, 25.8, 25.1, 18.1, -5.4.

**(3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-1-[3-(*terc*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (9.4):**



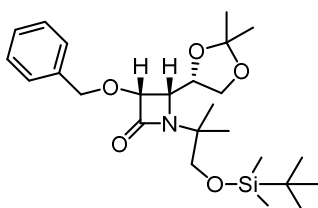
La BnO-β-lactama **9.4** fue sintetizada a partir de la (*Z,S*)-*N*-[[2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metiliden]-3-(*terc*-butildimetilsililoxi)propilamina **7.3**, preparada por reacción de la 3-(*terc*-butildimetilsililoxi)propilamina **7.1** (1.14 g, 6.0 mmol) y el (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído **1.2** (0.79 g, 6.1 mmol), y posterior reacción de la imina formada con la cetena del cloruro de benciloxiacetilo comercial (1 mL, 6.1 mmol). Rendimiento global: 1.50 g (55%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -48.11$  ( $c = 0.5$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2985, 2929, 2884, 2857, 1755. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.41–7.20 (5H, m, arom.); 4.90 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.8$  Hz); 4.63 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.8$  Hz); 4.57 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J = 5.1$  Hz); 4.30 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 4.14 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 3.74–3.58 (4H, m, 2H CH<sub>2</sub>-O-Si, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.50 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.9$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz,  $J_3 = 6.7$  Hz); 3.30 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.9$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz,  $J_3 = 6.0$  Hz); 2.02–1.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.42 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>):

167.6, 137.1, 128.5, 128.0, 127.8, 109.5, 80.3, 77.2, 72.8, 66.9, 60.8, 60.5, 38.8, 30.6, 26.9, 25.9, 25.2, 18.3, -5.3.

**3-Benciloxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.4):**

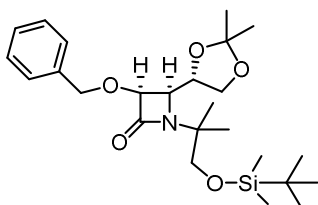
La BnO-β-lactama **15.4** fue sintetizada a partir de la (*Z,S*)-1,1-dimetil-*N*-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metiliden]-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etilamina **15.3**, preparada mediante la 1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etilamina **15.1** (1.22 g, 6.0 mmol) y el (*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carbaldehído **1.2** (0.79 g, 6.1 mmol), y por reacción con la cetena del cloruro de benciloxiacetilo comercial (1 mL, 6.1 mmol). Rendimiento global: 1.53 g (55%) de la mezcla de diasterómeros (*3R,4S*/*3S,4R* (3/1)). Los diasterómeros difícilmente se separan aunque se pudieron aislar fracciones puras de ambos.

**(3*R,4S*)-3-Benciloxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.4a):**



Producto mayoritario (75%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -36.82$  ( $c = 0.5$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2982, 2951, 2928, 2882, 2856, 1745, 1471, 1369. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.42–7.28 (5H, m, arom.); 4.92 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.7$  Hz); 4.64 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.7$  Hz); 4.48 (1H, d, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[β-lact],  $J = 5.5$  Hz); 4.29–4.12 (2H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.79–3.73 (1H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub>[β-lact]); 3.71 (1H, d, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 9.7$  Hz); 3.63 (1H, d, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 9.7$  Hz); 3.58 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 6.1$  Hz,  $J_2 = 4.1$  Hz); 1.42 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.38 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.35 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.88 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 167.7, 137.2, 128.6, 128.01, 128.0, 109.3, 78.8, 77.6, 72.9, 67.9, 67.4, 60.9, 26.7, 26.0, 25.3, 23.3, 23.2, 18.3, -5.4.

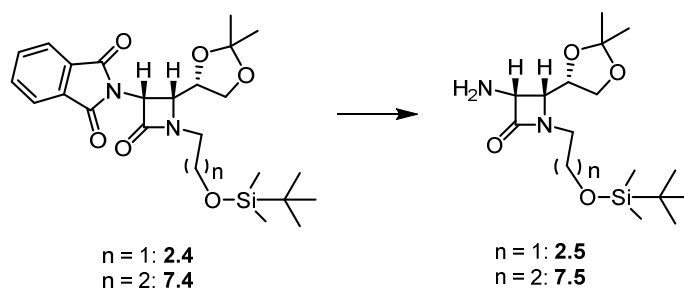
**(3*S,4R*)-3-Benciloxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.4b):**



Producto minoritario (25%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = +13.54$  ( $c = 0.5$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2985, 2953, 2928, 2856, 1761. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.39–7.28 (5H, m, arom.); 4.86 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.7$  Hz); 4.61 (1H, d, CH<sub>2</sub>-Ph,  $J = 11.7$  Hz); 4.56 (1H, d,

$H^{\alpha}_S[\beta\text{-lact}], J = 5.6 \text{ Hz}$ ; 4.28 (1H, dd,  $H^{\beta}_R[\beta\text{-lact}], J_1 = 5.6 \text{ Hz}, J_2 = 2.0 \text{ Hz}$ ); 4.19 (1H, ddd,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}], J_1 = 7.6 \text{ Hz}, J_2 = 6.8 \text{ Hz}, J = 2.0 \text{ Hz}$ ); 3.94 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}], J_1 = 8.5 \text{ Hz}, J_2 = 6.8 \text{ Hz}$ ); 3.87 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}], J_1 = 8.5 \text{ Hz}, J_2 = 7.6 \text{ Hz}$ ); 3.78 (1H, d,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}, J = 9.6 \text{ Hz}$ ); 3.55 (1H, d,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}, J = 9.6 \text{ Hz}$ ); 1.47 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.36 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.30 (3H, s, N-C- $\text{CH}_3$ ); 1.28 (3H, s, N-C- $\text{CH}_3$ ); 0.88 (9H, s, Si- $t\text{Bu}$ ); 0.04 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 168.0, 137.2, 128.6, 128.2, 128.1, 108.1, 79.0, 75.0, 73.4, 67.8, 64.5, 58.8, 26.0, 23.8, 23.5, 23.4, 18.3, -5.4.

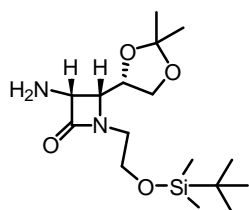
### 7.2.1.2. Desprotección del grupo ftaloilo en las $\beta$ -lactamas 2.4 y 7.4



#### Procedimiento general

En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó la correspondiente ftalimido- $\beta$ -lactama (1 equiv., 4.62 mmol) en etanol (50 mL). Sobre la disolución se vertió hidracina monohidratada (4.3 equiv., 1.11 mL, 20.8 mmol) y la reacción se agitó vigorosamente durante 48 horas. Pasado ese tiempo la reacción se filtró, y el precipitado se lavó con éter (30 mL). Se recogieron todas las fases orgánicas y se lavaron con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 50 mL) y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación del disolvente a presión reducida dio lugar a la correspondiente  $\beta$ -lactama que fue utilizada en la siguiente reacción sin posterior purificación.

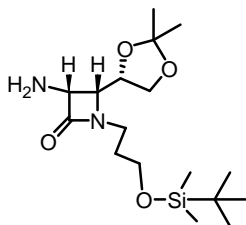
#### (3*R*,4*R*)-3-Amino-1-[(2-*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (2.5):



La amino- $\beta$ -lactama **2.5** fue sintetizada a partir de la ftalimido- $\beta$ -lactama **2.4** (2.19 g, 4.62 mmol). Rendimiento: 1.51 g (95%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = +0.81$  ( $c = 0.5, \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3386, 3334, 2984, 2952, 2928, 2856, 1747.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.29–4.13 (3H, m,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}], \text{CH}_2[\text{dioxol}], H^{\alpha}_R[\beta\text{-lact}]$ ); 3.98–3.86 (1H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ); 3.82–3.68 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}, H^{\beta}_R[\beta\text{-lact}]$ ); 3.61 (1H, dt, N- $\text{CH}_2, J_1 = 14.1 \text{ Hz}, J_2 = 5.5 \text{ Hz}$ ); 3.24 (1H, dt, N- $\text{CH}_2, J_1 = 14.1 \text{ Hz}, J_2 = 5.5 \text{ Hz}$ ); 1.72 (2H,

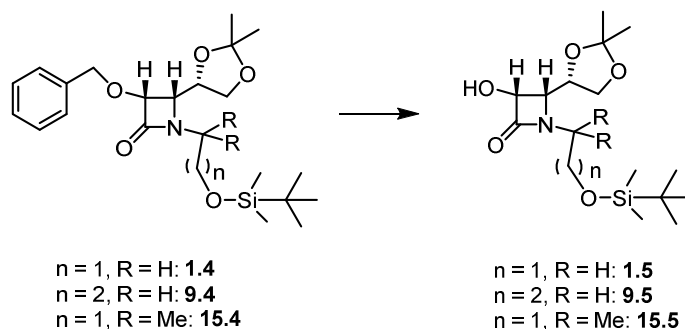
b.s., NH<sub>2</sub>); 1.44 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.88 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.3, 109.8, 75.9, 66.7, 61.5, 61.1, 61.1, 43.4, 26.7, 26.0, 25.1, 18.3, -5.3, -5.3.

**(3*R*,4*S*)-3-Amino-1-[(3-*tert*-butildimetilsililo)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (7.5):**



La amino-β-lactama **7.5** fue sintetizada a partir de la ftalimido-β-lactama **7.4** (1.82 g, 3.72 mmol). Rendimiento: 1.27 g (95%). Aceite. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +7.67 (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3477, 3383, 3332, 2984, 2952, 2928, 2885, 2856, 1739. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.24–4.11 (2H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 4.09 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], J = 5.2 Hz); 3.75–3.65 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.60–3.53 (3H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 3.46 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub> = 13.8 Hz, J<sub>2</sub> = 8.2 Hz, J<sub>3</sub> = 6.7 Hz); 3.16 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub> = 13.8 Hz, J<sub>2</sub> = 8.1 Hz, J<sub>3</sub> = 5.9 Hz); 1.86–1.64 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.50 (2H, b.s., NH<sub>2</sub>); 1.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.82 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); -0.03 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.7, 109.5, 76.4, 66.8, 60.8, 60.5, 38.6, 30.7, 26.7, 25.9, 25.0, 17.3, -5.4.

**7.2.1.3. Desprotección del grupo benciloxilo en las β-lactamas 1.4, 9.4 y 15.4**

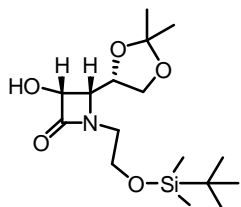


**Procedimiento general**

Sobre una disolución de la correspondiente BnO-β-lactama (1 equiv., 4.32 mmol) en metanol (40 mL) y bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó formiato amónico (6 equiv., 1.63g, 25.9 mmol) y paladio al 10% sobre carbono (%15) 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) y se lavó con HCl 0.1 N (2 x 60 mL). La fase orgánica fue separada y secada con MgSO<sub>4</sub>. La

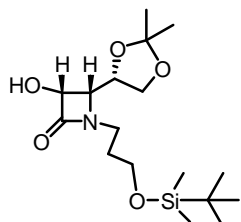
evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue cristalizado en hexano.

**(3*R*,4*S*)-3-Hidroxi-1-[(2-*terc*-butildimetilsililo)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (1.5):**



La HO- $\beta$ -lactama **1.5** fue sintetizada a partir de la BnO- $\beta$ -lactama **1.4** (1.88 g, 4.32 mmol). Rendimiento: 1.43 g (96%). Sólido blanco, p.f. = 140–142 °C.  $[\alpha]_D^{25} = -4.07$  (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3333, 2984, 2952, 2929, 2884, 2856, 1735. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.82 (1H, dd, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lact],  $J_1 = 8.5$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 4.40–4.30 (1H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.19 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 7.1$  Hz); 4.00 (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lact],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.90–3.83 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.79–3.71 (2H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si); 3.66 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.39 (1H, d, HO,  $J = 8.5$  Hz); 3.24 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 1.46 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.88 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.8, 109.7, 76.6, 75.3, 66.7, 62.1, 60.2, 43.6, 26.8, 25.9, 25.1, 18.2, -5.3, -5.4.

**(3*R*,4*S*)-3-Hidroxi-1-[(3-*terc*-butildimetilsililo)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (9.5):**



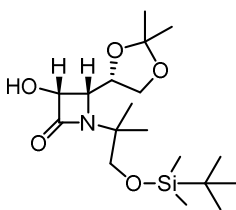
La HO- $\beta$ -lactama **9.5** fue sintetizada a partir de la BnO- $\beta$ -lactama **9.4** (1.50 g, 3.30 mmol). Rendimiento: 1.14 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 111–114 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +13.83$  (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3308, 2985, 2929, 2894, 2858, 1719. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.79 (1H, dd, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lact],  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 4.34 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 4.21 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 3.97 (1H, d, OH,  $J = 7.5$  Hz); 3.81 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 3.71 (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> <sub>S</sub>[ $\beta$ -lact],  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 3.63 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 6.1$  Hz); 3.55 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz,  $J_3 = 6.8$  Hz); 3.25 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz,  $J_3 = 6.1$  Hz); 1.96–1.66 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.45 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.6, 109.6, 76.9, 75.0, 66.9, 61.8, 60.8, 39.0, 30.6, 26.9, 26.0, 25.2, 18.3, -5.3.



**3-Hidroxi-1-[1,1-dimetil-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.5):**

La HO- $\beta$ -lactama **15.5** fue sintetizada a partir de la BnO- $\beta$ -lactama **15.4** (1.53 g, 3.30 mmol) (mezcla de diasterómeros). Rendimiento: 1.19 g (96%) (mezcla de diasterómeros).

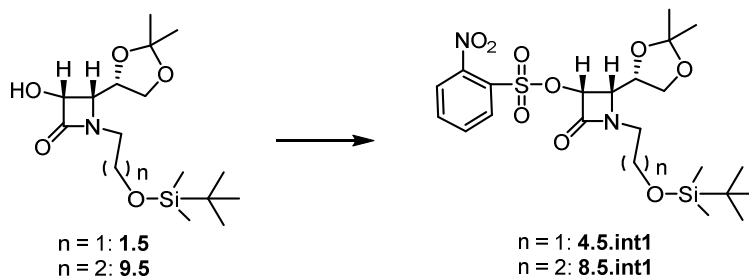
**(3*R*,4*S*)-3-Hidroxi-1-[1,1-dimetil-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.5a):**



El crudo se cristalizó en hexano consiguiendo el producto mayoritario puro. Rendimiento: del diasterómero puro: 0.79 g (64%). Sólido blanco, p.f. = 99–101 °C.  $[\alpha]_D^{25} = -10.15$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3323, 2982, 2952, 2928, 2884, 2856, 1729, 1471, 1370.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.31 (1H, b.s., OH); 4.71 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}], J = 5.0$  Hz); 4.30 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}], J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz); 4.21 (1H, dt,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}], J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz); 3.77 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{S}}[\beta\text{-lact}], J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.71–3.60 (3H, m, 1H  $\text{CH}_2[\text{dioxol}], 2\text{H } \text{CH}_2\text{-O-Si}$ ); 1.44 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.37 (3H, s, N-C- $\text{CH}_3$ ); 1.35 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.33 (3H, s, N-C- $\text{CH}_3$ ); 0.88 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 0.04 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 171.1, 109.1, 77.5, 73.14, 67.8, 67.4, 62.3, 58.2, 26.7, 25.9, 25.2, 23.1, 18.3, -5.4.

**7.2.1.4. Inversión de la configuración de las  $\beta$ -lactamas 1.5 y 9.5**

**7.2.1.4.1. Nosilación de las  $\beta$ -lactamas 1.5 y 9.5**

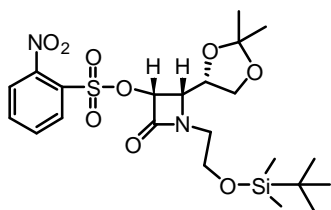


**Procedimiento general**

Una disolución de la HO- $\beta$ -lactama correspondiente (1 equiv., 4.15 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (45 mL) en atmósfera de nitrógeno, fue enfriada a 0 °C. Posteriormente se

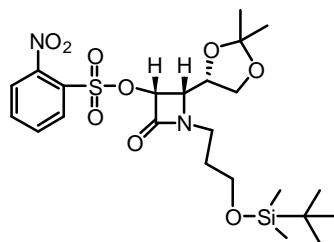
adicionó TEA (2 equiv., 1.15 mL, 8.3 mmol) y se mantuvo en agitación durante diez minutos. A continuación se añadió, a la misma temperatura, el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (1.1 equiv., 1.01 g, 4.57 mmol). La reacción se mantuvo 3 horas en agitación a 0 °C y tras comprobar por TLC (EtOAc/hexano (1/1)) que no quedaba producto de partida se lavó con una disolución saturada de NaCl (2 x 30 mL). La fase orgánica fue separada y secada con MgSO<sub>4</sub>. La evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue utilizado en la siguiente reacción sin posterior purificación.

**(3R,4S)-1-[2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona (4.5.int1):**



La Ns-β-lactama **4.5.int1** fue sintetizada a partir de la HO-β-lactama **1.5** (1.43 g, 4.15 mmol). Rendimiento: 2.12 g (96%). Aceite.  $[\alpha]_D^{25} = +85.02$  (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2985, 2929, 2884, 2856, 1769, 1544, 1381. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.26–7.74 (4H, m, arom.); 5.60 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], J = 5.0 Hz); 4.34 (1H, ddd, CH<sub>5</sub>[dioxol], J<sub>1</sub> = 8.7 Hz, J<sub>2</sub> = 6.6 Hz, J<sub>3</sub> = 5.4 Hz); 4.19 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, J<sub>2</sub> = 6.6 Hz); 3.93 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], J<sub>1</sub> = 8.7 Hz, J<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 3.79–3.71 (3H, m, 2H CH<sub>2</sub>-O-Si, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.53 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub> = 13.8 Hz, J<sub>2</sub> = 5.8 Hz); 3.34 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub> = 13.8 Hz, J<sub>2</sub> = 5.8); 1.44 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.87 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.9, 148.2, 135.5, 132.7, 131.5, 129.4, 125.1, 110.0, 79.4, 76.2, 66.3, 60.5, 59.6, 44.1, 26.7, 25.7, 24.9, 18.0, -5.5, -5.5.

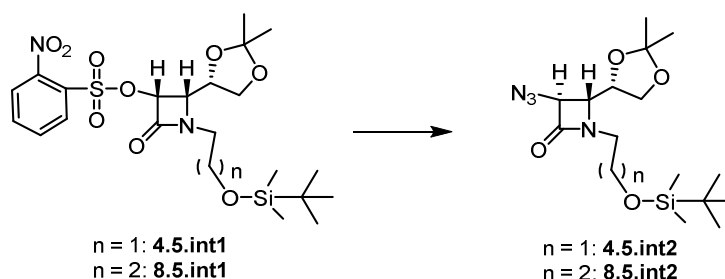
**(3R,4S)-1-[3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidín-2-ona (8.5.int1):**



La Ns-β-lactama **8.5.int1** fue sintetizada a partir de la HO-β-lactama **9.5** (1.14 g, 3.17 mmol). Rendimiento: 1.64 g (96%). Aceite.  $[\alpha]_D^{25} = +88.89$  (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3096, 2986, 2933, 2886, 2858, 1770, 1546, 1383. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.32–7.74 (4H, m, arom.); 5.58 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], J = 5.0 Hz); 4.35 (1H, ddd, CH<sub>5</sub>[dioxol], J<sub>1</sub> = 8.9 Hz, J<sub>2</sub> = 6.5 Hz, J<sub>3</sub> = 5.2 Hz); 4.23 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, J<sub>2</sub> = 6.5 Hz); 3.85 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], J<sub>1</sub> = 8.9 Hz, J<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 3.76 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, J<sub>2</sub> = 5.2 Hz); 3.61 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, J = 5.9 Hz); 3.51 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>, J<sub>1</sub> = 13.9 Hz, J<sub>2</sub> = 8.2 Hz, J<sub>3</sub> = 6.7 Hz); 3.31 (1H, ddd,

N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.9$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz,  $J_3 = 6.0$  Hz); 1.93–1.72 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.45 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.87 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.03 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).  
<sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.8, 148.4, 135.5, 132.8, 131.7, 129.7, 125.2, 110.1, 79.4, 76.4, 66.5, 60.7, 60.1, 39.9, 30.4, 26.9, 26.0, 25.7, 25.0, 18.3, -5.3.

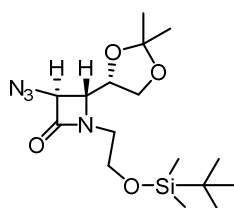
### 7.2.1.4.2. Introducción del grupo azida e inversión de configuración en las β-lactamas 4.5.Int1 y 8.5.Int1



### Procedimiento general

Se calentó a 80 °C una disolución de la Ns-β-lactama correspondiente (1 equiv., 3.99 mmol) en DMF (35 mL). Una vez alcanzada dicha temperatura se adicionó la azida sódica (5 equiv., 1.30 g, 19.95 mmol) y se mantuvo la reacción durante una hora a la misma temperatura. Pasado ese tiempo se sacó el matraz del baño y se dejó que la disolución alcanzara la temperatura ambiente, manteniéndose en agitación durante una hora más. Tras comprobar por TLC (EtOAc/hexano (1/1)) que no quedaba producto de partida, la mezcla se lavó con H<sub>2</sub>O (20 mL). Se extrajo varias veces la fase acuosa con dietil éter (4 x 20 mL). Se juntaron las fases orgánicas y se lavaron varias veces con una disolución saturada de NaCl (3 x 50 mL). La fase orgánica fue separada y secada con MgSO<sub>4</sub>. La evaporación a presión reducida del disolvente dio un residuo que fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice básica (EtOAc/hexano (5/95)).

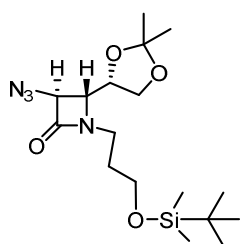
### (3S,4R)-3-Azido-1-[2-(*terc*-butildimetilsililo)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (4.5.int2):



La azido-β-lactama **4.5.int2** fue sintetizada a partir de la Ns-β-lactama **4.5.int1** (2.12 g, 3.99 mmol). Rendimiento: 0.96 (65%). Aceite.  $[\alpha]_D^{25} = -105.25$  ( $c = 1$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2986, 2952, 2929, 2884, 2857, 2106, 1763, 1471, 1371, 1255. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.30–4.22 (2H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], H<sup>α</sup><sub>5</sub>[β-lact]); 4.09 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 7.1$  Hz); 3.90 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.9$  Hz,

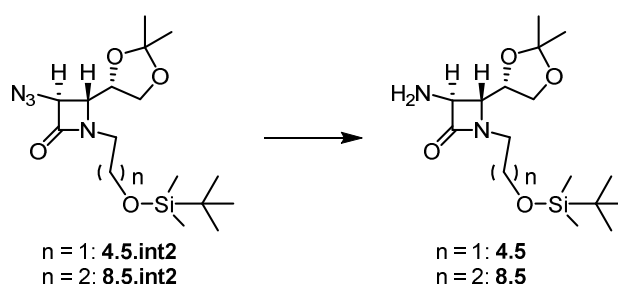
$J_2 = 4.7$  Hz); 3.18–3.72 (2H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si); 3.62 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J_1 = 5.6$  Hz,  $J_2 = 2.0$  Hz); 3.58 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.26 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 4.6$  Hz); 1.44 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 163.9, 110.5, 75.4, 65.6, 65.4, 62.1, 61.0, 43.8, 26.6, 25.9, 24.8, 18.2, -5.4, -5.5.

**(3S,4R)-3-Azido-1-[3-(*terc*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (8.5.int2):**



La azido-β-lactama **8.5.int2** fue sintetizada a partir de la Ns-β-lactama **8.5.int1** (1.64 g, 3.04 mmol). Rendimiento: 0.74 (63%). Aceite.  $[\alpha]_D^{25} = -84.60$  (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2985, 2952, 2929, 2884, 2856, 2107, 1764, 1471, 1372. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.24–4.16 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.12 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz); 3.78 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 3.65 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 6.1$  Hz); 3.59–3.50 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.48 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J_1 = 6.8$  Hz,  $J_2 = 2.0$  Hz); 3.25 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 7.9$  Hz,  $J_3 = 6.2$  Hz); 1.97–1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.45 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.90 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 163.2, 110.4, 75.9, 65.7, 65.0, 61.3, 60.2, 38.9, 30.6, 26.5, 25.7, 24.8, 18.0, -5.6.

**7.2.1.4.3. Reducción del grupo azida a amina en las β-lactamas 4.5 y 8.5**

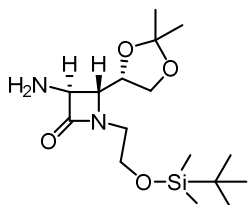


**Procedimiento general**

Sobre una disolución de la azido-β-lactama correspondiente (1 equiv., 2.59 mmol) en EtOH (25 mL) se adicionó el catalizador de *Lindlar* (180 mg, 5% Pd/CaCO<sub>3</sub>) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación bajo atmósfera de hidrógeno 16 horas. Tras comprobar mediante TLC (hexano/EtOAc (2/1)) que no quedaba producto de partida, el catalizador se eliminó mediante filtración sobre celita y el residuo fue

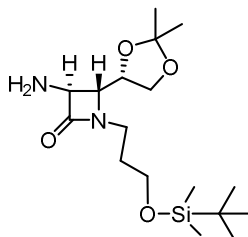
evaporado a presión reducida para obtener el compuesto que se utilizó en la siguiente reacción sin posterior purificación.

**(3S,4R)-3-Amino-1-(2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil)-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (4.5):**



La amino- $\beta$ -lactama **4.5** fue sintetizada a partir de la azido- $\beta$ -lactama **4.5.int2** (0.96 g, 2.59 mmol). Rendimiento: 0.86 g (96%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -37.99$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3372, 2984, 2952, 2928, 2883, 2856, 1745.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.18 (1H, dt,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 4.10 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 3.87 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 3.77 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}$ ,  $J = 5.8$  Hz); 3.75–3.66 (1H, m,  $\text{H}^\alpha_S[\beta\text{-lact}]$ ); 3.53 (1H, dt,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 3.38 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_R[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz); 3.27 (1H, dt,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 1.55 (2H, b.s.,  $\text{NH}_2$ ); 1.44 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.35 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 0.89 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ );  $-0.05$  (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 170.1, 109.6, 76.9, 65.6, 65.0, 61.6, 60.1, 43.2, 26.4, 25.5, 25.4, 17.8,  $-5.7$ ,  $-5.7$ .

**(3S,4R)-3-Amino-1-[3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (8.5):**

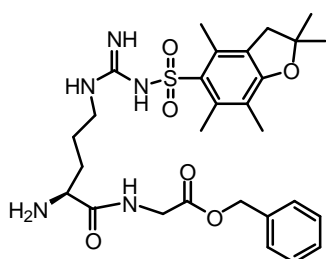


La amino- $\beta$ -lactama **8.5** fue sintetizada a partir de la azido- $\beta$ -lactama **8.5.int2** (0.74 g, 1.92 mmol). Rendimiento: 0.66 g (96%). Aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{25} = -27.87$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3372, 2984, 2952, 2928, 2883, 2856, 1745.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.23–4.03 (2H, m,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}]$ ,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ); 3.89–3.77 (1H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ); 3.71–3.57 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{-O-Si}$ ,  $\text{H}^\alpha_S[\beta\text{-lact}]$ ); 3.46 (1H, ddd,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J_1 = 15.1$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz,  $J_3 = 6.8$  Hz); 3.36–3.15 (2H, m,  $\text{H}^\beta_R[\beta\text{-lact}]$ ,  $\text{N-CH}_2$ ); 2.00–1.71 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 1.55 (2H, b.s.,  $\text{NH}_2$ ); 1.44 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 0.89 (9H, s,  $\text{Si-}^t\text{Bu}$ ); 0.05 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 169.8, 110.0, 77.3, 65.9, 64.7, 61.5, 60.5, 38.6, 30.8, 26.6, 25.7, 25.0, 18.1,  $-5.5$ .



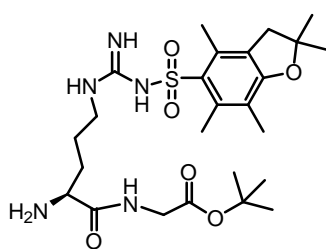
**2ª Etapa:** El dipéptido así preparado se disolvió en ácido fórmico (40 mL) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante cinco horas. La reacción se siguió por TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20/1)) y cuando la conversión resultó ser cuantitativa se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) y se basificó empleando NaHCO<sub>3</sub> concentrado hasta conseguir un pH de 10. Se separaron las dos fases formadas y la disolución acuosa básica se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL). Las fases orgánicas se secaron con MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se utilizó en la siguiente reacción sin necesidad de purificación posterior.

**NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn (1.10):**



El NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** se sintetizó a partir del derivado del aminoácido comercial NH<sub>2</sub>-Gly-OBn·HCl (1.76 g, 8.4 mmol). Rendimiento global: 4.23 g (84%). Sólido blanco, p. f. = 63–72 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3433, 3334, 2972, 1748, 1669, 1616, 1548. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.00 (1H, t, NH[Gly], *J* = 5.3 Hz); 7.42–7.21 (5H, m, arom.); 6.42–6.22 (3H, m, NH(C=NH)NH); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.03 (2H, dd, H<sup>α</sup>[Gly], *J*<sub>1</sub> = 5.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.7 Hz); 3.51–3.37 (1H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 3.30–3.12 (2H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 3.00 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.60 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.52 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.95–1.74 (2H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.74–1.53 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.48 (6H, s, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 176.1, 170.0, 158.7, 156.5, 138.2, 135.3, 133.0, 132.2, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 124.7, 117.5, 86.4, 67.0, 54.3, 43.2, 41.1, 40.6, 32.0, 28.6, 25.4, 19.2, 17.9, 12.4.

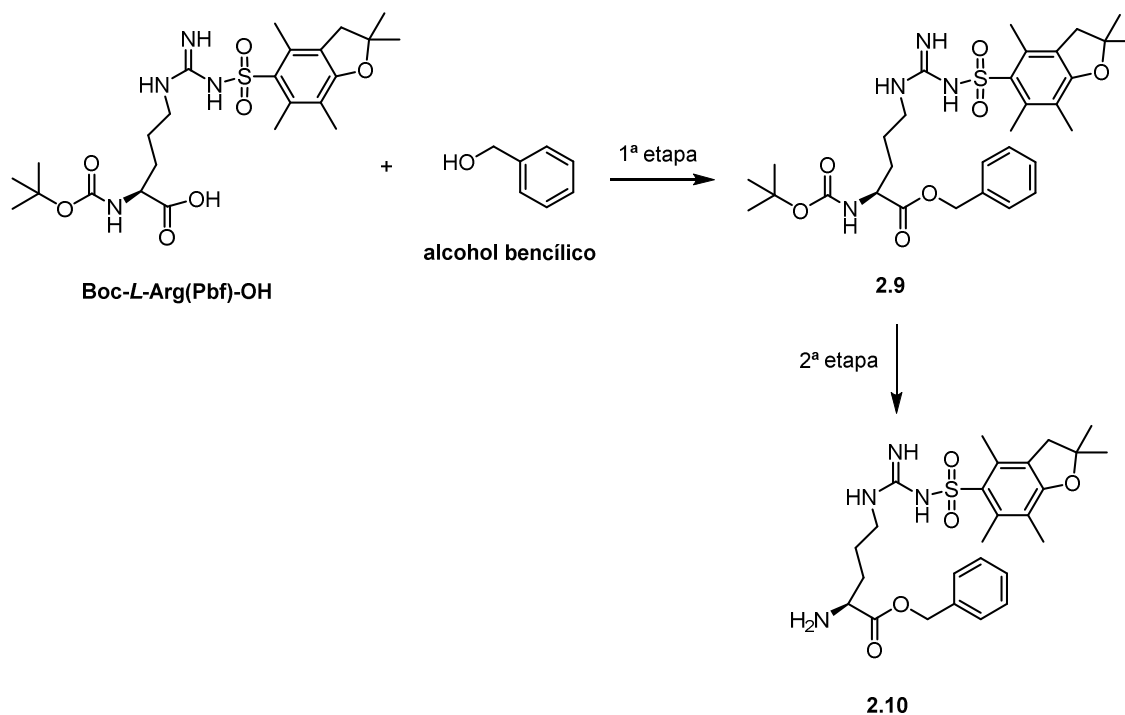
**NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (24.10):**



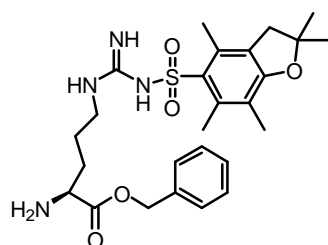
El NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu **24.10** se sintetizó a partir del derivado del aminoácido comercial NH<sub>2</sub>-Gly-O<sup>t</sup>Bu·HCl (1.39 g, 8.4 mmol). Rendimiento global: 3.32 g (81%). Sólido blanco, p. f. = 98–104 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3427, 3327, 2971, 2930, 1734, 1636, 1550. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.13–7.95 (1H, m, NH[Gly]); 6.65–6.35 (3H, m, NH(C=NH)NH); 4.01–3.79 (2H, m, H<sup>α</sup>[Gly]); 3.75–3.58 (1H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 3.34–3.12 (2H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 2.94 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 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]); 1.96–1.77 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.78–1.56 (3H, m, 2H H<sup>γ</sup>[Arg], 1H H<sup>β</sup>[Arg]); 1.42 (6H, s, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>); 1.44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 174.7, 169.3, 158.8,

156.6, 138.4, 132.9, 132.4, 124.7, 117.6, 86.5, 82.3, 54.1, 43.4, 42.0, 40.7, 31.5, 28.7, 28.2, 25.4, 19.4, 18.1, 12.6.

### 7.2.1.6. Preparación del éster bencílico de la arginina 2.10



#### NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn (2.10):



**1ª Etapa:** En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvió la Boc-Arg(Pbf)-OH (1 equiv., 4 g, 7.6 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (180 mL) a 0 °C junto con BnOH (1.1 equiv., 0.87 mL, 8.4 mmol). Sobre esta mezcla se añadió TEA (2 equiv., 2 mL, 15.2 mmol) y posteriormente de forma consecutiva los agentes de acoplamiento EDC-HCl (1.6 equiv., 2.33 g, 12.16 mmol), y HOBT (1.4 equiv., 1.44 g, 10.6 mmol). Tras la adición se dejó que la disolución alcanzara poco a poco la temperatura ambiente agitando la mezcla de la reacción durante 20 horas. Transcurrido ese tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2 x 80 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 80 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 con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20/1).

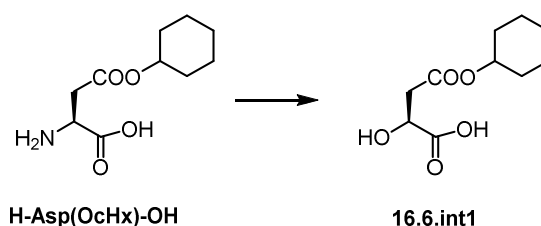
**2ª Etapa:** El compuesto Boc-NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.9** preparado (3.75 g, 6.08 mmol) se disolvió en ácido fórmico (40 mL) y se dejó en agitación a temperatura



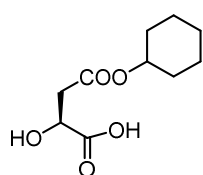
ambiente durante cinco horas. La reacción se controló mediante TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (20/1)) y cuando la conversión resultó ser cuantitativa la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) y se basificó empleando  $\text{NaHCO}_3$  concentrado hasta conseguir un pH de 10. Se separaron las dos fases formadas y la disolución acuosa básica se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se utilizó en la siguiente reacción sin necesidad de purificación.

Rendimiento global: 2.99 g (76%). Sólido blanco, p. f. = 65–73 °C. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3436, 3337, 2975, 2930, 2874, 1734, 1620, 1551.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.44–7.28 (5H, m, arom.); 6.31–6.07 (3H, m,  $\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}$ ); 5.14 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ); 3.69–3.52 (1H, m,  $\text{H}^\alpha[\text{Arg}]$ ); 3.23–3.08 (2H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ); 2.94 (2H, s,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ); 2.56 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.50 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.08 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.92–1.75 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.75–1.54 (3H, m, 2H  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ , 1H  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.45 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 175.5, 158.8, 156.4, 138.3, 135.7, 133.2, 132.2, 128.7, 128.4, 128.3, 124.7, 117.5, 86.4, 66.8, 54.1, 43.3, 40.8, 31.6, 28.6, 25.6, 19.3, 18.0, 12.5.

### 7.2.1.7. Preparación del hidroxiaácido derivado del ácido aspártico



#### Ácido 4-(ciclohexiloil)-2-hidroxi-4-oxobutanoico (16.6.int1):

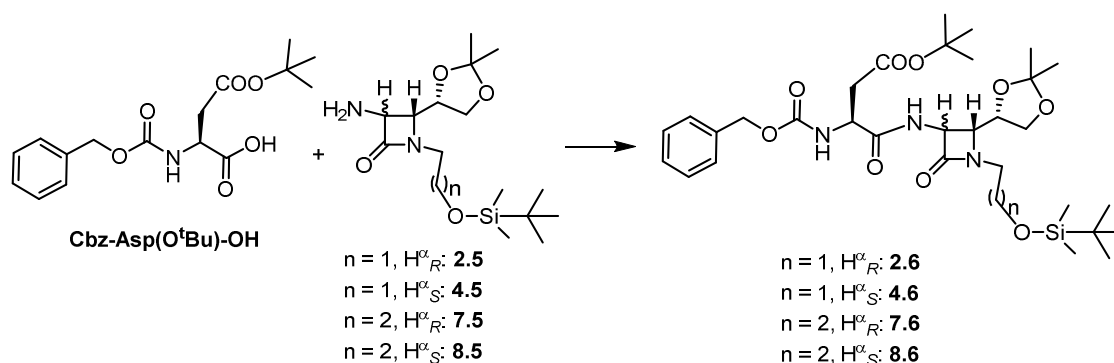


Se disolvió el H-Asp(OcHx)-OH (1 equiv., 2.15 g, 10 mmol) en una mezcla de ácido acético (5 mL) y agua (20 mL) a 0 °C y se le añadió gota a gota una disolución de  $\text{NaNO}_2$  (2 equiv., 1.38 g, 20 mmol) en agua (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Tras comprobar mediante TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  (90/9/1)) que no quedaba producto de partida la mezcla de reacción se trató con metilamina 2 M en THF (10 mL). La fase orgánica se eliminó a presión reducida y la fase acuosa restante se acidificó con  $\text{HCl}$  1 M hasta que el pH fue 2. La fase acuosa ácida se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . El disolvente se eliminó a presión reducida y como resultado se consiguió un aceite amarillo que se empleó en la siguiente reacción sin previa purificación. Rendimiento: 2.05 g (95%). Aceite amarillo. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):

3465, 3210, 2935, 2859, 1729.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.40 (1H, b.s., OH.); 4.80–4.69 (1H, m,  $\text{CH}[\text{cHx}]$ ); 4.52 (1H, t,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ); 2.90–2.80 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ); 2.75 (1H, dd,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 16.5$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 1.90–1.10 (10H, m,  $\text{CH}_2[\text{cHx}]$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 176.6, 170.6, 73.9, 67.1, 38.8, 31.4, 25.2, 23.6.

## 7.2.2. Acoplamiento entre las HO- y $\text{NH}_2$ - $\beta$ -lactamas y el aspártico

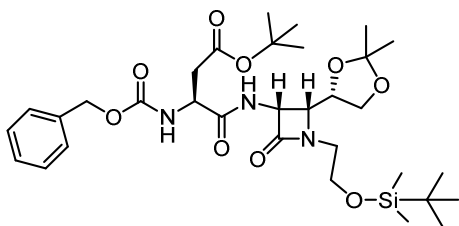
### 7.2.2.1. Acoplamiento entre las 3-amino- $\beta$ -lactamas 2.5, 4.5, 7.5 y 8.5 y el ácido aspártico



### Procedimiento general

En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvió la correspondiente 3-amino- $\beta$ -lactama (1 equiv., 4.39 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (90 mL) a 0 °C. Sobre ella se adicionaron consecutivamente el derivado de ácido aspártico (1.56 g, 1.1 equiv., 4.83 mmol), TEA (2 equiv., 1.2 mL, 8.78 mmol), EDC·HCl (1.6 equiv., 1.34 g, 7.02 mmol), y HOBt (1.4 equiv., 0.83 g, 6.14 mmol) dejando que la disolución alcanzara poco a poco la temperatura ambiente mientras se agitaba la mezcla de reacción durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2 x 60 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 60 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice básica (EtOAc/hexano (5/95)).

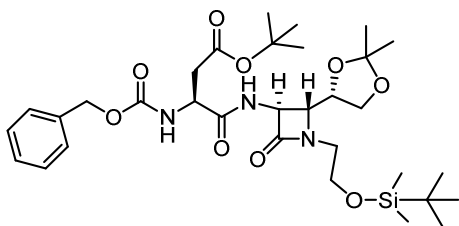
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (2.6):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama **2.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (1.56 g, 4.83 mmol) y la 3-amino-β-lactama **2.5** (1.51 g, 4.39 mmol). Rendimiento: 2.25 g (79%). Sólido blanco, p. f. = 99–102 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>,

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3306, 3065, 3034, 2932, 2886, 2858, 1731, 1680, 1529. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.45–7.29 (6H, m, arom., NH-β-lact); 5.85 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.0 Hz); 5.27 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 5.20–5.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.52 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 4.17–4.08 (1H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 4.08–3.99 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.97–3.89 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.80–3.57 (3H, m, 1H N-CH<sub>2</sub>, 2H CH<sub>2</sub>-O-Si); 3.23 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 2.84 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 2.68 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 1.42 (12H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol], <sup>t</sup>Bu); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.88 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.2, 170.3, 167.0, 156.2, 136.1, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 109.7, 81.5, 75.3, 67.1, 66.0, 60.9, 60.6, 56.6, 51.6, 43.5, 37.4, 28.0, 26.5, 25.8, 24.8, 18.1, -5.4, -5.5.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (4.6):**

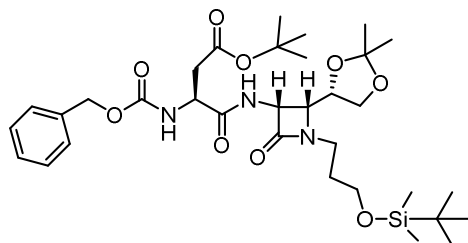


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama **4.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.89 g, 2.75 mmol) y la 3-amino-β-lactama **4.5** (0.86 g, 2.5 mmol). Rendimiento: 1.33 g (82%). Sólido blanco, p. f. = 103–107 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>,

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3303, 3065, 3032, 2930, 2886, 1768, 1754, 1730, 1682, 1531. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.42–7.30 (5H, m, arom.); 7.13 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 7.4 Hz); 5.86 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.9 Hz); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.61–4.42 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.24–4.07 (2H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.86–3.71 (3H, m, 2H CH<sub>2</sub>-O-Si, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.56 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz); 3.44 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz); 3.33 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz); 3.00 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.2 Hz); 2.56 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.7 Hz); 1.43 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.5, 171.2, 165.4, 136.0, 128.8, 128.5,

128.4, 110.3, 82.3, 77.4, 67.6, 66.7, 64.2, 60.4, 58.2, 51.2, 44.1, 37.6, 28.1, 26.8, 26.0, 25.4, 18.3, -5.2, -5.3.

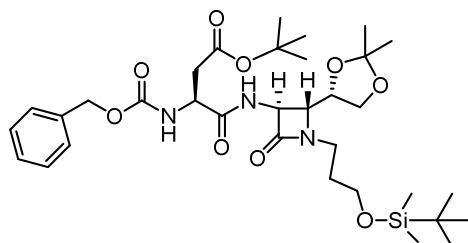
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*R*)-3-amino-1-[3-(*terc*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (7.6):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama **7.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (1.26 g, 3.88 mmol) y la 3-amino-β-lactama **7.5** (1.27 g, 3.53 mmol). Rendimiento: 1.83 g (78%). Sólido blanco, p. f. = 95–99 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3399, 3063, 3033, 2979, 2952,

2929, 2885, 2856, 1746, 1677. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.46–7.27 (5H, m, arom.); 7.18 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 8.7 Hz); 5.83 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.5 Hz); 5.26–5.02 (3H, m, CH<sub>2</sub>-Ph, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 4.51 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz); 4.17–3.95 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.83–3.68 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.63 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, *J* = 6.0 Hz); 3.62–3.51 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.22 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.9 Hz, *J*<sub>3</sub> = 6.0 Hz); 2.86 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz); 2.66 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz); 1.91–1.71 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.43 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.41 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.3, 170.3, 166.8, 156.1, 136.0, 128.3, 127.9, 127.8, 109.3, 81.2, 75.8, 66.8, 66.1, 60.6, 60.4, 56.0, 51.3, 39.0, 37.4, 30.3, 27.8, 26.6, 25.7, 24.9, 18.0, -5.5.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[3-(*terc*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (8.6):**

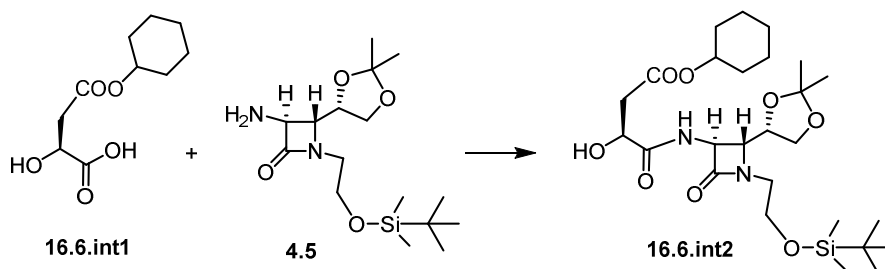


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama **8.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.65 g, 2.02 mmol) y la 3-amino-β-lactama **8.5** (0.66 g, 1.84 mmol). Rendimiento: 0.98 g (80%). Sólido blanco, p. f. = 99–105 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3486, 3304, 2981, 2930, 2885,

2857, 1729, 1680, 1530. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.91 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 6.8 Hz); 7.41–7.21 (5H, m, arom.); 6.07 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.9 Hz); 5.09 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.56 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 4.47 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5 Hz); 4.16–4.05 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 4.00 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.3 Hz);

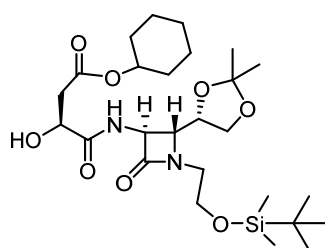
3.70 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 6.3$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz); 3.64 (1H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 6.1$  Hz); 3.47–3.34 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 3.32 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 8.8$  Hz,  $J_3 = 6.3$  Hz); 2.90 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 2.58 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 1.93–1.69 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.38 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.29 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.82 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.02 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>).  
<sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.3, 170.9, 165.8, 155.8, 136.1, 128.4, 128.0, 127.9, 110.0, 81.5, 77.45, 67.0, 66.6, 63.4, 60.5, 57.7, 51.2, 39.3, 37.5, 30.9, 27.9, 26.6, 25.8, 25.2, 14.1, -5.5.

### 7.2.2.2. Acoplamiento entre la β-lactama 4.5 y el hidroxácido de ácido aspártico



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.2.1.

#### HO-Asp(OcHx)-{(3S,4R)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (16.6.int2):

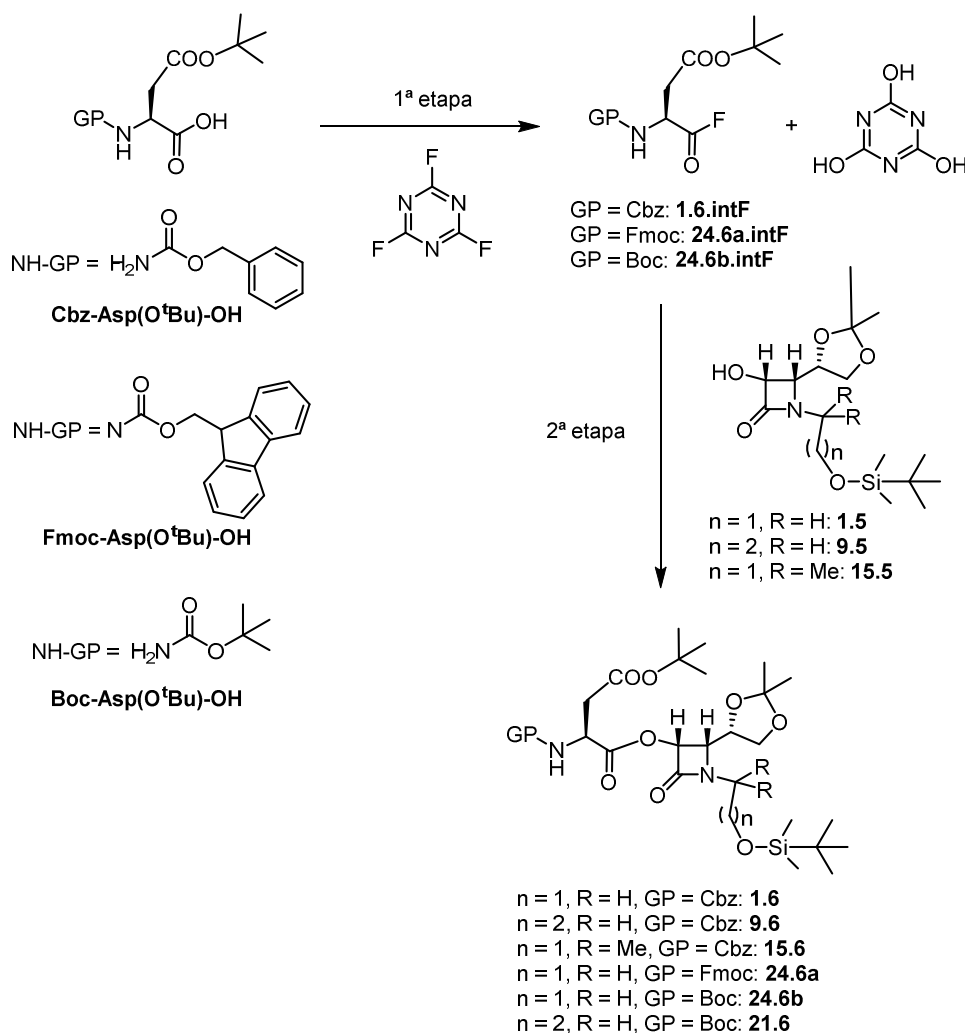


La HO-Asp(OcHx)-NH-β-lactama **16.6.int2** se preparó a partir del hidroxácido de ácido aspártico **16.6.int1** (0.59 g, 2.75 mmol) y la 3-amino-β-lactama **4.5** (0.86 g, 2.5 mmol) y se purificó mediante sucesivos lavados con hexano. Rendimiento: 0.74 g (55%). Aceite amarillo. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3330, 2931, 2857, 1772, 1735, 1650, 1550, 1378.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.56 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 7.8$  Hz); 4.82 (1H, dt, CH[cHx],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 4.2$  Hz); 4.65 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact],  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz); 4.41 (1H, ddd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp],  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz,  $J_3 = 3.7$  Hz); 4.31–4.13 (2H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.88–3.81 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], OH); 3.82 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si,  $J = 6.1$  Hz); 3.65–3.47 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 3.37 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.7$  Hz,  $J_2 = 6.1$  Hz); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 3.7$  Hz); 2.72 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 7.9$  Hz); 2.00–1.21 (16H, m, 2 x CH<sub>3</sub>[dioxol], 10H CH<sub>2</sub>[cHx]); 0.92 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.10

(6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 173.4, 170.7, 166.5, 109.9, 77.0, 73.0, 68.3, 66.2, 63.6, 60.2, 57.1, 43.8, 38.8, 31.3, 26.5, 25.7, 25.2, 25.0, 23.5, 18.0, -5.6.

### 7.2.2.3. Acoplamiento entre las 3-hidroxi-β-lactamas 1.5, 9.5 y 15.5 y los derivados del ácido aspártico



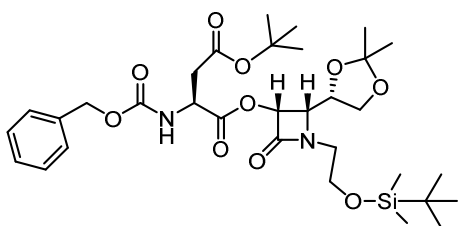
### Procedimiento general

**1ª Etapa:** En un matraz de 25 mL se disolvió el derivado de ácido aspártico correspondiente (1 equiv., 2.4 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) y en atmosfera de nitrógeno. A la disolución se le añadió piridina (1 equiv., 0.2 mL, 2.4 mmol) y se enfrió la mezcla hasta -15 °C. A esta temperatura se le añadió 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazina (1.5 equiv., 0.3 mL, 3.6 mmol) y se mantuvo una hora en agitación apareciendo un precipitado blanco. El seguimiento se realizó mediante TLC (EtOAc/hexano (2/1)) de una muestra previamente tratada con MeOH anhidro. Una vez consumido el material de partida se le añadió hielo y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) con sumo cuidado. Se separaron las dos fases, la fase

acuosa se extrajo con más CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 10 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó empleando MgSO<sub>4</sub>, y se evaporó el disolvente a presión reducida; como resultado se consiguió un aceite incoloro.

**2ª Etapa:** Tras comprobar mediante <sup>1</sup>H-RMN que el fluoruro de ácido correspondiente se había formado, el crudo de reacción (1.1 equiv., 2.28 mmol) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Por otro lado se disolvió la 3-hidroxi-β-lactama correspondiente (1 equiv., 2.07 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) y se le añadió TEA (2 equiv., 0.58 mL, 4.14 mmol). A continuación se añadió gota a gota la disolución del fluoruro de ácido sobre la disolución de la 3-hidroxi-β-lactama. La reacción se siguió mediante TLC (EtOAc/hexano (2/1)) y se comprobó que finalizaba en 30 minutos. La disolución se lavó con HCl 1 M (2 x 30 mL), NaHCO<sub>3</sub> 1 M (2 x 30 mL) y agua (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida dando como resultado un aceite que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/hexano (2/1)).

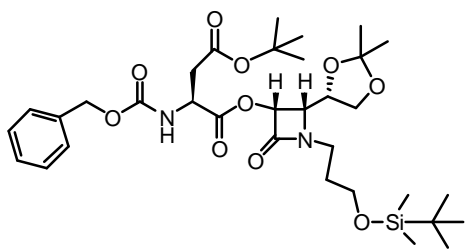
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (1.6):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama **1.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.78 g, 2.4 mmol) y la 3-hidroxi-β-lactama **1.5** (0.71 g, 2.07 mmol). Rendimiento global: 1.18 g (88%). Sólido blanco, p. f. = 98–102 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>,

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3442, 2984, 2931, 2856, 1752, 1726. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.40–7.29 (5H, m, arom.); 5.77–5.68 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.65 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 4.14–4.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.86 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.78 (2H, dt, CH<sub>2</sub>-O-Si, *J*<sub>1</sub> = 5.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.7 Hz); 3.68–3.58 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.34 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.6 Hz); 2.97 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 1.43 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.90 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 169.7, 163.8, 155.8, 136.1, 128.4, 128.0, 127.8, 109.5, 81.9, 75.7, 75.1, 66.9, 66.4, 60.6, 59.7, 50.4, 43.9, 37.1, 27.8, 26.6, 25.7, 24.8, 18.0, -5.5, -5.6.

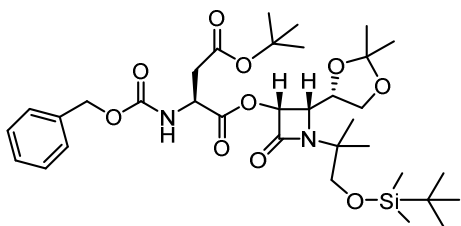
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[3-(*tert*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (9.6):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama **9.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.88 g, 2.73 mmol) y la 3-hidroxi-β-lactama **9.5** (0.85 g, 2.38 mmol). Rendimiento global: 1.39 g (88%). Sólido blanco, p. f. = 87–90 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3324, 2931, 2886, 2857, 1768, 1724.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.45–7.25 (5H, m, arom.); 5.77–5.64 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.13 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.65 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.20–3.93 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.78 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.69–3.48 (4H, m, 2H CH<sub>2</sub>-O-Si, 1H N-CH<sub>2</sub>, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.32 (1H, ddd, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.9 Hz); 2.95 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.78 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 1.97–1.68 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.43 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.0, 163.8, 156.0, 136.2, 128.7, 128.4, 128.2, 109.9, 82.4, 76.1, 75.3, 67.3, 66.8, 60.9, 60.4, 50.6, 38.8, 37.4, 30.6, 28.2, 27.0, 26.0, 25.1, 18.4, -5.3.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[1,1-dimetil-2-(*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (15.6):**



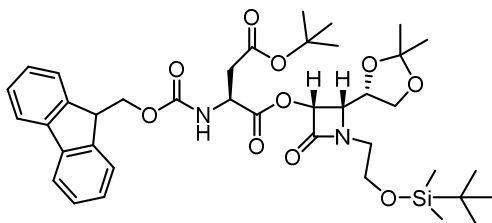
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama **15.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-*L*-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.79 g, 2.44 mmol) y la 3-hidroxi-β-lactama **15.5** (0.79 g, 2.11 mmol). Rendimiento global: 1.23 g (86%). Sólido blanco, p. f. = 95–99 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3328, 2981, 2932, 2884, 2857, 1765, 1728, 1507, 1472, 1379.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.41–7.30 (5H, m, arom.); 5.80–5.68 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.67 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 4.18–3.99 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.88 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz); 3.72–3.63 (2H, m, CH<sub>2</sub>-O-Si); 3.55–3.42 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 1.43 (12H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol], <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>); 1.34 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.04 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.0, 169.7, 163.6, 155.9, 136.1, 128.5, 128.2,



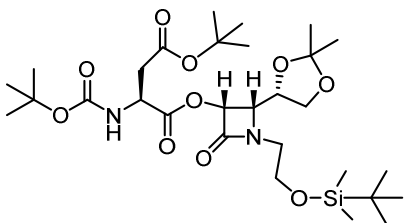
128.0, 109.6, 82.2, 76.5, 73.4, 67.6, 67.1, 66.7, 60.6, 60.3, 50.5, 37.3, 28.0, 26.5, 25.8, 24.9, 23.1, 23.0, 18.1, 14.2, -5.5, -5.5.

**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3R,4S)-3-oxo-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (24.6a):**



La Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama **24.6a** se preparó a partir del derivado comercial Fmoc-L-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.49 g, 1.19 mmol) y la 3-hidroxi-β-lactama **1.5** (0.36 g, 1.04 mmol). Rendimiento global: 0.69 g (90%). Sólido blanco, p. f. = 99–104 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3426, 3333, 2980, 2951, 2930, 2885, 2856, 1771, 1726, 1508, 1450, 1369. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.82–7.27 (8H, m, arom.); 5.78 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.8 Hz); 5.74 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 4.68 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 4.47–4.31 (2H, m, CH<sub>2</sub>[Fmoc]); 4.25 (1H, t, CH-CH<sub>2</sub>[Fmoc], *J* = 7.1 Hz); 4.19–4.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.87 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.77 (2H, dt, CH<sub>2</sub>-O-Si, *J*<sub>1</sub> = 5.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz); 3.70–3.57 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.33 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.6 Hz); 2.99 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 2.83 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 1.47 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 169.6, 163.8, 155.7, 143.6, 143.4, 141.00, 127.5, 126.9, 124.9, 124.9, 119.7, 109.5, 81.8, 75.7, 75.0, 67.1, 66.3, 60.5, 59.6, 50.4, 46.8, 43.8, 37.1, 27.8, 26.5, 25.6, 24.7, 17.0, -5.6.

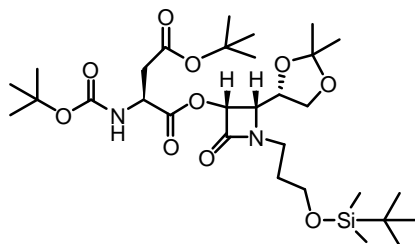
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3R,4S)-3-oxo-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (24.6b):**



La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama **24.6b** se preparó a partir del derivado comercial Boc-L-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.34 g, 1.19 mmol) y la 3-hidroxi-β-lactama **1.5** (0.36 g, 1.04 mmol). Rendimiento global: 0.58 g (90%). Sólido blanco, p. f. = 109–112 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3443, 3346, 2979, 2930, 2857, 1774, 1719. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 5.72 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 5.43 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.0 Hz); 4.59 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 4.19–4.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.85 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.77 (2H, dt, CH<sub>2</sub>-O-Si, *J*<sub>1</sub> = 5.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.4 Hz); 3.68–3.53 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.34 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.6 Hz); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],

$J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 2.76 (1H, dd,  $H^\beta$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 1.44 (21H, s, 2 x  $t$ Bu,  $CH_3$ [dioxol]); 1.31 (3H, s,  $CH_3$ [dioxol]); 0.88 (9H, s, Si- $t$ Bu); 0.05 (6H, s,  $CH_3$ -Si- $CH_3$ ).  $^{13}C$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 170.2, 169.9, 164.0, 155.2, 109.7, 82.0, 80.1, 75.9, 75.1, 66.6, 60.7, 59.8, 50.0, 44.0, 37.4, 28.2, 28.0, 26.8, 25.8, 25.0, 18.1, -5.4, -5.5.

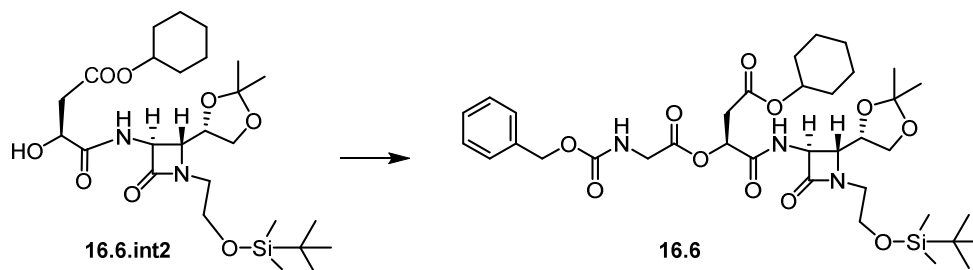
**Boc-Asp(O $t$ Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[3-(*terc*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (21.6):**



La Boc-Asp(O $t$ Bu)-O- $\beta$ -lactama **21.6** se preparó a partir del derivado comercial Boc-*L*-Asp(O $t$ Bu)-OH (0.26 g, 0.90 mmol) y la 3-hidroxi- $\beta$ -lactama **9.5** (0.28 g, 0.79 mmol). Rendimiento global: 0.44 g (88%). Sólido blanco, p. f. = 104–110 °C. IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ,  $CH_2Cl_2$ ): 3433, 3347, 2978, 2953, 2929, 2894, 2856, 1770,

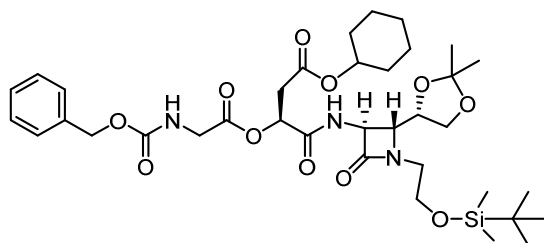
1718.  $^1H$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 5.70 (1H, d,  $H^\alpha_R$ [ $\beta$ -lact],  $J = 4.8$  Hz); 5.43 (1H, d, NH[Asp],  $J = 9.1$  Hz); 4.59 (1H, dt,  $H^\alpha_S$ [Asp],  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz); 4.18–4.03 (2H, m,  $CH_2$ [dioxol],  $CH_5$ [dioxol]); 3.78 (1H, dd,  $H^\beta_S$ [ $\beta$ -lact],  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.69–3.49 (4H, m, 2H  $CH_2$ -O-Si, 1H N- $CH_2$ , 1H  $CH_2$ [dioxol]); 3.32 (1H, ddd, N- $CH_2$ ,  $J_1 = 14.0$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz,  $J_3 = 5.9$  Hz); 2.92 (1H, dd,  $H^\beta$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz); 2.75 (1H, dd,  $H^\beta$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz); 1.94–1.74 (2H, m,  $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ ); 1.44 (21H, s, 2 x  $t$ Bu,  $CH_3$ [dioxol]); 1.31 (3H, s,  $CH_3$ [dioxol]); 0.88 (9H, s, Si- $t$ Bu); 0.04 (6H, s,  $CH_3$ -Si- $CH_3$ ).  $^{13}C$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 170.3, 170.0, 163.8, 155.3, 109.8, 82.2, 80.3, 76.1, 75.0, 66.7, 60.8, 60.3, 50.1, 39.6, 37.5, 30.5, 28.3, 28.1, 26.9, 26.1, 25.0, 18.3, -5.3.

**7.2.3. Acoplamiento entre la glicina y el HO-Asp-NH $_2$ - $\beta$ -lactama 16.6.int2**



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.2.1.

**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (16.6):**



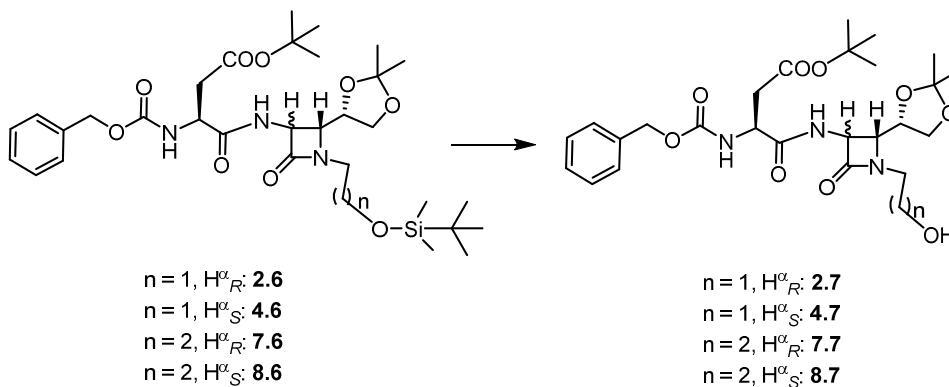
La Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH-β-lactama **16.6** se preparó a partir del derivado comercial Cbz-Gly-OH·HCl (0.32 g, 1.51 mmol) y la HO-Asp(OcHx)-NH-β-lactama **16.6.int2** (0.74 g, 1.37 mmol). Rendimiento: 0.78 g (77%). Aceite amarillo. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):

3324, 3065, 3032, 2932, 2856, 1732, 1532. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.43 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 7.5 Hz); 7.38–7.29 (5H, m, arom.); 5.55 (1H, t, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J* = 5.6 Hz); 5.37 (1H, t, NH[Gly], *J* = 6.0 Hz); 5.14 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.81–4.66 (1H, m, CH[cHx]); 4.57 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz); 4.26–4.06 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.99 (2H, dd, H<sup>α</sup>[Gly], *J*<sub>1</sub> = 6.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz); 3.84 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz); 3.79 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O-Si, *J* = 6.0 Hz); 3.57 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz); 3.55–3.44 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.37 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz); 2.98–2.79 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); 1.92–1.12 (16H, m, 2 x CH<sub>3</sub>[dioxol], 5 x CH<sub>2</sub>[cHx]); 0.89 (9H, s, Si-<sup>t</sup>Bu); 0.06 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 169.0, 168.9, 168.7, 165.6, 157.0, 136.2, 128.7, 128.5, 128.3, 110.3, 77.2, 73.9, 70.5, 67.6, 66.6, 63.7, 60.6, 58.1, 44.2, 43.2, 36.7, 31.6, 26.8, 26.0, 25.4, 25.3, 23.8, 18.4, -5.2.

**7.2.4. Preparación de las carboxi β-lactamas 2.7, 4.7, 7.7, 8.7, 1.7, 9.7, 15.7, 19.7a, 19.7b, 21.7 y 16.7**

**7.2.4.1. Desprotección del grupo sililo y obtención del alcohol**

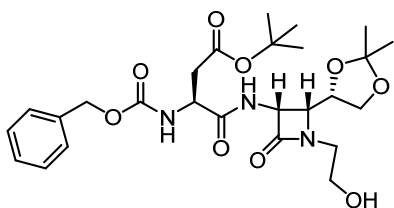
**7.2.4.1.1. Desprotección del grupo sililo de las Cbz-Asp(<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactamas 2.6, 4.6, 7.6 y 8.6**



### Procedimiento general

Sobre una disolución de la correspondiente  $\beta$ -lactama sililada (1 equiv., 3.47 mmol) en THF (17 mL) enfriada a 0 °C y en atmósfera de nitrógeno, se adicionó el fluoruro de piridinio (4 equiv., 0.27 mL, 13.88 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 3 horas, controlando el avance de la reacción por TLC (EtOAc/hexano (1/1)). Una vez finalizada la reacción se añadió NaHCO<sub>3</sub> hasta neutralizar todo el fluoruro de piridinio que había quedado en exceso, es decir hasta que cesara el borboteo de CO<sub>2</sub>, y se extrajo con dietil éter (3 x 15 mL). La fase orgánica se lavó posteriormente con una disolución saturada de cloruro sódico (3 x 15 mL), se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo al que se le añadió tolueno anhidro (10 mL), y se evaporó de nuevo para eliminar las pequeñas trazas de fluoruro de piridinio que hubiesen podido quedar. El crudo obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin purificación posterior.

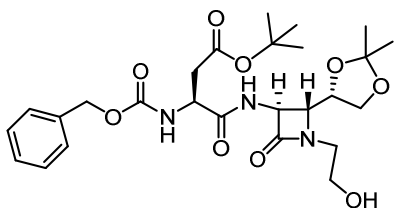
#### **Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxietyl)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (2.7):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama-OH **2.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama sililada **2.6** (2.25 g, 3.47 mmol). Rendimiento: 1.78 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 120–126 °C. IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3305, 3065, 3034, 2981, 2935, 2886, 1730, 1529, 1369.

<sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.57 (1H, d, NH- $\beta$ -lact,  $J$  = 8.6 Hz); 7.41–7.29 (5H, m, arom.); 5.96 (1H, d, NH[Asp],  $J$  = 8.7 Hz); 5.15 (1H, dd, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lact],  $J_1$  = 8.6 Hz,  $J_2$  = 5.2 Hz); 5.11 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.55 (1H, dt, H <sup>$\alpha$</sup> <sub>S</sub>[Asp],  $J_1$  = 8.7 Hz,  $J_2$  = 5.5 Hz); 4.17–3.98 (2H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.85–3.76 (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH); 3.73–3.65 (2H, m, H <sup>$\beta$</sup> <sub>R</sub>[ $\beta$ -lact], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.55–3.30 (3H, m, -OH, N-CH<sub>2</sub>); 2.84 (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> [Asp],  $J_1$  = 16.9 Hz,  $J_2$  = 5.5 Hz); 2.68 (1H, dd, H <sup>$\beta$</sup> [Asp],  $J_1$  = 16.9 Hz,  $J_2$  = 5.5 Hz); 1.42 (12H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol], <sup>t</sup>Bu); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.4, 170.3, 167.8, 156.2, 136.1, 128.5, 128.20, 128.1, 109.9, 81.6, 75.5, 67.2, 66.2, 61.5, 59.9, 56.3, 51.6, 46.1, 37.5, 28.0, 26.6, 24.9.

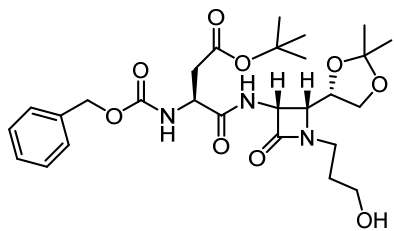
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (4.7):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-OH **4.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama sililada **4.6** (1.33 g, 2.05 mmol). Rendimiento: 1.05 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 130–137 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3468, 3309, 3066, 3034, 2981, 2935, 1730, 1675, 1531, 1369.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.55 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 7.4 Hz); 7.44–7.30 (5H, m, arom.); 6.01 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.9 Hz); 5.11 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.60–4.50 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.45–4.36 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact]); 4.21–4.03 (2H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.86–3.72 (3H, m, 2H CH<sub>2</sub>-OH, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.72–3.57 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 3.29 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.0 Hz); 2.91 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz); 2.62 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz); 1.42 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.8, 171.1, 166.7, 156.2, 136.0, 128.7, 128.5, 128.3, 110.5, 82.2, 77.3, 67.5, 66.6, 62.5, 59.8, 58.2, 51.3, 46.0, 37.5, 28.1, 26.8, 25.3.

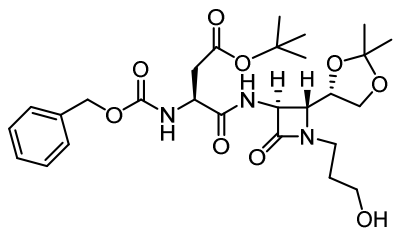
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (7.7):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-OH **7.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama sililada **7.6** (1.83 g, 2.75 mmol). Rendimiento: 1.45 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 115–125 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3432, 3330, 2981, 2936, 2883, 1725, 1510, 1370.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.30 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 8.4 Hz); 7.42–7.22 (5H, m, arom.); 6.37 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.9 Hz); 5.20–4.99 (3H, m, CH<sub>2</sub>-Ph, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 4.63 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz); 4.22 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.2 Hz); 4.12–3.97 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.69–3.55 (4H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], 2H CH<sub>2</sub>-OH, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.47 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz); 3.35 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz); 2.79–2.74 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); 1.88–1.73 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.42 (12H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol], <sup>t</sup>Bu); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.6, 171.5, 168.6, 157.4, 137.2, 129.6, 129.3, 129.2, 110.8, 82.7, 77.0, 68.2, 67.4, 62.1, 60.4, 57.4, 52.7, 40.0, 38.6, 31.4, 29.1, 27.8, 26.1.

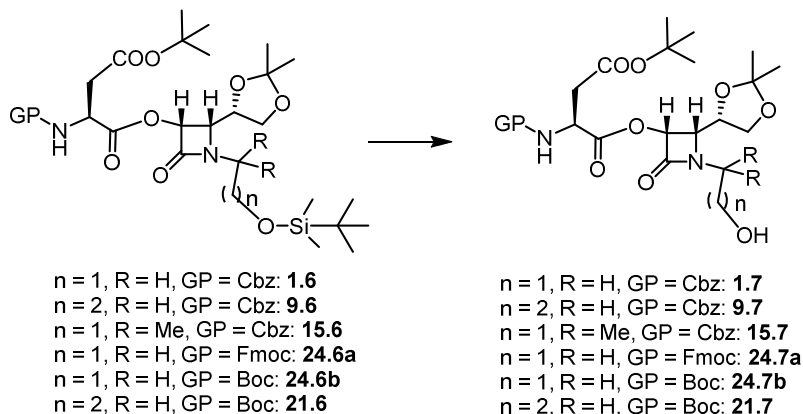
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (8.7):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-OH **8.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama sililada **8.6** (0.98 g, 1.47 mmol). Rendimiento: 0.78 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 129–135 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3316, 3067, 3039, 2934, 2883, 1729, 1529, 1369.

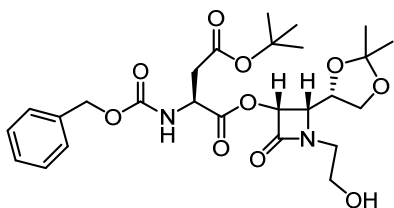
<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.77 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 4.9 Hz); 7.39–7.28 (5H, m, arom.); 6.01 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.6 Hz); 5.10 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.60–4.44 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>5</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>5</sub>[β-lact]); 4.19–4.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.73 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.2 Hz); 3.69–3.62 (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH); 3.56 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz); 3.46 (1H, d, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.9 Hz); 3.32 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.7 Hz); 3.02–2.80 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp], OH); 2.60 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.2 Hz); 1.88–1.70 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.40 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.6, 171.2, 166.7, 156.2, 136.2, 128.7, 128.4, 128.3, 110.4, 82.1, 77.6, 67.5, 66.8, 63.5, 59.5, 58.0, 51.4, 38.7, 37.8, 30.4, 28.2, 26.8, 25.4.

**7.2.4.1.2. Desprotección del grupo sililo de las GP-Asp(<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactamas 1.6, 9.6, 15.6, 24.6a, 24.6b y 21.6**



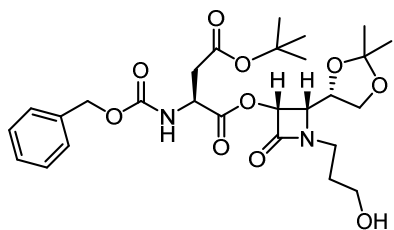
La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general de desprotección empleado en el apartado 7.2.4.1.1.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (1.7):**



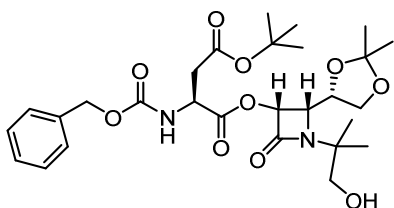
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **1.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **1.6** (1.18 g, 1.82 mmol). Rendimiento: 0.94 g (96%). Sólido blanco, p.f. = 116–120 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3435, 3331, 2981, 2935, 2886, 1721, 1508, 1369. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.39–7.29 (5H, m, arom.); 5.81–5.61 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.66 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 4.18–4.02 (2H, m, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.88–3.77 (3H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>-OH); 3.62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 3.55 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.43 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.33 (1H, b.s., OH); 2.96 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 1.43 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.1, 170.0, 164.8, 156.1, 136.2, 128.7, 128.4, 128.2, 110.0, 82.5, 76.0, 74.9, 67.4, 66.7, 61.3, 60.3, 50.6, 47.2, 37.4, 28.2, 26.9, 25.1.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (9.7):**



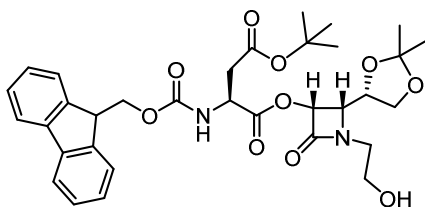
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **9.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **9.6** (1.39 g, 2.09 mmol). Rendimiento: 1.10 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 110–119 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3432, 3330, 2981, 2936, 2884, 1725, 1510, 1370. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.40–7.29 (5H, m, arom.); 5.78–5.66 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.12 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.66 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 4.14–4.02 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.80 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.2 Hz); 3.67 (2H, t, CH<sub>2</sub>-OH, *J* = 6.0 Hz); 3.62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.1 Hz); 3.50 (2H, t, N-CH<sub>2</sub>, *J* = 6.5 Hz); 2.97 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 1.88–1.81 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.0, 169.9, 164.6, 156.0, 136.1, 128.6, 128.2, 128.1, 109.9, 82.3, 75.9, 75.1, 67.2, 66.6, 60.6, 59.3, 50.4, 38.9, 37.3, 30.2, 28.0, 26.8, 25.0.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxi-1,1-dimetiletil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (15.7):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **15.7** se preparó a partir de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **15.6** (1.23 g, 1.81 mmol). Rendimiento: 0.98 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 106–112 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3332, 2980, 2925, 2854, 1725, 1509, 1456, 1369. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.44–7.27 (5H, m, arom.); 5.82 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.8 Hz); 5.76 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 5.2 Hz); 5.12 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.67 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 4.26–4.02 (3H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol], OH); 3.88 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.2 Hz); 3.72–3.58 (2H, dt, CH<sub>2</sub>-OH); 3.57–3.42 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.78 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 1.45 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.42 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.38 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>); 1.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.27 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 169.8, 164.2, 156.0, 136.2, 128.7, 128.4, 128.2, 110.1, 82.5, 76.2, 72.8, 69.7, 67.4, 66.8, 60.5, 60.0, 50.6, 37.5, 29.8, 28.1, 26.6, 25.0, 23.0, 22.2.

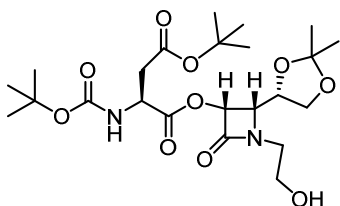
**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxi-1,1-dimetiletil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.7a):**



La Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **24.7a** se preparó a partir de la Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **24.6a** (0.69 g, 0.94 mmol). Rendimiento: 0.56 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 113–118 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3418, 3325, 3064, 2980, 2933, 1725, 1509, 1450, 1369. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.85–7.32 (8H, m, arom.); 5.89–5.75 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], NH[Asp]); 4.72 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 4.53–4.34 (2H, m, CH<sub>2</sub>[Fmoc]); 4.29 (1H, t, CH-CH<sub>2</sub>[Fmoc], *J* = 7.0 Hz); 4.25–4.09 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.92–3.83 (3H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>-OH); 3.69 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 3.59 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.47 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.35 (1H, b.s., OH); 3.03 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.86 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 1.51 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.2, 170.0, 164.8, 156.1, 143.9, 143.7, 141.4, 127.9, 127.2, 125.2, 125.2, 120.1, 110.2, 82.6, 76.0, 74.9, 67.6, 66.7, 61.3, 60.3, 50.6, 47.2, 37.5, 28.2, 26.9, 25.0.



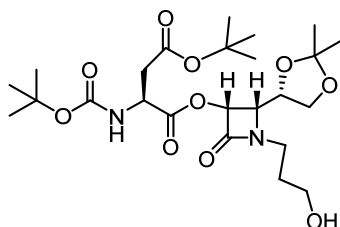
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.7b):**



La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **24.7b** se preparó a partir de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **24.6b** (0.58 g, 0.94 mmol). Rendimiento: 0.56 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 117–120 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3434, 3370, 2978, 2932, 1757, 1717, 1500, 1357. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>):

5.76 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 5.46 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.2 Hz); 4.59 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.19 (1H, ddd, CH<sub>S</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.9 Hz); 4.10 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz); 3.86–3.80 (3H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>-OH); 3.62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.55 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.43 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 2.91 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.75 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 1.44 (21H, s, 2 x <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.2, 170.0, 164.9, 155.3, 109.9, 82.1, 80.3, 75.9, 74.7, 66.6, 60.9, 59.7, 50.0, 46.4, 37.5, 28.3, 28.0, 26.8, 25.0.

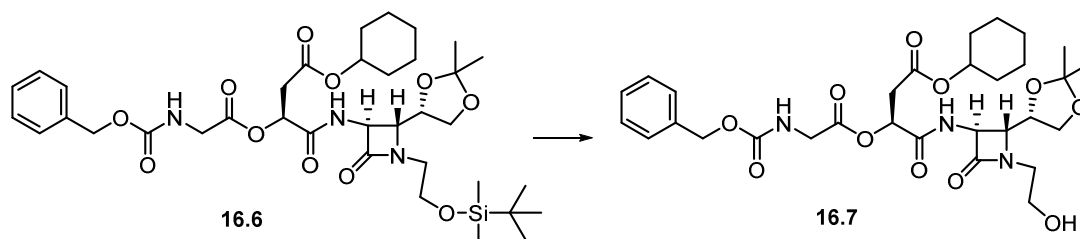
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (21.7):**



La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-OH **21.7** se preparó a partir de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama sililada **21.6** (0.44 g, 0.69 mmol). Rendimiento: 0.34 g (96%). Sólido blanco, p. f. = 116–122 °C. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3443, 3370, 2978, 2934, 2879, 1759, 1718, 1500, 1368. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>):

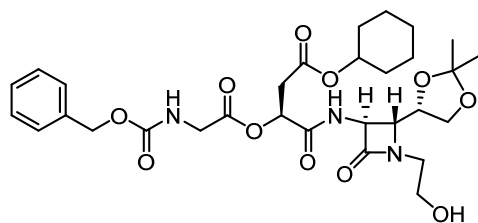
5.74 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 5.44 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.0 Hz); 4.59 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.20–4.05 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>S</sub>[dioxol]); 3.79 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.73–3.57 (3H, m, 2H CH<sub>2</sub>-OH, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.56–3.34 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.75 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.55 (1H, b.s., OH); 1.91–1.79 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.45 (21H, s, 2 x <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.3, 170.1, 164.8, 155.4, 110.0, 82.2, 80.4, 76.1, 75.0, 66.7, 60.9, 59.4, 50.1, 39.0, 37.5, 30.4, 28.3, 28.1, 26.9, 25.0.

**7.2.4.1.3. Desprotección del grupo sililo de la Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH-β-lactama 16.6**



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general de desprotección empleado en el apartado 7.2.4.1.1.

**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (16.7):**

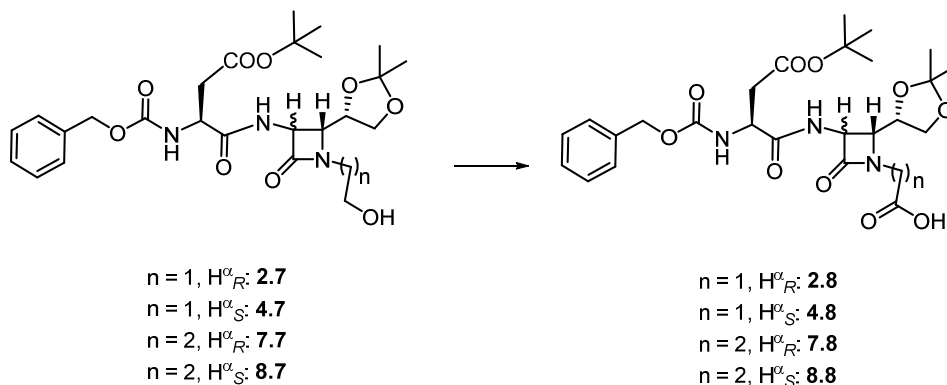


La Cbz-Gly-Asp(OcHx)-NH-β-lactama-OH **16.7** se preparó a partir de la Cbz-Gly-Asp(OcHx)-NH-β-lactama sililada **16.6** (0.78 g, 1.05 mmol). Rendimiento: 0.63 g (96%). Aceite amarillo. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3335, 3055, 3032, 2936, 2858,

1733, 1537, 1454, 1371.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.89 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 5.3$  Hz); 7.39–7.25 (5H, m, arom.); 5.65–5.49 (2H, m,  $\text{H}^\alpha$ [Asp], NH[Gly]); 5.13 (2H, d,  $\text{CH}_2$ -Ph,  $J = 2.2$  Hz); 4.74 (1H, tt, CH[cHx],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz); 4.50–4.44 (1H, m,  $\text{H}^\alpha$ [β-lact]); 4.26–4.04 (2H, m,  $\text{CH}_5$ [dioxol],  $\text{CH}_2$ [dioxol]); 3.98 (2H, d,  $\text{H}^\alpha$ [Gly],  $J = 5.6$  Hz); 3.87–3.56 (6H, m, 1H  $\text{CH}_2$ [dioxol], 2H  $\text{CH}_2$ -OH,  $\text{H}^\beta$ [β-lact], 1H N- $\text{CH}_2$ , OH); 3.26 (1H, dt, N- $\text{CH}_2$ ,  $J_1 = 14.7$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 3.00–2.78 (2H, m,  $\text{H}^\beta$ [Asp]); 1.89–1.11 (16H, m, 2 x  $\text{CH}_3$ [dioxol], 5 x  $\text{CH}_2$ [cHx]).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 169.4, 169.0, 168.8, 166.6, 157.4, 136.1, 128.8, 128.5, 128.2, 110.55, 77.3, 73.9, 70.5, 67.6, 66.5, 62.4, 59.8, 58.0, 46.0, 43.2, 36.6, 31.6, 26.8, 25.4, 25.3, 23.8.

## 7.2.4.2. Oxidación y obtención del ácido carboxílico

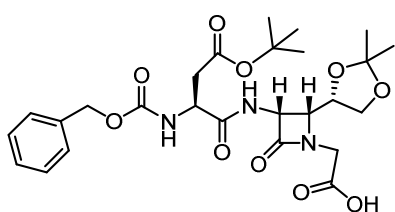
### 7.2.4.2.1. Oxidación de las Cbz-Asp(<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactamas-OH 2.7, 4.7, 7.7 y 8.7



### Procedimiento general

Sobre una disolución del alcohol correspondiente (1 equiv., 3.33 mmol) en acetonitrilo/agua (8 mL/8 mL) se adicionó BAIB (2.2 equiv., 2.24 g, 7.26 mmol) y TEMPO (0.25 equiv., 0.13 g, 0.82 mmol) y se mantuvo la reacción con agitación fuerte durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras comprobar que no quedaba producto de partida, TLC (EtOAc/hexano (5/1)), se evaporó la mezcla y el producto se extrajo de la fase acuosa con  $CH_2Cl_2$  (3 x 15 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se secaron con  $MgSO_4$ , se filtraron y se evaporaron a presión reducida obteniendo el producto deseado, el cual fue utilizado en la siguiente reacción tras purificarse triturándolo en hexano.

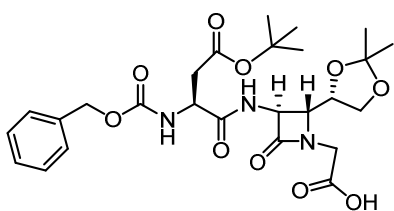
### Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-carboximetilen-4-((5*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (2.8):



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama- $CH_2$ -COOH **2.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama- $(CH_2)_2$ -OH **2.7** (1.78 g, 3.33 mmol). Rendimiento: 1.39 g (76%). Sólido amarillento. IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ,  $CH_2Cl_2$ ): 3306, 3065, 3033, 2982, 2936, 1728, 1530.  $^1H$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 7.72 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 8.2$  Hz); 7.41–7.32 (5H, m, arom.); 6.01 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.4$  Hz); 5.24 (1H, dd,  $H^{\alpha}_R$ [β-lact],  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 5.17–5.01 (2H, m,  $CH_2$ -Ph); 4.57 (1H, dt,  $H^{\alpha}_S$ [Asp],  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 4.28–4.14 (2H, m, N- $CH_2$ ,  $CH_2$ [dioxol]); 4.09–3.95 (2H, m,  $CH_2$ [dioxol], N- $CH_2$ ); 3.95–3.84 (1H, m,  $H^{\beta}_R$ [β-lact]); 3.67

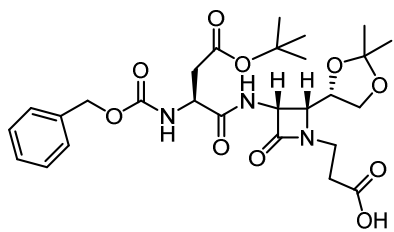
(1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 4.2$  Hz); 2.83 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.8$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 2.68 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.8$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 1.41 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.27 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.5, 171.2, 170.5, 167.3, 156.5, 135.9, 128.6, 128.3, 109.9, 81.8, 75.2, 67.4, 66.2, 61.0, 57.0, 51.5, 43.1, 37.5, 28.0, 26.6, 25.0.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-carboximetilen-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (4.8):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **4.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH **4.7** (1.05 g, 1.97 mmol). Rendimiento: 0.82 g (76%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3307, 3065, 3033, 2982, 2936, 1728, 1532. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.70 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 7.7$  Hz); 7.44–7.28 (5H, m, arom.); 6.01 (1H, d, NH[Asp],  $J = 9.2$  Hz); 5.21–5.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.73–4.52 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact]); 4.32 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>,  $J = 18.1$  Hz); 4.25–4.16 (1H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.14–4.07 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 4.02 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>,  $J = 18.1$  Hz); 3.78 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz); 3.66 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 2.2$  Hz); 2.90 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz); 2.63 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz); 1.42 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.5, 170.8, 170.7, 166.4, 156.1, 135.9, 128.5, 128.2, 128.1, 110.2, 81.9, 77.0, 67.3, 66.4, 63.5, 58.2, 51.3, 43.1, 37.7, 27.9, 26.6, 25.0.

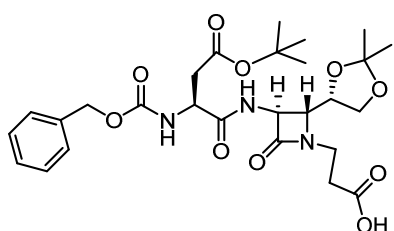
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-1-carboxietilen-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (7.8):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **7.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH **7.7** (1.45 g, 2.64 mmol). Rendimiento: 1.07 g (72%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3303, 3063, 3033, 2979, 2933, 1725, 1676. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 9.77 (1H, s, -COOH); 7.77 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 8.5$  Hz); 7.47–7.31 (5H, m, arom.); 6.01 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.7$  Hz); 5.23–4.92 (3H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>-Ph); 4.55 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 4.13 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 14.1$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz); 4.07–3.98 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.85–3.40 (4H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], 2H N-CH<sub>2</sub>); 3.97–2.45 (4H, m, 2H H<sup>β</sup>[Asp], CH<sub>2</sub>-COOH); 1.41 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30

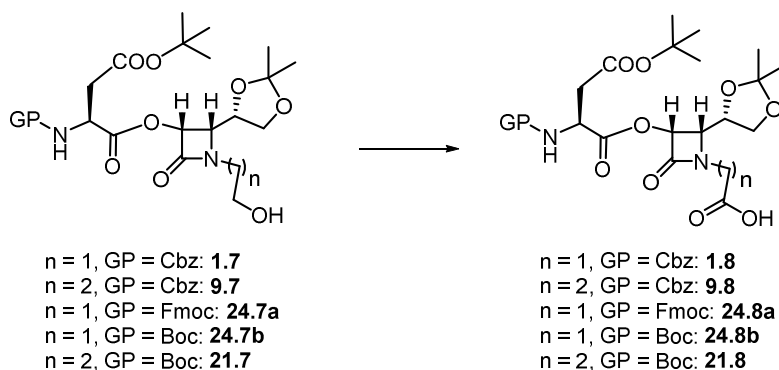
(3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 200.0, 174.6, 171.3, 166.9, 156.2, 136.1, 128.5, 128.2, 128.1, 109.8, 81.7, 75.4, 67.2, 66.2, 60.9, 56.4, 51.6, 38.0, 35.1, 32.8, 28.0, 26.6, 24.9.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-1-carboxietilen-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (8.8):**



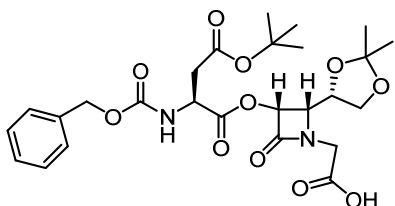
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **8.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH **8.7** (0.78 g, 1.41 mmol). Rendimiento: 0.60 g (75%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3314, 2969, 2942, 1725. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.91–7.81 (1H, m, NH-β-lact); 7.48–7.30 (5H, m, arom.); 6.15–6.00 (1H, m, NH[Asp]); 5.18–5.02 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.64–4.46 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.20–4.05 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.87–3.65 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.57–3.40 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 2.87 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], J<sub>1</sub> = 16.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 2.79–2.59 (3H, m, H<sup>β</sup>[Asp], CH<sub>2</sub>-COOH); 1.42 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 174.4, 171.3, 170.6, 166.0, 155.8, 135.9, 128.4, 128.0, 127.9, 110.0, 81.6, 67.1, 66.4, 63.2, 57.6, 51.2, 37.8, 37.6, 32.0, 27.8, 26.5, 25.0.

**7.2.4.2.2. Oxidación de las GP-Asp(<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactamas-OH 1.7, 9.7, 24.7a, 24.7b y 21.7**



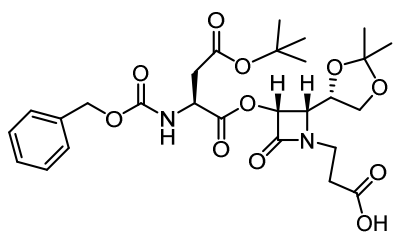
La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en la oxidación del apartado 7.2.4.2.1.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (1.8):**



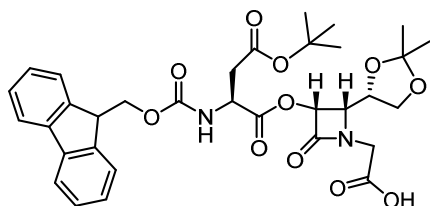
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **1.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH **1.7** (0.94 g, 1.74 mmol). Rendimiento: 0.79 g (83%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3339, 2982, 2934, 1719. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.41–7.29 (5H, m, arom.); 5.83–5.68 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.66 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 4.35 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>, *J* = 18.2 Hz); 4.20–3.94 (4H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol], H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 3.65 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 2.99 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 1.43 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.5, 170.1, 169.9, 164.3, 156.1, 136.1, 128.7, 128.3, 128.2, 109.9, 82.5, 75.8, 75.6, 67.4, 66.6, 60.6, 50.5, 43.0, 28.1, 26.8, 25.1.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboxietilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (9.8):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **9.8** se preparó a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH **9.7** (1.10 g, 2.00 mmol). Rendimiento: 0.84 g (74%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3327, 3310, 3064, 3034, 2982, 2937, 1719. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.42–7.28 (5H, m, arom.); 5.77 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.3 Hz); 5.71 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.66 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.17–3.99 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.84 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 3.74 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz); 4.67–3.47 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 2.95 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.86–2.61 (3H, m, H<sup>β</sup>[Asp], CH<sub>2</sub>-COOH); 1.44 (12H, s, <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 175.3, 170.0, 169.9, 164.2, 156.1, 136.2, 128.6, 128.3, 128.1, 110.0, 82.4, 75.8, 75.1, 67.3, 66.6, 60.6, 50.6, 37.9, 37.4, 31.9, 28.1, 26.8, 25.0.

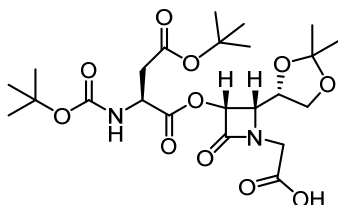
**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.8a):**



La Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **24.8a** se preparó a partir de Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH **24.7a** (0.56 g, 0.90 mmol). Rendimiento: 0.40 g (70%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 2978, 2927, 1763, 1726, 1522.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.87–7.28 (8H, m, arom.); 5.86–5.71 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], NH[Asp]); 4.72–4.63 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.47–4.24 (4H, m, 2H CH<sub>2</sub>[Fmoc], CH-CH<sub>2</sub>[Fmoc], 1H N-CH<sub>2</sub>); 4.23–4.14 (1H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.13–3.98 (3H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>[dioxol], N-CH<sub>2</sub>); 3.67 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 3.00 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 2.82 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 1.47 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.0, 170.0, 169.7, 164.3, 156.0, 143.7, 143.5, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 109.8, 82.3, 75.6, 75.4, 67.4, 66.4, 60.4, 50.4, 46.9, 43.0, 37.2, 28.0, 26.6, 24.9.

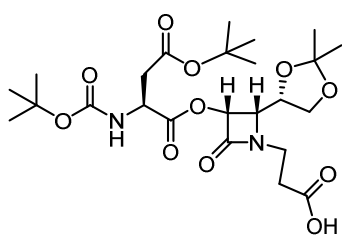
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.8b):**



La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **24.8b** se preparó a partir de Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH **24.7b** (0.45 g, 0.90 mmol). Rendimiento: 0.36 g (78%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3338, 2979, 2933, 1760, 1717, 1502. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 5.79 (1H, d,

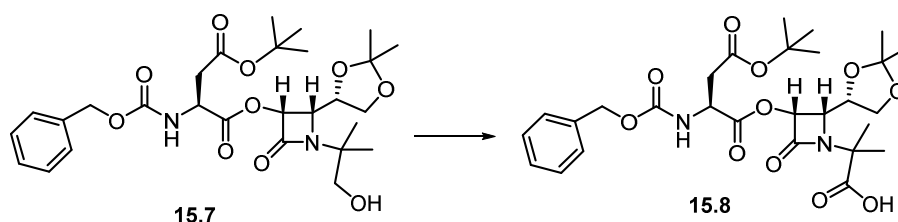
H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.7 Hz); 5.47 (1H, d, NH[Asp], *J* = 10.0 Hz); 4.57 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 10.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 4.33 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>, *J* = 18.1 Hz); 4.24–4.15 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 4.12–3.97 (3H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol], H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 3.64 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.92 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 2.75 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 1.44 (21H, s, 2 x <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.38 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.1, 171.5, 170.3, 164.3, 155.5, 109.9, 82.4, 80.6, 75.7, 66.7, 60.6, 50.1, 42.9, 37.6, 28.4, 28.2, 20.2, 26.9, 25.1.

**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboxietilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (21.8):**



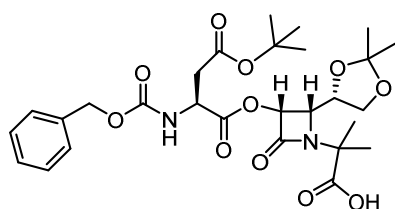
La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **21.8** se preparó a partir de Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH **21.7** (0.34 g, 0.66 mmol). Rendimiento: 0.27 g (77%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3334, 2979, 2933, 1762, 1718. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 9.79 (1H, s, COOH); 5.70 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 5.0 Hz); 5.50–5.36 (1H, m, NH[Asp]); 4.67–4.52 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.26–4.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.79 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 3.75–3.49 (3H, m, 2H N-CH<sub>2</sub>, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.03–2.66 (4H, m, 2H H<sup>β</sup>[Asp], CH<sub>2</sub>-COOH); 1.46 (21H, s, 2 x <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 199.7, 174.7, 170.3, 164.1, 155.5, 110.0, 82.3, 80.5, 75.9, 75.1, 66.7, 60.7, 50.1, 41.7, 37.9, 37.6, 28.4, 28.2, 26.9, 25.1.

**7.2.4.2.3. Oxidación de la Cbz-Asp(<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-OH 15.7**



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general de oxidación empleado en el apartado 7.2.4.2.1.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(1,1-dimetilcarboximetilen)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (15.8):**

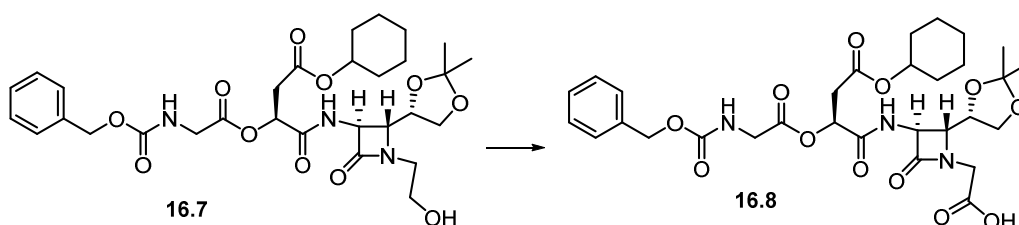


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-COOH **15.8** se consiguió a partir de Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH **15.7** (0.98 g, 1.74 mmol). Rendimiento: 0.73 g (73%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3319, 2978, 2952, 2927, 28,55, 1762, 1726, 1607. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 9.53 (1H, s, COOH); 7.43–7.31 (5H, m, arom.); 5.87–5.68 (2H, m, NH[Asp], H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 5.14 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.72–4.56 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.24–4.05 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.05–3.80 (1H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact]); 3.57–3.43 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 2.96 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 15.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.2 Hz); 2.79



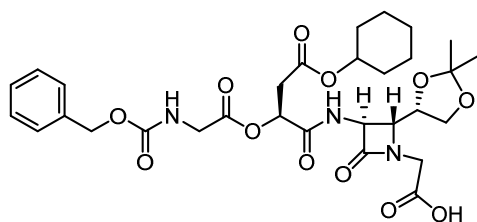
(1H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz); 1.74 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.67 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.43 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 199.0, 177.7, 169.9, 163.9, 156.1, 136.1, 128.7, 128.4, 128.2, 109.9, 82.5, 75.7, 73.9, 67.4, 66.7, 60.8, 60.3, 50.6, 37.4, 28.1, 26.4, 24.8, 24.2, 21.1.

#### 7.2.4.2.4. Oxidación de la Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH- $\beta$ -lactama-OH **16.7**



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general de oxidación empleado en el apartado 7.2.4.2.1.

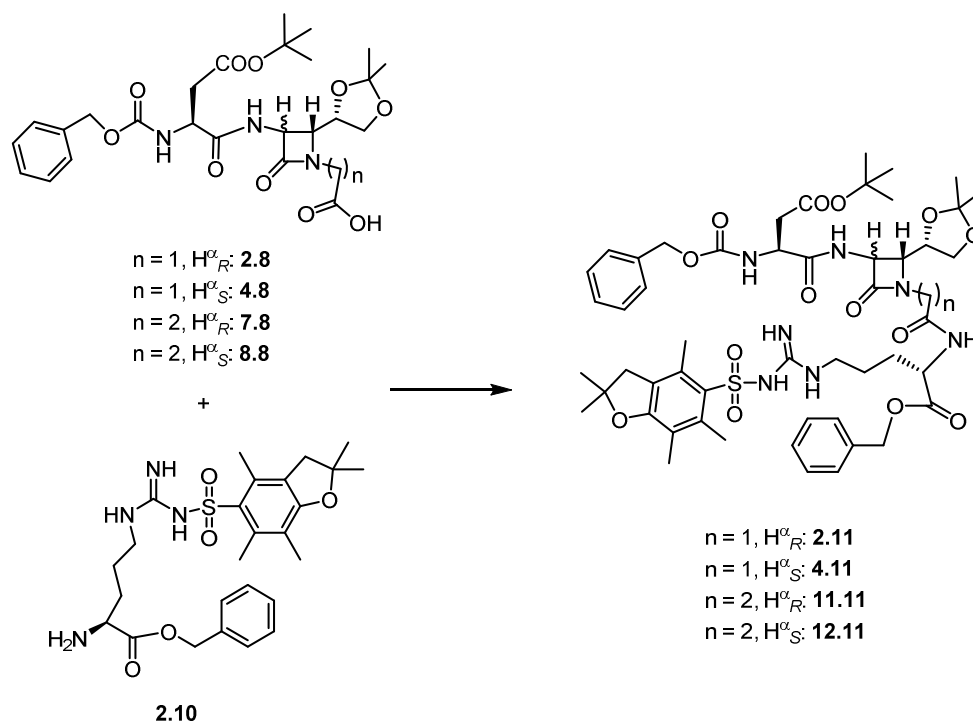
#### Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-carboximetileno-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidino-2-ona] (**16.8**):



La Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH- $\beta$ -lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **16.8** se preparó a partir de Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH- $\beta$ -lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH **16.7** (0.63 g, 1.02 mmol). Rendimiento: 0.48 g (74%). Sólido amarillento. IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3324, 3063, 3032, 2930, 2856, 1728, 1533, 1381. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.92–7.82 (1H, m, NH- $\beta$ -lact); 7.40–7.30 (5H, m, arom.); 5.67–5.50 (2H, m, NH[Gly],  $H^{\alpha}_S$ [Asp]); 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.80–4.64 (2H, m,  $H^{\alpha}_S$ [ $\beta$ -lact], CH[cHx]); 4.40–4.18 (2H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol], N-CH<sub>2</sub>); 4.18–4.06 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], N-CH<sub>2</sub>); 4.00 (2H, d,  $H^{\alpha}$ [Gly],  $J = 3.8$  Hz); 3.82 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.2$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.77–3.68 (1H, m,  $H^{\beta}_R$ [ $\beta$ -lact]); 2.99–2.84 (2H, m,  $H^{\beta}$ [Asp]); 1.91–1.24 (16H, m, 2 x CH<sub>3</sub>[dioxol], 5 x CH<sub>2</sub>[cHx]). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 174.5, 170.0, 169.0, 168.4, 166.1, 156.6, 135.8, 128.0, 127.7, 127.5, 109.8, 76.3, 73.2, 69.7, 66.7, 65.9, 63.0, 57.3, 42.8, 42.4, 36.2, 31.0, 26.1, 24.8, 24.6, 23.2.

## 7.2.5. Preparación de los precursores lineales

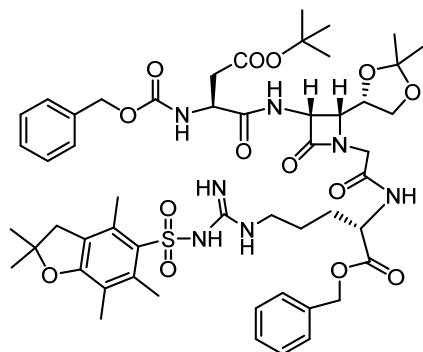
### 7.2.5.1. Preparación de los tetrapéptidos 2.11, 4.11, 11.11 y 12.11



#### Procedimiento general

En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvieron la amina correspondiente (1.1 equiv., 1.39 mmol) y el ácido de la  $\beta$ -lactama (1 equiv., 1.26 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (60 mL) a 0 °C. Sobre la disolución se adicionaron consecutivamente TEA (2 equiv., 0.37 mL, 2.52 mmol), EDC·HCl (1.6 equiv., 0.38 g, 2.01 mmol), y HOBT (1.4 equiv., 0.23 g, 1.76 mmol) y se dejó que la disolución alcanzara poco a poco la temperatura ambiente agitando la mezcla de la reacción durante 20 horas. Transcurrido ese tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2 x 40 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 40 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (20/1)).

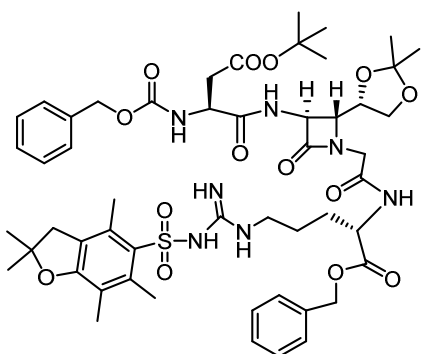
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (2.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **2.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **2.8** (0.69 g, 1.26 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.72 g, 1.39 mmol). Rendimiento: 0.29 g (70%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3323, 3035, 2975, 2933, 1730, 1668, 1539. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.82 (1H, d,

NH-β-lact, *J* = 6.4 Hz); 7.58 (1H, d, NH[Arg], *J* = 8.0 Hz); 7.40–7.24 (10H, m, arom.); 6.31–6.15 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.08 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.2 Hz); 5.94 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.18–4.93 (5H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.63–4.49 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.30 (1H dt, CH<sub>3</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 4.17–3.94 (3H, m, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], 2H N-CH<sub>2</sub>); 3.82 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.2 Hz); 3.62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 3.20–3.03 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.91 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.82 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 2.62 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 2.54 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.47 (3H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.92–1.68 (2H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.68–1.47 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.43 (6H, s, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.39 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.25 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.9, 171.6, 170.6, 167.8, 167.4, 158.7, 156.4, 156.3, 138.3, 136.0, 135.4, 133.0, 132.2, 128.6, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 124.6, 117.5, 109.9, 86.4, 81.9, 74.8, 67.4, 67.1, 66.2, 61.9, 57.5, 52.2, 51.6, 45.1, 43.2, 40.6, 37.2, 29.3, 28.6, 28.1, 26.8, 25.3, 24.9, 19.3, 18.0, 12.5. UPLC-MS (TQD [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>52</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>S: 1047.4623; encontrada: 1048.68.

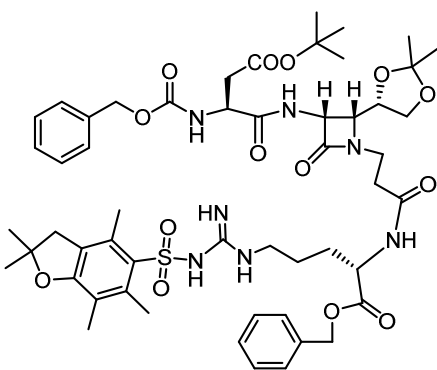
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (4.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **4.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **4.8** (0.41 g, 0.75 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.43 g, 0.82 mmol). Rendimiento: 0.60 g (76%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3436, 3318, 3066, 3034, 2976, 2934,

1759, 1730, 1545.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.04–7.93 (1H, m, NH- $\beta$ -lact); 7.77 (1H, d, NH[Arg],  $J = 7.7$  Hz); 7.38–7.21 (10H, m, arom.); 6.29–6.04 (4H, m, NH-(C=NH)-NH, NH[Asp]); 5.15–4.93 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ -Ph); 4.58–4.39 (4H, m,  $\text{H}^\alpha$ [ $\beta$ -lact],  $\text{H}^\alpha$ [Asp],  $\text{H}^\alpha$ [Arg], N- $\text{CH}_2$ ); 4.17 (1H, dt,  $\text{CH}_5$ [dioxol],  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 4.02 (1H, dd,  $\text{CH}_2$ [dioxol],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 3.90 (1H, d, N- $\text{CH}_2$ ,  $J = 17.2$  Hz); 3.78 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [ $\beta$ -lact],  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz); 3.70 (1H, dd,  $\text{CH}_2$ [dioxol],  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 3.26–3.02 (2H, m,  $\text{H}^\delta$ [Arg]); 2.90 (2H, s,  $\text{CH}_2$ [Pbf]); 2.76 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 5.7$  Hz); 2.66 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 5.7$  Hz); 2.55 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 2.48 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 2.05 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 1.91–1.72 (2H, m,  $\text{H}^\beta$ [Arg]); 1.64–1.46 (2H, m,  $\text{H}^\gamma$ [Arg]); 1.43 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -C- $\text{CH}_3$ [Pbf]); 1.36 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.30 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [dioxol]); 1.26 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [dioxol]).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 172.1, 171.6, 170.5, 168.1, 166.5, 158.7, 156.3, 138.3, 136.0, 135.4, 133.2, 132.2, 128.6, 128.6, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0, 124.6, 117.5, 110.4, 86.4, 82.0, 76.5, 67.3, 67.1, 66.2, 62.2, 59.0, 52.5, 51.6, 44.8, 43.3, 40.7, 37.5, 28.9, 28.6, 28.0, 26.6, 25.5, 25.1, 19.3, 18.0, 12.5. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{52}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{S}$ : 1047.4623; encontrada: 1048.62.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (11.11):**

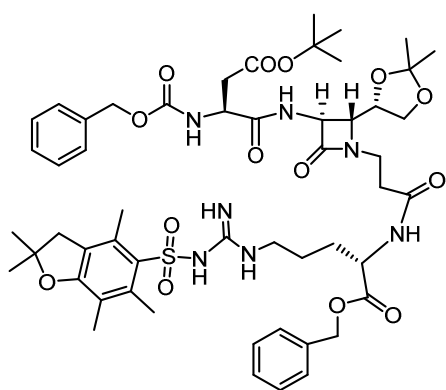


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **11.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-COOH **7.8** (0.53 g, 0.95 mmol) con la amina  $\text{NH}_2$ -Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.54 g, 1.04 mmol). Rendimiento: 0.74 g (73%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3432, 3334, 2976, 2935, 1739, 1675, 1620, 1546.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.55

(1H, d, NH- $\beta$ -lact,  $J = 9.5$  Hz); 7.41–7.28 (10H, m, arom.); 6.49 (1H, d, NH[Arg],  $J = 8.3$  Hz); 6.27–6.14 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.97 (1H, d, NH[Asp],  $J = 7.9$  Hz); 5.85 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.23–4.97 (5H, m,  $\text{H}^\alpha$ [ $\beta$ -lact], 2 x  $\text{CH}_2$ -Ph); 4.64 (1H, td,  $\text{H}^\alpha$ [Asp],  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 4.50 (1H, dt,  $\text{H}^\alpha$ [Arg],  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 4.23–4.01 (2H, m,  $\text{CH}_2$ [dioxol],  $\text{CH}_5$ [dioxol]); 3.95–3.81 (2H, m,  $\text{H}^\beta$ [ $\beta$ -lact],  $\text{CH}_2$ [dioxol]); 3.63 (1H, dt, N- $\text{CH}_2$ ,  $J_1 = 10.7$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.53 (1H, dt, N- $\text{CH}_2$ ,  $J_1 = 10.7$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.33–3.18 (1H, m,  $\text{H}^\delta$ [Arg]); 3.16–3.02 (1H, m,  $\text{H}^\delta$ [Arg]); 2.93 (2H, s,  $\text{CH}_2$ [Pbf]); 2.81 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 2.76–2.62 (2H, m,  $\text{H}^\beta$ [Asp], N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ); 2.58 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 2.55–2.38 (4H, m,  $\text{CH}_3$ [Pbf], N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ); 2.08 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 1.96–1.80 (1H, m,  $\text{H}^\beta$ [Arg]); 1.69–1.49 (3H, m, 1H  $\text{H}^\beta$ [Arg], 2H  $\text{H}^\gamma$ [Arg]); 1.45 (6H, s,

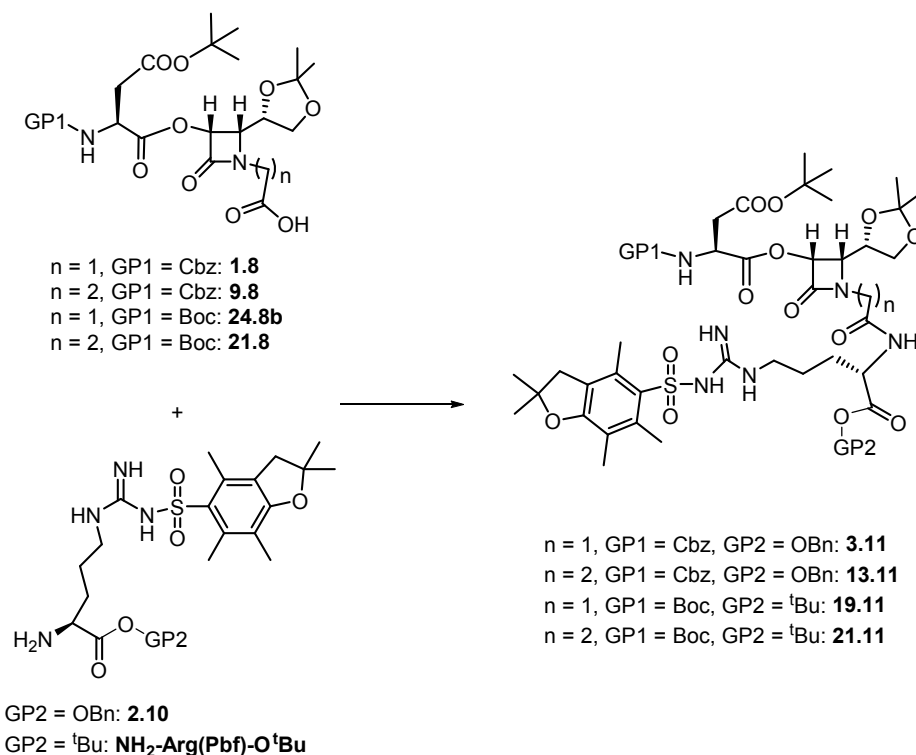
CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.42 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.40 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.29 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]).  
<sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.0, 171.6, 171.0, 170.33, 167.3, 158.6, 156.2, 138.3, 135.9, 135.3, 133.1, 132.2, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 124.6, 117.4, 110.0, 86.3, 81.8, 74.7, 67.3, 67.2, 66.1, 60.7, 56.48, 52.1, 51.7, 43.2, 40.5, 38.8, 37.3, 34.0, 29.1, 28.6, 28.0, 26.5, 25.6, 24.9, 19.3, 18.0, 12.5. UPLC-MS (TQD [M + 1 Na<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>53</sub>H<sub>71</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>S: 1061.4780; encontrada: 1085.37.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (12.11):**



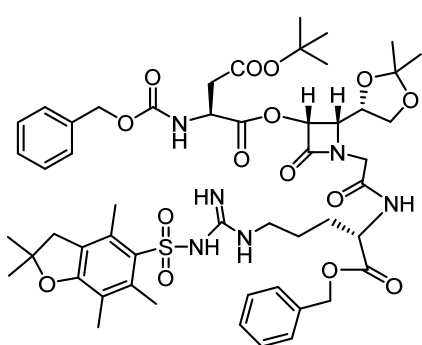
La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **12.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **8.8** (0.30 g, 0.53 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.33 g, 0.58 mmol). Rendimiento: 0.44 g (75%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3438, 3333, 3062, 3032, 2974, 2929, 1735, 1672, 1619, 1546. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.81 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 6.7 Hz); 7.38–7.30 (10H, m, arom.); 7.07 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.6 Hz); 6.33–6.21 (3H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.09 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.8 Hz); 5.20–4.947 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.61–4.49 (3H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.21–4.05 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.76 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 3.72–3.62 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 3.50 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz); 3.25–3.01 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.93 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.86 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 2.66 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 16.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 2.60–2.55 (5H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf], N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.93–1.77 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.77–1.59 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.55–1.36 (20H, 2H H<sup>γ</sup>[Arg], CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], CH<sub>3</sub>[dioxol], <sup>t</sup>Bu); 1.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.2, 171.5, 171.1, 170.7, 167.0, 158.8, 156.4, 156.2, 138.4, 136.1, 135.3, 133.2, 132.4, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 124.7, 117.6, 110.4, 86.4, 81.9, 76.4, 67.4, 67.3, 66.4, 62.6, 58.1, 52.2, 51.6, 43.4, 40.6, 39.1, 37.8, 34.3, 29.2, 28.7, 28.1, 26.8, 25.3, 25.2, 19.4, 18.0, 12.6. UPLC-MS (TQD [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>53</sub>H<sub>71</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>S: 1061.4780; encontrada: 1062.48.

### 7.2.5.2. Preparación de los tetrapeptidos 3.11, 13.11, 19.11 y 21.11



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.5.1.

#### Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (3.11):

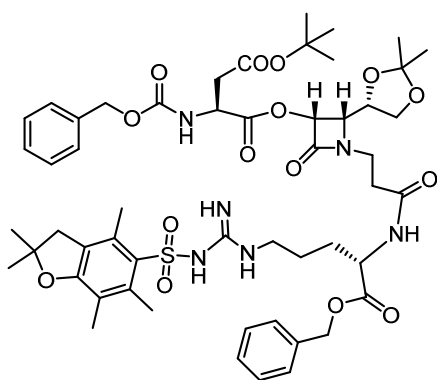


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **3.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **1.8** (0.39 g, 0.72 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.45 g, 0.79 mmol). Rendimiento: 0.58 g (76%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3443, 3328, 2975, 2932, 1729, 1547, 1370. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>):

7.40–7.29 (10H, m, arom.); 6.85 (1H, d, NH[Arg],  $J = 9.1$  Hz); 6.01–5.91 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.81 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.5$  Hz); 5.74 (1H, d, H<sup>α<sub>R</sub></sup>[β-lact],  $J = 5.0$  Hz); 5.64 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.23–5.05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.71–4.56 (2H, m, H<sup>α<sub>S</sub></sup>[Asp], H<sup>α<sub>S</sub></sup>[Arg]); 4.22 (1H, ddd, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 6.2$ ,  $J_3 = 4.6$  Hz); 4.14–3.99 (3H, m, 2H N-CH<sub>2</sub>, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.94 (1H, dd, H<sup>β<sub>S</sub></sup>[β-lact],  $J_1 = 9.1$ ,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.63 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.4$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 3.18 (2H, dt, H<sup>δ</sup>[Arg],  $J_1 = 7.2$  Hz,

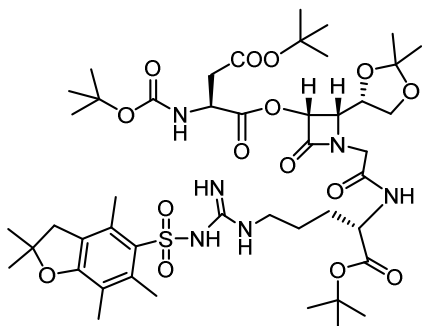
$J_2 = 6.1$  Hz); 3.00–2.87 (3H, m,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ); 2.79 (1H, dd,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 17.2$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 2.58 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.52 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.01 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.05–1.86 (2H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.78–1.59 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ); 1.45 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.43 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.38 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.27 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 171.8, 170.0, 167.2, 165.1, 158.9, 156.3, 156.1, 138.5, 136.2, 135.4, 132.9, 132.4, 128.8, 128.4, 128.2, 124.8, 117.6, 110.1, 86.5, 82.4, 75.8, 75.5, 67.4, 66.6, 64.50, 61.0, 52.2, 50.6, 45.1, 43.4, 40.8, 37.5, 29.4, 28.7, 28.2, 26.8, 25.4, 25.1, 19.4, 18.0, 12.6. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}$ : 1048.4463; encontrada: 1049.60.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (13.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O- $\beta$ -lactama-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **13.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O- $\beta$ -lactama-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-COOH **9.8** (0.42 g, 0.74 mmol) con la amina  $\text{NH}_2$ -Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.46 g, 0.81 mmol). Rendimiento: 0.54 g (68%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3434, 3319, 2974, 2934, 1757, 1729, 1541.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.43–7.30 (10H, m, arom.); 6.44 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Arg}]$ ,  $J = 7.6$  Hz); 6.14–6.05 (2H, m,  $\text{NH-(C=NH)-NH}$ ); 5.82 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Asp}]$ ,  $J = 8.8$  Hz); 5.70 (1H, b.s.,  $\text{NH-(C=NH)-NH}$ ); 5.66 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 5.0$  Hz); 5.26–5.05 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ); 4.70–4.51 (2H, m,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ); 4.20–4.12 (1H, m,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}]$ ); 4.10–4.06 (1H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ); 3.97 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{S}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.69 (1H, ddd,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 9.1$  Hz,  $J_3 = 4.1$  Hz); 3.63 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.56 (1H, dt,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 3.25–3.10 (2H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ); 2.98–2.84 (3H, m,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ); 2.77 (1H, dd,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 17.2$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 2.62–2.56 (4H, m, 1H  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.55–2.47 (4H, m, 1H  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.08 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.95–1.82 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.64–1.58 (3H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ , 2H  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ); 1.46–1.43 (9H, m,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3[\text{Pbf}]$ ,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.43 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.32 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 171.9, 170.6, 169.9, 169.8, 164.5, 158.6, 156.3, 156.0, 138.2, 136.0, 135.3, 133.1, 132.1, 128.5, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 124.5, 117.3, 109.8, 86.2, 82.2, 75.6, 75.0, 67.1, 67.1, 66.4, 59.8, 52.0, 50.4, 43.2, 40.4, 38.9, 37.3, 33.3, 29.2, 29.0, 28.5, 27.9, 26.7, 25.0, 19.2, 17.8, 12.4. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{53}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}$ : 1062.4620; encontrada: 1063.50.

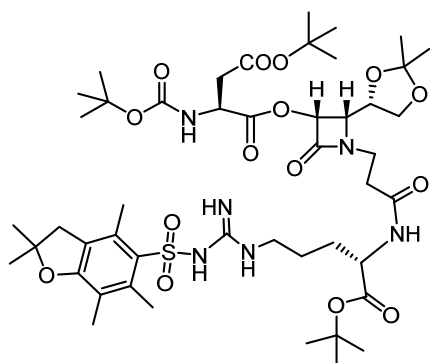
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu (19.11):**



La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **19.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **24.8b** (0.18 g, 0.35 mmol) con la amina comercial NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu (0.19 g, 0.38 mmol). Rendimiento: 0.26 g (70%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3430, 3335, 2978, 2945, 1773, 1719, 1617,

1543. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 6.87 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.8 Hz); 6.17–6.00 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.87 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.78 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.9 Hz); 5.51 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.8 Hz); 4.59 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 4.45 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg], *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.24 (1H, ddd, CH<sub>5</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.3 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.7 Hz); 4.19–4.01 (3H, m, 2H N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.98 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.64 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 3.28–3.17 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.99–2.84 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.76 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 2.59 (3H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.52 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.96–1.83 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.77–1.50 (3H, m, 1H H<sup>β</sup>[Arg], 2H H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.49–1.42 (33H, m, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], 3 x <sup>t</sup>Bu); 1.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 170.9, 170.1, 170.0, 166.9, 164.9, 158.6, 156.3, 155.3, 138.2, 133.0, 132.2, 124.5, 117.4, 109.8, 86.3, 82.2, 82.0, 80.2, 75.5, 75.5, 66.5, 60.8, 52.6, 50.0, 44.7, 43.2, 40.6, 37.4, 29.5, 28.6, 28.2, 28.0, 27.9, 26.7, 25.2, 25.0, 19.2, 17.9, 12.4.

**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu (21.11):**



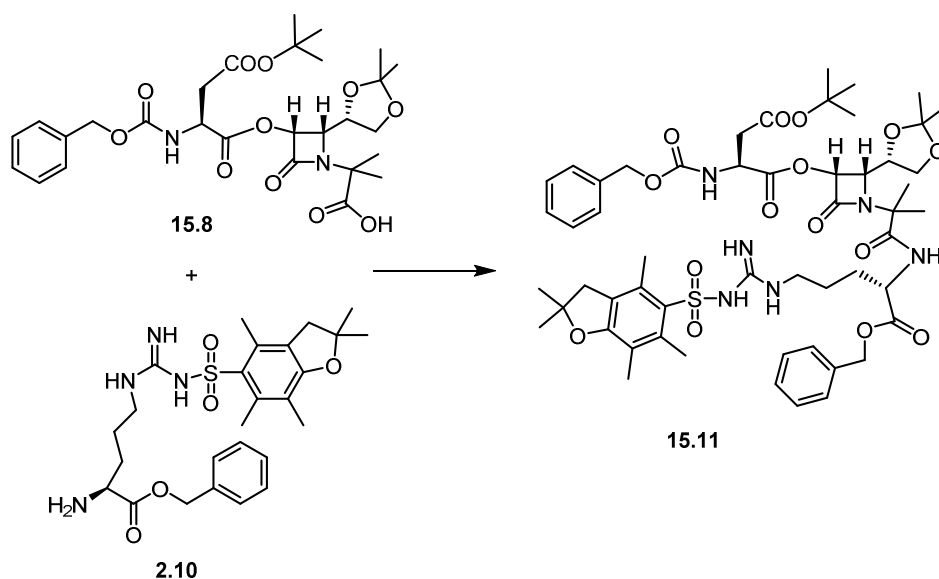
La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **21.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **21.8** (0.13 g, 0.25 mmol) con la amina comercial NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu (0.13 g, 0.28 mmol). Rendimiento: 0.17 g (67%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3443, 3333, 2976, 2932, 1761, 1722, 1662, 1618, 1545. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>):

6.47–6.32 (1H, m, NH[Arg]); 6.20–6.13 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.81 (1H, b.s.,



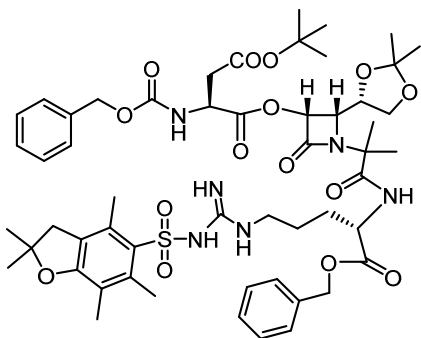
NH-(C=NH)-NH); 5.67 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.9 Hz); 5.50 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.8 Hz); 4.57 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 4.50–4.41 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.20 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.2 Hz); 4.11 (1H, d, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.2 Hz); 3.99 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.78–3.67 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.63 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.2 Hz); 3.60–3.47 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.37–3.12 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.95 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.87 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.73 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.60 (3H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.57–2.49 (5H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf], N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.94–1.76 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.71–1.51 (3H, m, 1H H<sup>β</sup>[Arg], 2H H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.51–1.37 (36H, m, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], 3 x <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.4, 170.6, 170.2, 170.1, 164.9, 158.6, 156.3, 155.4, 138.4, 133.6, 132.4, 124.6, 117.4, 110.1, 86.4, 82.7, 82.4, 80.6, 76.0, 75.1, 66.7, 60.0, 52.1, 50.1, 43.4, 40.5, 39.4, 37.6, 33.8, 29.7, 28.7, 28.4, 28.2, 28.1, 26.9, 25.2, 24.6, 19.4, 18.1, 12.6.

### 7.2.5.3. Preparación del tetradepsipéptido 15.11



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.5.1.

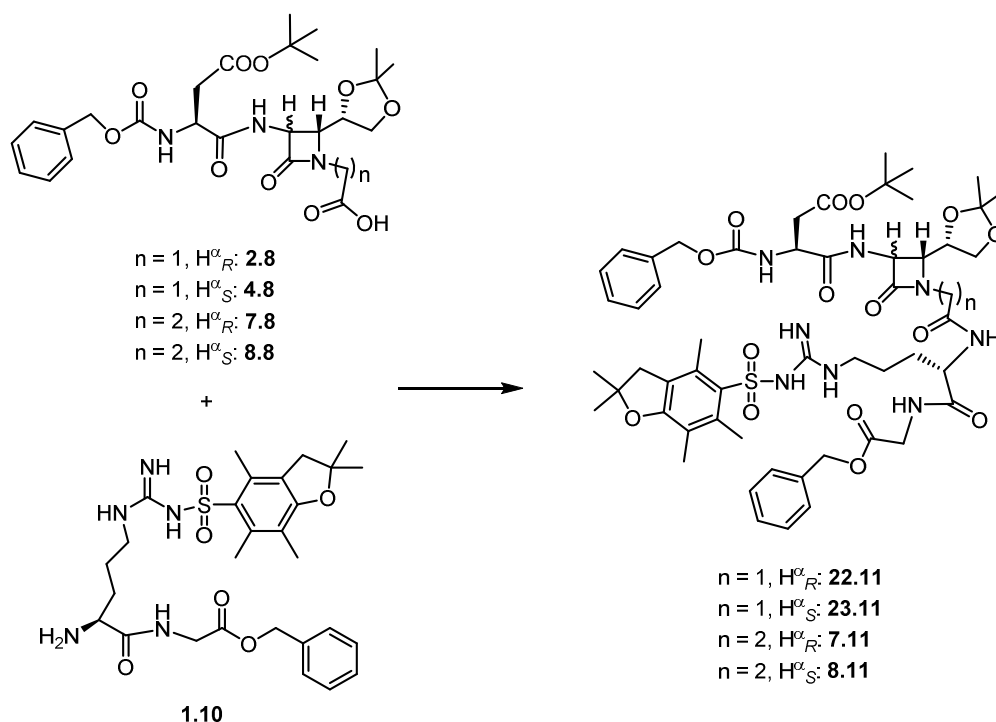
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(1,1-dimetilmetilencarbonil)azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (15.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **15.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-COOH **15.8** (0.36 g, 0.64 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.36 g, 0.70 mmol). Rendimiento: 0.48 g (70%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3436, 3338, 3032, 2976, 2928, 2872, 1733,

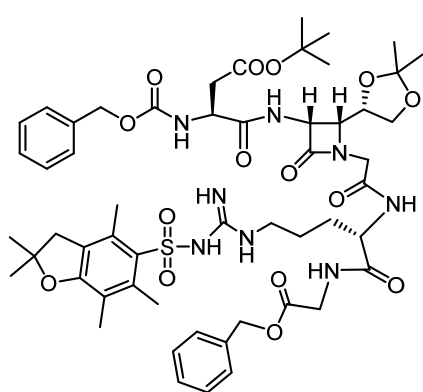
1677, 1619, 1548. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.42–7.28 (10H, m, arom.); 6.97 (1H, NH[Arg], *J* = 7.8 Hz); 6.21–6.02 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.90 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.3 Hz); 5.88 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.77 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 5.3 Hz); 5.23–5.01 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.67 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 4.63–4.55 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.26–4.18 (1H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.18–4.09 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 4.07–4.00 (1H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact]); 3.61–3.52 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.24–3.09 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.96–2.86 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.79 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 2.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.52 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.03–1.95 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.76–1.66 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.61 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.59 (3H, s, N-C-CH<sub>3</sub>); 1.51–1.37 (20H, m, 2H H<sup>γ</sup>[Arg], CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], <sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.27 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 171.9, 170.0, 170.0, 164.5, 158.6, 156.3, 156.1, 138.4, 136.1, 135.1, 133.5, 132.4, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 124.5, 117.4, 110.3, 86.3, 82.6, 76.0, 73.9, 67.5, 66.8, 61.0, 60.5, 60.4, 52.0, 50.6, 43.4, 40.4, 37.5, 29.8, 29.2, 28.7, 28.1, 26.5, 24.8, 24.6, 23.6, 19.4, 18.0, 12.6. UPLC-MS (TQD [M + 1 Na<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>S: 1076.4776; encontrada: 1100.32.

### 7.2.5.4. Preparación de los pentapéptidos 22.11, 23.11, 7.11 y 8.11



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.5.1.

#### Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (22.11):

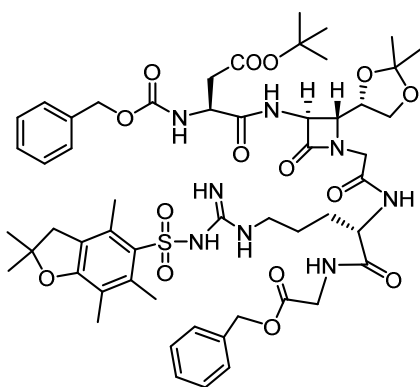


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **22.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **2.8** (0.69 g, 1.26 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.80 g, 1.40 mmol). Rendimiento: 0.98 g (70%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3432, 3310, 3064, 3035, 2976, 2933, 1753, 1663, 1543. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.66

(1H, d, NH[Arg],  $J = 8.6$  Hz); 7.55 (1H, d, NH-β-lact,  $J = 7.7$  Hz); 7.35–7.27 (11H, m, arom., NH[Gly]); 6.28–6.08 (3H, m, NH[Asp], NH-(C=NH)-NH); 5.72 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.18–4.99 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.88 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J_1 = 7.7$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 4.68–4.49 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.39 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz); 4.24–4.10 (2H, m, H<sup>α</sup>[Gly], N-CH<sub>2</sub>); 3.97–3.86 (3H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], H<sup>α</sup>[Gly], N-CH<sub>2</sub>); 3.83 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 3.66 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],

$J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz); 3.29–3.09 (2H, m,  $H^\delta$ [Arg]); 2.93 (2H, s,  $CH_2$ [Pbf]); 2.71 (2H, d,  $H^\beta$ [Asp],  $J = 6.2$  Hz); 2.57 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.50 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.08 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.05–1.98 (1H, m,  $H^\beta$ [Arg]); 1.86–1.73 (1H, m,  $H^\beta$ [Arg]); 1.70–1.55 (2H, m,  $H^\nu$ [Arg]); 1.45 (6H, s,  $CH_3$ -C- $CH_3$ [Pbf]); 1.40 (3H, s,  $CH_3$ [dioxol]); 1.39 (9H, s,  $^t$ Bu); 1.17 (3H, s,  $CH_3$ [dioxol]).  $^{13}C$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 172.2, 172.1, 170.4, 170.0, 168.0, 167.2, 158.8, 156.6, 156.4, 138.5, 136.0, 135.3, 133.0, 132.4, 128.7, 128.7, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 124.7, 117.6, 110.1, 86.5, 82.0, 74.8, 67.5, 67.2, 66.4, 61.6, 57.7, 53.0, 51.6, 45.5, 43.4, 41.3, 40.6, 37.2, 29.4, 28.7, 28.1, 27.0, 25.6, 25.1, 19.4, 18.1, 12.6.

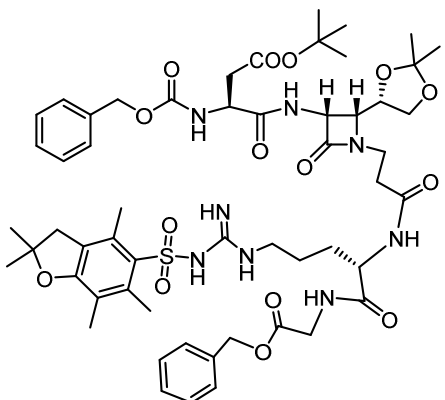
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3S,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (23.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama- $CH_2$ -CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **23.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH- $\beta$ -lactama- $CH_2$ -COOH **4.8** (0.41 g, 0.75 mmol) con el dipéptido  $NH_2$ -Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.47 g, 0.82 mmol). Rendimiento: 0.63 g (76%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ,  $CH_2Cl_2$ ): 3432, 3324, 3064, 3033, 2975, 2932, 1753, 1728, 1660, 1542.  $^1H$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ):

8.22–8.09 (1H, m, NH[Arg]); 7.43–7.35 (1H, m, NH[Gly]); 7.32 (1H, d, NH- $\beta$ -lact,  $J = 1.5$  Hz) 7.31–7.28 (10H, m, arom.); 6.36 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.6$  Hz); 6.15–5.97 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.74 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.21–4.89 (4H, m, 2 x  $CH_2$ -Ph); 4.72–4.51 (2H, m,  $H^\alpha_S$ [Asp],  $H^\alpha_S$ [Arg]); 4.36–4.17 (4H, m,  $H^\alpha_S$ [ $\beta$ -lact],  $H^\alpha$ [Gly], N- $CH_2$ ,  $CH_2$ [dioxol]); 4.18–4.08 (1H, m,  $CH_5$ [dioxol]); 4.07–3.92 (2H, m,  $CH_2$ [dioxol], N- $CH_2$ ); 3.87–3.66 (2H, m,  $H^\beta_R$ [ $\beta$ -lact],  $H^\alpha$ [Gly]); 3.38–3.23 (1H, m,  $H^\delta$ [Arg]); 3.23–3.09 (1H, m,  $H^\delta$ [Arg]); 2.94 (2H, s,  $CH_2$ [Pbf]); 2.83 (1H, dd,  $H^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz); 2.68 (1H, dd,  $H^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz); 2.58 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.51 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.09 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.06–1.93 (1H, m,  $H^\beta$ [Arg]); 1.93–1.75 (1H, m,  $H^\beta$ [Arg]); 1.75–1.60 (2H, m,  $H^\nu$ [Arg]); 1.45 (3H, s,  $CH_3$ -C- $CH_3$ [Pbf]); 1.41 (15H, s,  $CH_3$ [dioxol], 3H  $CH_3$ -C- $CH_3$ [Pbf],  $^t$ Bu); 1.33 (3H, s,  $CH_3$ [dioxol]).  $^{13}C$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 172.4, 172.3, 170.2, 169.9, 167.9, 166.8, 158.6, 156.4, 156.4, 138.3, 136.0, 135.2, 133.0, 132.2, 128.5, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0, 124.6, 117.4, 110.3, 86.3, 81.8, 76.4, 67.2, 67.0, 66.1, 62.0, 59.1, 53.0, 51.3, 45.4, 43.2, 41.2, 40.5, 37.4, 29.2, 28.6, 28.0, 26.7, 25.5, 25.0, 19.3, 17.9, 12.4.

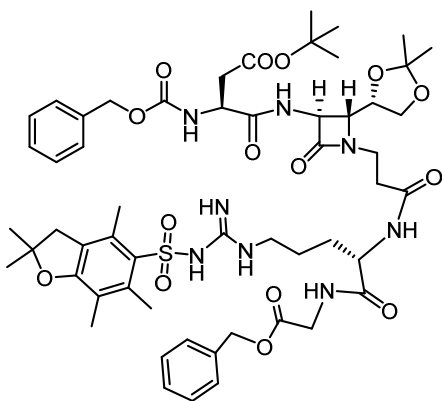
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (7.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **7.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **7.8** (0.53 g, 0.95 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.60 g, 1.04 mmol). Rendimiento: 0.79 g (74%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3323, 3063, 3033, 2976, 2933, 1742, 1663, 1542. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.71 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 9.1 Hz); 7.41–7.27 (11H, m,

arom., NH[Gly]); 6.94 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.9 Hz); 6.34–6.17 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.01 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.2 Hz); 5.93 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.20–4.96 (5H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.61–4.45 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.22–3.99 (4H, m, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], 2H H<sup>α</sup>[Gly], CH<sub>3</sub>[dioxol]); 3.89–3.77 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.71–3.59 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.57–3.45 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>); 3.35–3.06 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.94 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.87–2.62 (4H, m, 2H H<sup>β</sup>[Asp], 2H N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.51 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.97–1.79 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.76–1.50 (6H, m, 1H H<sup>β</sup>[Arg], 2H H<sup>γ</sup>[Arg], 3H CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.41 (6H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol], 3H CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.39 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.7, 171.6, 171.2, 170.3, 169.9, 167.4, 158.8, 156.6, 156.3, 138.4, 136.1, 135.4, 132.9, 132.3, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 124.7, 117.6, 110.0, 86.4, 81.8, 74.9, 67.3, 67.1, 66.2, 60.9, 56.6, 52.8, 51.7, 43.3, 41.4, 40.5, 38.9, 37.4, 34.2, 29.6, 28.7, 28.1, 26.7, 25.6, 25.0, 19.4, 18.0, 12.6. UPLC-MS (TQD [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S: 1118.4994; encontrada: 1120.12.

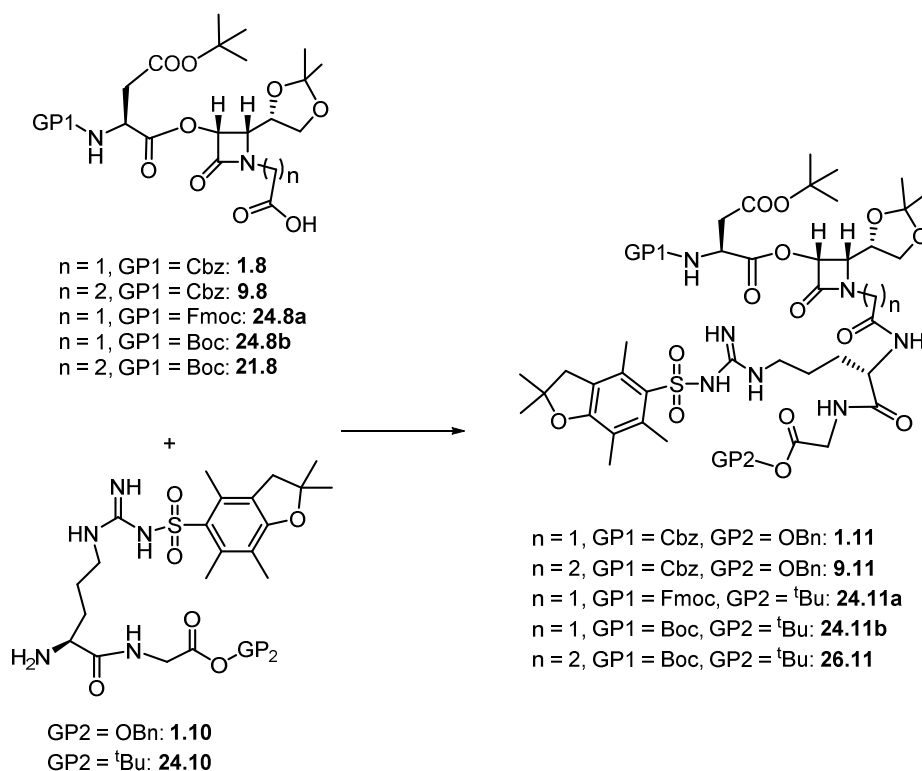
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (8.11):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **8.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-NH-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **8.8** (0.30 g, 0.53 mmol) y el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.33 g, 0.58 mmol). Rendimiento: 0.44 g (75%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3432, 3325, 3065, 3033, 2972,

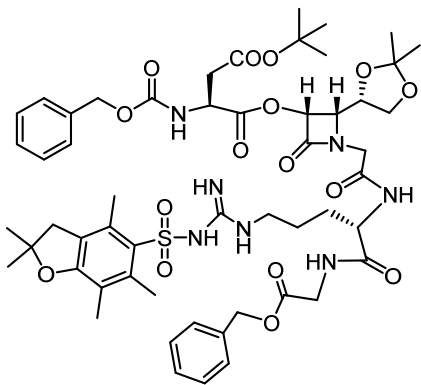
2929, 1729, 1656, 1544.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.20 (1H, d, NH- $\beta$ -lact,  $J = 5.0$  Hz); 7.85 (1H, t, NH[Gly],  $J = 6.0$  Hz); 7.51 (1H, d, NH[Arg],  $J = 4.1$  Hz); 7.38–7.22 (10H, m, arom.); 6.50–6.36 (3H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.32 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.6$  Hz); 5.18–4.94 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ -Ph); 4.67–4.45 (3H, m,  $\text{H}^\alpha$ [ $\beta$ -lact],  $\text{H}^\alpha$ [Asp],  $\text{H}^\alpha$ [Arg]); 4.24–4.05 (3H, m,  $\text{CH}_2$ [dioxol],  $\text{CH}_3$ [dioxol],  $\text{H}^\alpha$ [Gly]); 3.99 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha$ [Gly],  $J_1 = 17.8$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 3.89–3.59 (3H, m,  $\text{H}^\beta$ [ $\beta$ -lact],  $\text{CH}_2$ [dioxol], N- $\text{CH}_2$ ); 3.56–3.38 (1H, m, N- $\text{CH}_2$ ); 3.28–3.10 (2H, m,  $\text{H}^\delta$ [Arg]); 2.94 (2H, s,  $\text{CH}_2$ [Pbf]); 2.82 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 2.72 (1H, dd,  $\text{H}^\beta$ [Asp],  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 2.62–2.56 (4H, m,  $\text{CH}_3$ [Pbf], N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ); 2.56–2.45 (4H, m,  $\text{CH}_3$ [Pbf], N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ); 2.09 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [Pbf]); 1.98–1.81 (1H, m,  $\text{H}^\beta$ [Arg]); 1.80–1.53 (3H, m, 1H  $\text{H}^\beta$ [Arg], 2H  $\text{H}^\gamma$ [Arg]); 1.46 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -C- $\text{CH}_3$ [Pbf]); 1.40 (12H, s,  $\text{CH}_3$ [dioxol],  $^t\text{Bu}$ ); 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3$ [dioxol]).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 174.0, 172.8, 171.7, 170.3, 169.9, 166.4, 158.6, 156.4, 156.1, 138.2, 136.1, 135.2, 132.9, 132.1, 128.4, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 124.5, 117.3, 110.1, 86.2, 81.5, 77.0, 67.0, 66.9, 66.3, 61.9, 57.9, 52.9, 51.4, 43.1, 41.2, 40.4, 38.7, 37.7, 34.2, 29.3, 28.5, 27.9, 26.6, 25.2, 25.1, 19.2, 17.8, 12.3. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{S}$ : 1118.4994; encontrada: 1119.42.

### 7.2.5.5. Preparación de los pentadesipéptidos 1.11, 9.11, 24.11a, 24.11b y 26.11



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.5.1.

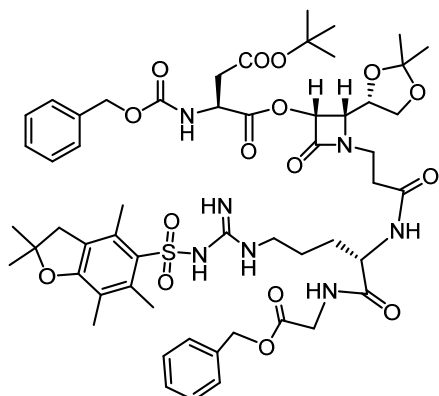
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (**1.11**):**



La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **1.8** (0.39 g, 0.72 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.45 g, 0.79 mmol). Rendimiento: 0.60 g (76%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3443, 3328, 2975, 2932, 1728, 1700, 1547.

<sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.63 (1H, t, NH[Gly], *J* = 5.8 Hz); 7.40–7.26 (11H, m, arom., NH[Arg]); 6.35–6.17 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.05 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.86–5.74 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], NH[Asp]); 5.20–5.01 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.69–4.53 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.33–4.13 (2H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol], N-CH<sub>2</sub>); 4.13–3.91 (5H, m, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], 1H N-CH<sub>2</sub>, 2H H<sup>α</sup>[Gly]); 3.61 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz); 3.32–3.14 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.99–2.86 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.78 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.8 Hz); 2.56 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.49 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.02–1.81 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.78–1.64 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.64–1.51 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.45 (6H, s, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.41 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.36 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.3, 170.1, 170.0, 169.9, 167.2, 165.2, 159.0, 156.6, 156.1, 138.5, 136.2, 135.4, 132.8, 132.4, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 124.8, 117.7, 110.1, 86.6, 82.4, 75.8, 75.6, 67.4, 67.2, 66.7, 61.0, 53.0, 50.6, 45.3, 43.4, 41.4, 40.6, 37.5, 30.0, 29.4, 28.7, 28.2, 26.9, 25.2, 19.4, 18.1, 12.6. UPLC-MS (TQD [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>54</sub>H<sub>71</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>S: 1105.4678; encontrada: 1106.62.

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (9.11):**

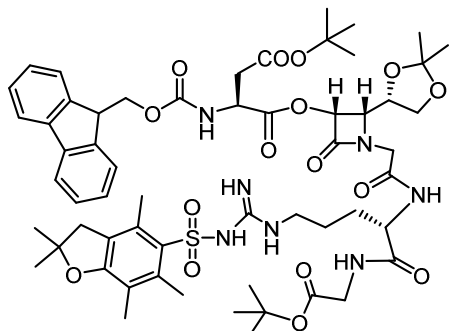


La Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **9.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **9.8** (0.42 g, 0.74 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn **1.10** (0.47 g, 0.81 mmol). Rendimiento: 0.56 g (68%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3434, 3319, 2974, 2934, 1757, 1729, 1541. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.63 (1H, t, NH[Gly],

*J* = 5.7 Hz); 7.43–7.23 (10H, m, arom.); 7.21–7.10 (1H, m, NH[Arg]); 6.39–6.25 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.02 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.88 (1H, d, NH[Asp], *J* = 9.2 Hz); 5.68 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 5.1 Hz); 5.19–5.01 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>-Ph); 4.65 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 4.59–4.51 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.17–4.09 (1H, m, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 4.09–3.96 (3H, m, 1H CH<sub>2</sub>[dioxol], 2H H<sup>α</sup>[Gly]); 3.92 (1H, dd, H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.1 Hz); 3.76 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.1 Hz); 3.65–3.58 (1H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol]); 3.50 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.1 Hz); 3.30–3.18 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 3.00–2.83 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.77 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz); 2.67–2.53 (5H, m, 2H N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.00–1.86 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.75–1.64 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.64–1.50 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.46 (6H, s, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf]); 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.41 (9H, s, <sup>t</sup>Bu); 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.6, 170.9, 170.1, 170.0, 169.9, 164.6, 158.8, 156.6, 156.0, 138.4, 136.1, 135.4, 133.0, 132.3, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 124.8, 117.6, 110.0, 86.5, 82.4, 75.8, 75.2, 67.3, 67.1, 66.6, 60.1, 52.7, 50.5, 43.3, 41.4, 40.5, 39.2, 37.4, 33.7, 29.7, 28.7, 28.1, 26.9, 25.1, 19.4, 18.1, 12.6. UPLC-MS (TQD [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>55</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>S: 1119.4835; encontrada: 1120.56.



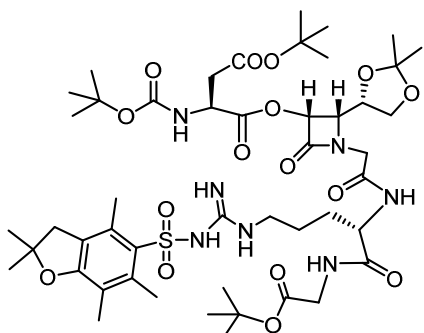
**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (24.11a):**



La Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **24.11a** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **24.8a** (0.20 g, 0.32 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu **24.10** (0.19 g, 0.35 mmol). Rendimiento: 0.24 g (65%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3445, 3328, 3065, 2976, 2931, 1730,

1659, 1620, 1547. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.99–7.28 (10H, m, arom., NH[Arg], NH[Gly]); 6.37–6.21 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.07 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.87 (1H, d, NH[Asp], *J* = 8.7 Hz); 5.84 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 4.8 Hz); 4.68 (1H, dt, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 4.64–4.48 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg]); 4.45–4.30 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Fmoc], 1H N-CH<sub>2</sub>); 4.30–4.14 (2H, m, CH[Fmoc], CH<sub>S</sub>[dioxol]); 4.12–3.99 (3H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], H<sup>β</sup><sub>S</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 3.94 (1H, dd, H<sup>α</sup>[Gly], *J*<sub>1</sub> = 17.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 3.82 (1H, dd, H<sup>α</sup>[Gly], *J*<sub>1</sub> = 17.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz); 3.65 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 3.36–3.19 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 3.04–2.89 (3H, m, CH<sub>2</sub>[Pbf], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.82 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp], *J*<sub>1</sub> = 17.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.7 Hz); 2.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.02–1.81 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.79–1.53 (3H, m, 1H H<sup>β</sup>[Arg], 2H H<sup>γ</sup>[Arg]); 1.44 (24H, m, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], 2 x <sup>t</sup>Bu); 1.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.25 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.0, 170.1, 169.9, 169.0, 167.2, 165.2, 158.9, 156.6, 156.0, 143.9, 143.7, 141.4, 138.4, 132.7, 132.3, 127.8, 127.2, 125.2, 124.8, 120.1, 117.7, 110.1, 86.5, 82.4, 82.1, 75.8, 75.5, 67.5, 66.6, 60.9, 53.2, 50.6, 47.1, 45.1, 43.3, 42.1, 40.5, 37.5, 29.8, 28.7, 28.2, 26.9, 25.8, 25.1, 19.4, 18.1, 12.6.

**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (24.11b):**

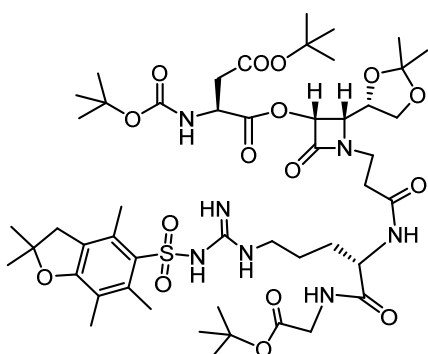


La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **24.11b** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **24.8b** (0.18 g, 0.35 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu **24.10** (0.21 g, 0.38 mmol). Rendimiento: 0.28 g (76%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3433, 3332, 2976, 2930, 1768, 1720, 1658,

1546. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.44 (1H, d, NH[Arg], *J* = 6.6 Hz); 7.36 (1H, t, NH[Gly],

$J = 5.0$  Hz); 6.37–6.19 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.07 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.80 (1H, d,  $H^{\alpha}_R[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.7$  Hz); 5.49 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.9$  Hz); 4.65–4.47 (2H, m,  $H^{\alpha}_S[\text{Asp}]$ ,  $H^{\alpha}_S[\text{Arg}]$ ); 4.29 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>,  $J = 16.9$  Hz); 4.20 (1H, dt, CH<sub>5</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.8$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 4.09–3.98 (3H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $H^{\beta}_S[\beta\text{-lact}]$ , N-CH<sub>2</sub>); 3.93 (1H, dd,  $H^{\alpha}[\text{Gly}]$ ,  $J_1 = 17.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.82 (1H, dd,  $H^{\alpha}[\text{Gly}]$ ,  $J_1 = 17.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.62 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 3.36–3.19 (2H, m,  $H^{\delta}[\text{Arg}]$ ); 2.98–2.83 (3H, m, 2H CH<sub>2</sub>[Pbf], 1H  $H^{\beta}[\text{Asp}]$ ); 2.76 (1H, dd,  $H^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 17.1$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 2.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.00–1.86 (1H, m,  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ ); 1.80–1.53 (3H, m, 1H  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ , 2H  $H^{\nu}[\text{Arg}]$ ); 1.52–1.40 (33H, m, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], 3 x <sup>t</sup>Bu); 1.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]); 1.28 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.0, 170.2, 170.0, 168.8, 167.1, 165.1, 158.8, 156.5, 155.3, 138.3, 132.8, 132.2, 124.7, 117.5, 109.9, 86.4, 82.0, 82.0, 80.3, 75.6, 75.6, 66.6, 60.9, 53.0, 50.0, 44.9, 43.3, 42.0, 40.4, 37.5, 29.7, 28.6, 28.3, 28.1, 26.8, 25.7, 25.1, 19.3, 18.0, 12.5.

**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (26.11):**

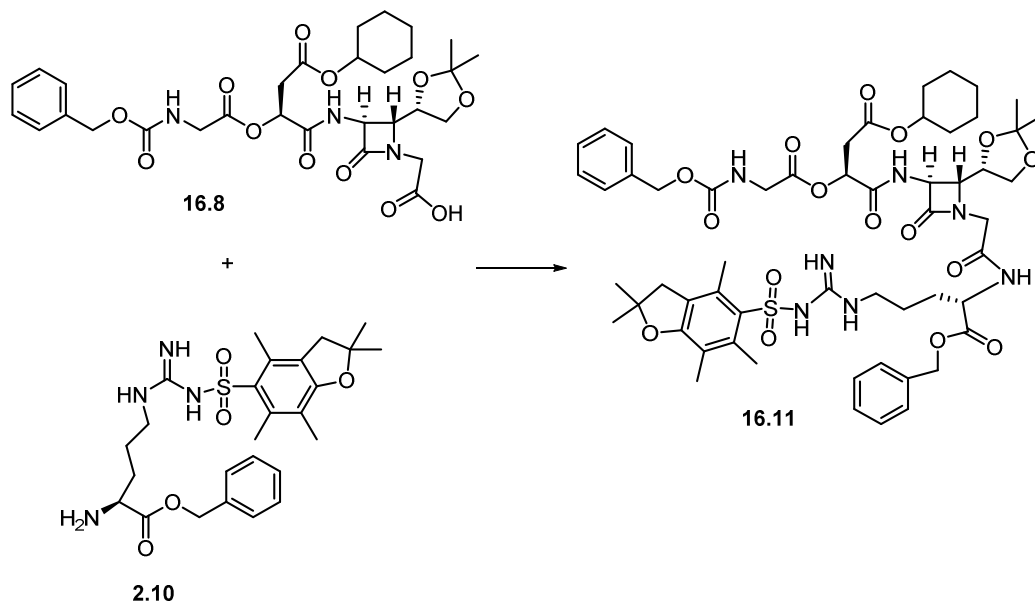


La Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O- $\beta$ -lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-Gly-OBn **26.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-O- $\beta$ -lactama-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH **21.8** (0.13 g, 0.25 mmol) con el dipéptido NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu **24.10** (0.15 g, 0.28 mmol). Rendimiento: 0.28 g (70%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3432, 3326, 2977, 2932, 1748, 1651, 1547. <sup>1</sup>H-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.51 (1H, t, NH[Gly],

$J = 5.2$  Hz); 7.30 (1H, d, NH[Arg],  $J = 7.0$  Hz); 6.49–6.28 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.17 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.69 (1H, d,  $H^{\alpha}_R[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.8$  Hz); 5.57 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.9$  Hz); 4.65–4.47 (2H, m,  $H^{\alpha}_S[\text{Asp}]$ ,  $H^{\alpha}_S[\text{Arg}]$ ); 4.24–4.02 (2H, m, CH<sub>2</sub>[dioxol], CH<sub>5</sub>[dioxol]); 3.94 (1H, dd,  $H^{\beta}_S[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.91–3.71 (3H, m, 2H  $H^{\alpha}[\text{Gly}]$ , 1H N-CH<sub>2</sub>); 3.61 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol],  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.50 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.8$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 3.32–3.19 (2H, m,  $H^{\delta}[\text{Arg}]$ ); 2.96 (2H, s, CH<sub>2</sub>[Pbf]); 2.85 (1H, dd,  $H^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 2.75 (1H, dd,  $H^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 2.66–2.54 (5H, m, CH<sub>3</sub>[Pbf], 2H N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>[Pbf]); 2.01–1.84 (1H, m,  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ ); 1.79–1.53 (3H, m, 1H  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ , 2H  $H^{\nu}[\text{Arg}]$ ); 1.50–1.37 (36H, m, CH<sub>3</sub>-C-CH<sub>3</sub>[Pbf], CH<sub>3</sub>[dioxol], 3 x <sup>t</sup>Bu); 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub>[dioxol]). <sup>13</sup>C-RMN ( $\delta$ , ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.4, 171.0, 170.3, 170.0, 169.0, 164.6, 158.7, 156.5, 155.3, 138.3, 133.0, 132.2, 124.6, 117.5, 109.9, 86.4, 82.1, 82.0, 80.3, 75.9, 75.0, 66.6, 60.0,

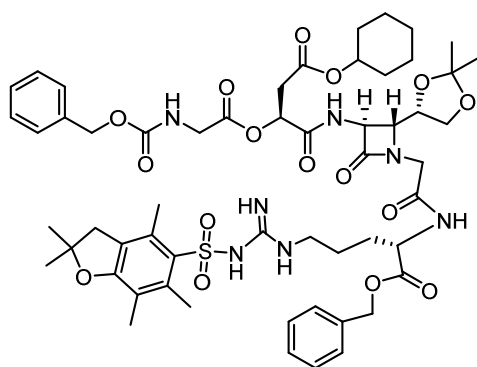
52.7, 50.0, 43.3, 42.0, 40.5, 39.0, 37.5, 33.5, 29.6, 28.6, 28.3, 28.1, 26.8, 25.2, 25.1, 19.3, 18.0, 12.5.

### 7.2.5.6. Preparación del pentadepsipéptido 16.11



La reacción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el acoplamiento peptídico del apartado 7.2.5.1.

#### **Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (16.11):**

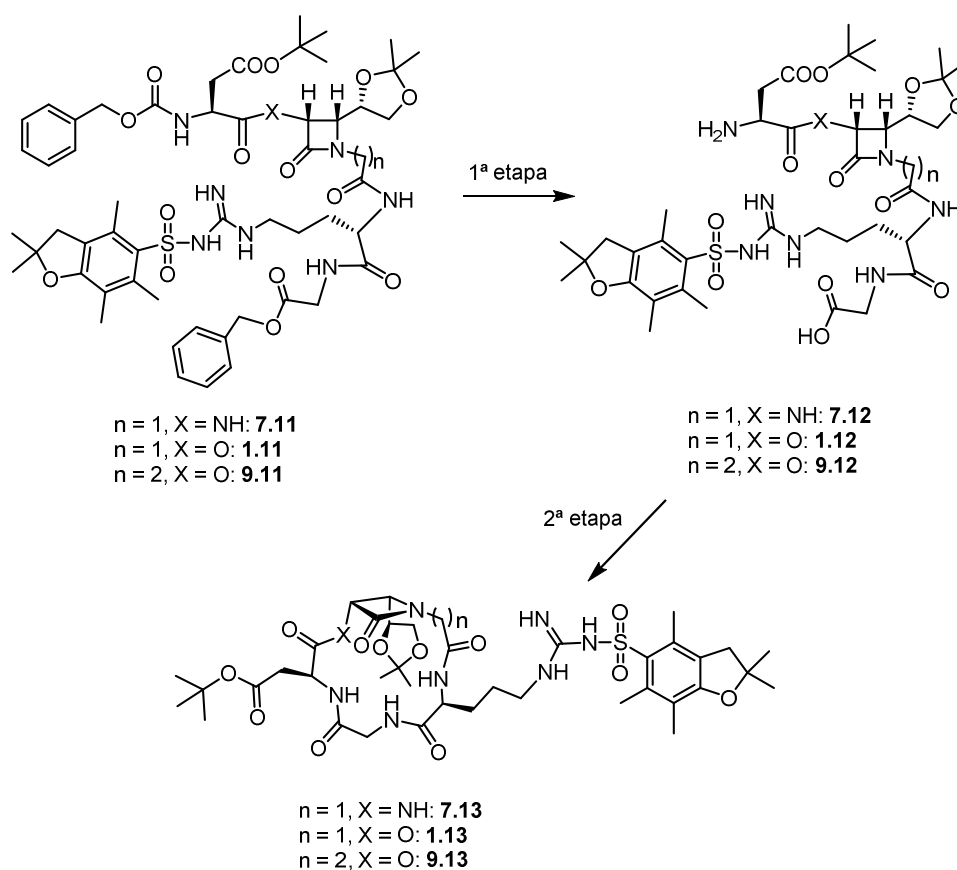


La Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-CO-Arg(Pbf)-OBn **16.11** se preparó mediante acoplamiento peptídico de la Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-NH-β-lactama-CH<sub>2</sub>-COOH **16.8** (0.48 g, 0.75 mmol) con la amina NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn **2.10** (0.42 g, 0.82 mmol). Rendimiento: 0.59 g (70%). Sólido amarillento. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 3439, 3334, 3065, 3034, 2932, 2858, 1733, 1670,

1620, 1547. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.92 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 3.6 Hz); 7.67 (1H, d, NH[Arg], *J* = 8.0 Hz); 7.41–7.28 (10H, m, arom.); 6.19–6.03 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.91 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.81–5.66 (1H, m, NH[Gly]); 5.51 (1H, t, H<sup>α</sup><sub>5</sub>[Asp], *J* = 5.9 Hz); 5.24–5.02 (4H, m, CH<sub>2</sub>-Ph); 4.78–4.66 (1H, m, CH[cHx]); 4.59–4.39 (3H, m, H<sup>α</sup><sub>5</sub>[β-lact], H<sup>α</sup><sub>5</sub>[Arg], N-CH<sub>2</sub>); 4.30–4.17 (1H, m, CH<sub>5</sub>[dioxol]); 4.06 (1H, dd, CH<sub>2</sub>[dioxol], *J*<sub>1</sub> = 9.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz); 3.96 (2H, d, H<sup>α</sup>[Gly], *J* = 6.1 Hz); 3.91 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>, *J* = 17.3 Hz);

3.85–3.80 (1H, m,  $H^{\beta}_R$ [ $\beta$ -lact]); 3.75 (1H, dd,  $CH_2$ [dioxol],  $J_1 = 9.2$  Hz,  $J_2 = 4.4$  Hz); 3.30–3.14 (1H, m,  $H^{\delta}$ [Arg]); 3.14–3.01 (1H, m,  $H^{\delta}$ [Arg]); 2.92 (2H, s,  $CH_2$ [Pbf]); 2.86 (1H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 5.9$  Hz); 2.75 (1H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 17.0$  Hz,  $J_2 = 5.9$  Hz); 2.55 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.48 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 2.07 (3H, s,  $CH_3$ [Pbf]); 1.96–1.11 (26H, m, 2H  $H^{\beta}$ [Arg], 2H  $H^{\gamma}$ [Arg],  $CH_3$ -C- $CH_3$ [Pbf],  $CH_3$ [dioxol], 5 x  $CH_2$ [cHx]).  $^{13}C$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ): 171.4, 169.8, 169.5, 169.0, 168.0, 166.2, 158.8, 157.2, 156.2, 138.3, 136.2, 135.4, 133.0, 132.2, 128.6, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 124.7, 117.5, 110.3, 86.4, 76.3, 73.9, 70.5, 67.2, 67.1, 66.2, 62.0, 58.7, 52.4, 44.7, 43.22, 42.9, 40.7, 36.5, 31.4, 28.8, 28.6, 26.6, 25.6, 25.2, 25.0, 23.7, 19.2, 17.9, 12.4. UPLC-MS (TQD [ $M + 1 H^+$ ]) masa exacta calculada para  $C_{56}H_{73}N_7O_{16}S$ : 1131.4835; encontrada: 1132.26.

### 7.2.6. Ciclación de los precursores lineales 7.11, 1.11 y 9.11



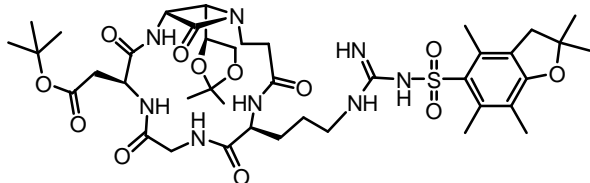
#### Procedimiento general

**1ª Etapa:** Sobre una disolución del correspondiente precursor  $\beta$ -lactámico lineal protegido (1 equiv., 0.49 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió Pd/C al 20% (%15, 0.08 g) y la mezcla se agitó bajo presión atmosférica de hidrógeno durante 16 horas. Pasado

ese tiempo y tras comprobar mediante TLC (EtOAc) el progreso de la reacción, se filtró la mezcla sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida.

**2ª Etapa:** El crudo así obtenido (1 equiv., 0.46 mmol) se disolvió en DMF (280 mL) y se bajó la temperatura a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez alcanzada la temperatura deseada se adicionaron consecutivamente  $\text{KHCO}_3$  (10 equiv., 0.46 g, 4.6 mmol), HATU (1.3 equiv., 0.23 g, 0.60 mmol) y HOAt (1.6 equiv., 0.10 g, 0.74 mmol). La reacción se agitó a esa misma temperatura durante toda la noche, transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se disolvió en EtOAc (60 mL) y se lavó con HCl 1 M (40 mL) y una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL) y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . El compuesto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ácida (EtOAc/acetona (4/6)).

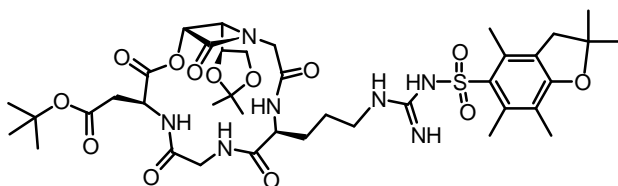
**Ciclo{[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (7.13):**



El ciclo **7.13** fue sintetizado a partir del precursor lineal **7.11** (0.55 g, 0.49 mmol). Rendimiento total: 0.28 g (65%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3428, 3294, 3064, 2975, 2931,

1736, 1648, 1544.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.59–8.47 (1H, m, NH[Gly]); 8.33 (1H, d, NH- $\beta$ -lact,  $J = 7.8$  Hz); 7.57 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.3$  Hz); 6.99 (1H, d, NH[Arg],  $J = 8.4$  Hz); 6.40–6.02 (3H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.06 (1H, dd,  $\text{H}^{\alpha}_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz); 4.81–4.68 (1H, m,  $\text{H}^{\alpha}_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ); 4.62–4.53 (1H, m,  $\text{H}^{\alpha}_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ); 4.09 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.84 (1H, dd,  $\text{H}^{\alpha}[\text{Gly}]$ ,  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz) 3.76–3.53 (5H, m,  $\text{H}^{\beta}_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $\text{H}^{\alpha}[\text{Gly}]$ ,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}]$ , 2H N- $\text{CH}_2$ ); 3.48 (1H, dd,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 3.37–3.23 (2H, m,  $\text{H}^{\delta}[\text{Arg}]$ ); 3.23–3.08 (1H, m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 2.95 (2H, s,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ); 2.88 (1H, dd,  $\text{H}^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 2.73 (1H, dd,  $\text{H}^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 16.7$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 2.57 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.54–2.45 (4H, m,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ , 1H N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 2.09 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.00–1.87 (1H, m,  $\text{H}^{\beta}[\text{Arg}]$ ); 1.85–1.70 (1H, m,  $\text{H}^{\beta}[\text{Arg}]$ ); 1.66–1.53 (2H, m,  $\text{H}^{\gamma}[\text{Arg}]$ ); 1.46 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.43 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.38 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.29 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 174.9, 171.6, 171.1, 170.8, 170.3, 167.3, 159.0, 156.6, 138.4, 132.6, 132.3, 124.9, 117.7, 109.6, 86.6, 82.1, 76.5, 66.6, 62.5, 57.0, 51.7, 51.0, 45.6, 43.3, 41.1, 40.3, 36.0, 34.8, 31.0, 28.7, 28.1, 26.8, 25.6, 24.9, 19.4, 18.1, 12.6. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$ : 876.4051; encontrada: 877.88.

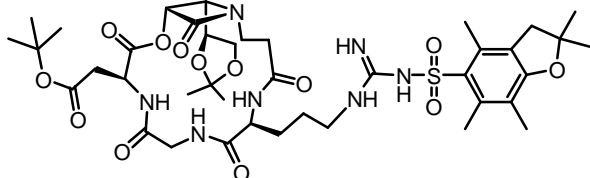
**Ciclo{[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (1.13):**



El ciclo **1.13** fue sintetizado a partir del precursor lineal **1.11** (0.42 g, 0.38 mmol) empleando EtOAc/THF (1/1) en vez de MeOH en la hidrogenación. Rendimiento total: 0.20 g (60%).

Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3440, 3337, 3063, 2971, 2924, 2853, 1763, 1662, 1545.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.99–7.92 (1H, m, NH[Gly]); 7.88 (1H, d, NH[Asp],  $J = 9.1$  Hz); 7.08 (1H, d, NH[Arg],  $J = 8.5$  Hz); 6.37–6.24 (2H, m, NH-(C=NH)-NH); 6.13 (1H, b.s., NH-(C=NH)-NH); 5.85 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.2$  Hz); 4.90 (1H, dt,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 6.1$  Hz); 4.54 (1H, dt,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 8.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 4.40 (1H, d, N- $\text{CH}_2$ ,  $J = 15.5$  Hz); 4.20–4.04 (3H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ ,  $\text{CH}_5[\text{dioxol}]$ ); 3.88 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{S}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 8.5$  Hz,  $J_2 = 4.2$  Hz); 3.67–3.42 (3H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ , N- $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ ); 3.43–3.31 (1H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ); 3.29–3.16 (1H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ); 2.95 (2H, s,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ); 2.79 (1H, d,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J = 6.1$  Hz); 2.57 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.49 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.08 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.01–1.88 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.86–1.69 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.67–1.53 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ); 1.46 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.44 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.43 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.31 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 172.8, 169.4, 169.2, 169.1, 169.0, 164.9, 159.0, 156.6, 138.5, 132.7, 132.4, 124.8, 117.7, 110.5, 86.6, 82.4, 76.2, 74.3, 66.6, 62.0, 53.7, 48.8, 47.2, 44.7, 43.4, 40.5, 36.7, 29.5, 28.7, 28.2, 26.9, 25.6, 24.9, 19.4, 18.1, 12.6. UPLC-MS (TQD [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}$ : 863.3735; encontrada: 864.51.

**Ciclo{[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (9.13):**



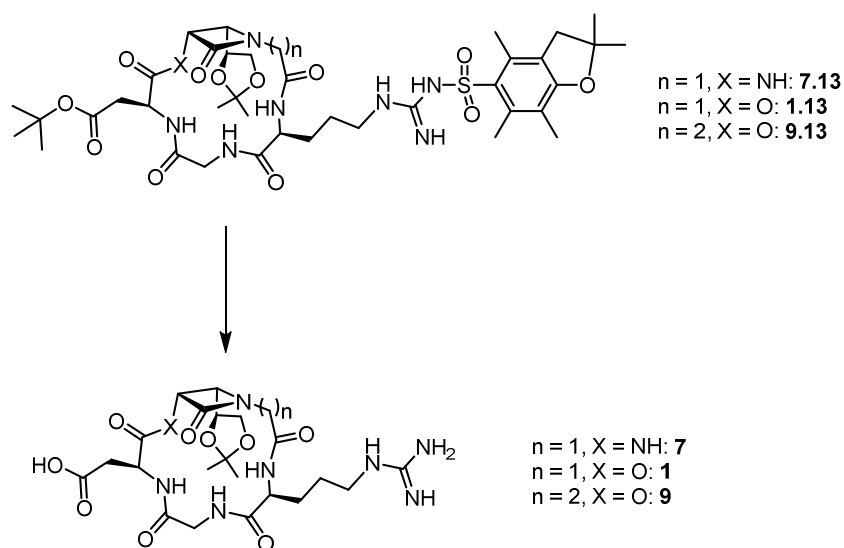
El ciclo **9.13** fue sintetizado a partir del precursor lineal **9.11** (0.39 g, 0.35 mmol) empleando en la hidrogenación EtOAc/THF (1/1) en vez de MeOH. Rendimiento total: 0.14 g (45%). Sólido blanco.

IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 3564, 3435, 3325, 3075, 2954, 2922, 2852, 1759, 1652, 1546.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.97 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.9$  Hz); 7.82 (1H, t, NH[Gly],  $J = 3.2$  Hz); 7.38 (1H, d, NH[Arg],  $J = 7.6$  Hz); 6.44–6.15 (3H, m, NH-(C=NH)-NH); 5.76 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.7$  Hz); 4.80 (1H, dt,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz); 4.55 (1H,

ddd,  $H^{\alpha}_S[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $J_3 = 4.9 \text{ Hz}$ ); 4.17–4.09 (3H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ,  $H^{\alpha}[\text{Gly}]$ ,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 3.72 (1H, dd,  $H^{\beta}_S[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 8.4 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 4.7 \text{ Hz}$ ); 3.69–3.53 (3H, m, 2H  $\text{N-CH}_2$ , 1H  $H^{\alpha}[\text{Gly}]$ ); 3.47–3.39 (1H, m,  $\text{CH}_2[\text{dioxol}]$ ); 3.33–3.09 (3H, m, 2H  $H^{\delta}[\text{Arg}]$ , 1H  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 2.94 (2H, s,  $\text{CH}_2[\text{Pbf}]$ ); 2.81 (2H, d,  $H^{\beta}[\text{Asp}]$ ,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ ); 2.56 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 2.53–2.41 (4H, m,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 2.08 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.95–1.79 (1H, m,  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ ); 1.77–1.47 (3H, m, 1H  $H^{\beta}[\text{Arg}]$ , 2H  $H^{\gamma}[\text{Arg}]$ ); 1.45 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-CH}_3[\text{Pbf}]$ ); 1.43 (9H, s,  $^t\text{Bu}$ ); 1.40 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ); 1.33 (3H, s,  $\text{CH}_3[\text{dioxol}]$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 173.0, 171.3, 169.7, 169.6, 169.30, 164.8, 158.9, 156.6, 138.4, 132.9, 132.4, 124.8, 117.6, 110.1, 86.5, 82.2, 76.0, 74.7, 66.3, 61.5, 52.8, 48.9, 44.6, 43.4, 41.0, 40.6, 36.8, 34.2, 29.5, 28.7, 28.2, 26.9, 25.7, 25.2, 19.4, 18.1, 12.6. UPLC-MS (TQD [ $M + 1 H^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}$ : 877.3892; encontrada: 878.43.

## 7.2.7. Desprotección completa de los ciclos y de los compuestos de cadena abierta

### 7.2.7.1. Desprotección de los ciclos 7.13, 1.13 y 9.13

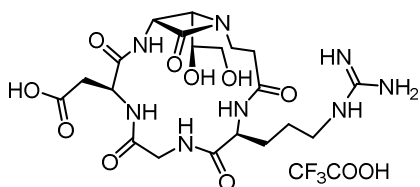


### Procedimiento general

En un tubo de ensayo se disolvió el ciclo protegido correspondiente (30 mg, 0.034 mmol) en una mezcla anhídrido de TFA /agua (1.8 mL/0.2 mL) a 0 °C, y se añadió trietilsilano (0.3 mL). La mezcla se agitó durante 16 horas a 4 °C. La reacción se siguió por  $^1\text{H-RMN}$  y una vez la conversión resultó ser completa se añadió a la mezcla diisopropil éter (2 mL). El pentapéptido desprotegido precipitó y la suspensión

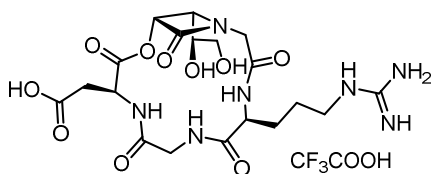
resultante se centrifugó a 6000 rpm. El residuo se lavó con más diisopropiléter (4 x 2 mL). El producto se secó mediante bomba de vacío (presión  $10^{-3}$  mmHg) obteniendo el producto final puro en forma de sal de trifluoroacetato.

**Trifluoro acetato de ciclo{[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-Asp (7):**



El ciclo **7** se preparó mediante la desprotección del ciclo **7.13** (30 mg, 0.034 mmol). Rendimiento total: 15 mg (80%). Sólido blanco. IR (ν,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3500–3000 (b.s.), 1742, 1654, 1542.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.03 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.9$  Hz); 4.64–4.57 (2H, m,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ); 3.81 (1H, d,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ ,  $J = 14.6$  Hz); 3.79 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 8.5$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 3.63 (2H, m,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ , N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 3.49 (1H, dt, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.39 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz); 3.29–3.23 (2H, m,  $\text{CH}_5\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.19–3.11 (2H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ); 3.05 (1H, dt, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 2.94 (2H, d,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J = 6.0$  Hz); 2.49 (1H, ddd, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $J_1 = 14.6$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz,  $J_3 = 5.6$  Hz); 1.88–1.70 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.76–1.66 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.66–1.53 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 8.93 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Asp}]$ ,  $J = 7.5$  Hz); 8.76 (1H, dd,  $\text{NH}[\text{Gly}]$ ,  $J_1 = 5.9$  Hz,  $J_2 = 3.1$  Hz); 8.36 (1H, d,  $\text{NH-}\beta\text{-lact}$ ,  $J = 8.6$  Hz); 8.06 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Arg}]$ ,  $J = 8.9$  Hz); 7.68–7.04 (1H, m,  $\text{NH-(C=NH)-NH}_2$ ); 6.68 (3H, b.s.,  $\text{NH-(C=NH)-NH}_2$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 175.0, 174.4, 174.3, 173.2, 173.0, 168.6, 157.0, 71.4, 62.5, 59.7, 56.0, 52.0, 50.9, 44.9, 40.6, 40.6, 34.6, 34.4, 29.2, 24.5. HRMS (TOF [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_9$ : 528.2292 ( $528.2292 + 1.0078 = 529.2370$ ); encontrada: 529.2368.

**Trifluoro acetato de ciclo{[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-Asp (1):**

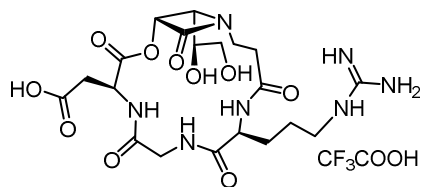


El ciclo **1** se preparó mediante la desprotección del ciclo **1.13** (30 mg, 0.035 mmol). Rendimiento total: 15 mg (80%). Sólido blanco. IR (ν,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3277, 2921, 1735, 1648, 1542.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.94 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.4$  Hz); 4.92–4.79 (1H, m,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ); 4.53 (1H, d, N- $\text{CH}_2$ ,  $J = 15.3$  Hz); 4.42 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz); 4.16 (1H, dd,  $\text{H}^\beta_{\text{S}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 4.4$  Hz); 4.07 (1H, d,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ ,  $J = 14.7$  Hz); 3.86 (1H, ddd,  $\text{CH}_5\text{OH}$ ,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz,  $J_3 = 4.0$  Hz); 3.79 (1H, d,  $\text{H}^\alpha[\text{Gly}]$ ,  $J = 14.7$  Hz); 3.70–3.61 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , N- $\text{CH}_2$ ); 3.57 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 6.1$  Hz); 3.26 (2H, t,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ,



$J = 6.8$  Hz); 3.12 (1H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 17.3$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 2.95 (1H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 17.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz); 1.99–1.73 (2H, m,  $H^{\beta}$ [Arg]); 1.73–1.58 (2H, m,  $H^{\gamma}$ [Arg]).  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 8.86 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.1$  Hz); 8.06 (2H, m, NH[Arg], NH[Gly]); 7.23 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>,  $J = 6.1$  Hz) 6.79–6.53 (3H, b.s, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 174.4, 173.1, 170.6, 170.2, 169.8, 165.7, 156.8, 76.8, 69.7, 62.6, 60.2, 54.2, 49.4, 46.3, 43.0, 40.5, 34.3, 27.4, 24.4. HRMS (TOF [ $M + 1 H^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{10}$ : 515.1976 (515.1976 + 1.0078 = 516.2054); encontrada: 516.2051.

**Trifluoro acetato de ciclo{[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-Asp} (9):**

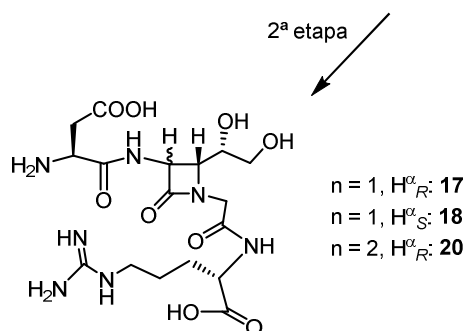
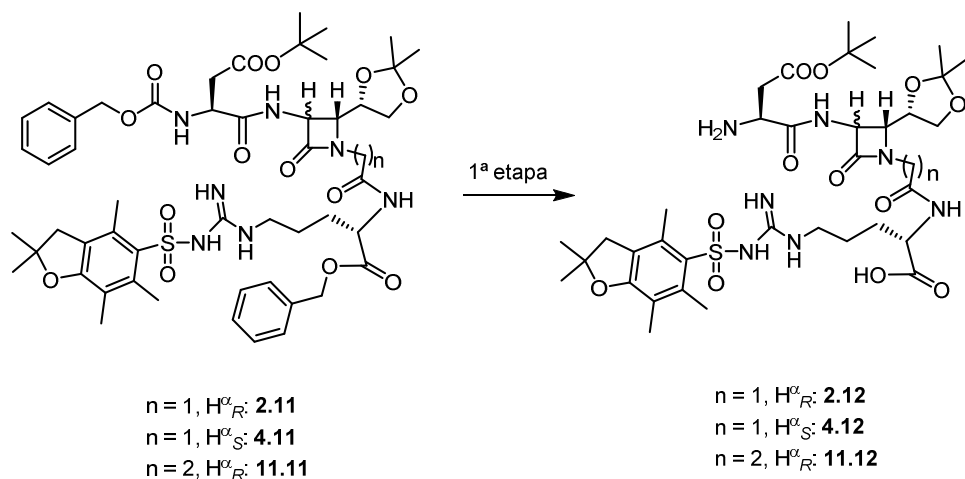


El ciclo **9** se preparó mediante la desprotección del ciclo **9.13** (30 mg, 0.034 mmol). Rendimiento total: 15 mg (80%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3500–2700 (b.s.), 1743, 1654, 1542.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.91 (1H, d,  $H^{\alpha}_R$ [ $\beta$ -lact],  $J = 4.7$  Hz);

4.96–4.86 (1H, m,  $H^{\alpha}_S$ [Asp]); 4.60 (1H, dd,  $H^{\alpha}_S$ [Arg],  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 6.1$  Hz); 4.13 (1H, d,  $H^{\alpha}$ [Gly],  $J = 14.9$  Hz); 4.02 (1H, dd,  $H^{\beta}_S$ [ $\beta$ -lact],  $J_1 = 8.9$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz); 3.81 (1H, d,  $H^{\alpha}$ [Gly],  $J = 14.9$  Hz); 3.76–3.60 (4H, m, 2H N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OH); 3.55 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 6.0$  Hz); 3.30 (2H, t,  $H^{\delta}$ [Arg],  $J = 6.7$  Hz); 3.19 (2H, ddd, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 15.7$  Hz,  $J_2 = 12.4$  Hz,  $J_3 = 5.1$  Hz); 3.09–2.98 (2H, m,  $H^{\beta}$ [Asp]); 2.66 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 15.7$  Hz,  $J_2 = 3.1$  Hz); 2.02–1.80 (2H, m,  $H^{\beta}$ [Arg]); 1.77–1.60 (2H, m,  $H^{\gamma}$ [Arg]).  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 8.70 (1H, d, NH[Asp],  $J = 8.1$  Hz); 8.58 (1H, t, NH[Gly],  $J = 8.3$  Hz); 8.37 (1H, d, NH[Arg],  $J = 8.6$  Hz); 7.10 (3H, m, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 175.3, 173.5, 173.4, 167.9, 166.5, 156.8, 74.8, 69.9, 63.3, 58.1, 52.4, 49.2, 40.5, 39.0, 33.7, 32.8, 27.7, 24.4. HRMS (TOF [ $M + 1 H^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_{10}$ : 529.2132 (529.2132 + 1.0078 = 530.2210); encontrada: 530.2210.

## 7.2.7.2. Desprotección de los péptidos de cadena abierta

### 7.2.7.2.1. Desprotección de los tetrapéptidos de cadena abierta 2.11, 4.11 y 11.11



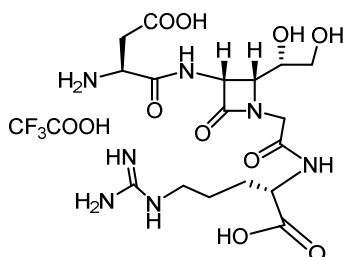
### Procedimiento general

**1ª Etapa:** Sobre una disolución del péptido lineal correspondiente (60 mg) en MeOH (2 mL) se añadió Pd/C al 20% (9 mg) y la mezcla se agitó en atmosfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por TLC para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida.

**2ª Etapa:** El crudo así obtenido con un rendimiento del 97%, se disolvió, en un tubo de ensayo, en una mezcla de anhídrido de TFA/agua (1.8 mL/0.2 mL) a 0 °C, y se añadió trietilsilano (0.3 mL). Se dejó en agitación durante 16 horas a 4 °C. La reacción se siguió por  $^1\text{H}$ -RMN. Una vez finalizada la reacción se añadió diisopropil éter (2 mL), el pentapéptido desprotegido precipitó y la suspensión resultante se centrifugó a 6000 rpm. El residuo se lavó con más diisopropil éter (4 x 2 mL). El producto se secó

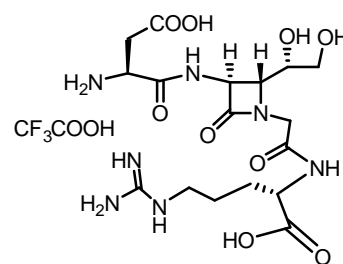
mediante bomba de vacío (presión  $10^{-3}$  mmHg) obteniendo el producto puro en forma de sal de trifluoroacético.

**Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona}]\text{-Arg-OH (17):}$**



El tetrapéptido **17** se preparó mediante la desprotección de del péptido **2.11** (60 mg, 0.057 mmol). Rendimiento total: 25 mg (75%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3339–2502 (b.s.), 1698, 1658, 1546, 1425.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.40 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 5.1$  Hz); 4.56–4.40 (2H, m,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ); 4.29 (1H, d,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J = 17.5$  Hz); 4.22–4.07 (1H, m,  $\text{N-CH}_2$ ,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ); 3.92–3.77 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.63 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 3.7$  Hz); 3.55 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 5.7$  Hz); 3.24 (1H, t,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ,  $J = 6.8$  Hz); 3.10 (2H, dd,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 6.1$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz); 2.07–1.91 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.91–1.76 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.76–1.62 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 9.01 (1H, d,  $\text{NH-}\beta\text{-lact}$ ,  $J = 9.0$  Hz); 8.59 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Arg}]$ ,  $J = 7.5$  Hz); 7.22 (1H, t,  $\text{NH-(C=NH)-NH}_2$ ,  $J = 4.3$  Hz); 6.67 (3H, b.s.,  $\text{NH-(C=NH)-NH}_2$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 175.3, 172.6, 170.1, 169.4, 169.1, 156.8, 69.6, 63.5, 60.7, 56.5, 52.5, 49.6, 45.2, 40.4, 34.8, 27.8, 24.4. HRMS (TOF [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_9$ : 475.2027 ( $475.2027 + 1.0078 = 476.2105$ ); encontrada: 476.2107.

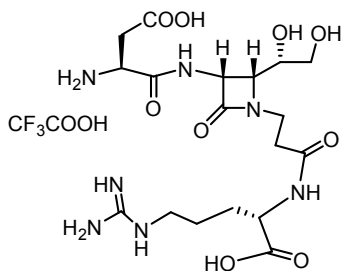
**Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3S,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona}]\text{-Arg-OH (18):}$**



El tetrapéptido **18** se preparó mediante la desprotección de del péptido **4.11** (60 mg, 0.057 mmol). Rendimiento total: 25 mg (75%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3399–2269 (b.s.), 1749, 1654, 1540, 1412.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 4.72 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 2.2$  Hz); 4.45 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 9.1$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 4.39 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 6.7$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz); 4.24 (1H, d,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J = 17.4$  Hz); 4.20 (1H, d,  $\text{N-CH}_2$ ,  $J = 17.4$  Hz); 3.99–3.92 (2H, m,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.64 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz); 3.60 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz); 3.21 (2H, t,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ,  $J = 6.9$  Hz); 3.10–3.06 (2H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ); 2.02–1.90 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.87–1.77 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.70–1.60 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 9.09 (1H, d,  $\text{NH-}\beta\text{-lact}$ ,  $J = 7.4$  Hz); 8.50 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Arg}]$ ,  $J = 8.3$  Hz); 7.18 (1H, t,  $\text{NH-(C=NH)-NH}_2$ ,  $J = 5.0$  Hz);

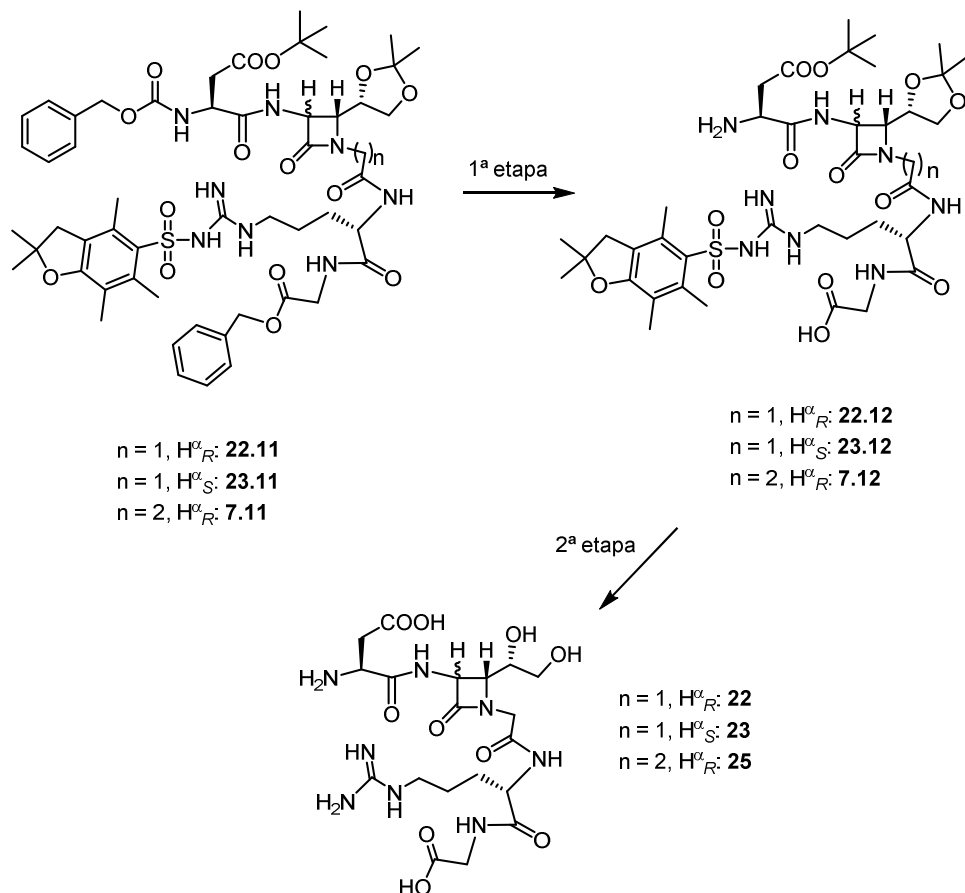
6.64 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 175.3, 172.6, 170.0, 169.1, 169.0, 156.9, 71.7, 63.1, 61.9, 58.3, 52.6, 49.6, 44.99, 40.6, 34.8, 27.7, 24.4. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>: 475.2027 (475.2027 + 1.0078 = 476.2105); encontrada: 476.2100.

**Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-OH (**20**):**



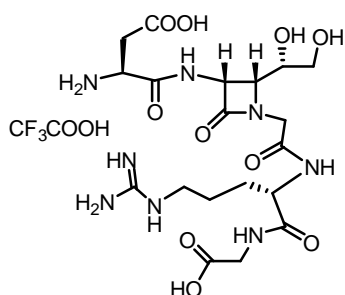
El tetrapéptido **20** se preparó mediante la desprotección de del péptido **11.11** (60 mg, 0.056 mmol). Rendimiento total: 26 mg (75%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, sólido): 3338–2500 (b.s.), 1728, 1654, 1542. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 5.21 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact], *J* = 5.1 Hz); 4.42–4.26 (2H, m, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 4.11–4.03 (1H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 3.86 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz); 3.80–3.71 (1H, m, CH<sub>3</sub>OH); 3.62–3.49 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH); 3.44 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 14.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.9 Hz); 3.30–3.06 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 3.04–2.86 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); 2.70–2.52 (1H, m, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.98–1.83 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.81–1.69 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.69–1.54 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.96 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 8.9 Hz); 8.49 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.6 Hz); 7.20 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>, *J* = 4.8 Hz); 6.72 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 175.5, 173.6, 172.7, 169.2, 168.6, 157.0, 70.4, 63.4, 58.3, 55.8, 52.6, 49.8, 40.6, 39.0, 35.0, 32.9, 27.8, 24.4. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>: 489.2183 (489.2183 + 1.0078 = 490.2261); encontrada: 490.2257.

### 7.2.7.2.2. Desprotección de los pentapéptidos de cadena abierta 22.11, 23.11, 7.11



La desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el apartado 7.2.7.2.1.

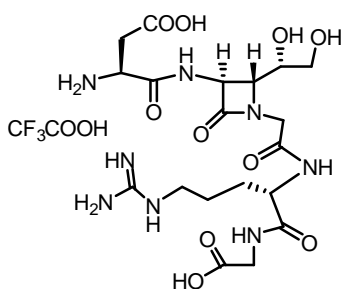
#### Trifluoro acetato de $NH_2$ -Asp-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-OH (**22**):



El tetrapéptido **22** se preparó mediante la desprotección de del péptido **22.11** (60 mg, 0.054 mmol). Rendimiento total: 22 mg (75%). Sólido blanco. IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ , sólido): 3500–2267 (b.s.), 1733, 1654, 1543, 1397.  $^1H$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $D_2O$ ): 5.40 (1H, d,  $H^{\alpha}_R$ [ $\beta$ -lact],  $J = 5.1$  Hz); 4.49–4.40 (2H, m,  $H^{\alpha}_S$ [Arg],  $H^{\alpha}_S$ [Asp]); 4.30 (1H, d, N- $CH_2$ ,  $J = 17.4$  Hz); 4.20–4.07 (2H, m,  $H^{\beta}_R$ [ $\beta$ -lact], N- $CH_2$ ); 4.01 (2H, s,  $H^{\alpha}$ [Gly]); 3.93–3.79 (1H, m,  $CH_2OH$ ); 3.66 (1H, dd,  $CH_2OH$ ,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 3.56 (1H, dd,  $CH_2OH$ ,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz); 3.25 (2H, t,  $H^{\delta}$ [Arg],  $J = 6.8$  Hz); 3.02 (2H, dd,  $H^{\beta}$ [Asp],  $J_1 = 6.1$  Hz,  $J_2 = 3.1$  Hz); 2.06–1.89 (1H, m,  $H^{\beta}$ [Arg]); 1.87–1.78 (1H, m,  $H^{\beta}$ [Arg]);

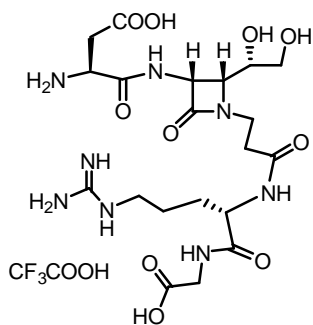
1.78–1.65 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.94 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 8.9 Hz); 8.59 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.2 Hz); 8.47 (1H, t, NH[Gly], *J* = 6.1 Hz); 7.13 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>, *J* = 5.5 Hz); 6.58 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 174.1, 173.1, 172.6, 170.3, 169.4, 169.1, 156.9, 69.6, 63.6, 61.0, 56.6, 53.5, 49.6, 45.4, 41.2, 40.6, 34.8, 28.2, 24.3. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 532.2241 (532.2241 + 1.0078 = 533.2319); encontrada: 533.2322.

**Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-OH (**23**):**



El tetrapéptido **23** se preparó mediante la desprotección de del péptido **23.11** (60 mg, 0.054 mmol). Rendimiento total: 22 mg (75%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, sólido): 3291–2930 (b.s.), 1746, 1655, 1539, 1406. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 4.73 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[β-lact], *J* = 2.2 Hz); 4.43 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg], *J*<sub>1</sub> = 8.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz); 4.39 (1H, t, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp], *J* = 6.2 Hz); 4.23 (2H, d, N-CH<sub>2</sub>, *J* = 2.5 Hz); 4.01 (2H, d, H<sup>α</sup>[Gly], *J* = 3.0 Hz); 3.99–3.90 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], CH<sub>3</sub>OH); 3.66 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH, *J*<sub>1</sub> = 12.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.0 Hz); 3.61 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH, *J*<sub>1</sub> = 12.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.9 Hz); 3.22 (2H, t, H<sup>δ</sup>[Arg], *J* = 6.8 Hz); 3.10–3.05 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); 1.99–1.88 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.86–1.75 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.73–1.59 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 9.11 (1H, d, NH[Asp], *J* = 7.4 Hz); 8.54 (1H, d, NH[Arg], *J* = 7.4 Hz); 8.50 (1H, t, NH[Gly], *J* = 5.9 Hz); 7.21 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>, *J* = 5.6 Hz); 6.51 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 174.1, 173.3, 172.9, 170.1, 169.3, 169.1, 157.0, 71.8, 63.2, 62.0, 58.4, 53.5, 49.8, 45.1, 41.4, 40.6, 35.1, 28.2, 27.4, 24.4. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 532.2241 (532.2241 + 1.0078 = 533.2319); encontrada: 533.2324.

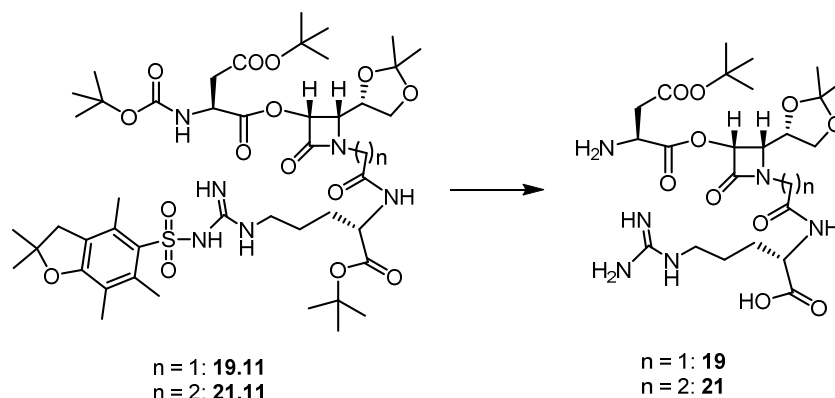
**Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-OH (**25**):**



El tetrapéptido **25** se preparó mediante la desprotección de del péptido **7.11** (60 mg, 0.056 mmol). Rendimiento total: 0.28 g (75%). Sólido blanco. IR (v, cm<sup>-1</sup>, sólido): 3382–2500 (b.s.), 1740, 1659, 1538, 1417. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 5.09–5.00 (1H, m, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact]); 4.6 (2H, no hay señal, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg], H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp]); 3.92–3.74 (3H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], 2H H<sup>α</sup>[Gly]); 3.00–3.58 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH); 3.44 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH, *J*<sub>1</sub> = 11.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 3.37 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH, *J*<sub>1</sub> = 11.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz); 3.30 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>, *J*<sub>1</sub> = 13.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.4 Hz); 3.09–3.00 (2H, m, H<sup>δ</sup>[Arg]); 2.87–2.73 (2H, m, H<sup>β</sup>[Asp]); 2.56–2.46 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.79–1.65 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.63–1.54 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.54–1.42 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.85 (1H, d, NH-β-lact, *J* = 8.8 Hz); 8.35 (2H, m, NH[Arg], NH[Gly]); 7.09 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>, *J* = 5.8 Hz). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 174.1, 173.7, 173.6, 169.4, 168.7, 157.0, 157.0, 70.4, 63.3, 58.6, 55.8, 53.4, 50.1, 41.6, 40.7, 39.1, 35.5, 33.0, 28.3. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 546.2398 (546.2398 + 1.0078 = 547.2476); encontrada: 547.2473.

**7.2.7.3. Desprotección de los depsipéptidos de cadena abierta**

**7.2.7.3.1. Desprotección de los tetradepsipéptidos de cadena abierta 19.11 y 21.11**

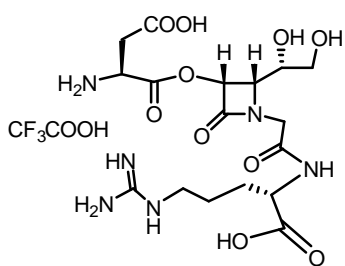


**Procedimiento general**

El correspondiente depsipéptido (35 mg) se disolvió en una mezcla de anhídrido de TFA/agua (1.8 mL/0.2 mL) a 0 °C, y se añadió trietilsilano (0.3 mL). La mezcla se

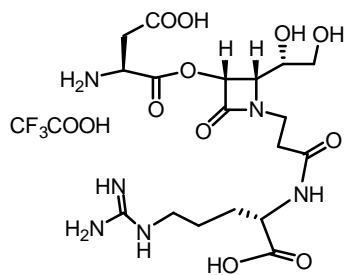
mantuvo en agitación durante 16 horas a 4 °C. La reacción se siguió por  $^1\text{H}$ -RMN. Una vez finalizada se añadió diisopropil éter (2 mL), el pentapéptido desprotegido precipitó y la suspensión resultante se centrifugó. El residuo se lavó con más diisopropil éter (4 x 2 mL). El producto se secó a mediante bomba de vacío (presión  $10^{-3}$  mmHg) obteniendo el producto puro en forma de sal de trifluoroacético.

**Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2$ -Asp-[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-OH (19):**



El tetrapéptido **19** se preparó mediante la desprotección de del depsipéptido **19.11** (35 mg, 0.036 mmol). Rendimiento total: 14 mg (80%). Sólido blanco. IR (v,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3370–2939 (b.s.), 1771, 1659, 1416.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 6.13 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 5.0$  Hz); 4.60 (1H, t,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $J = 4.6$  Hz); 4.42 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 4.35–4.22 (2H, m,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ , N- $\text{CH}_2$ ); 4.18 (1H, d, N- $\text{CH}_2$ ,  $J = 17.3$  Hz); 4.02–3.91 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.69 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz); 3.58 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz); 3.29–3.17 (3H, m,  $\text{H}^\delta[\text{Arg}]$ ,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ); 3.09 (1H, dd,  $\text{H}^\beta[\text{Asp}]$ ,  $J_1 = 18.3$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 2.04–1.89 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.89–1.74 (1H, m,  $\text{H}^\beta[\text{Arg}]$ ); 1.74–1.61 (2H, m,  $\text{H}^\gamma[\text{Arg}]$ ).  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9)): 8.73 (1H, d,  $\text{NH}[\text{Arg}]$ ,  $J = 7.2$  Hz); 7.27–7.21 (1H, m,  $\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{-NH}_2$ ); 6.70 (3H, b.s.,  $\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{-NH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 175.2, 172.6, 169.6, 167.6, 167.0, 156.5, 74.9, 68.9, 63.4, 60.1, 52.4, 48.9, 44.8, 40.2, 33.4, 27.4, 24.1. HRMS (TOF [ $\text{M} + 1 \text{H}^+$ ]) masa exacta calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{10}$ : 476.1867 (476.1867 + 1.0078 = 477.1945); encontrada: 477.1942.

**Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2$ -Asp-[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-OH (21):**

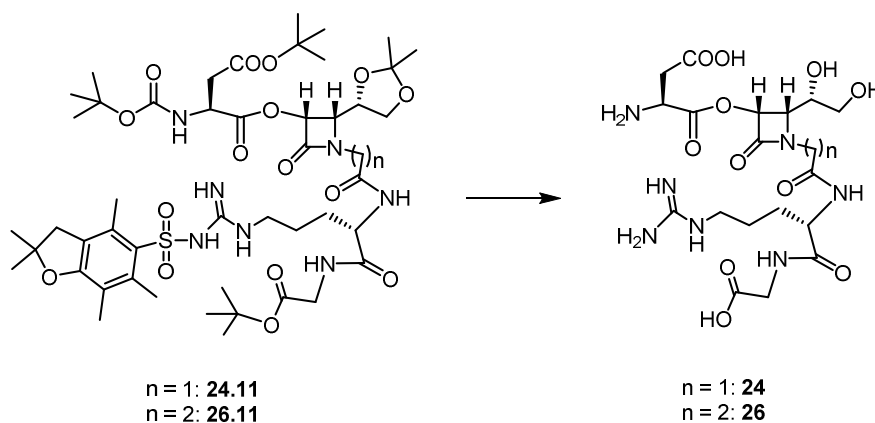


El tetrapéptido **21** se preparó mediante la desprotección de del depsipéptido **21.11** (35 mg, 0.035 mmol). Rendimiento total: 14 mg (80%). Sólido blanco. IR (v,  $\text{cm}^{-1}$ , sólido): 3359–2500 (b.s.), 1742, 1654, 1559, 1388.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.96 (1H, d,  $\text{H}^\alpha_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ,  $J = 4.5$  Hz); 4.55 (1H, t,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Asp}]$ ,  $J = 4.9$  Hz); 4.36 (1H, dd,  $\text{H}^\alpha_{\text{S}}[\text{Arg}]$ ,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz); 4.21–4.18 (1H, m,  $\text{H}^\beta_{\text{R}}[\beta\text{-lact}]$ ); 3.98–3.92 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.91–3.82 (1H, m, N- $\text{CH}_2$ ); 3.66 (1H, dd,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz); 3.59



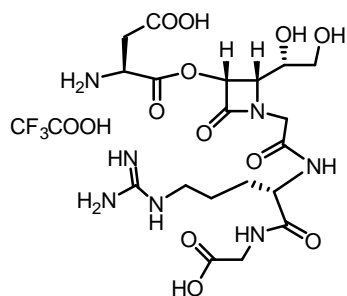
(1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz); 3.53 (1H, td, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 13.9$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 3.24 (2H, t, H<sup>δ</sup>[Arg],  $J = 6.8$  Hz); 3.17 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 18.1$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 3.05 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 18.1$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz); 2.68 (2H, t, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,  $J = 6.6$  Hz); 2.00–1.87 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.85–1.73 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.73–1.61 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.53 (1H, d, NH[Arg],  $J = 7.6$  Hz); 7.20 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>,  $J = 5.0$  Hz); 6.67 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 175.7, 173.7, 173.1, 168.0, 166.4, 156.4, 74.3, 69.0, 63.0, 57.7, 52.5, 49.2, 40.1, 38.7, 34.1, 32.5, 27.5, 24.1. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 490.2023 (490.2023 + 1.0078 = 491.2101); encontrada: 491.2103.

### 7.2.7.3.2. Desprotección de los pentadepsipéptidos de cadena abierta 24.11 y 26.11



La desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general empleado en el apartado 7.2.7.3.1.

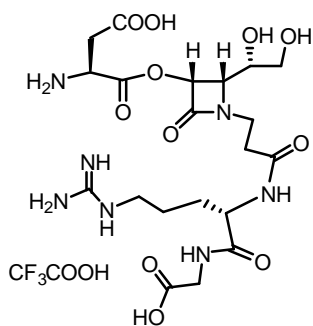
#### Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-OH (24):



El tetrapéptido **24** se preparó mediante la desprotección de del depsipéptido **24.11** (35 mg, 0.034 mmol). Rendimiento total: 14 mg (80%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, sólido): 3350–2936 (b.s.), 1771, 1659, 1416. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 6.13 (1H, d, H<sup>α</sup><sub>R</sub>[β-lact],  $J = 5.0$  Hz); 4.59 (1H, t, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Asp],  $J = 4.6$  Hz); 4.43 (1H, dd, H<sup>α</sup><sub>S</sub>[Arg],  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz); 4.34–4.23 (2H, m, H<sup>β</sup><sub>R</sub>[β-lact], N-CH<sub>2</sub>); 4.19 (1H, d, N-CH<sub>2</sub>,  $J = 17.4$  Hz); 4.05–3.93 (3H, m, H<sup>α</sup>[Gly], CH<sub>5</sub>OH); 3.70 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 3.59 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.1$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz).

Hz); 3.30–3.14 (3H, m, H<sup>δ</sup>[Arg], H<sup>β</sup>[Asp]); 3.07 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 18.3$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz); 2.05–1.87 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.87–1.76 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.76–1.64 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.78 (1H, d, NH[Arg],  $J = 7.4$  Hz); 8.52 (1H, t, NH[Gly],  $J = 6.4$  Hz); 7.31–7.14 (1H, m, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>); 6.68 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>); 6.68 (3H, b.s., NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 174.0, 173.7, 170.0, 169.9, 168.2, 167.4, 156.7, 74.8, 68.9, 63.6, 60.6, 53.4, 49.5, 45.2, 41.4, 40.2, 34.5, 28.0, 24.2. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>: 532.2082 (533.2082 + 1.0078 = 534.2160); encontrada: 534.2163.

**Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg-Gly-OH (26):**



El tetrapéptido **26** se preparó mediante la desprotección de del depsipéptido **26.11** (35 mg, 0.033 mmol). Rendimiento total: 15 mg (80%). Sólido blanco. IR (ν, cm<sup>-1</sup>, sólido): 3500–2369 (b.s.), 1733, 1652, 1541. <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 5.77 (1H, d, H<sup>α<sub>R</sub></sup>[β-lact],  $J = 4.9$  Hz); 4.42 (1H, t, H<sup>α<sub>S</sub></sup>[Asp],  $J = 4.5$  Hz); 4.17 (1H, dd, H<sup>α<sub>S</sub></sup>[Arg],  $J_1 = 8.3$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz); 4.01–3.98 (1H, m, H<sup>β<sub>R</sub></sup>[β-lact]); 3.87 (1H, d, H<sup>α</sup>[Gly],  $J = 17.9$  Hz); 3.79 (1H, d, H<sup>α</sup>[Gly],  $J = 17.9$  Hz); 3.75 (1H, td, CH<sub>3</sub>OH,  $J_1 = 6.2$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz); 3.66 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.3$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz); 3.45 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz); 3.39 (1H, dd, CH<sub>2</sub>OH,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz); 3.34 (1H, dt, N-CH<sub>2</sub>,  $J_1 = 14.3$ ,  $J_2 = 6.6$  Hz); 3.13–3.01 (3H, m, H<sup>δ</sup>[Arg], H<sup>β</sup>[Asp]); 2.96 (1H, dd, H<sup>β</sup>[Asp],  $J_1 = 18.6$  Hz,  $J_2 = 4.5$  Hz); 2.49 (2H, t, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>,  $J = 6.6$  Hz); 1.78–1.65 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.65–1.55 (1H, m, H<sup>β</sup>[Arg]); 1.55–1.45 (2H, m, H<sup>γ</sup>[Arg]). <sup>1</sup>H-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)): 8.54–8.38 (2H, m, NH[Gly], NH[Arg]); 7.22 (1H, t, NH-(C=NH)-NH<sub>2</sub>,  $J = 5.1$  Hz). <sup>13</sup>C-RMN (δ, ppm, D<sub>2</sub>O): 174.0, 173.3, 172.9, 172.7, 167.6, 166.4, 156.5, 74.5, 69.6, 63.0, 58.0, 53.1, 48.9, 40.8, 40.3, 38.8, 33.4, 32.6, 28.0, 24.1. HRMS (TOF [M + 1 H<sup>+</sup>]) masa exacta calculada para C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>: 547.2238 (547.2238 + 1.0078 = 548.2316); encontrada: 548.2319.

## ***ANEXO***

---

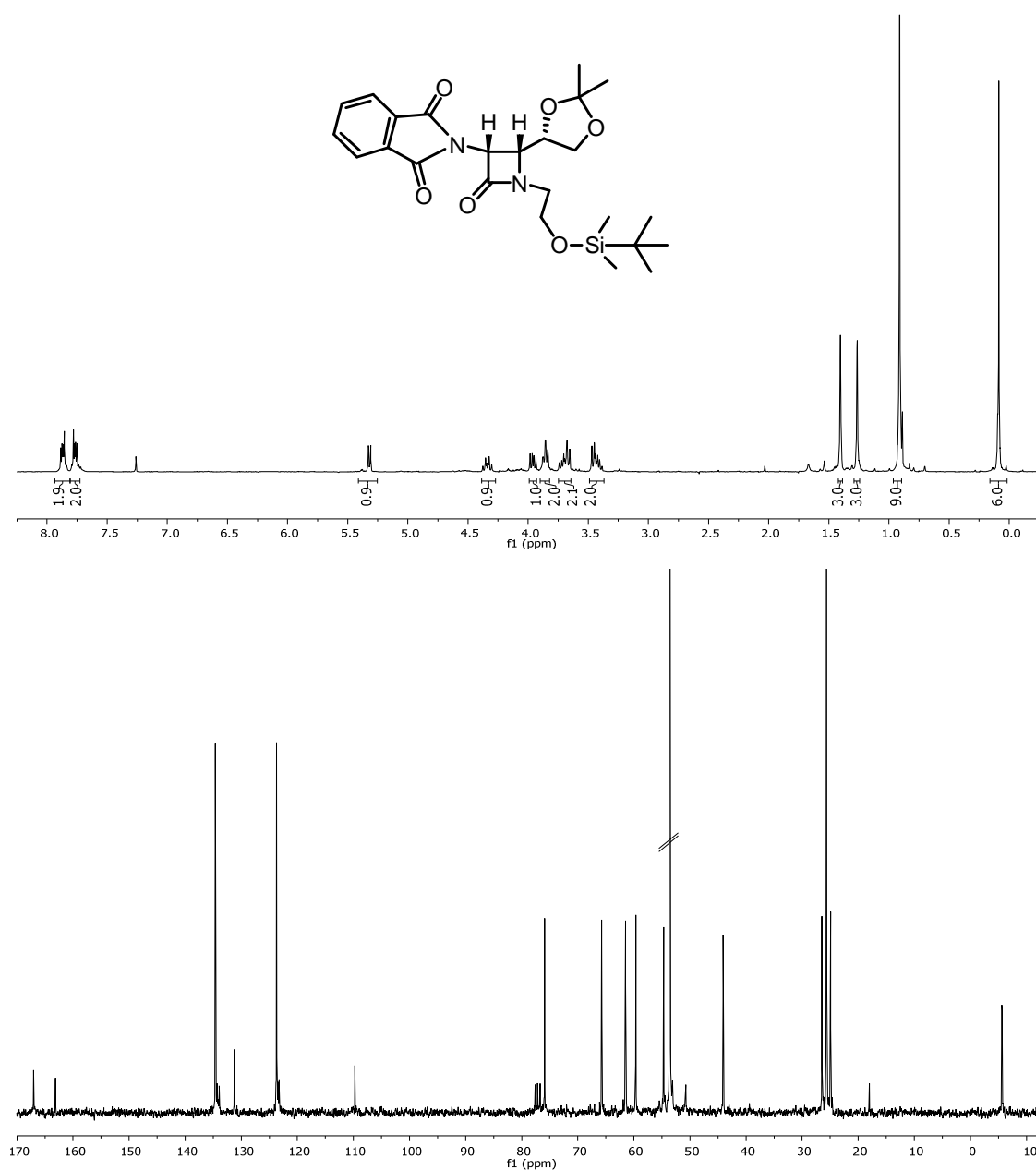


## 8. Anexo

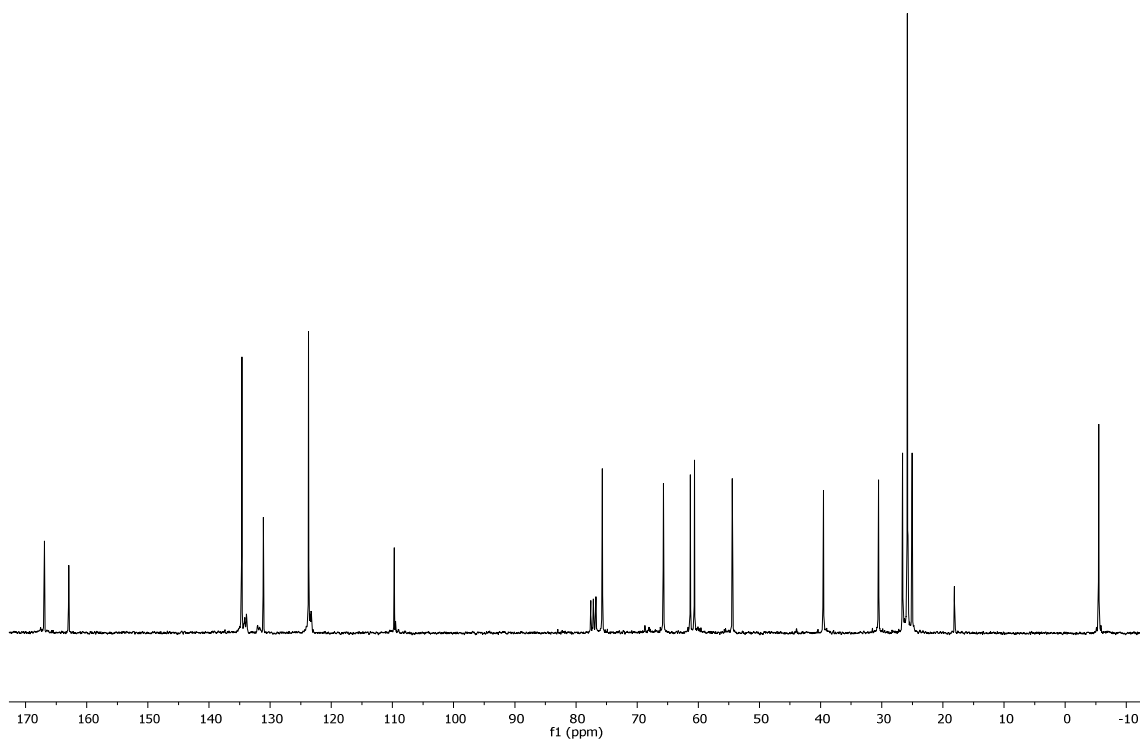
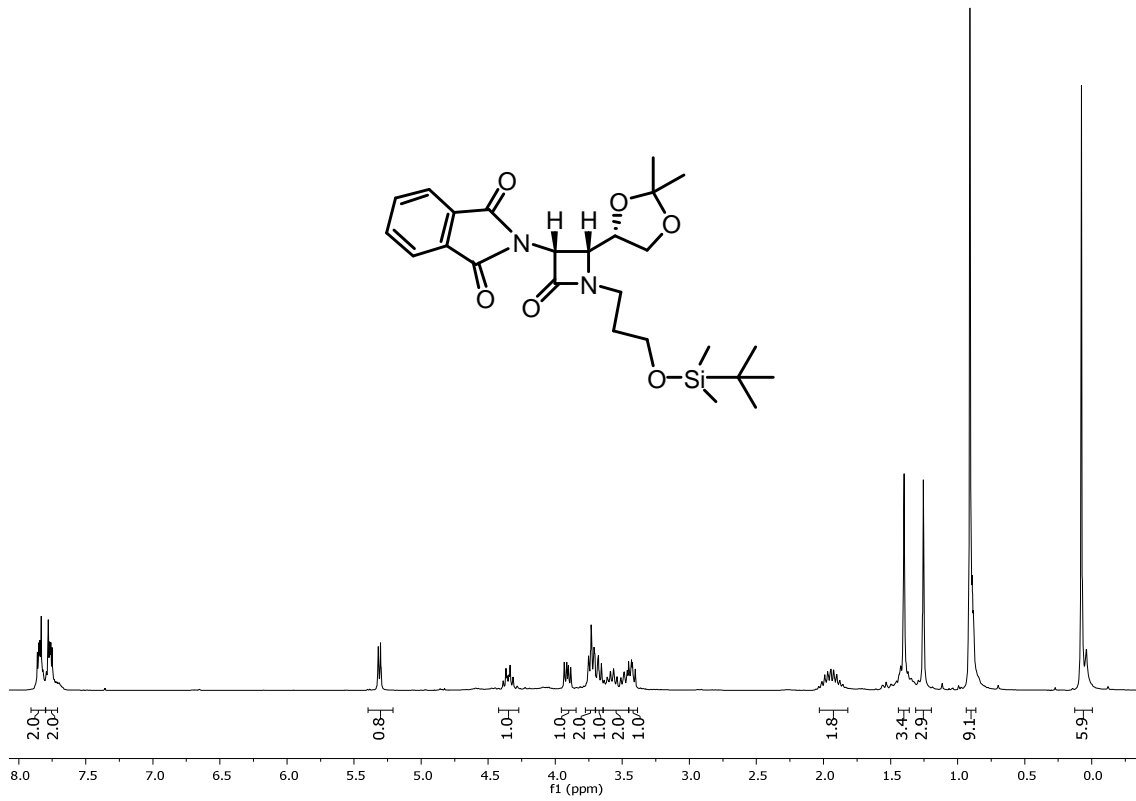
### 8.1. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN, $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY y HSQC de los compuestos sintetizados

Todos los espectros que se muestran a continuación están realizados en  $\text{CDCl}_3$  mientras no se diga lo contrario. Para el caso de los precursores lineales y los ciclos también se muestran los experimentos COSY y HSQC.

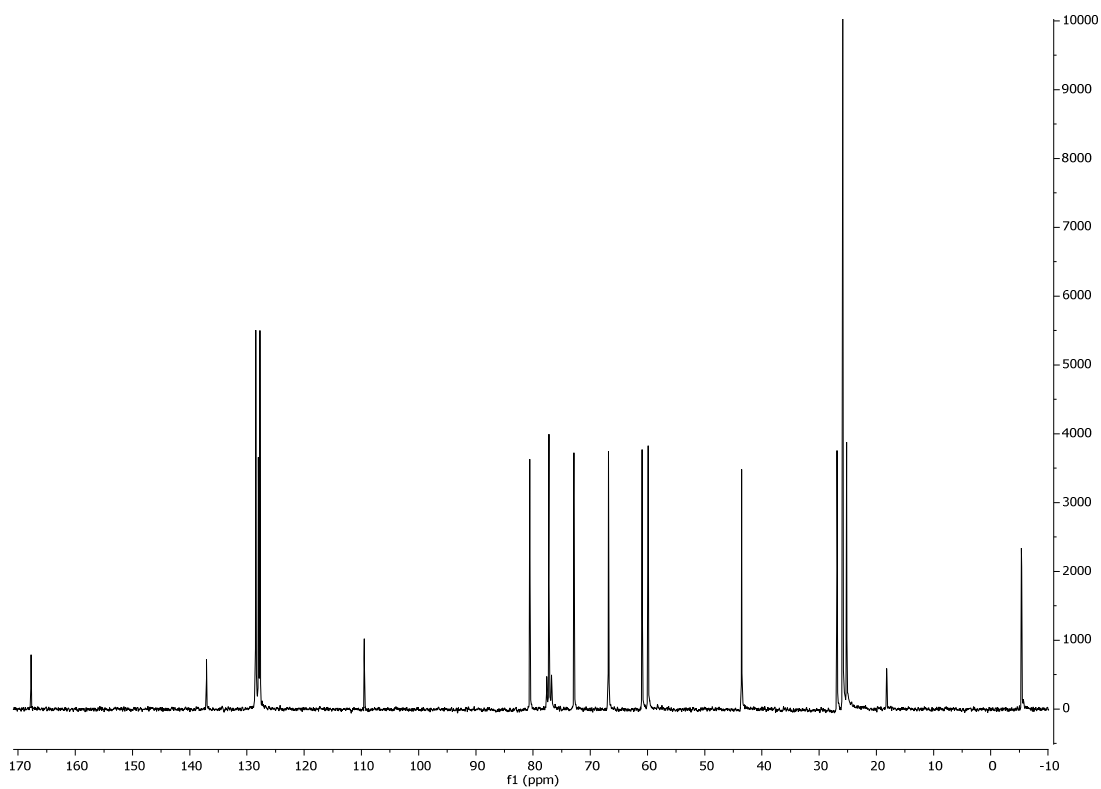
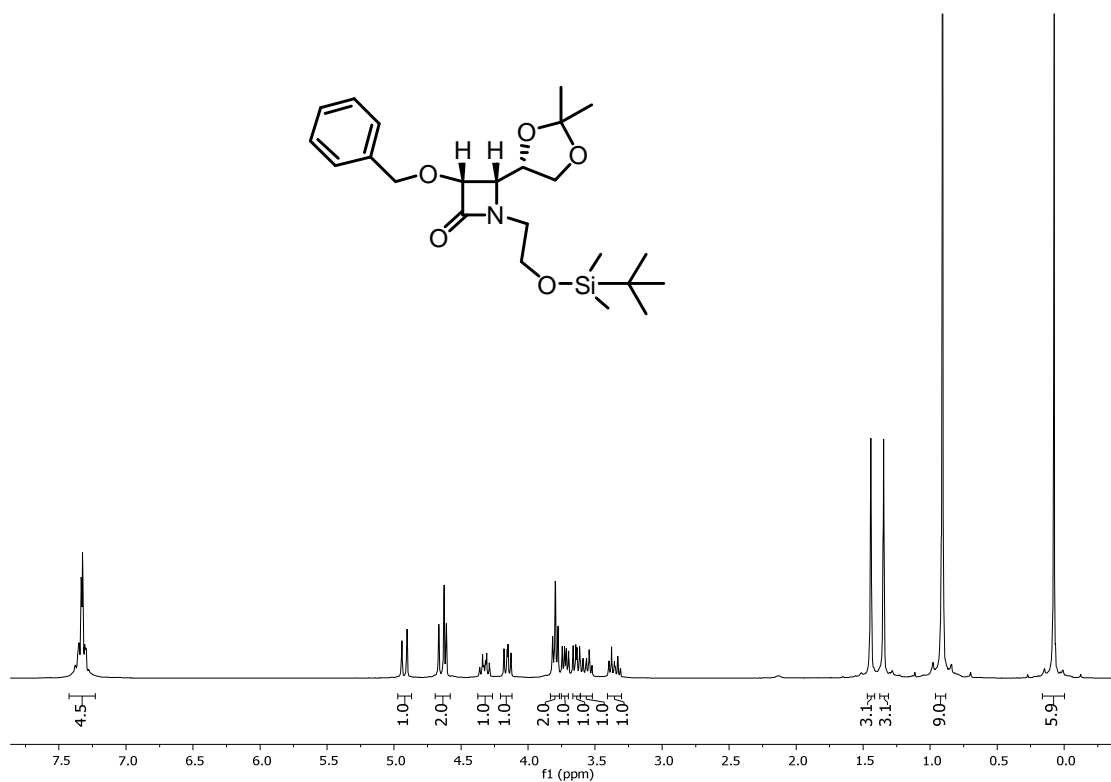
#### (3*R*,4*R*)-3-Ftalimidoil-1-[2-(*terc*-butildimetilsililo)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (2.4):



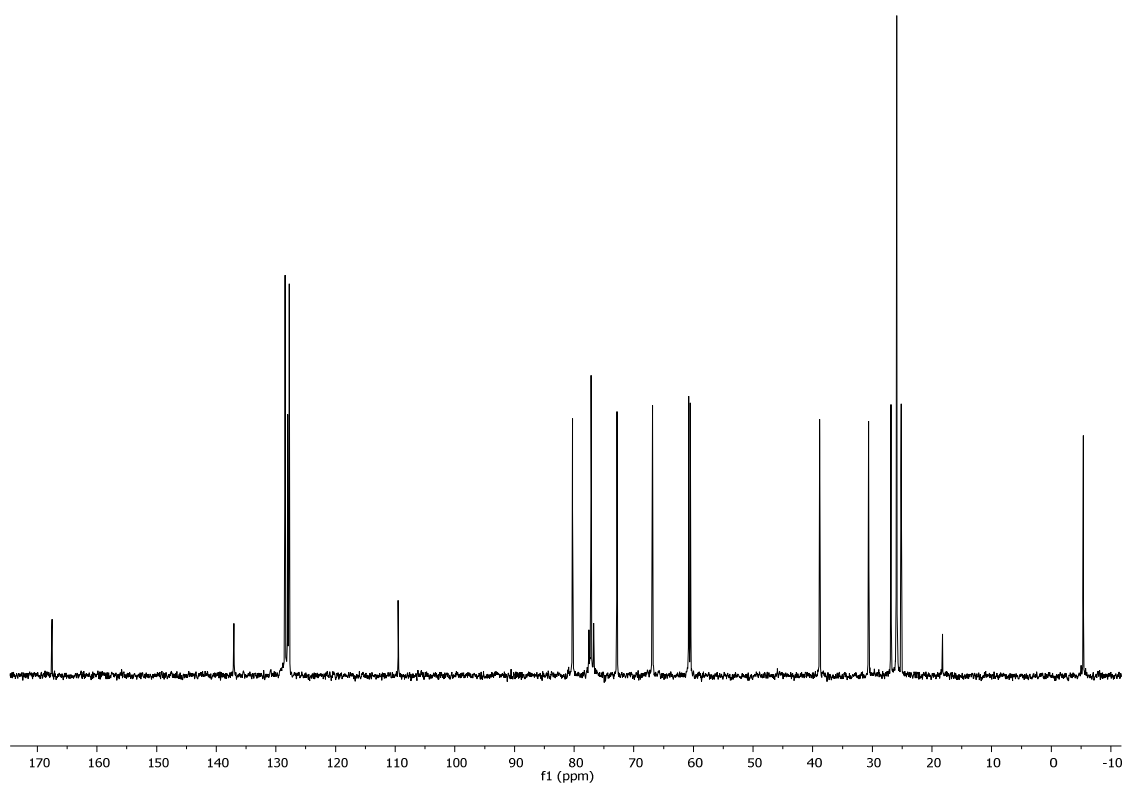
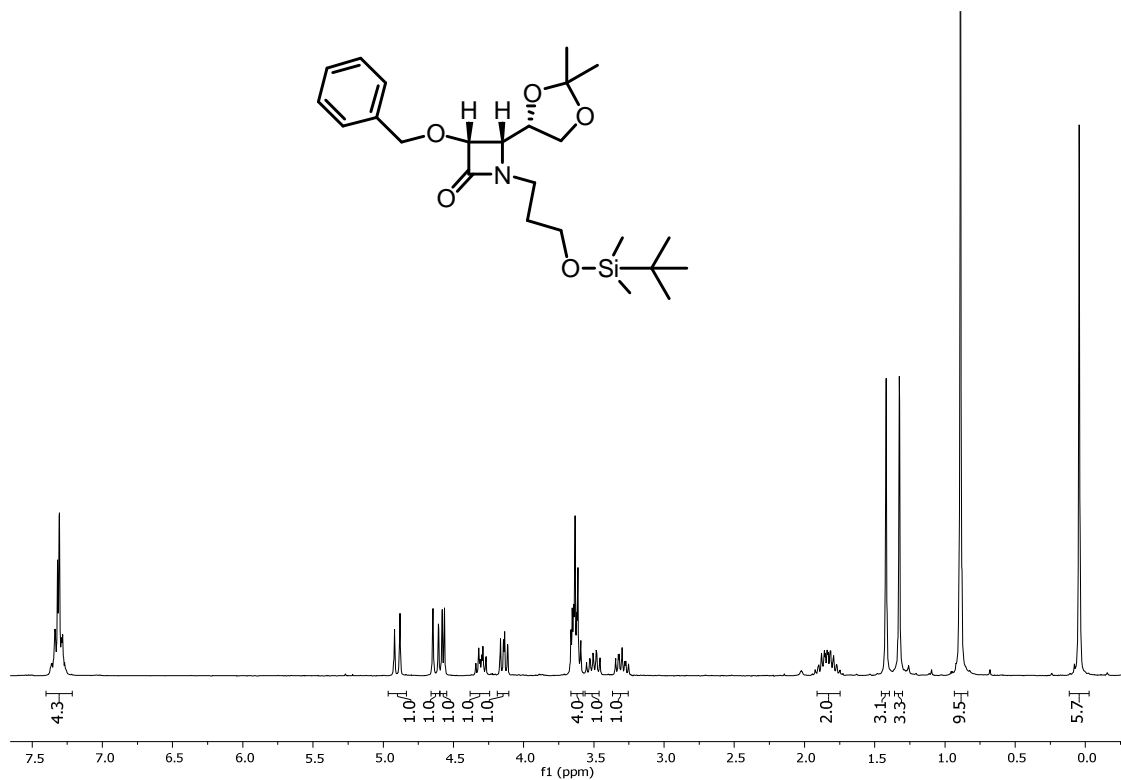
**(3R,4R)-3-Ftalimidoil-1-[3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (7.4):**



**(3R,4S)-3-Benciloxi-1-[2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (1.4):**

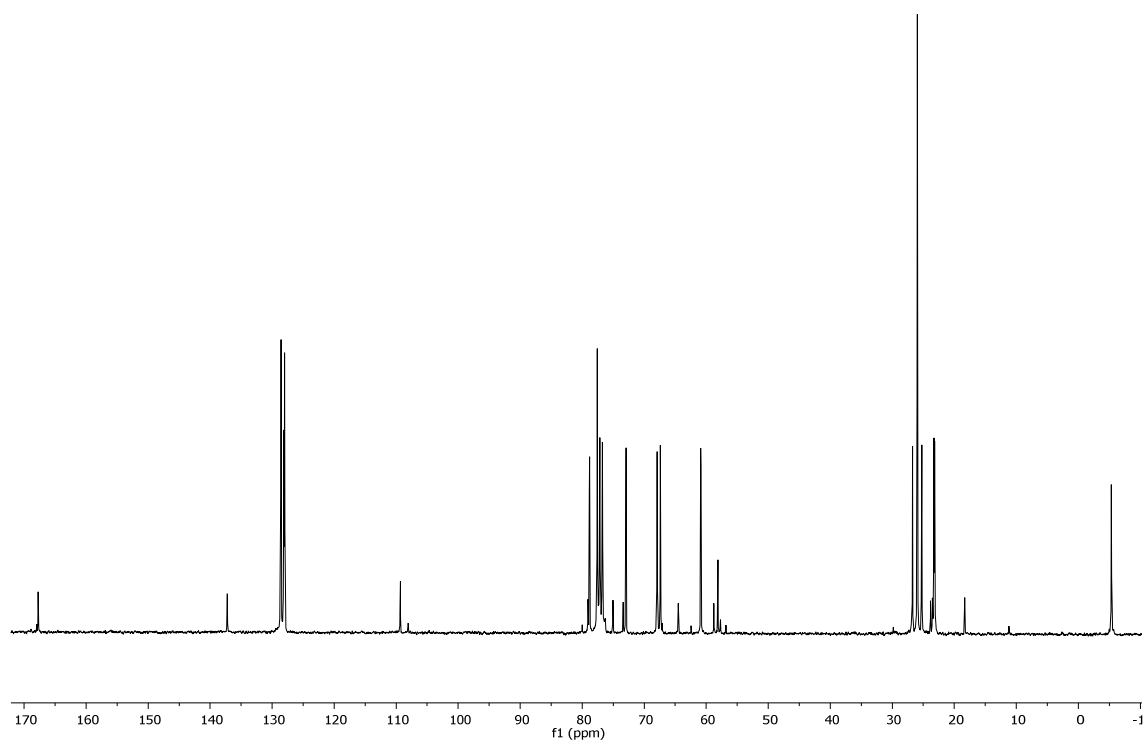
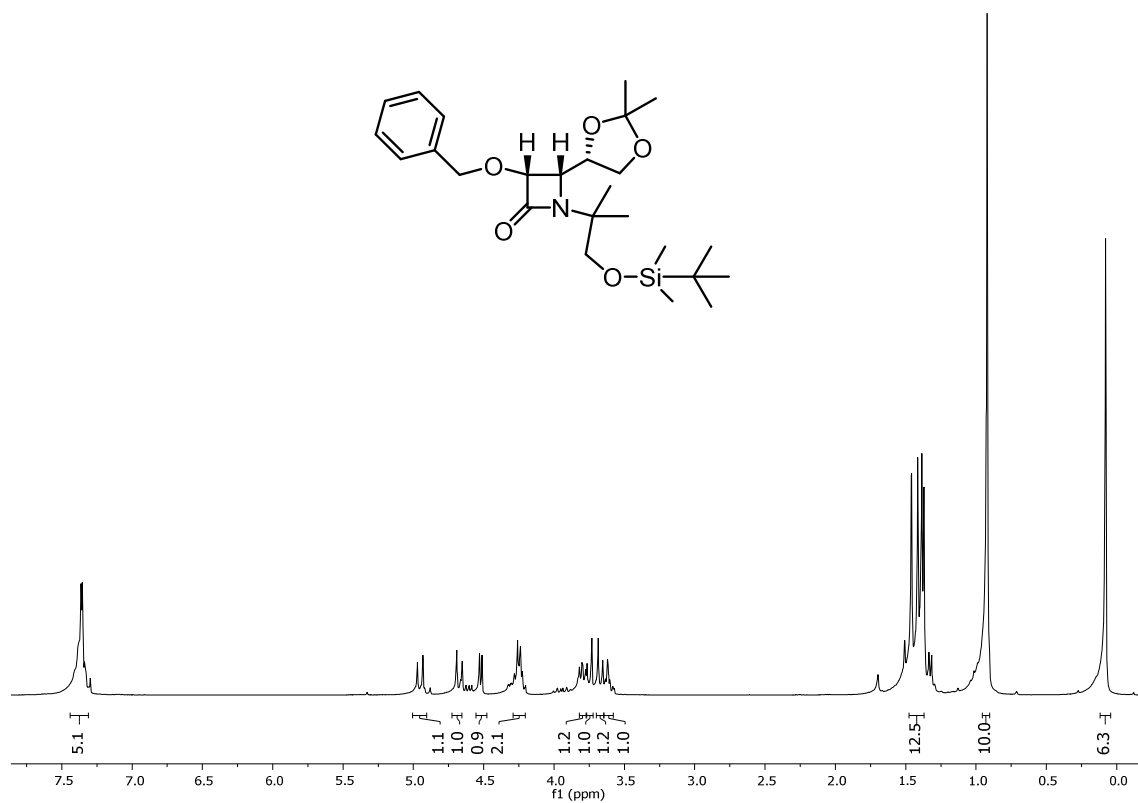


**(3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-1-[3-(*tert*-butildimetilsiloxi)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (9.4):**

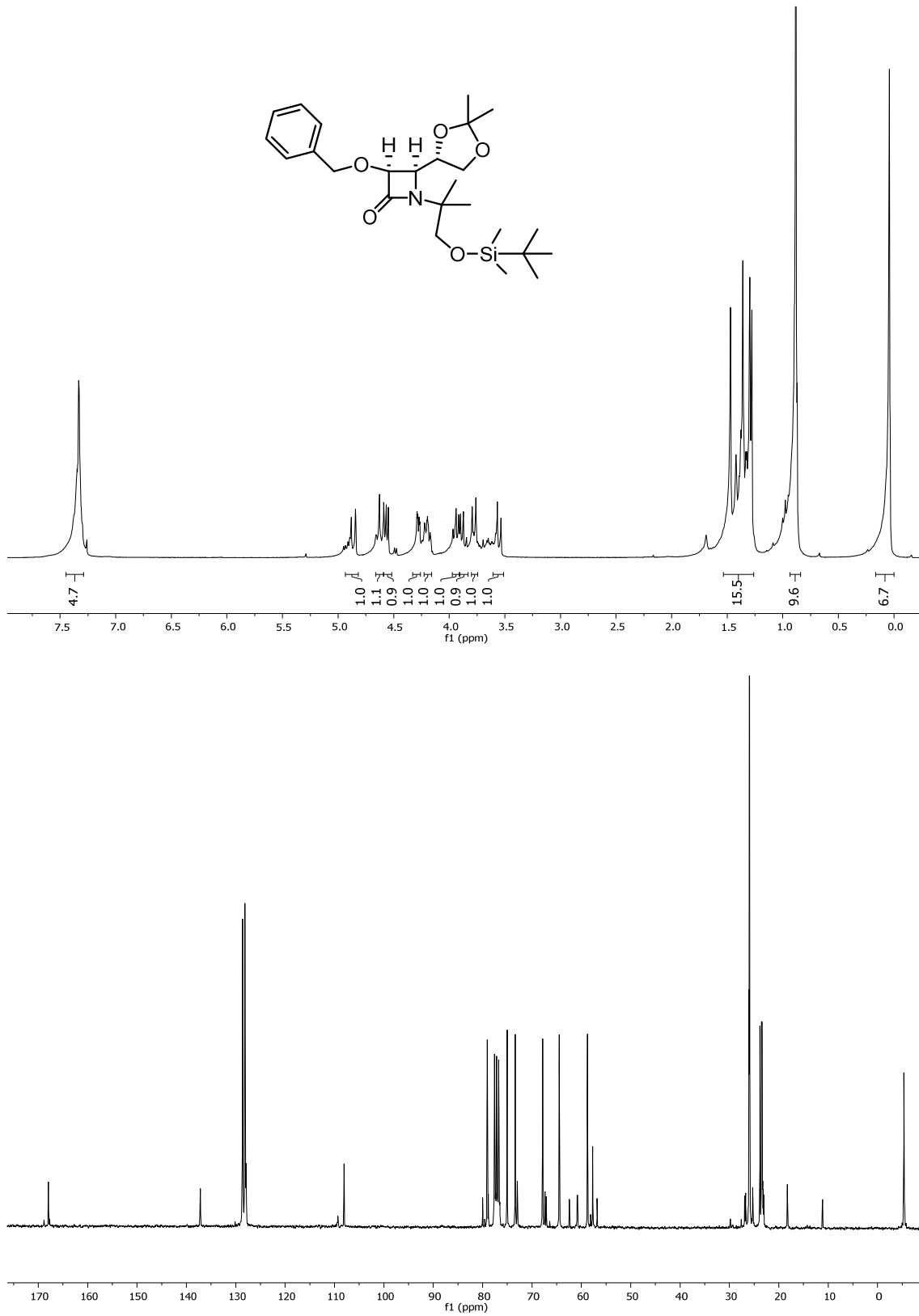




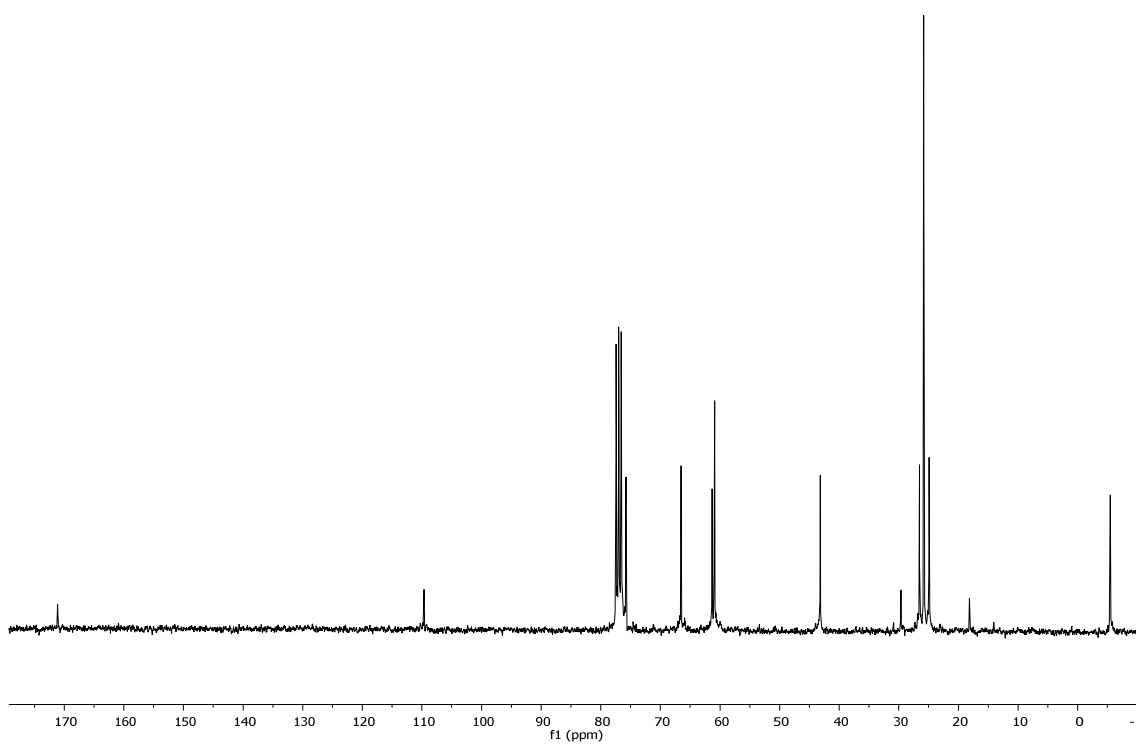
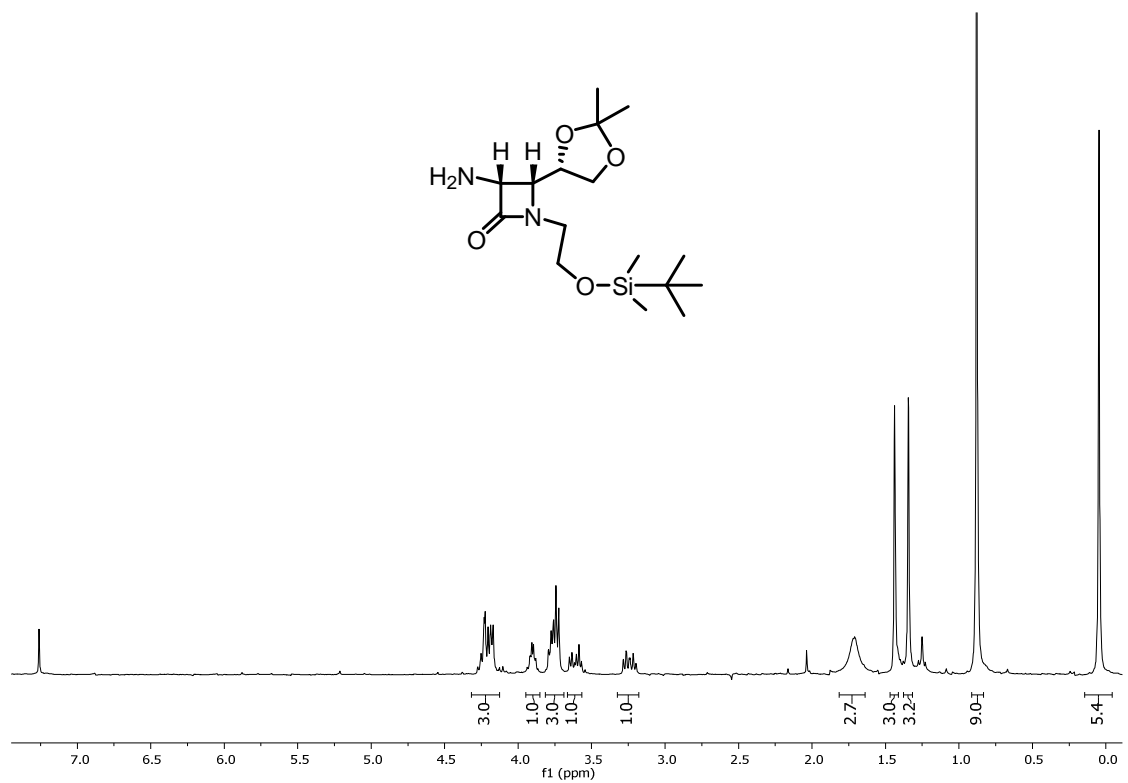
**(3*R*,4*S*) 3-Benciloxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (15.4a):**



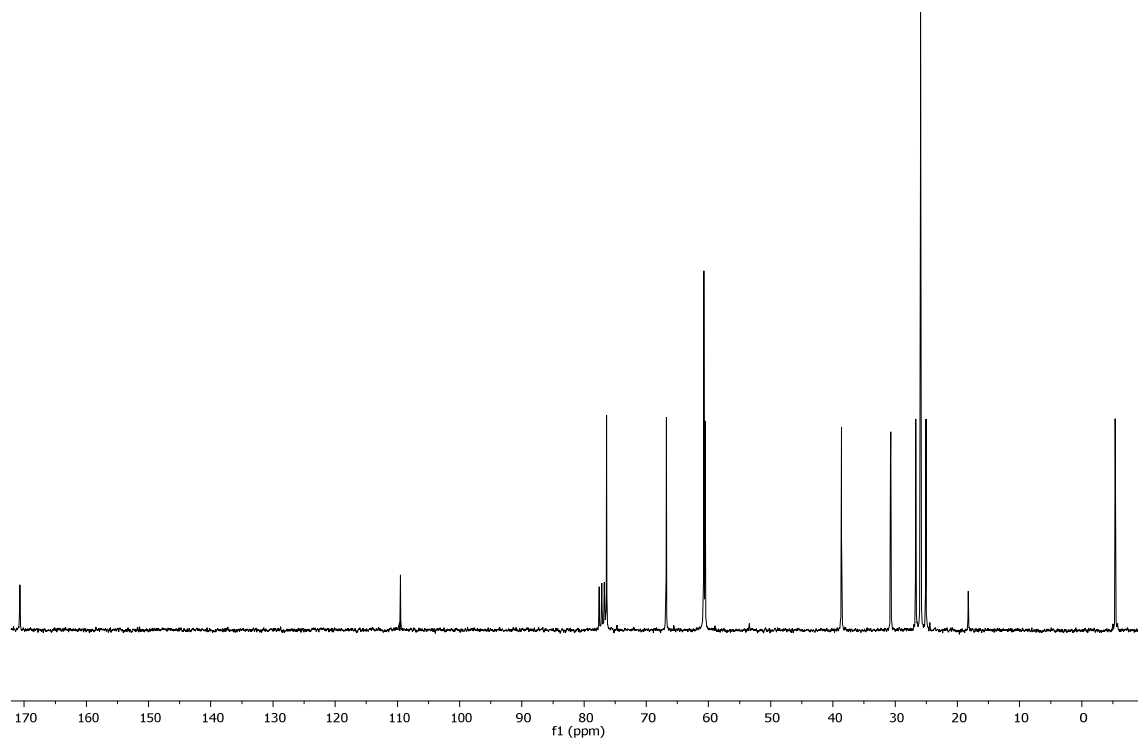
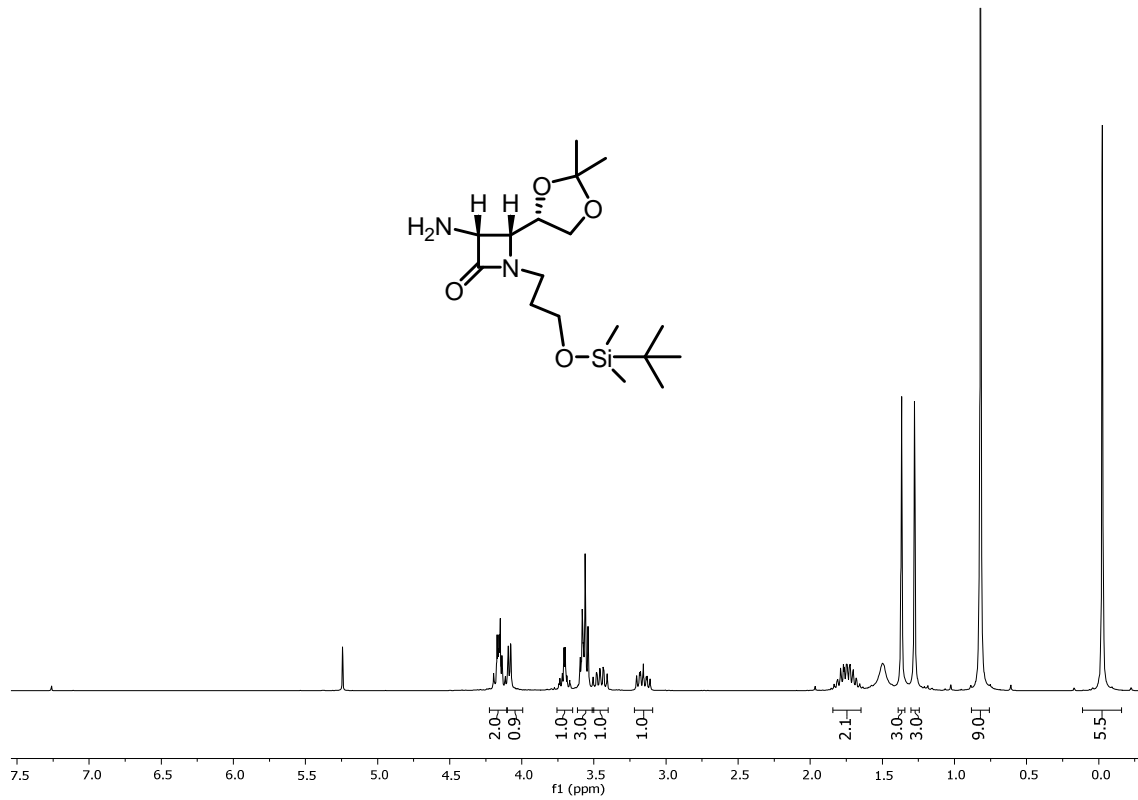
**(3*S*,4*R*) 3-Benciloxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.4b):**



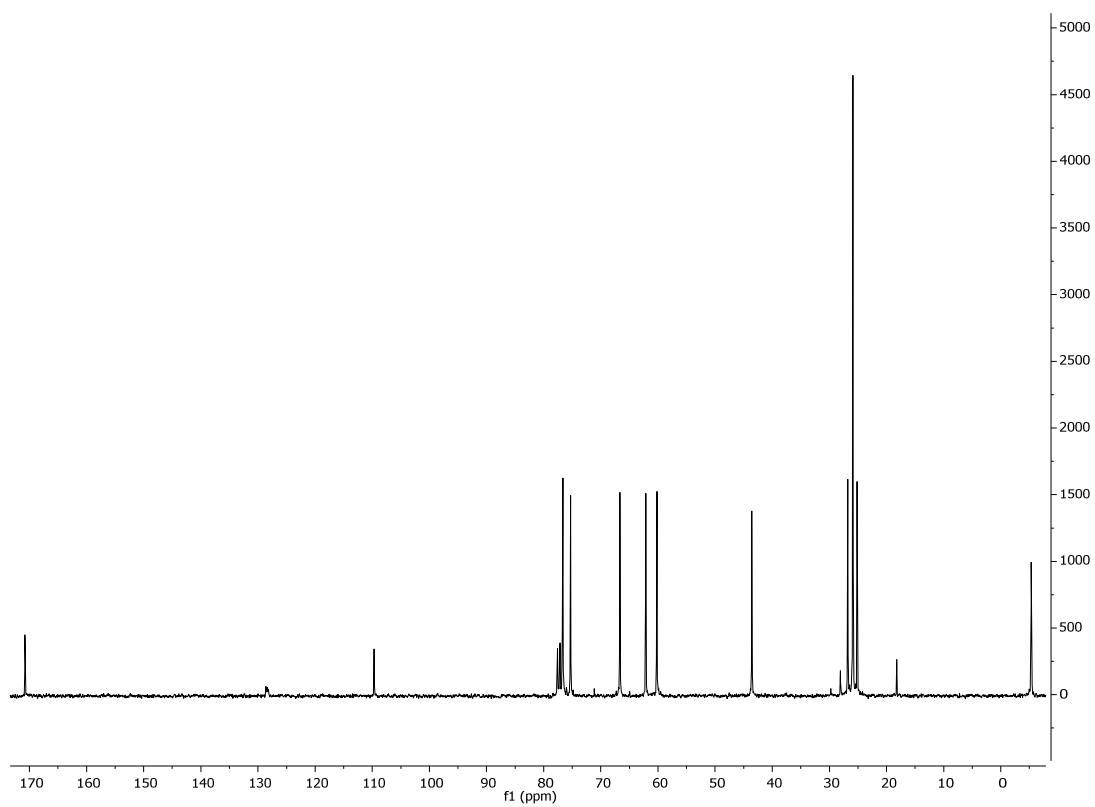
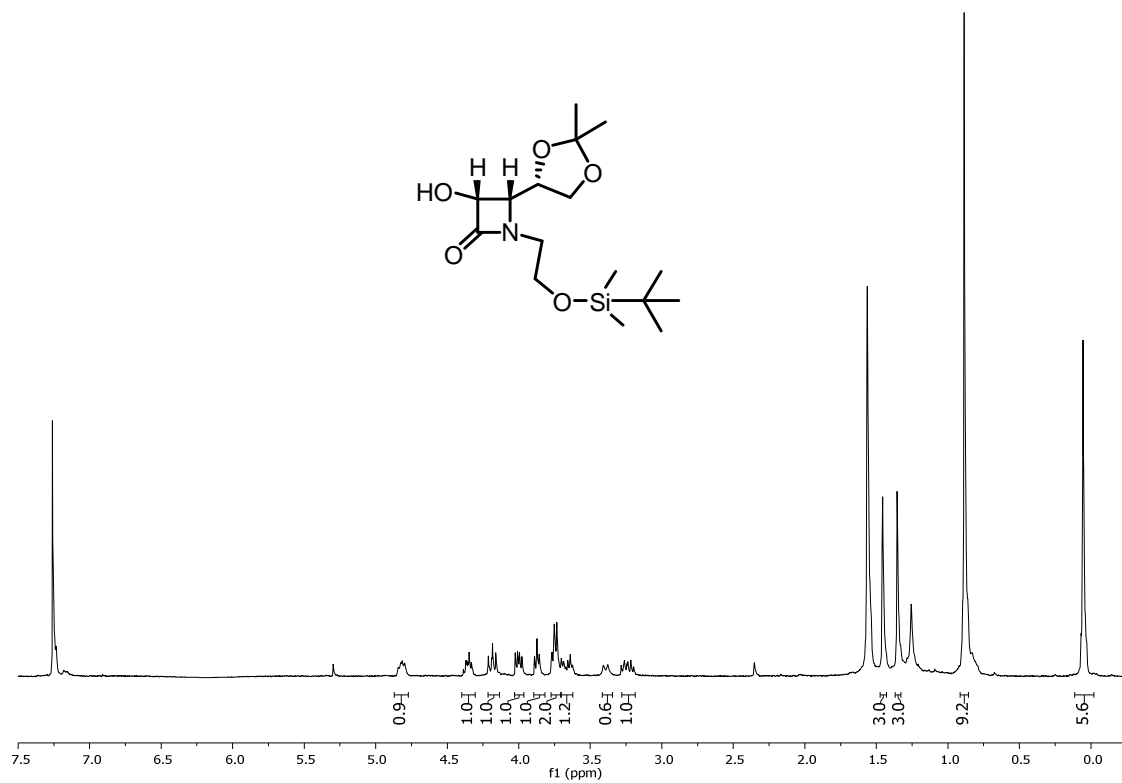
**(3*R*,4*R*)-3-Amino-1-[(2-*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (2.5):**



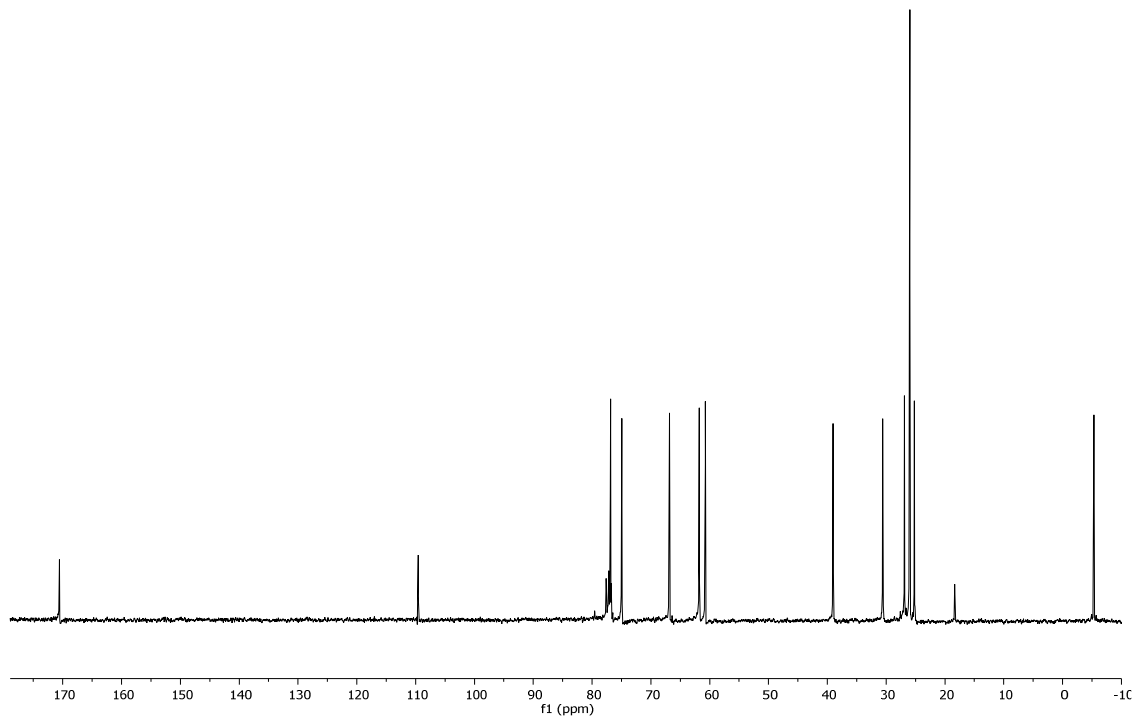
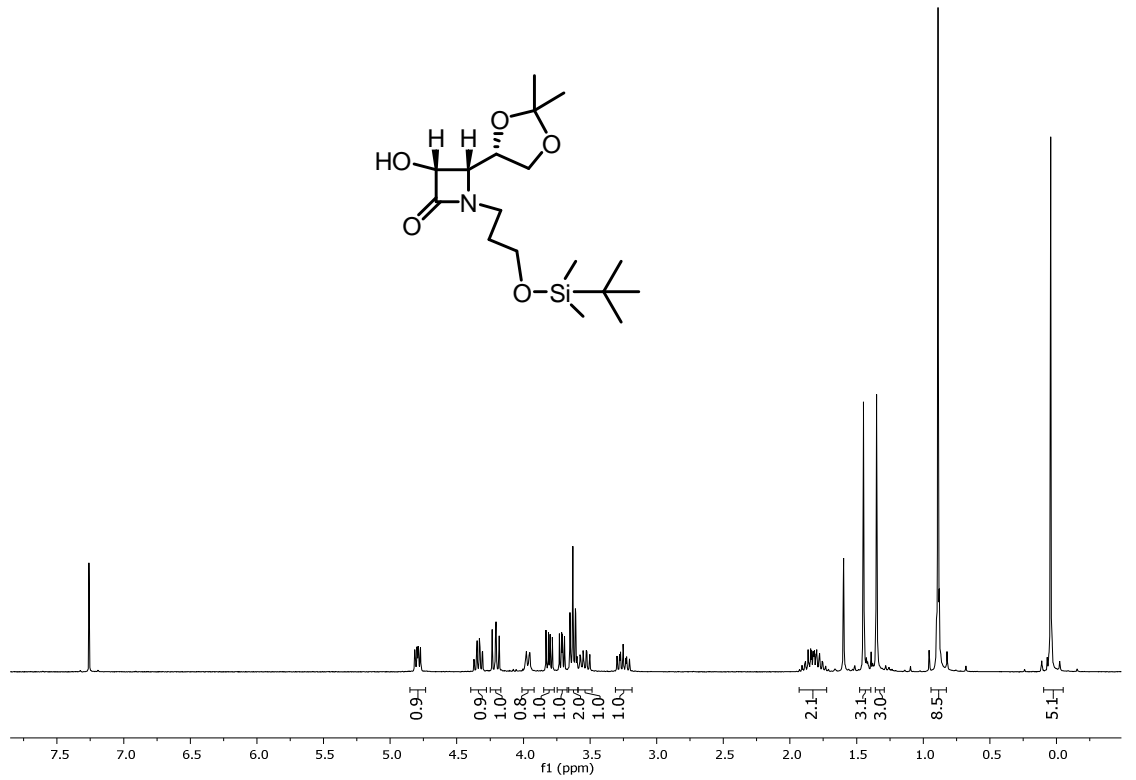
**(3*R*,4*S*)-3-Amino-1-[(3-*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (7.5):**



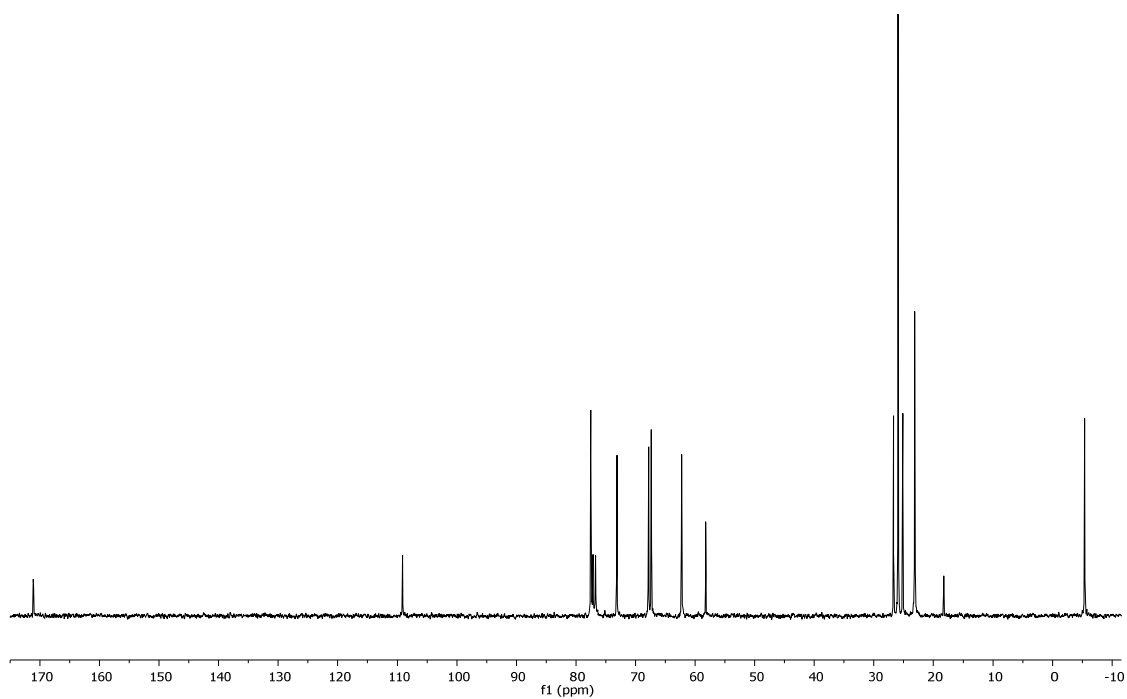
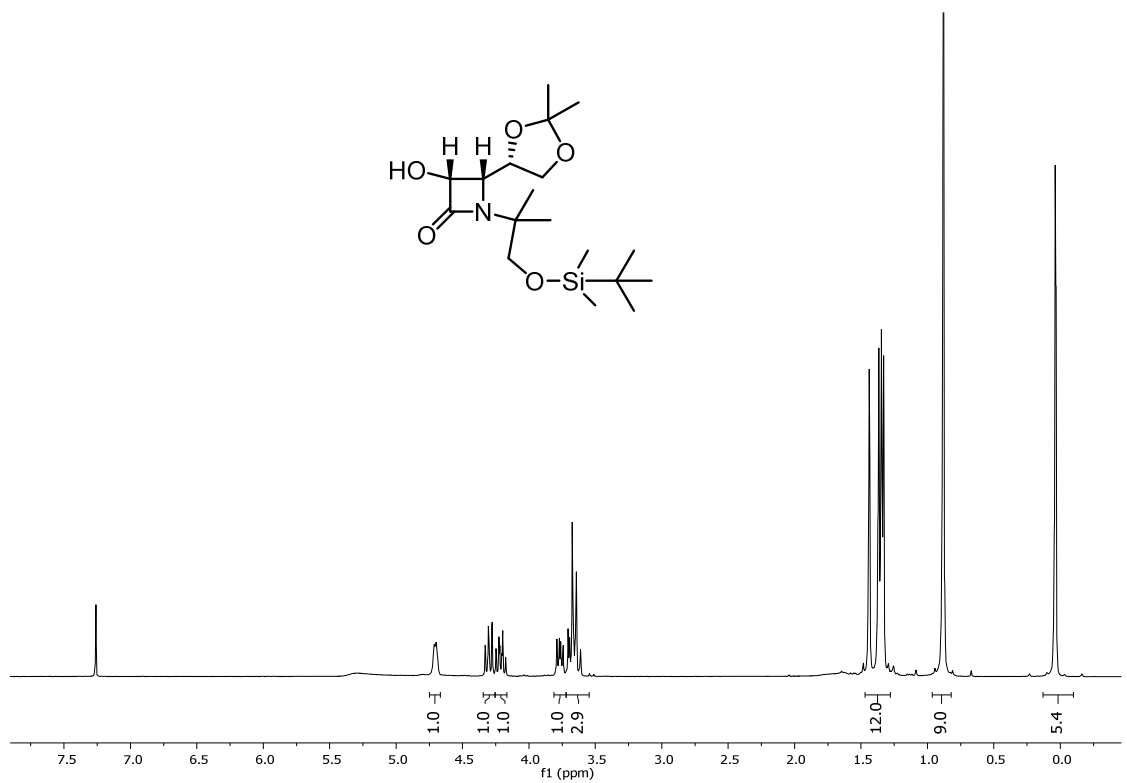
**(3R,4S)-3-Hidroxi-1-[(2-*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (1.5):**



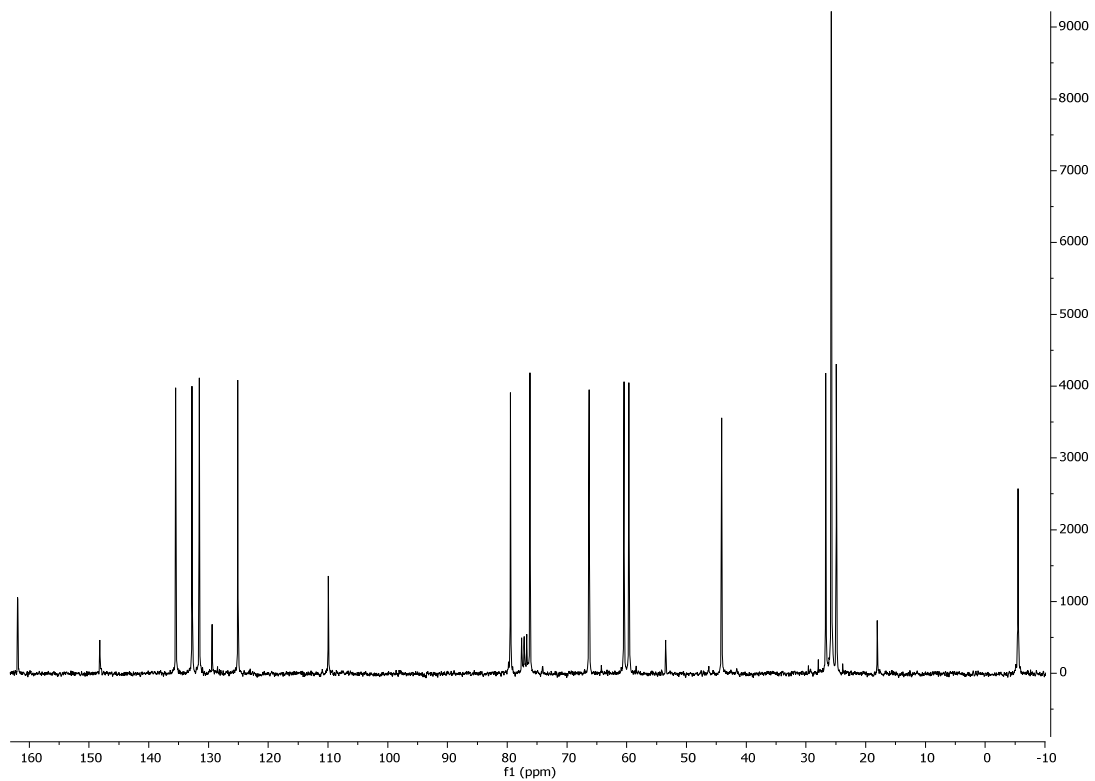
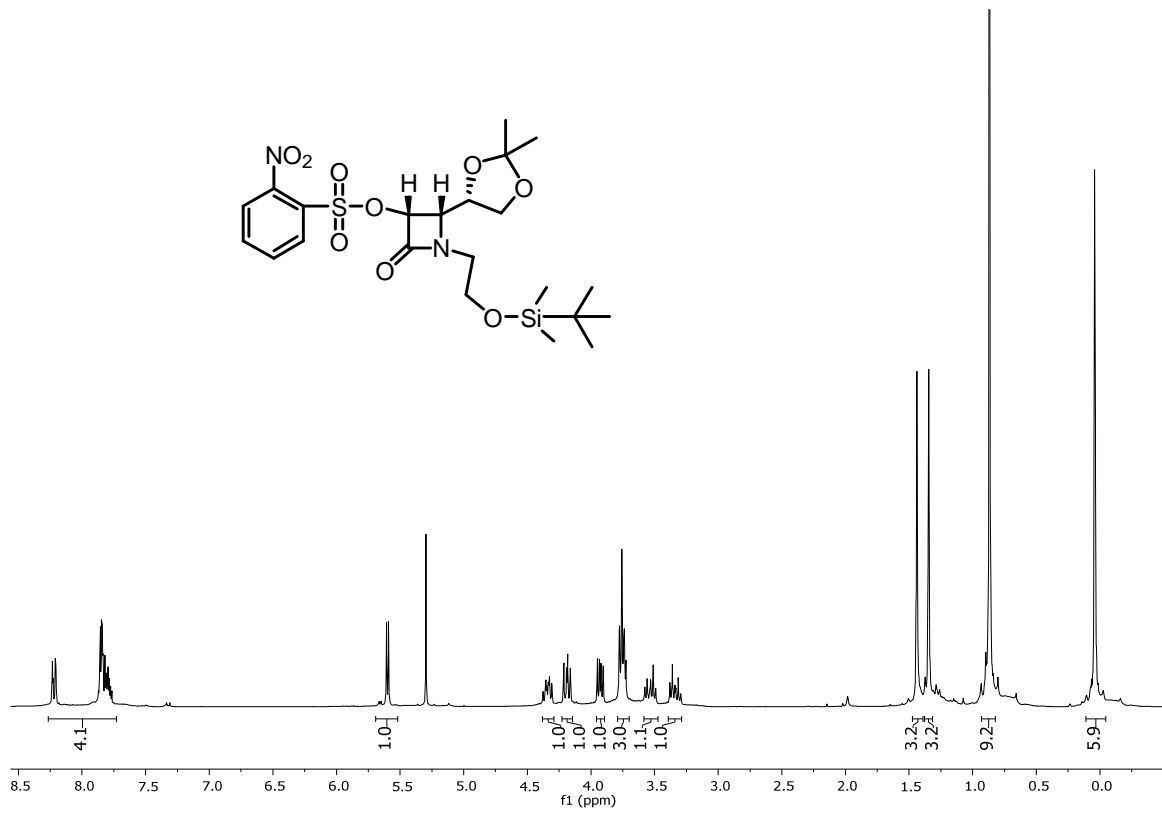
**(3*R*,4*S*)-3-Hidroxi-1-[(3-*terc*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (9.5):**



**(3*R*,4*S*)-3-Hidroxi-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (15.5a):**

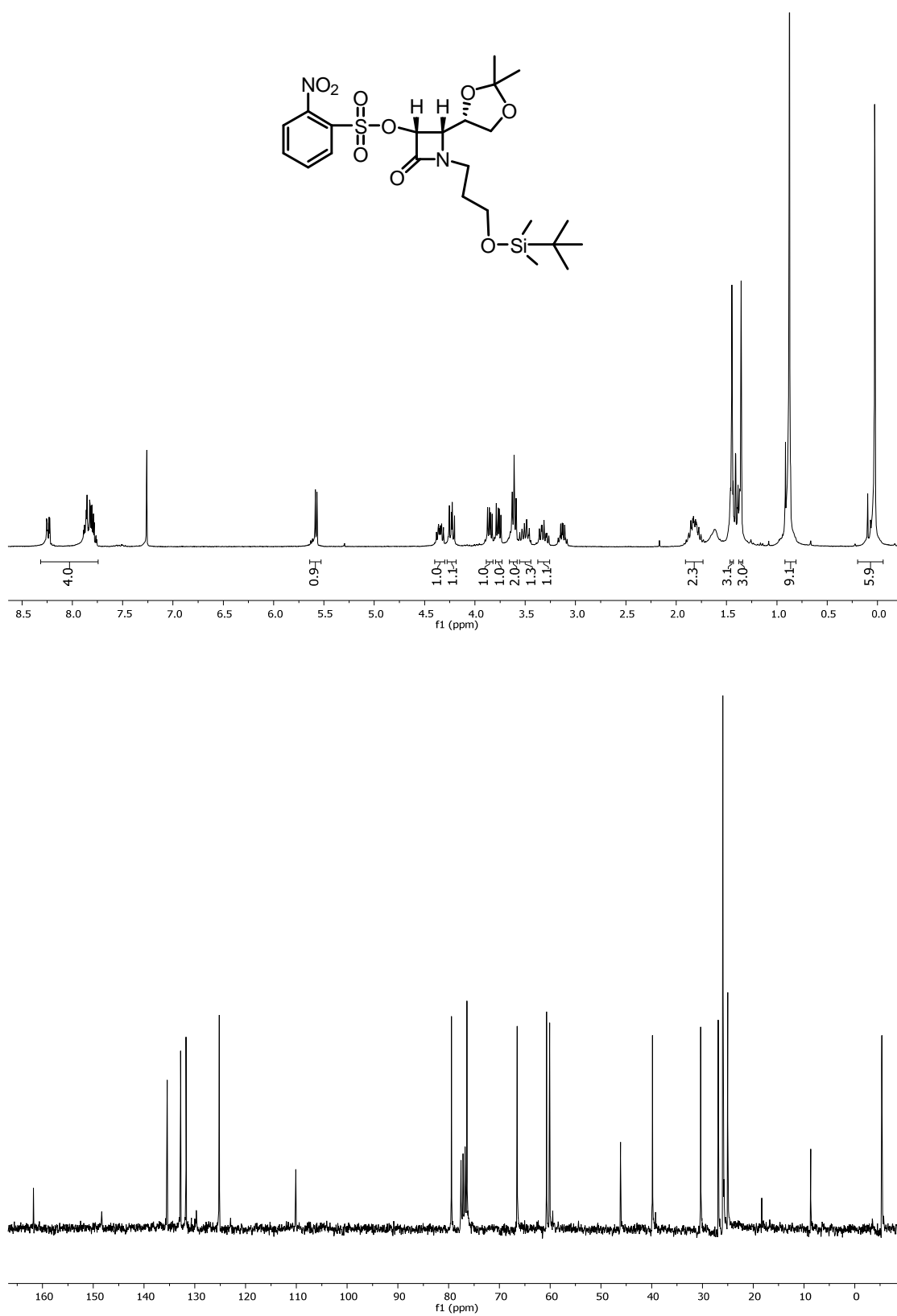


**(3R,4S)-1-[2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidina (4.5.int1):**

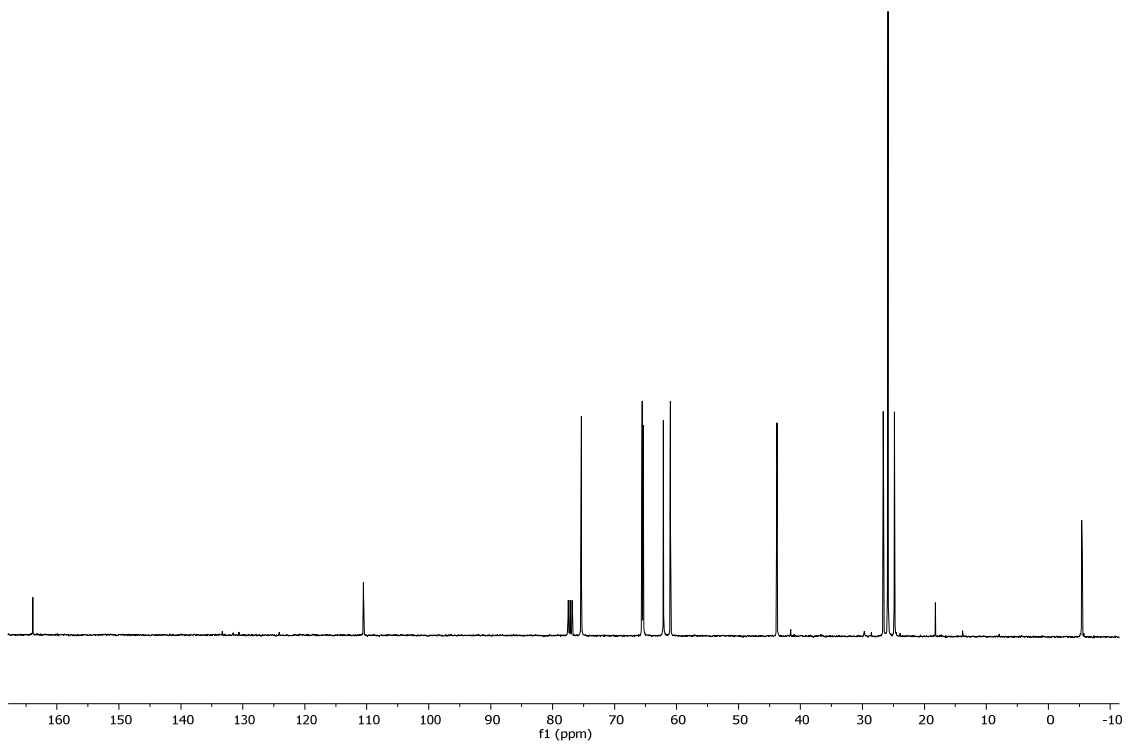
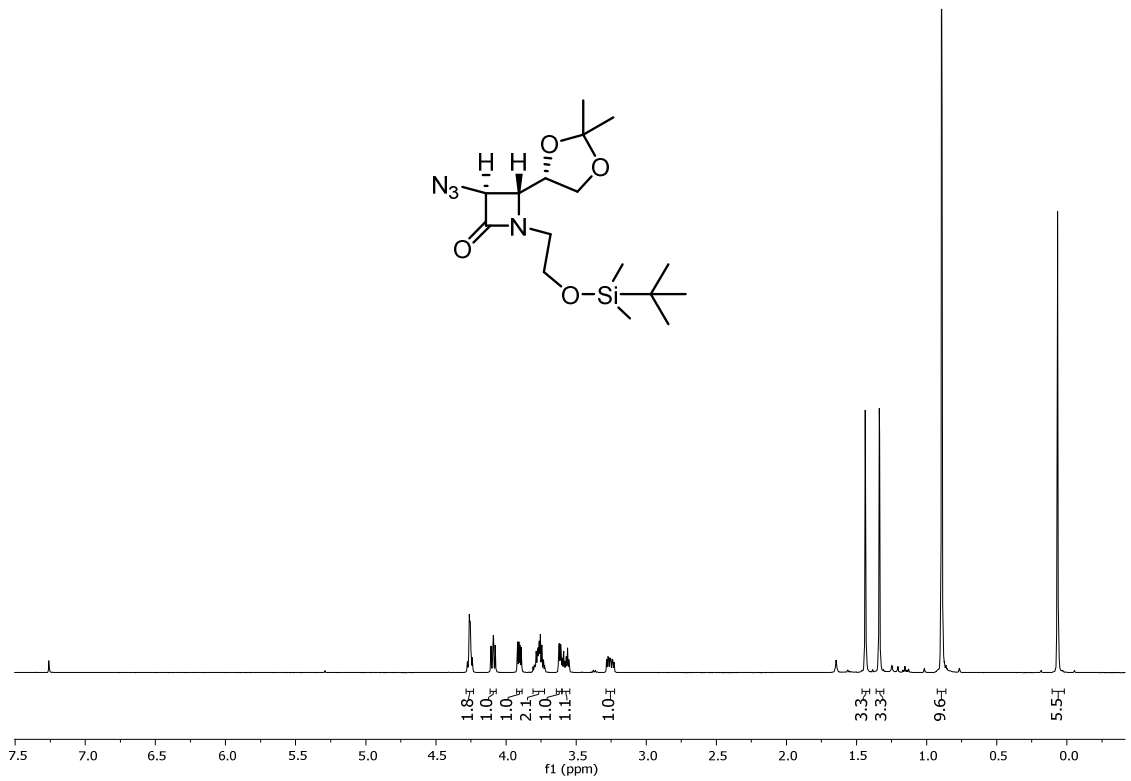




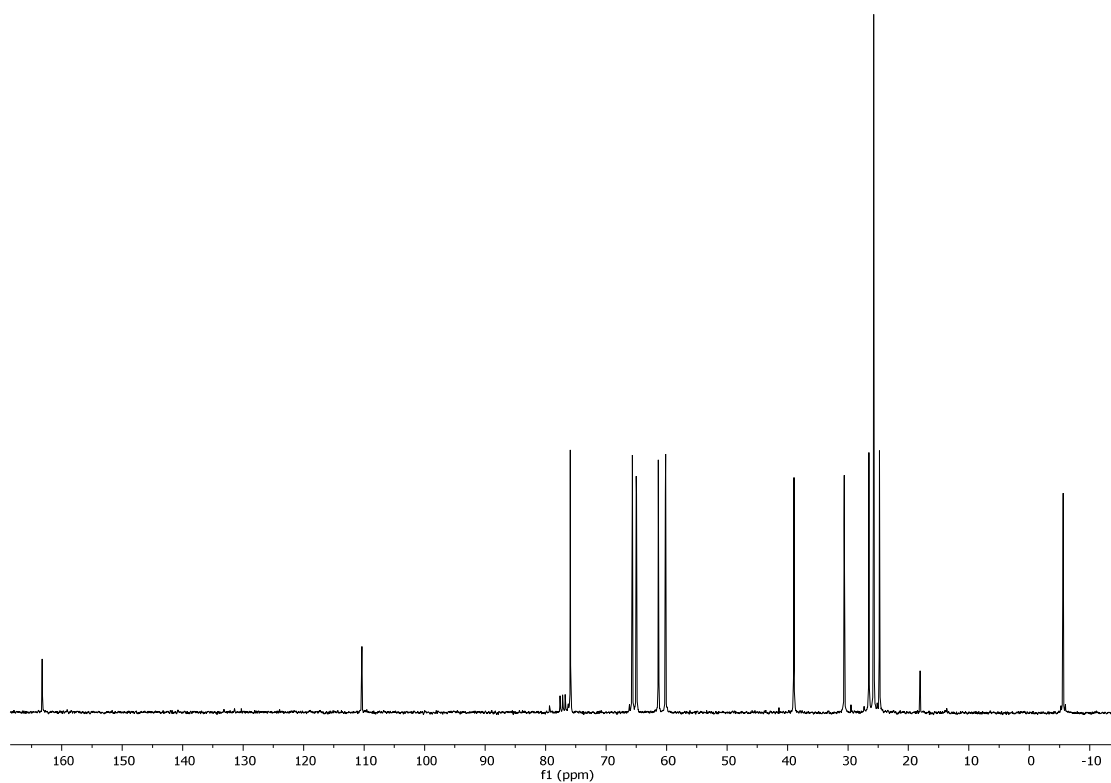
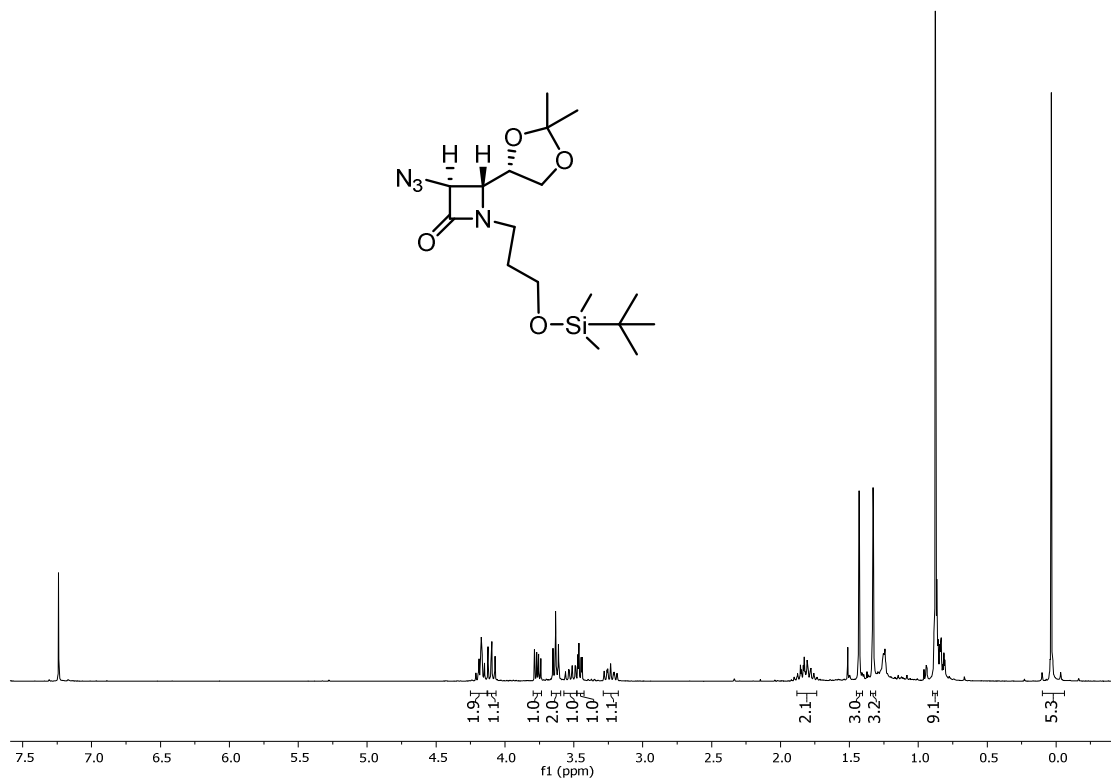
**(3R,4S)-1-[3-(*tert*-butildimetilsiloxi)propil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-3-(2-nitrobenzenosulfoniloxi)-azetidin-2-ona (8.5.int1):**



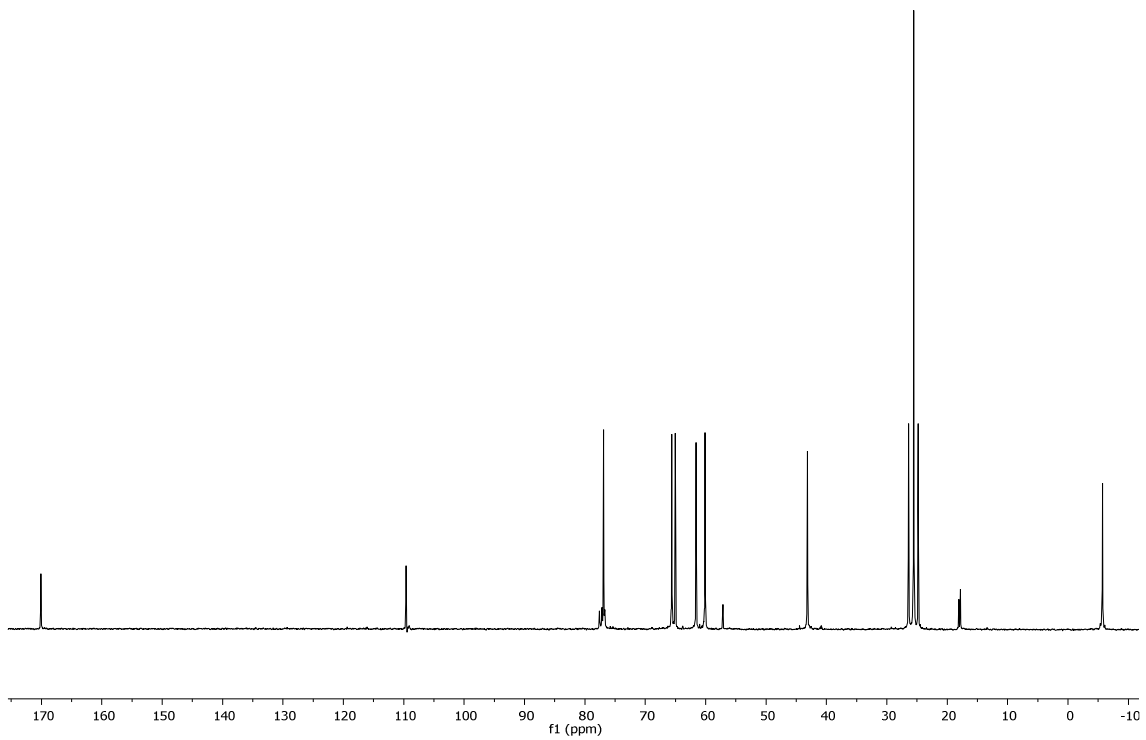
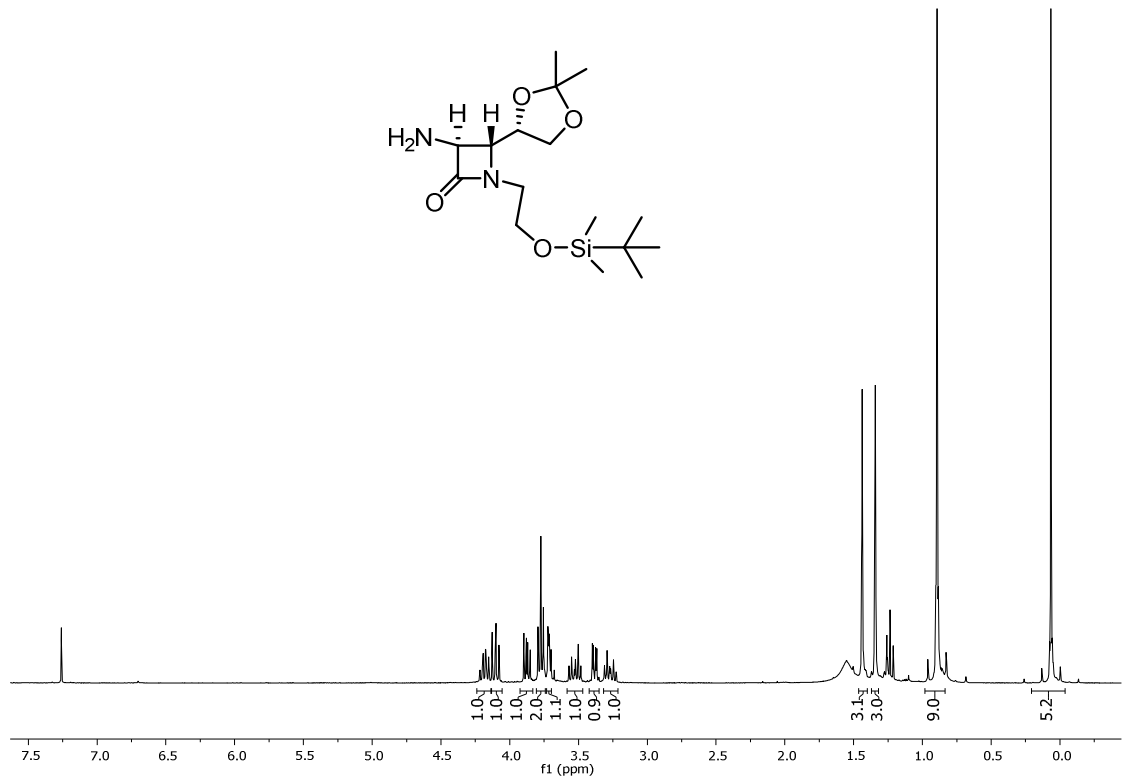
**(3*S*,4*R*)-3-Azido-1-[2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona (4.5.int2):**



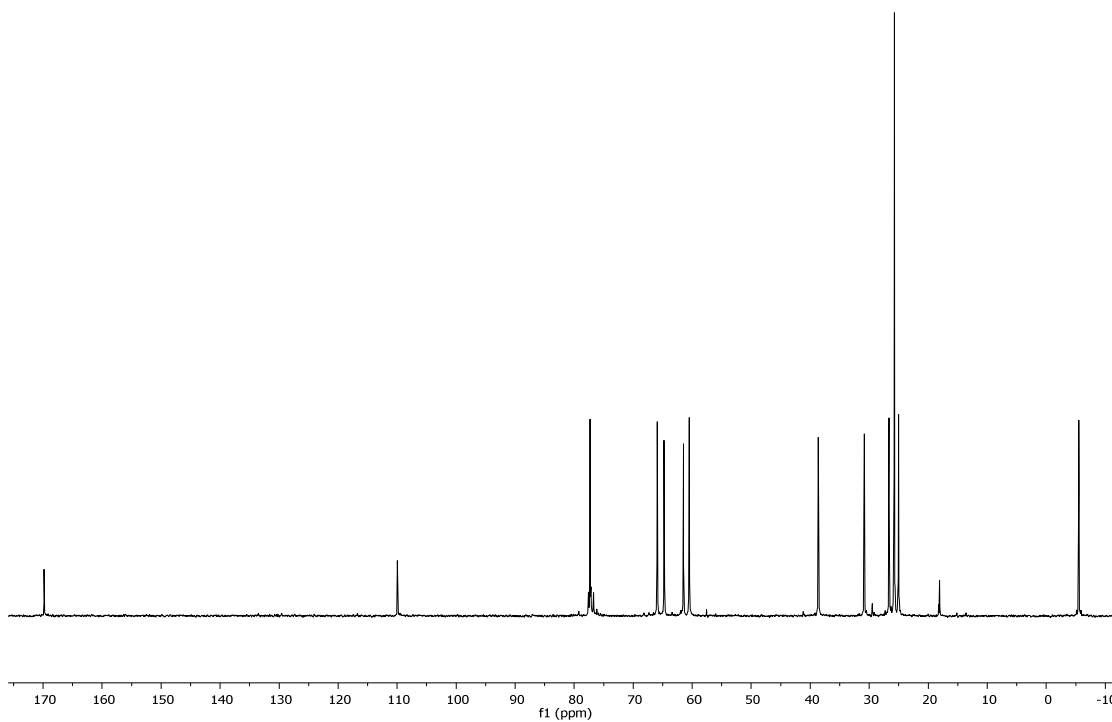
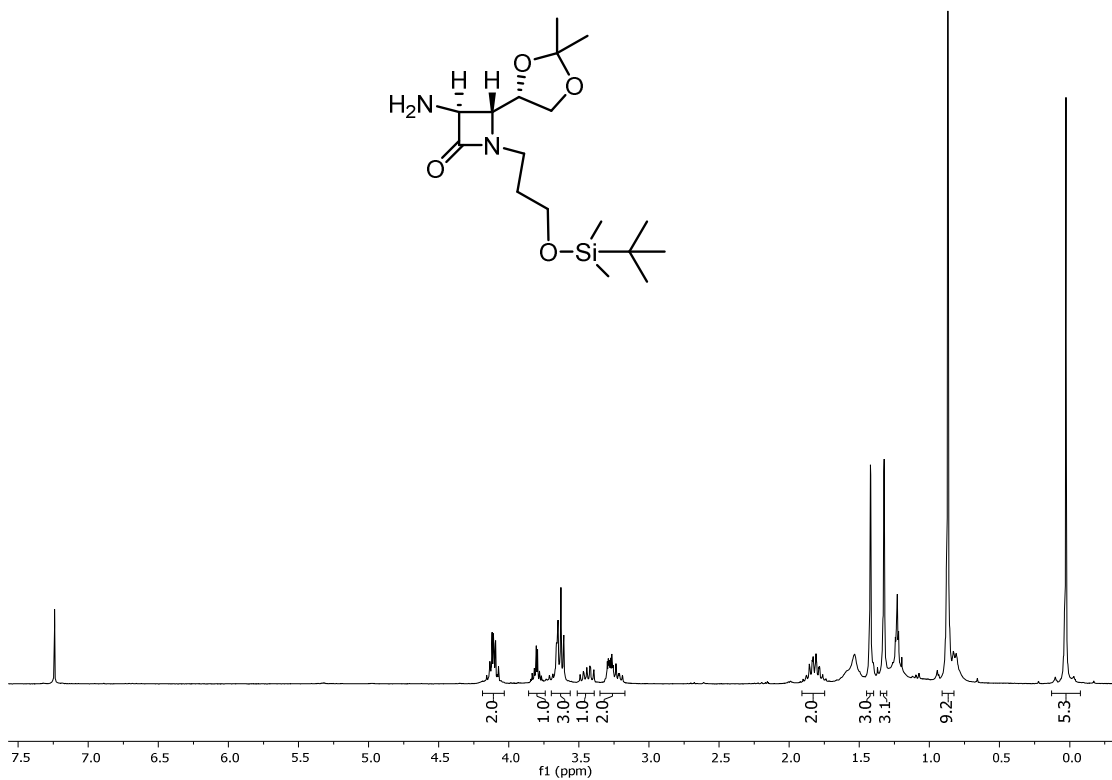
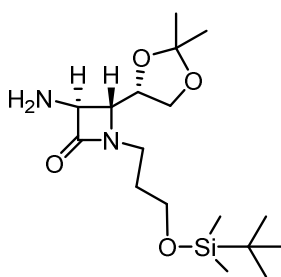
**(3*S*,4*R*)-3-Azido-1-[3-(*tert*-butildimetilsililo)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (8.5.int2):**



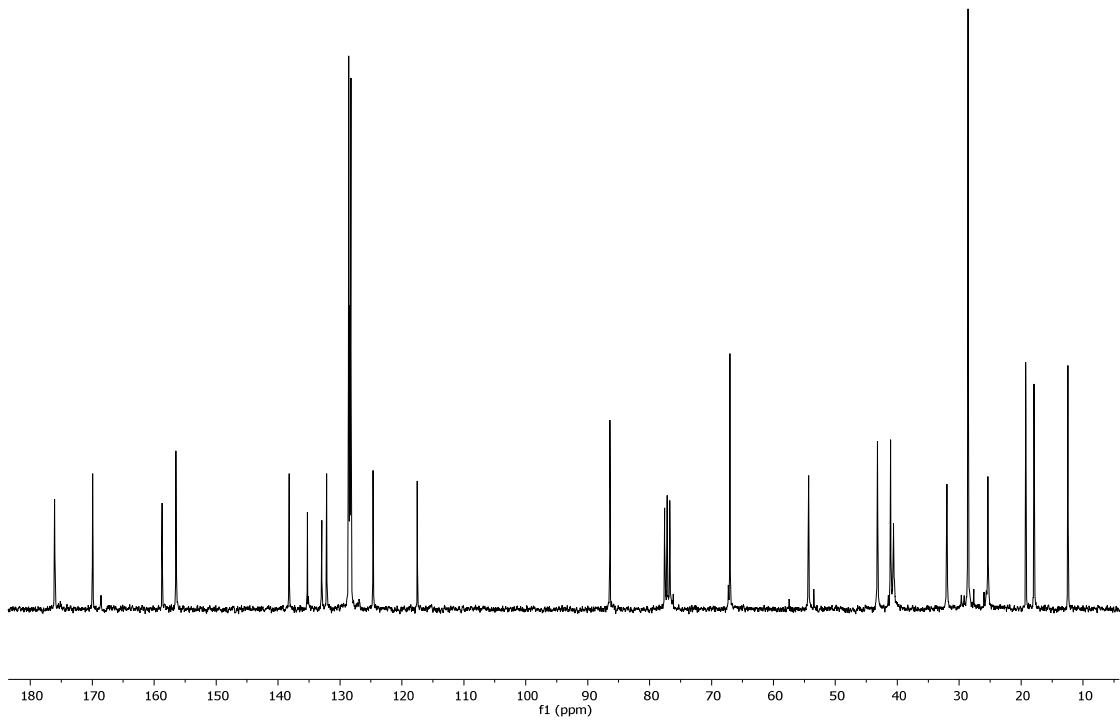
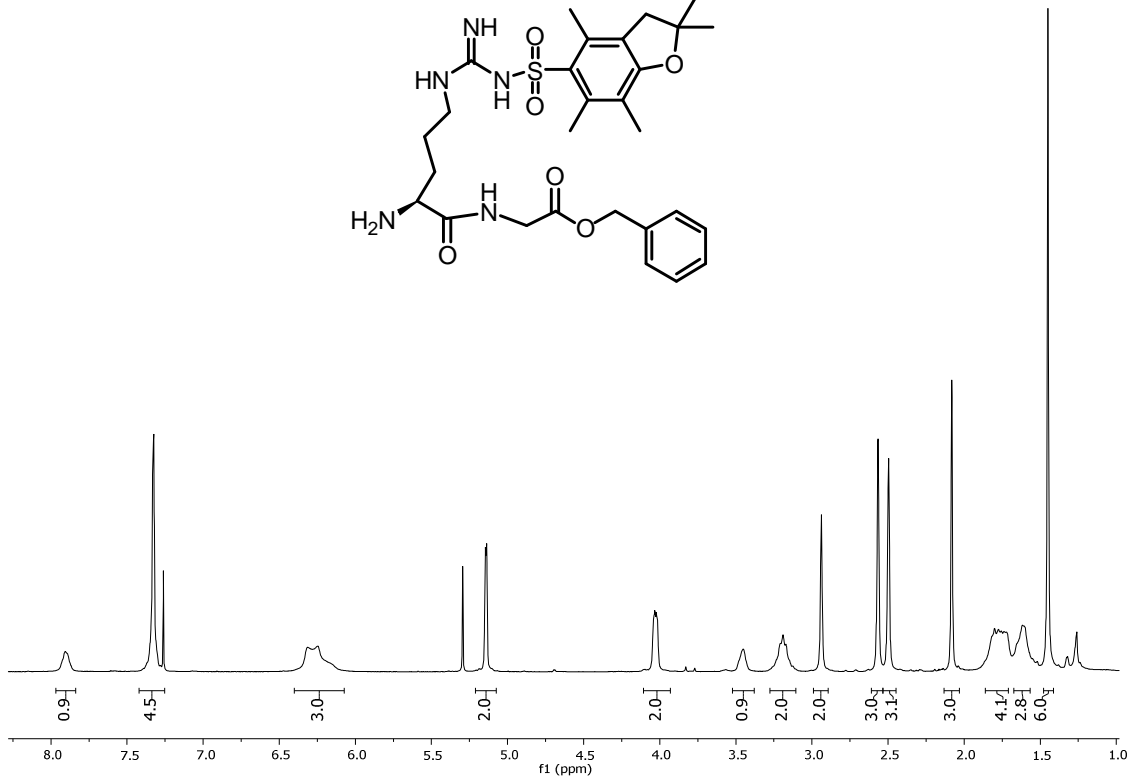
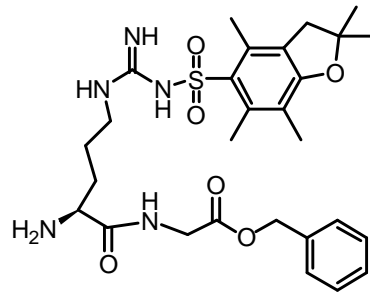
**(3*S*,4*R*)-3-Amino-1-(2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (4.5):**

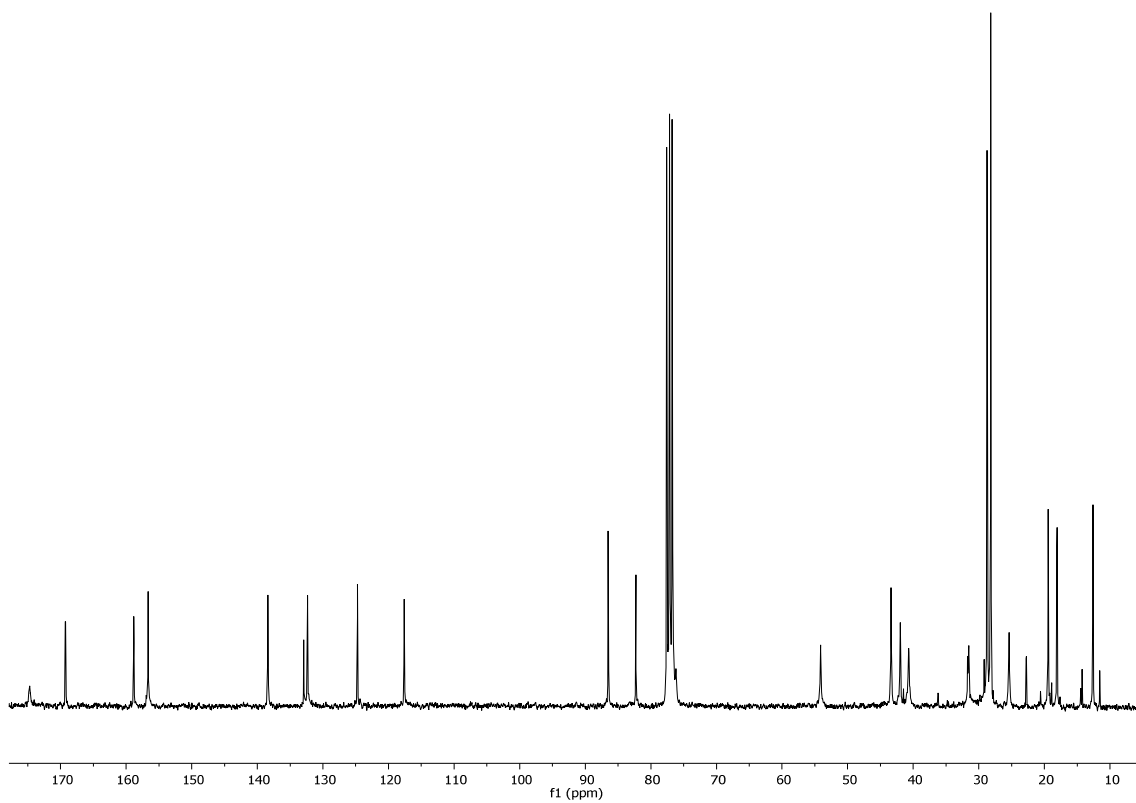
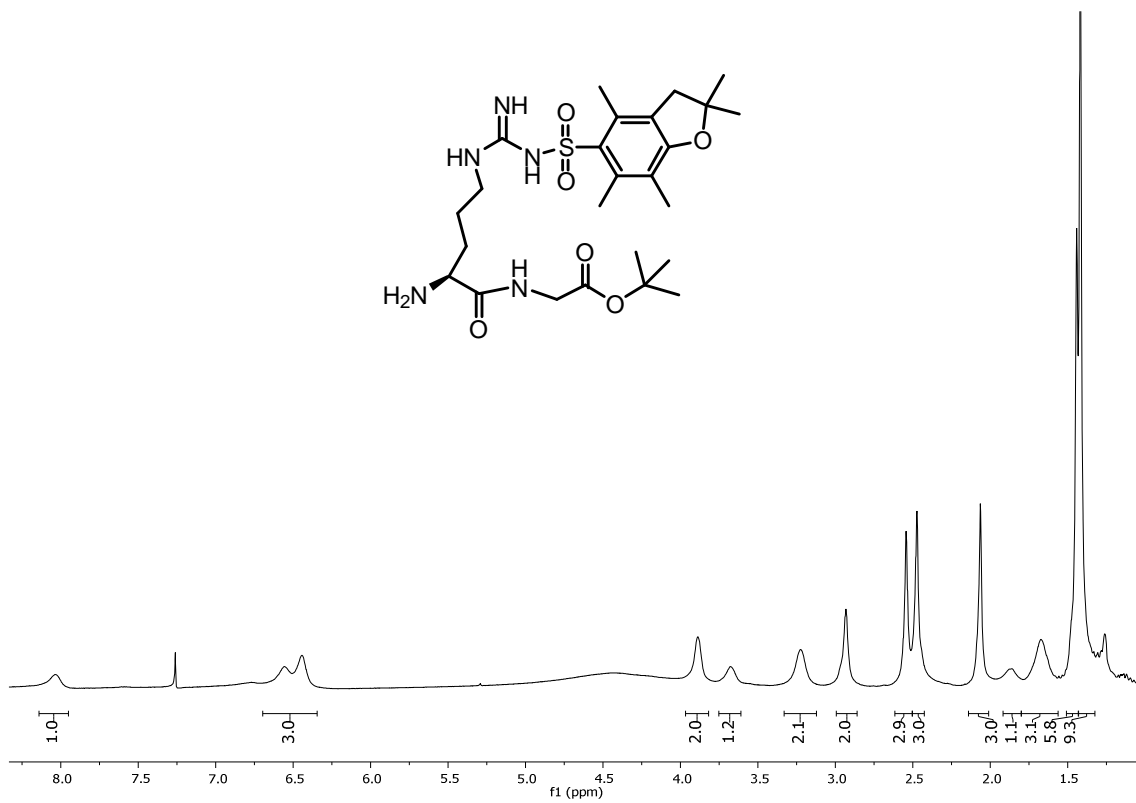
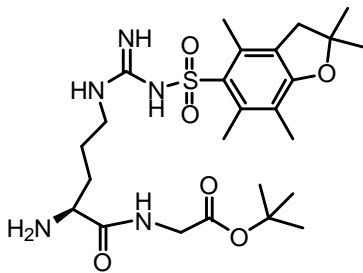


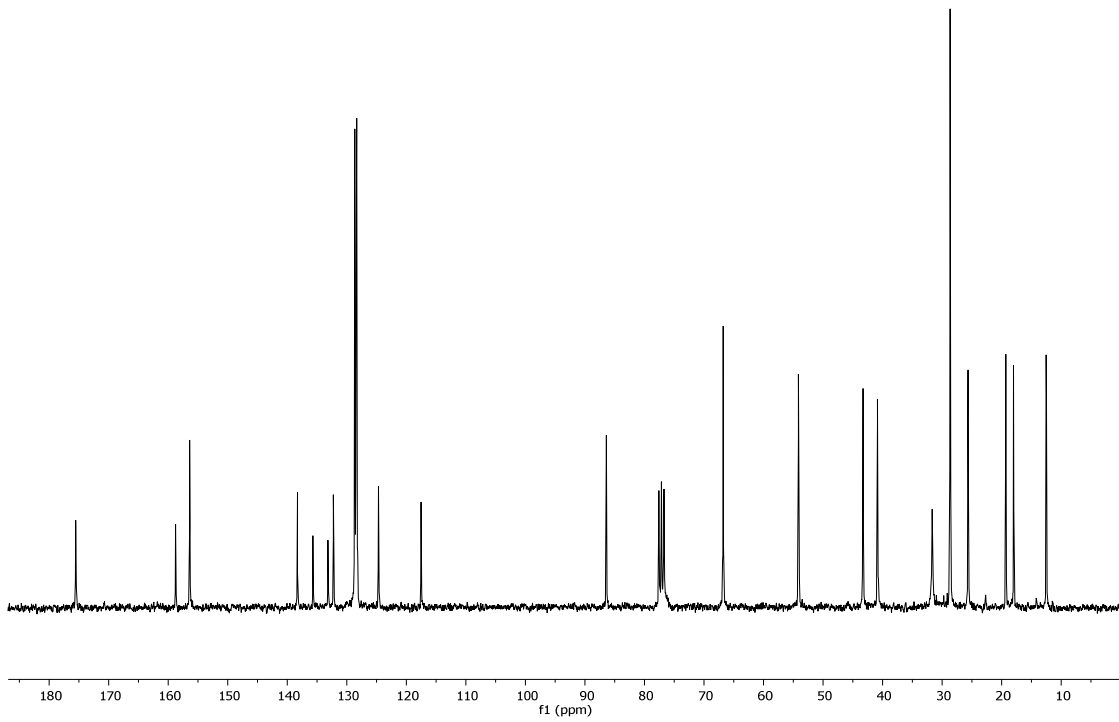
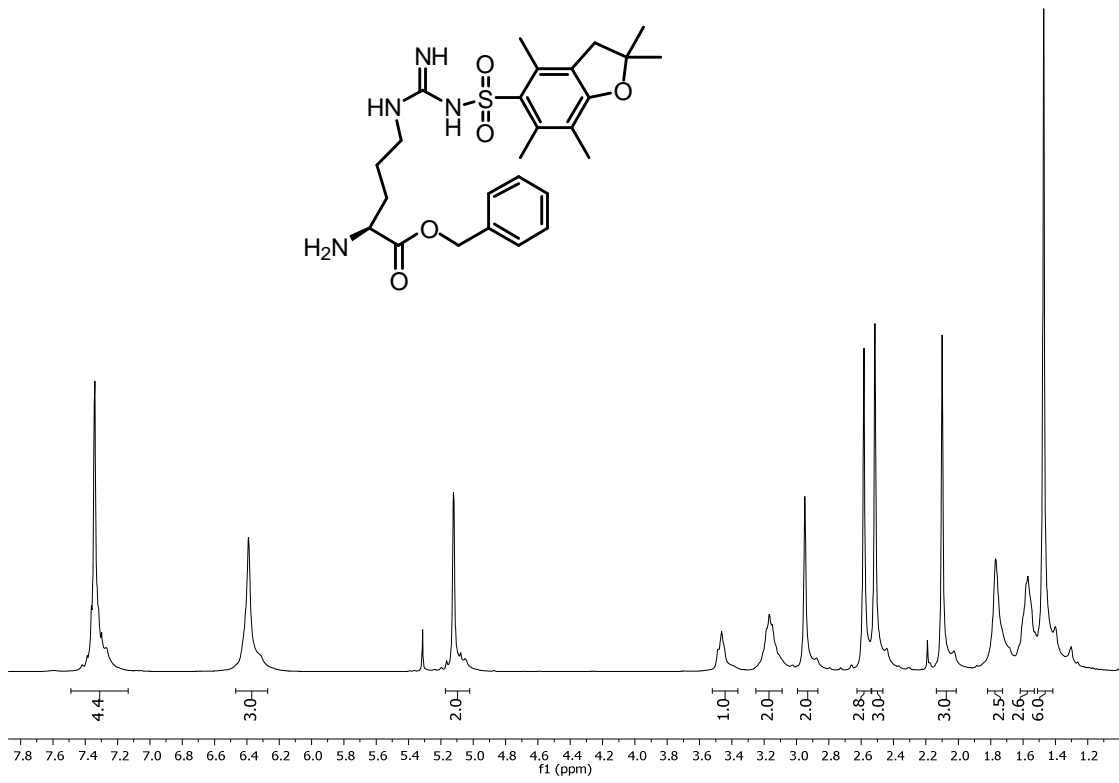
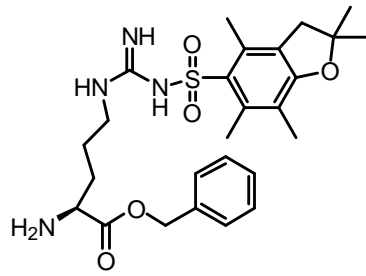
**(3*S*,4*R*)-3-Amino-1-[3-(*tert*-butildimetilsililoxi)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona (8.5):**



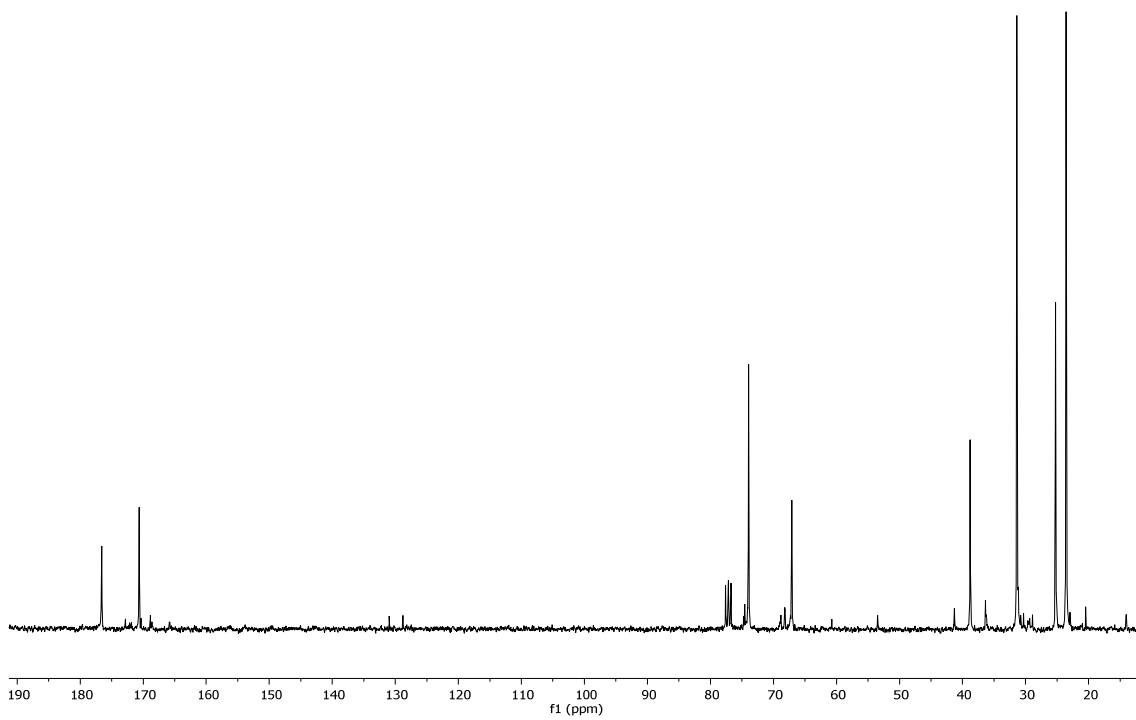
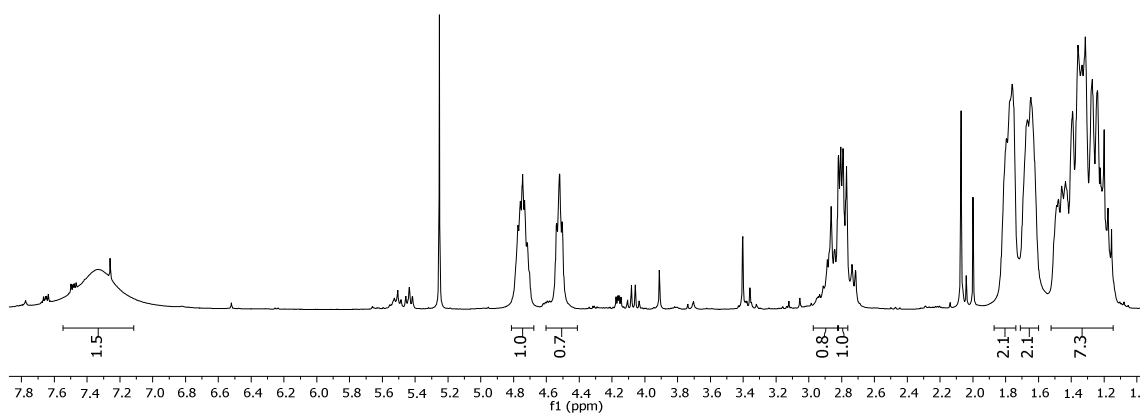
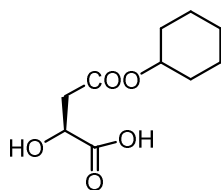
**NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-OBn (1.10):**



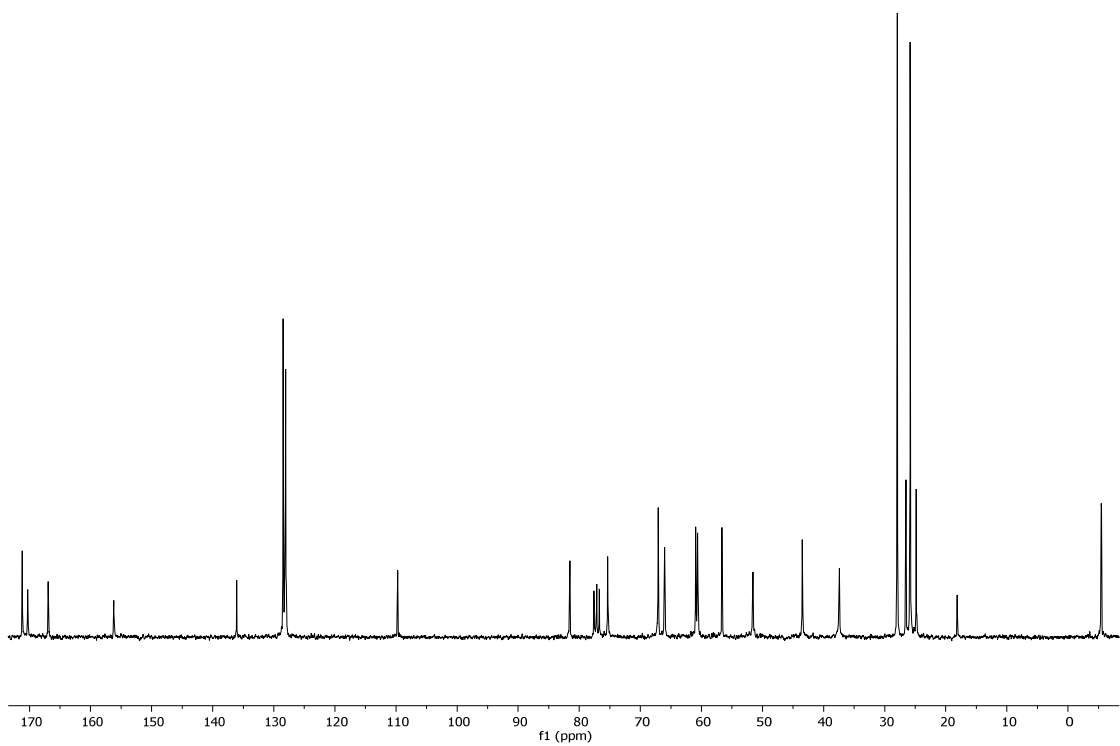
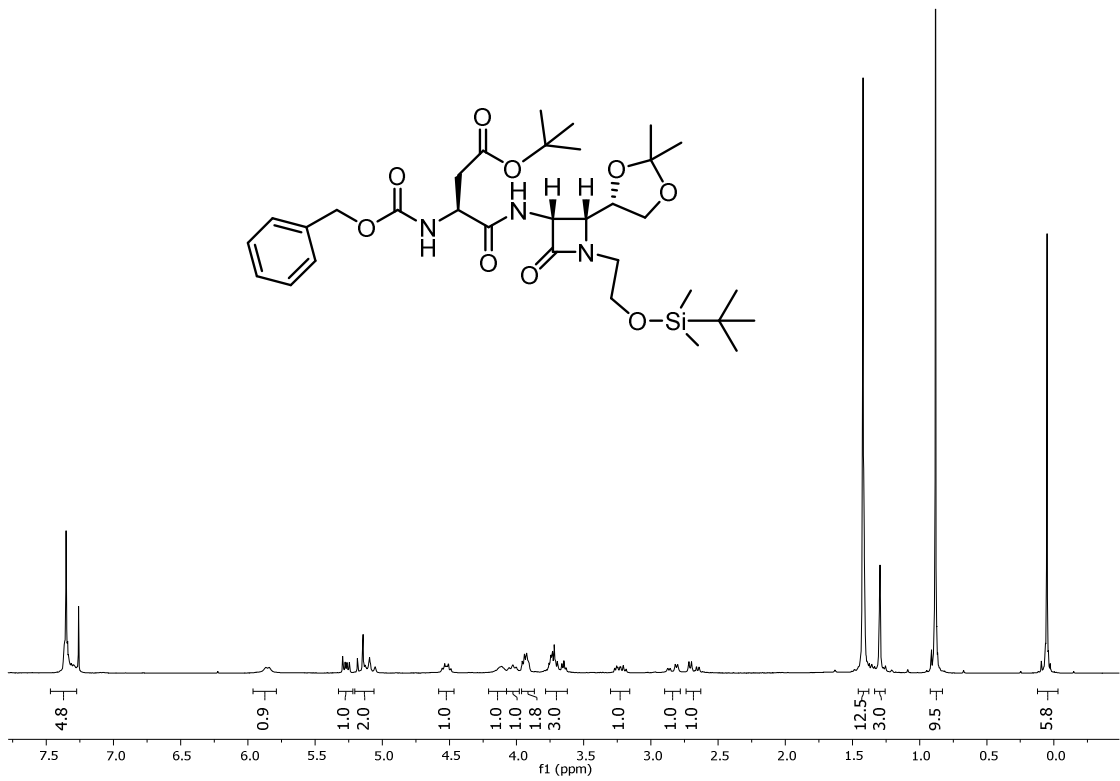
**NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (24.10):**

**NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-OBn (2.10):**

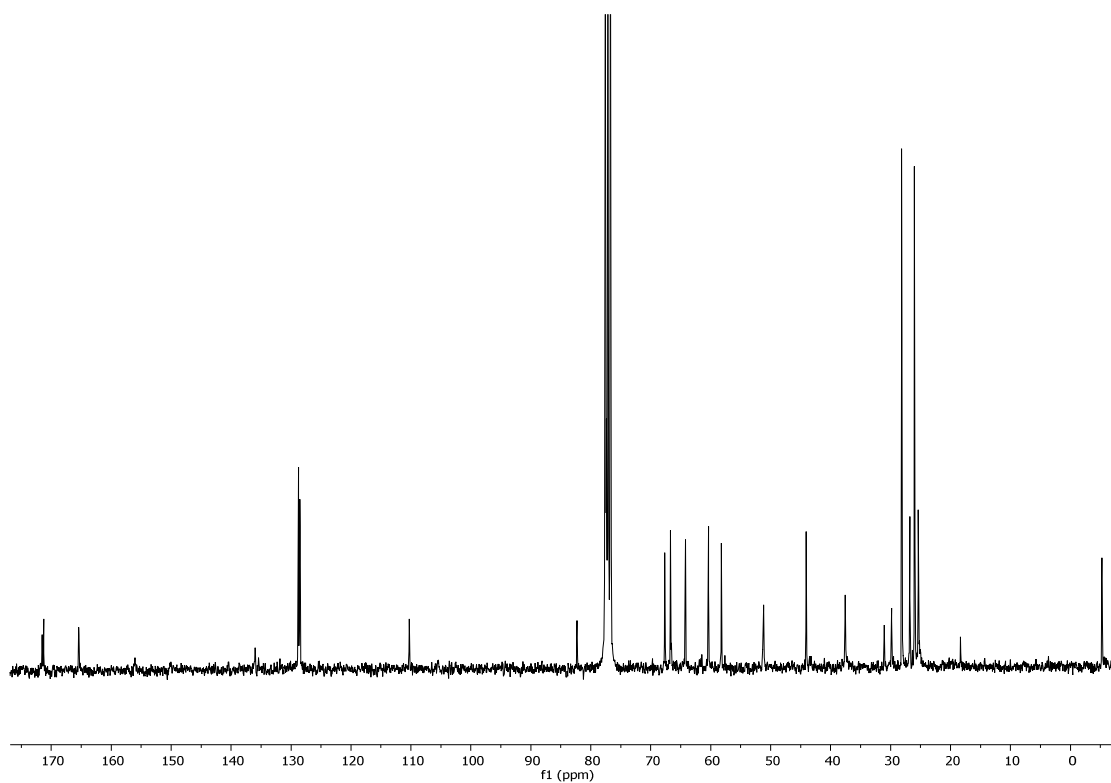
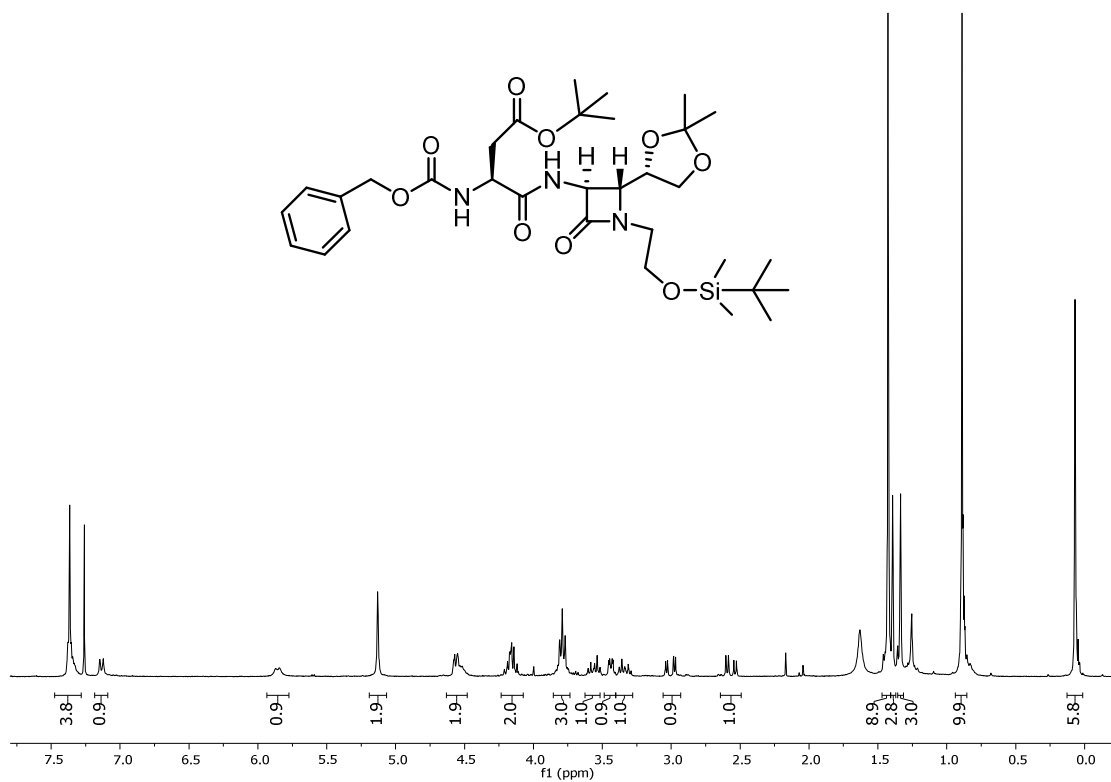


**Ácido 4-(ciclohexilóil)-2-hidroxi-4-oxobutanoico (16.6.int1):**

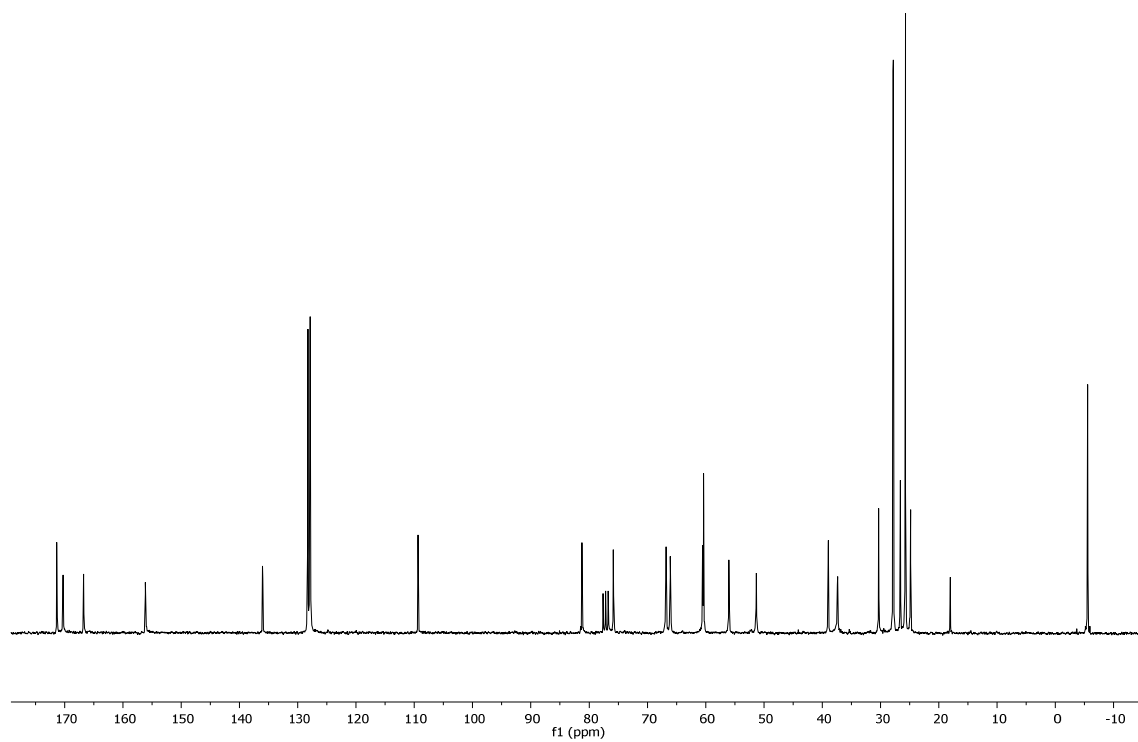
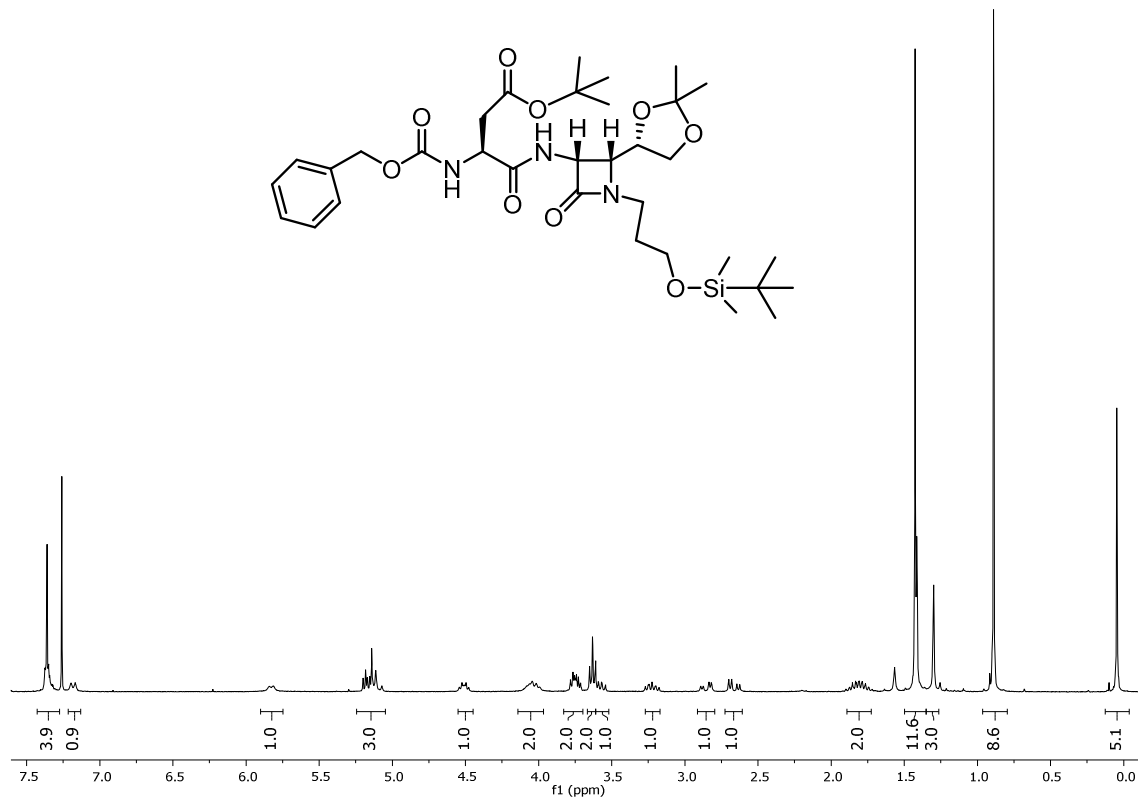
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (2.6):**



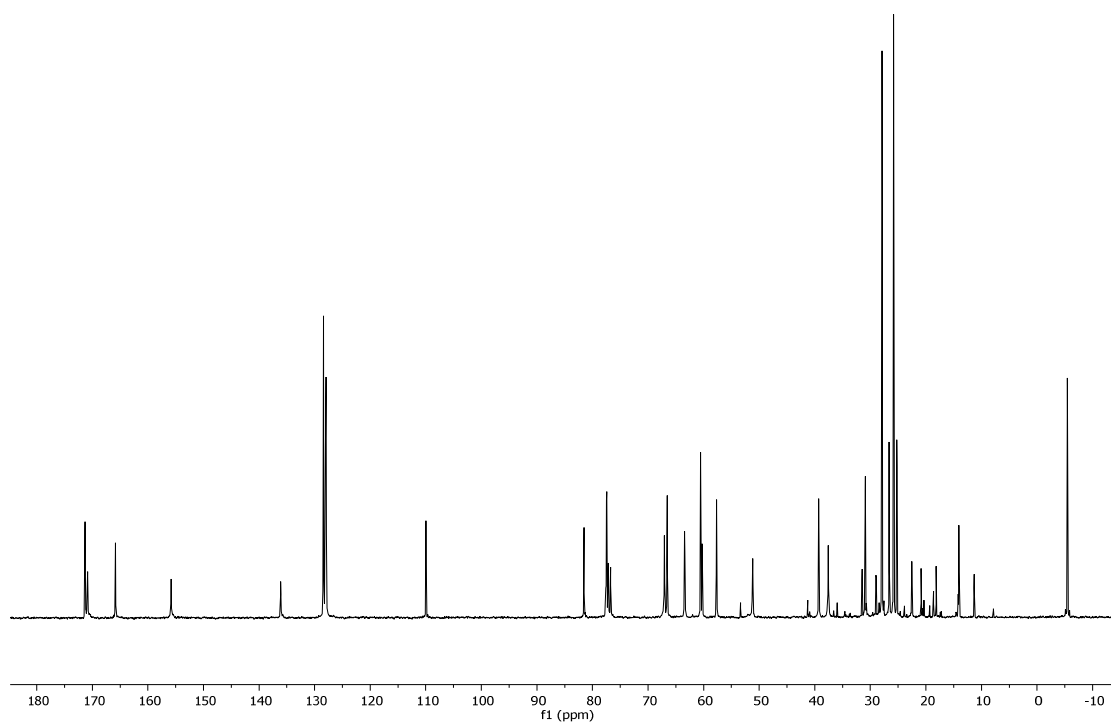
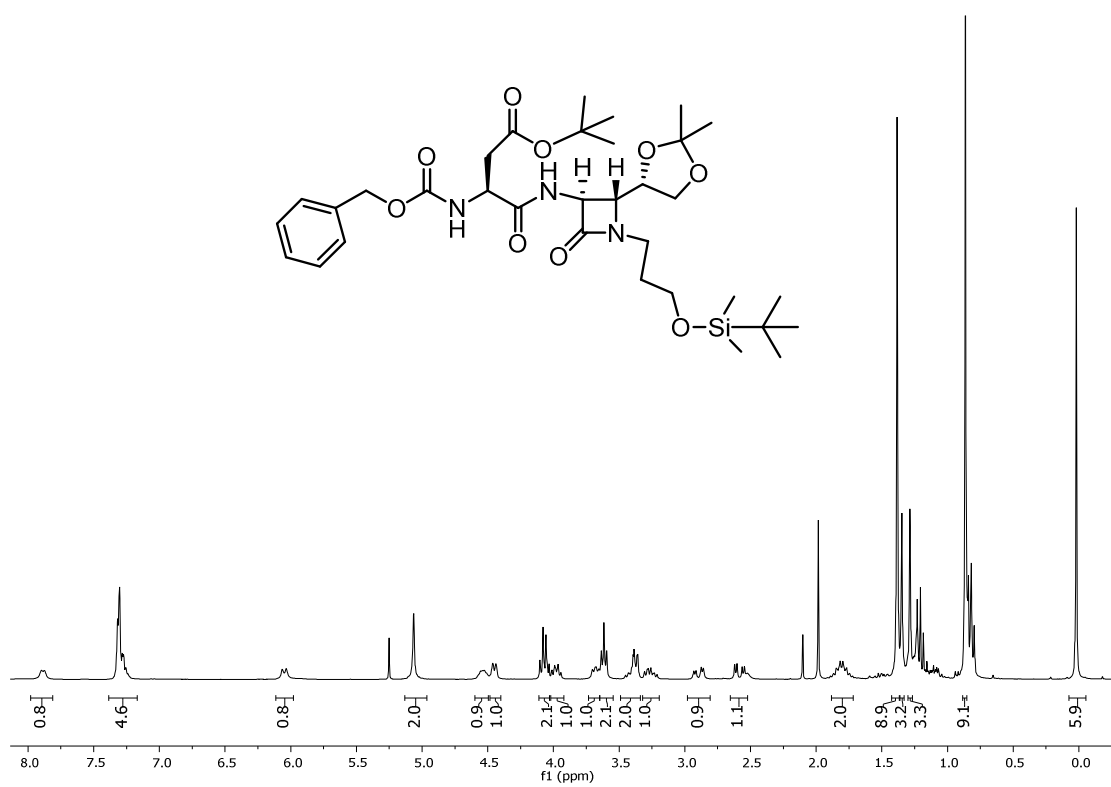
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (4.6):**



**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*R*)-3-amino-1-[3-(*tert*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (7.6):**



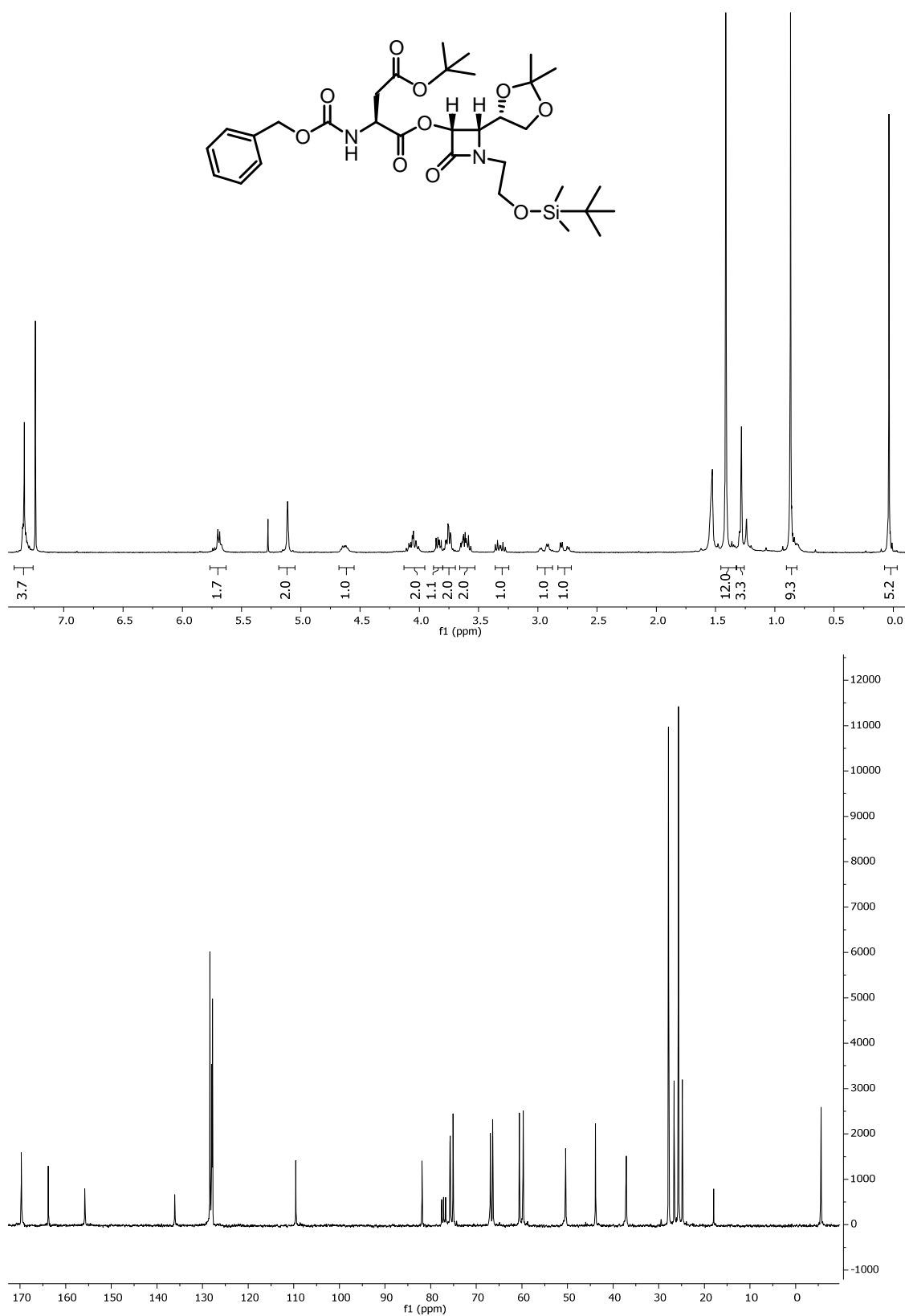
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[3-(*tert*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (8.6):**



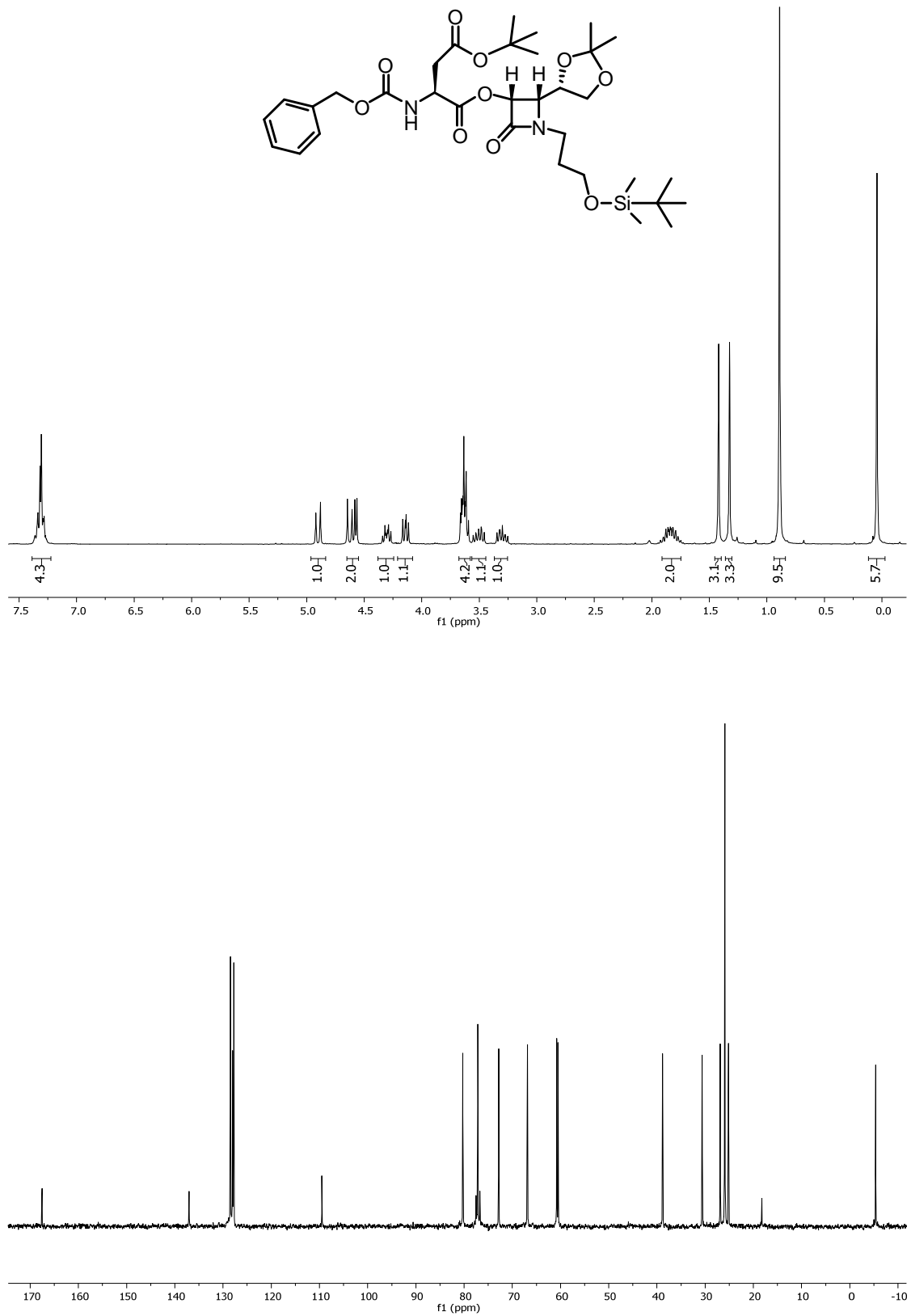
**HO-Asp(OcHx)-{(3S,4R)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (16.6.int2):**



**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[2-(*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (1.6):**

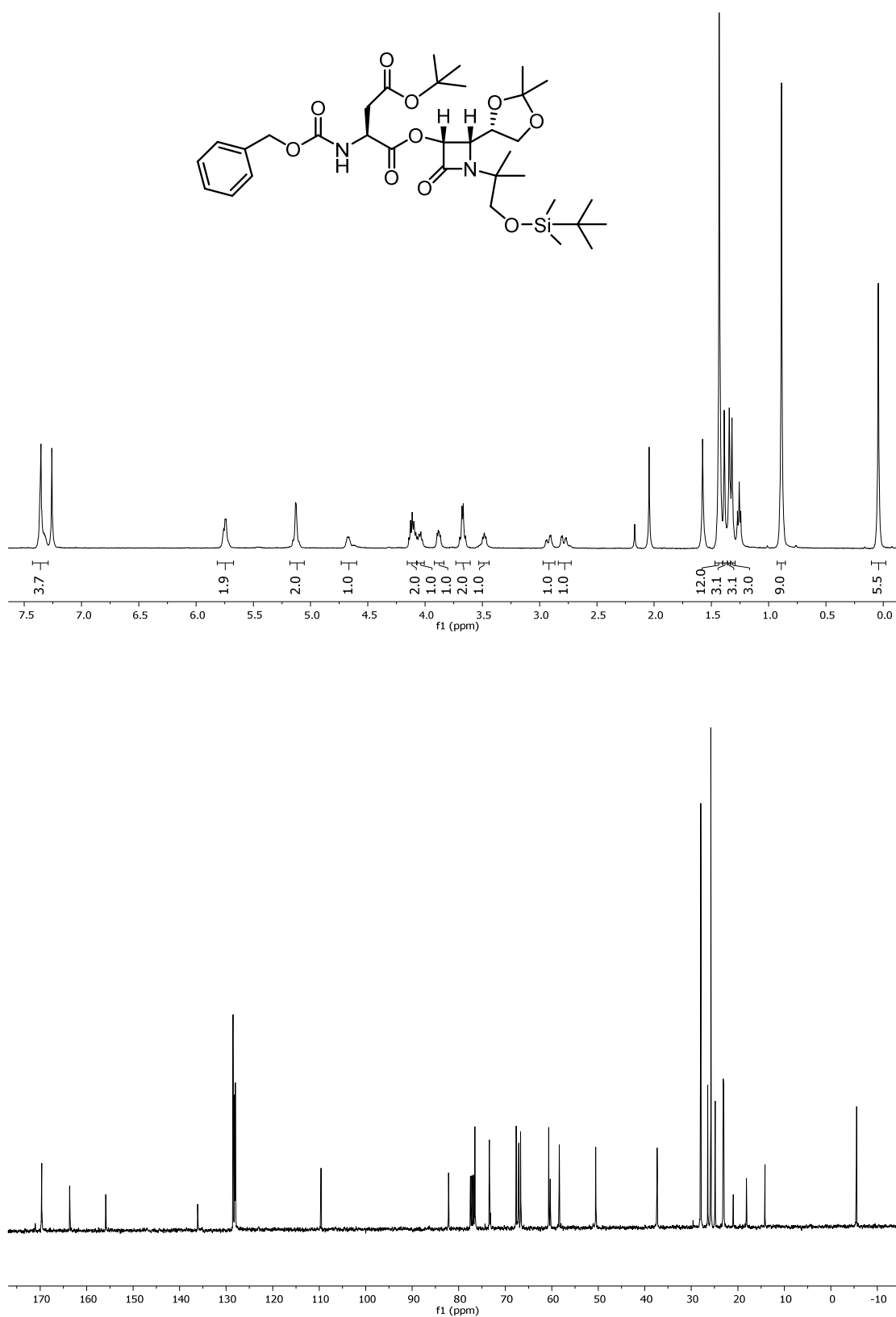


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[3-(*tert*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (9.6):**

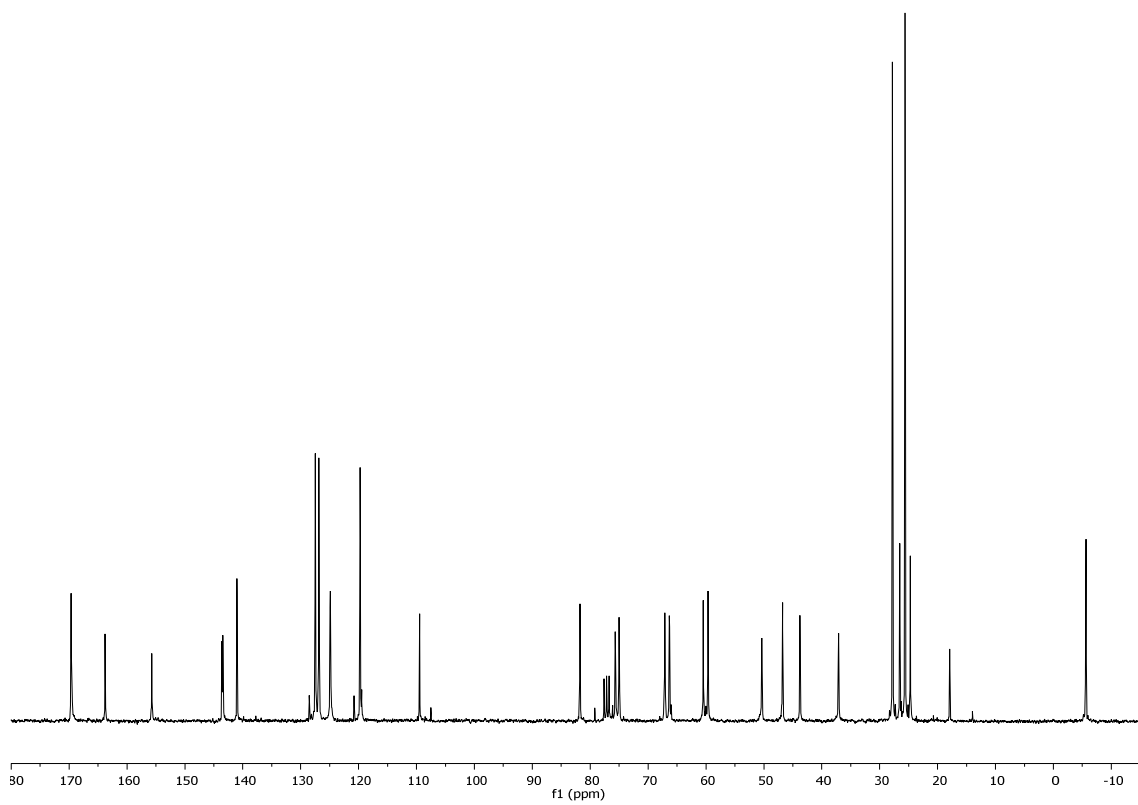
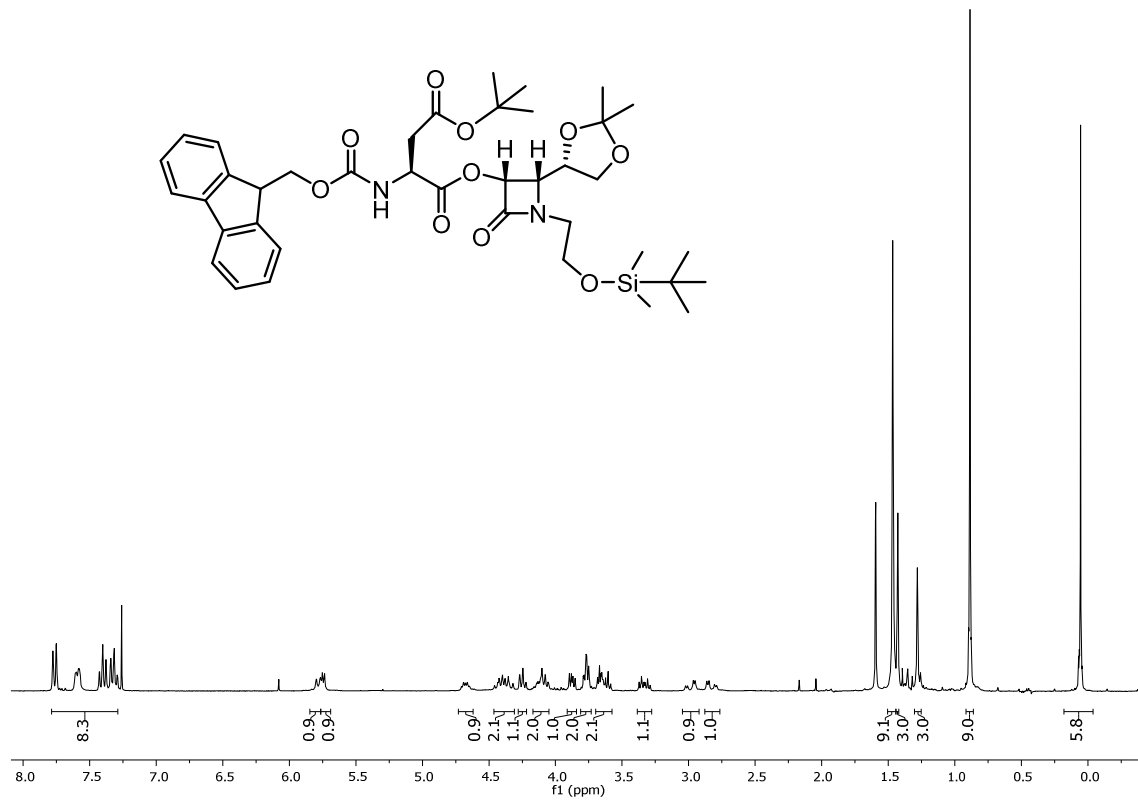




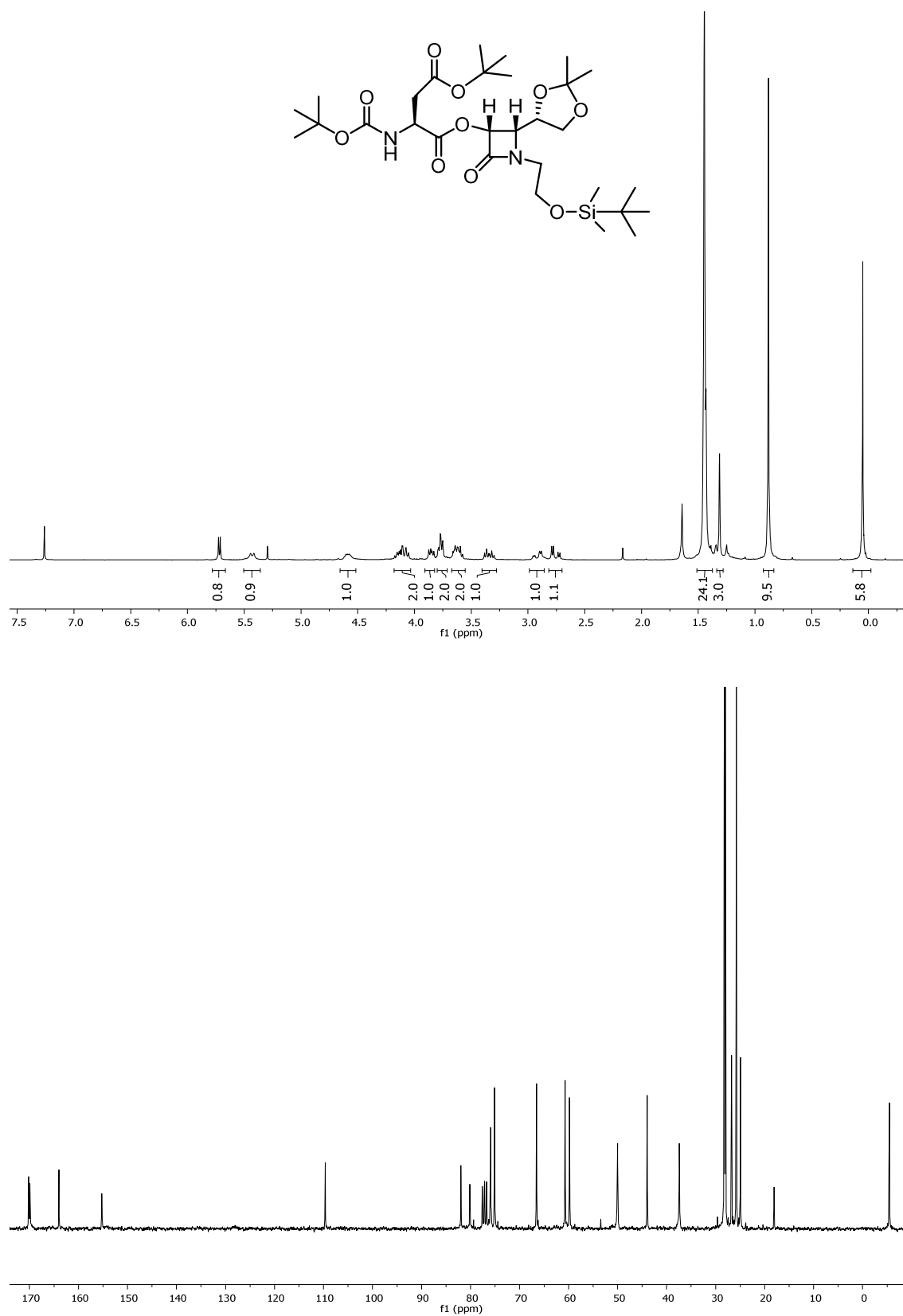
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[1,1-dimetil-2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetid-2-ona} (15.6):**



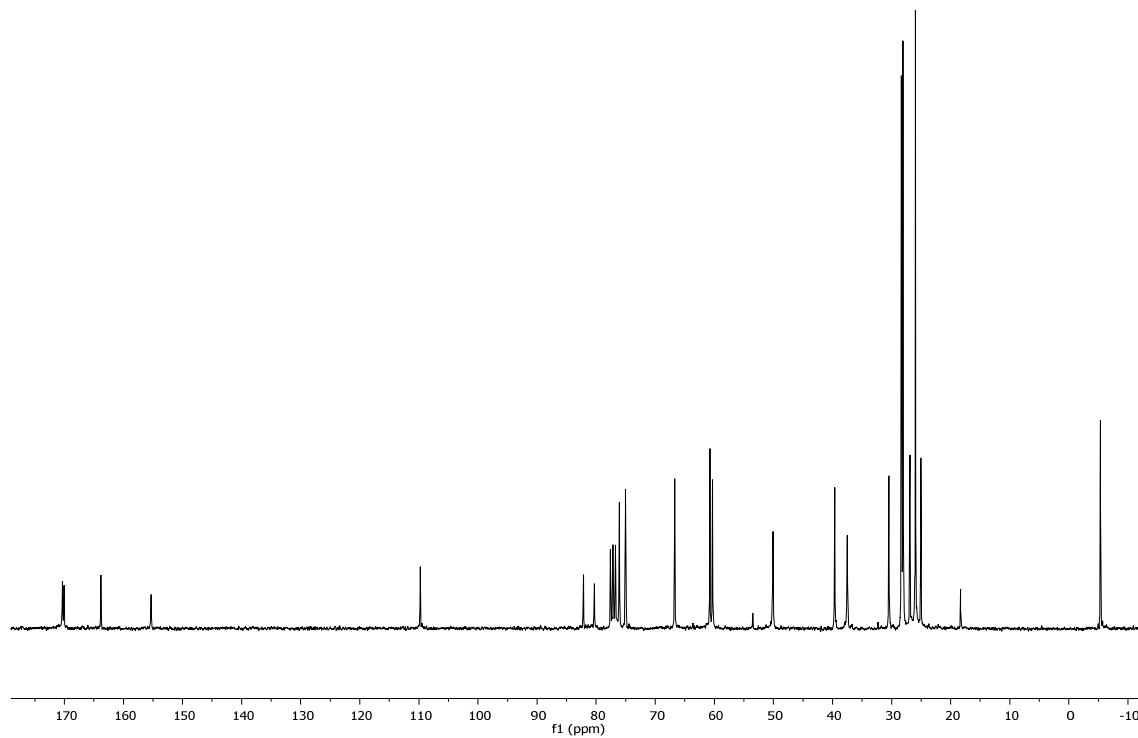
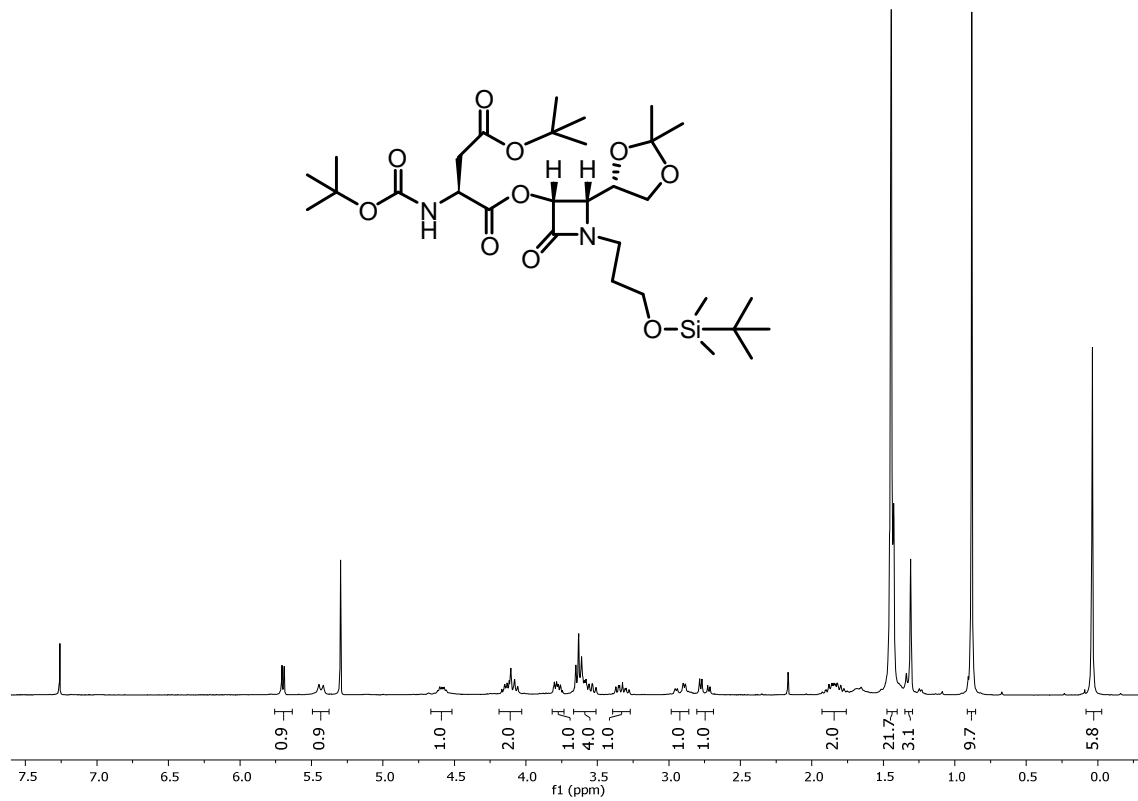
**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[2-(*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (24.6a):**



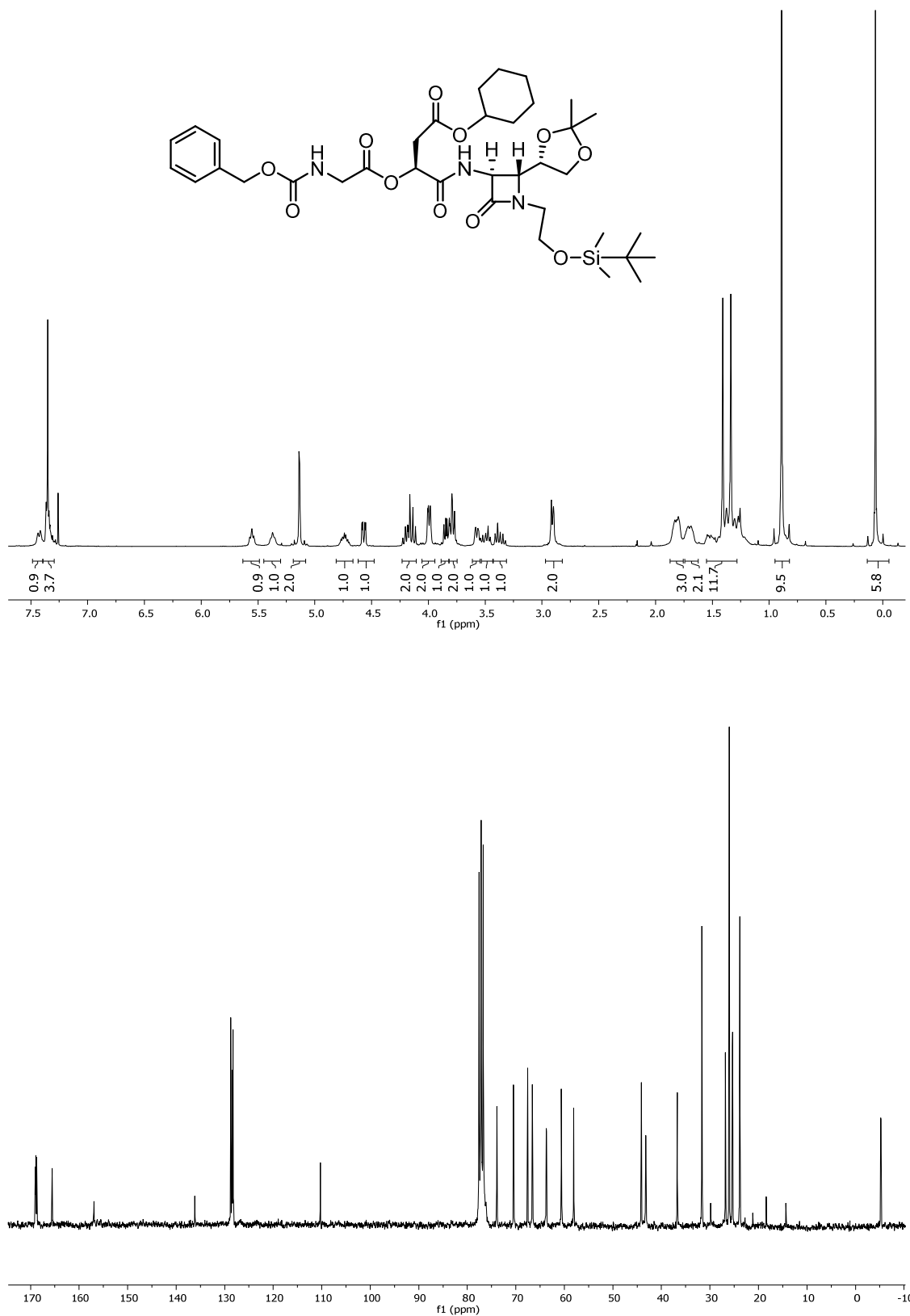
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[2-(*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (24.6b):**



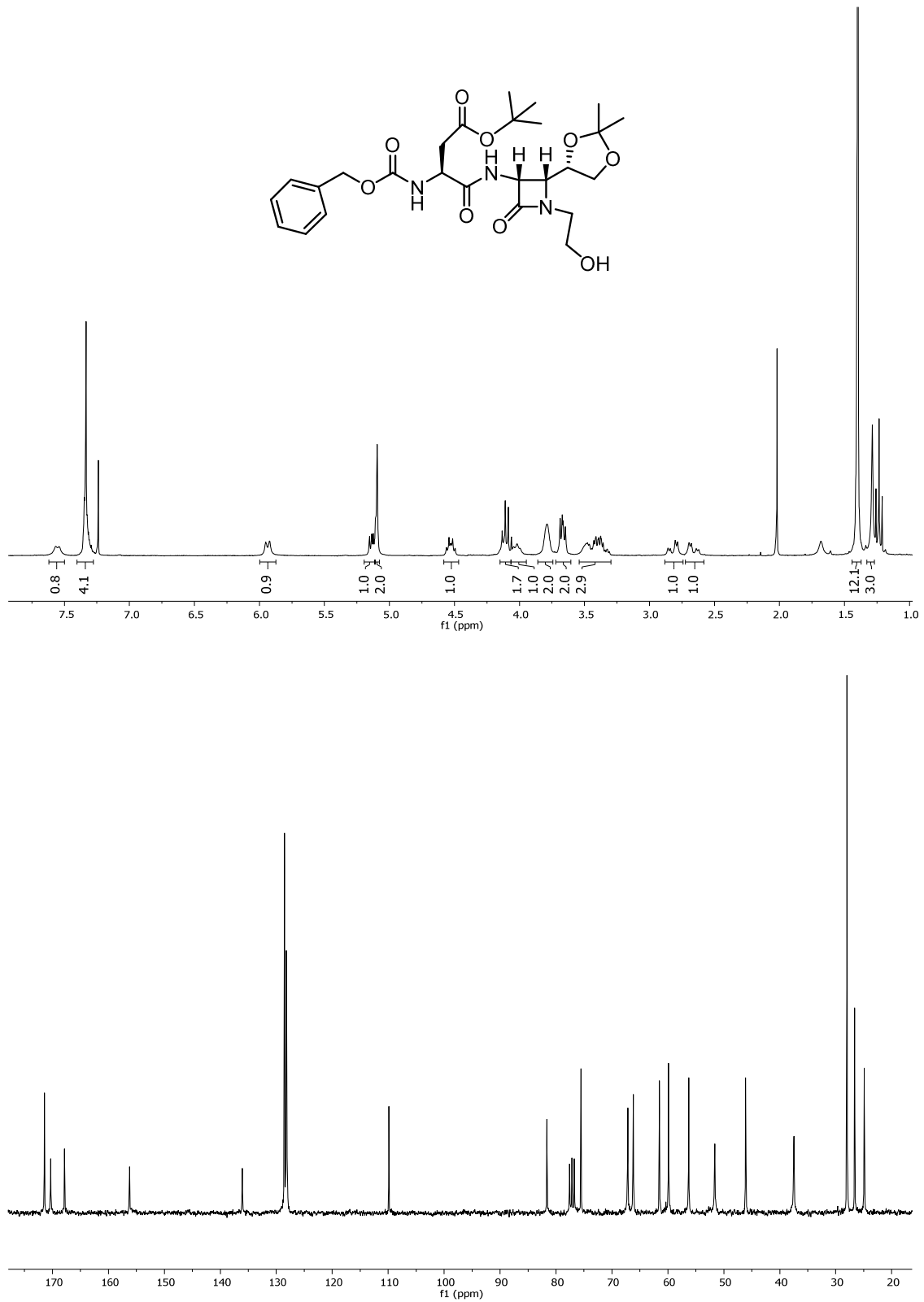
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-{(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-[3-(*tert*-butildimetilsilil)propil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (21.6):**



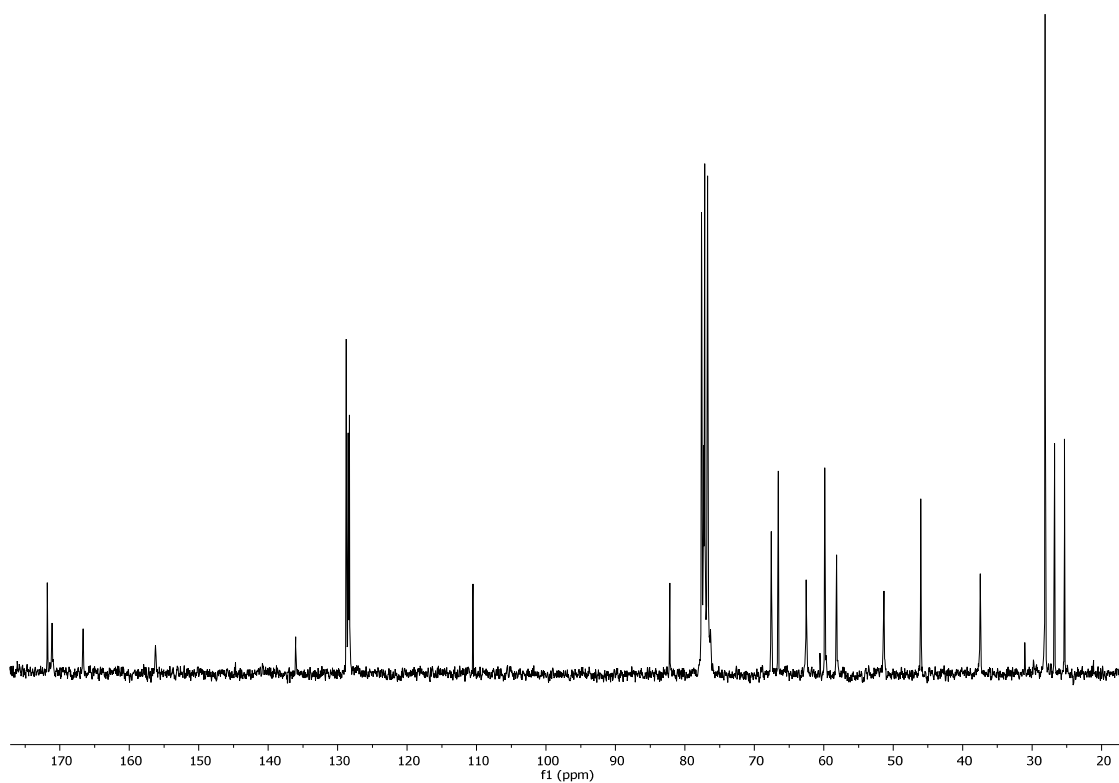
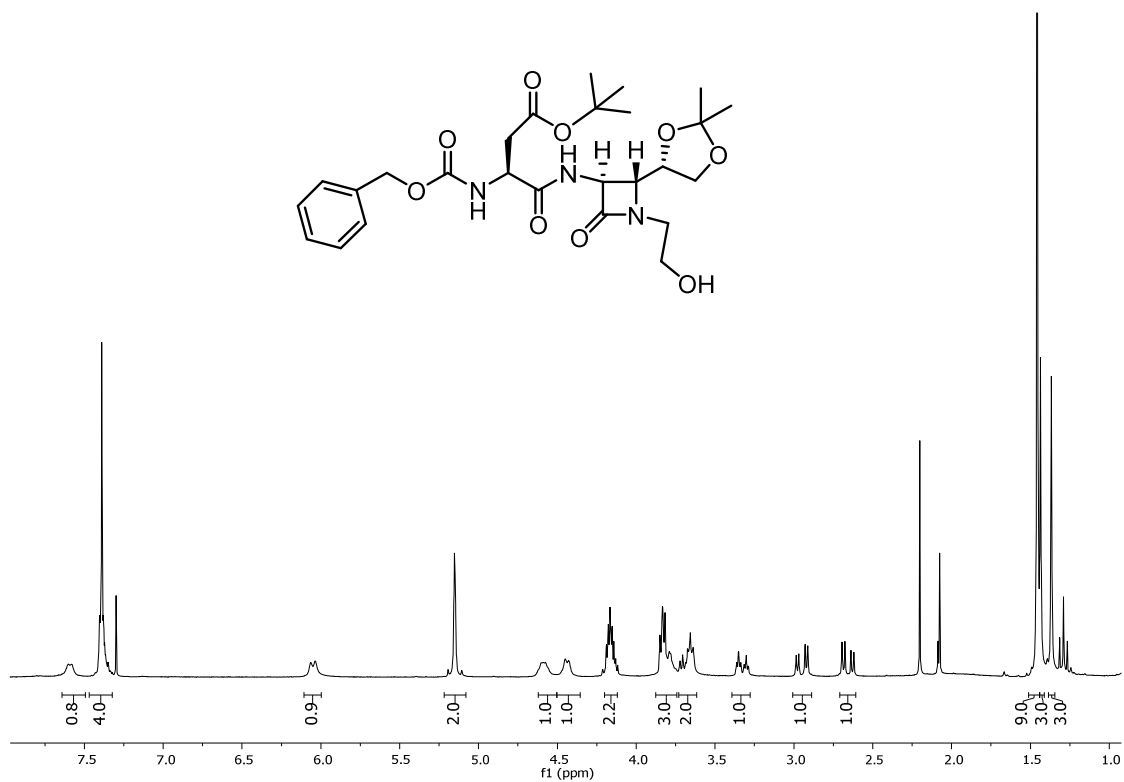
**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-{(3*S*,4*R*)-3-amino-1-[2-(*terc*-butildimetilsilil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona} (16.6):**



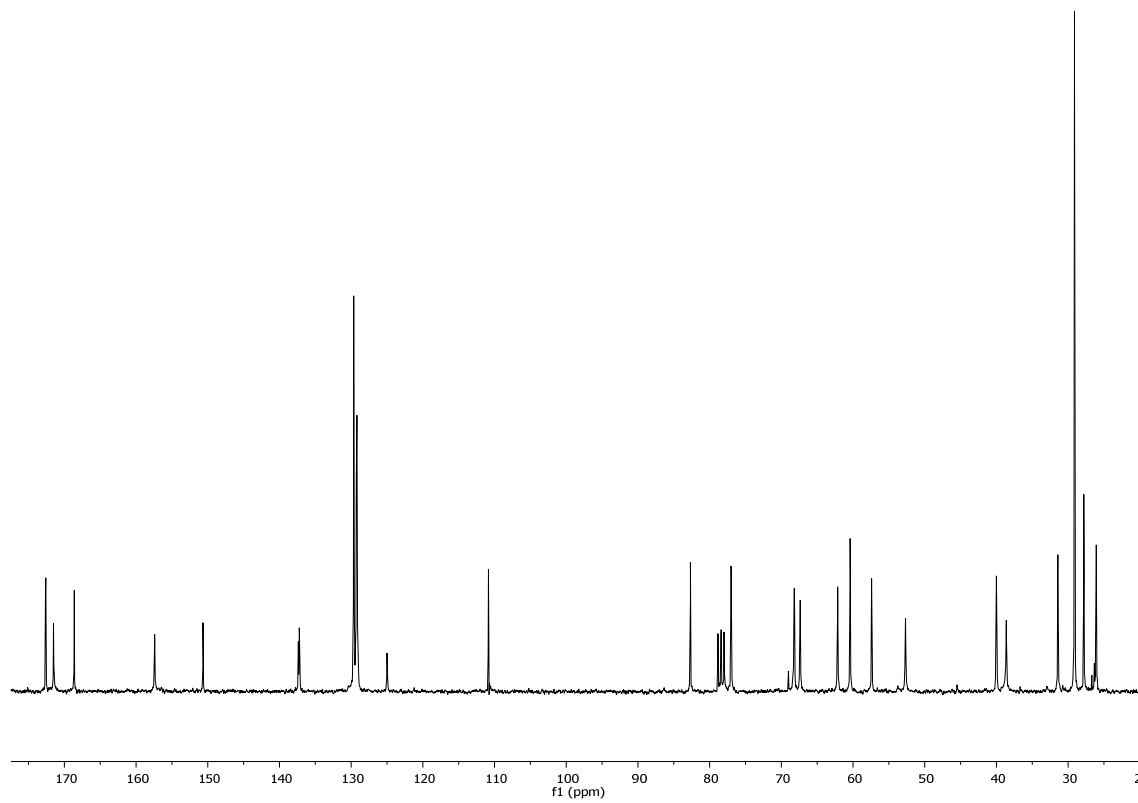
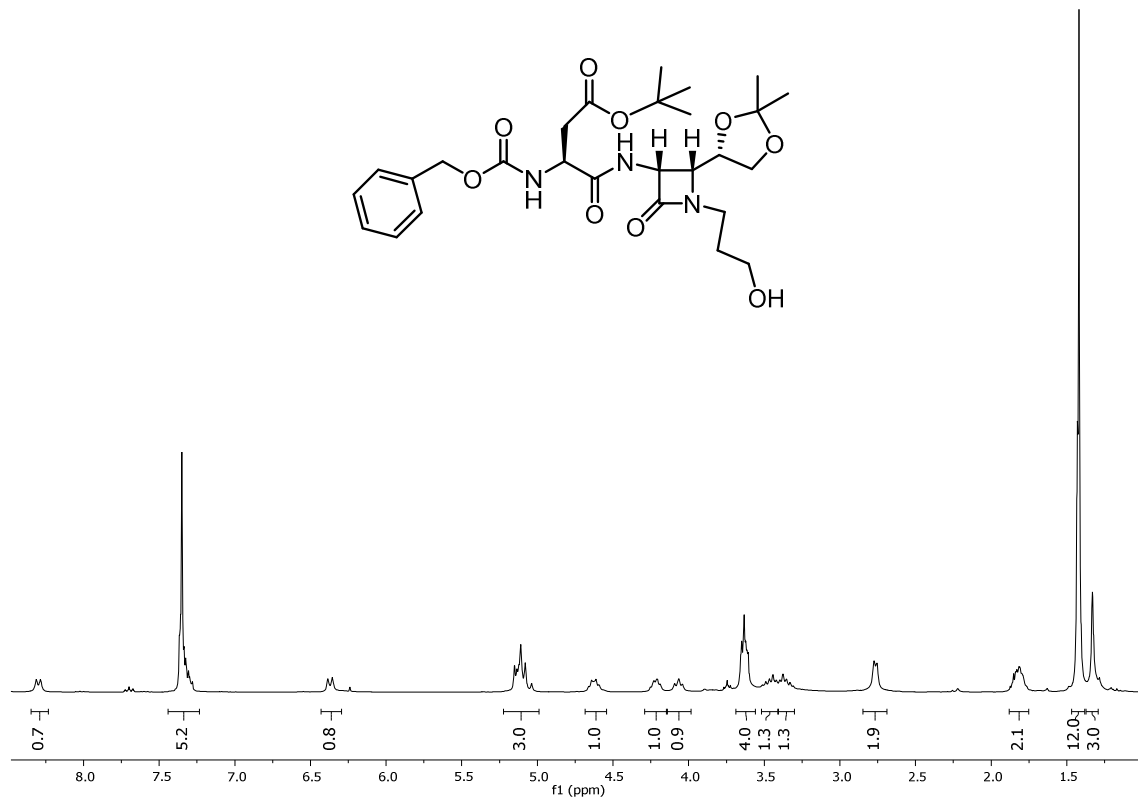
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxietyl)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (2.7):**



**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxi-etil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona] (4.7):**

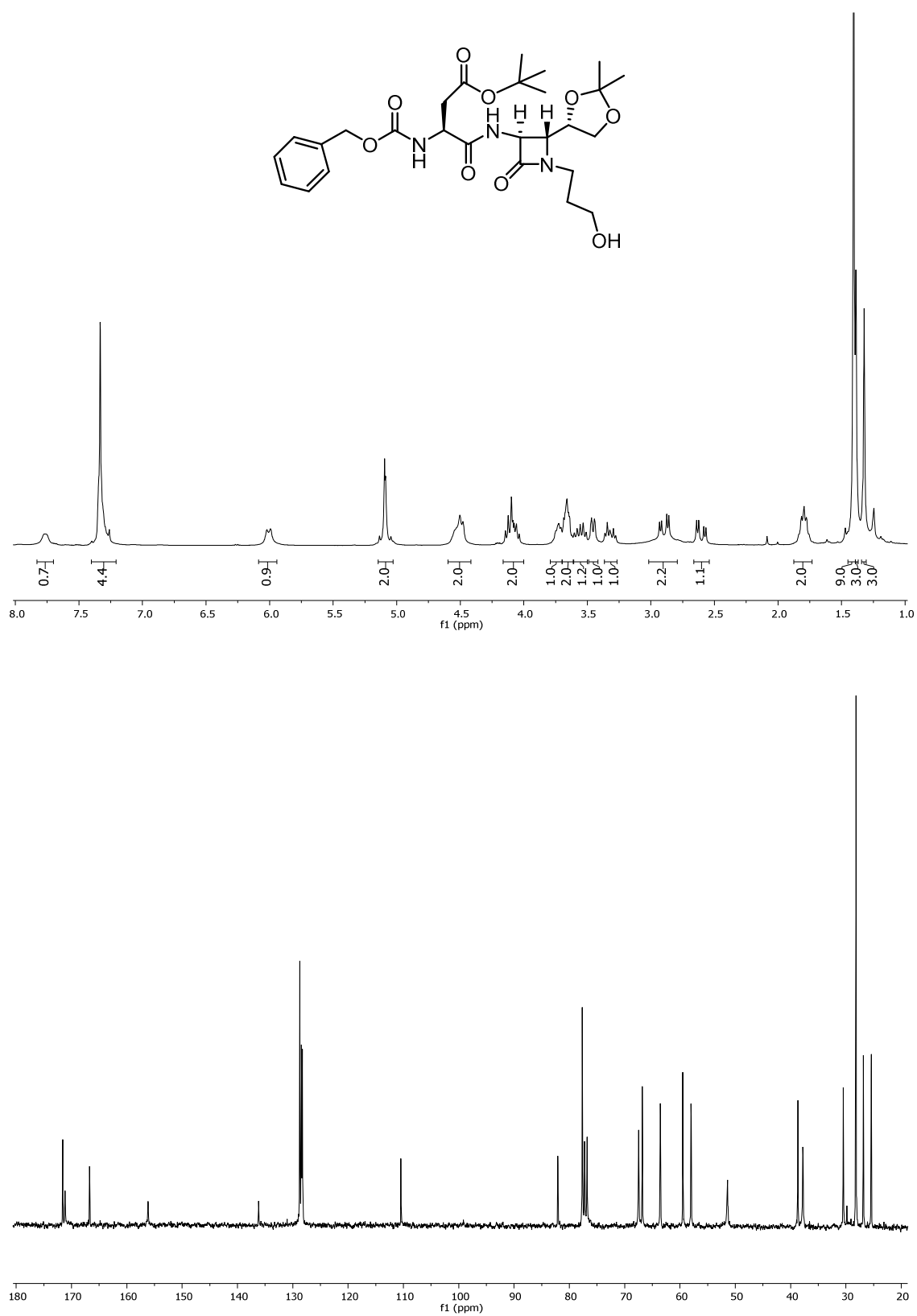


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (7.7):**

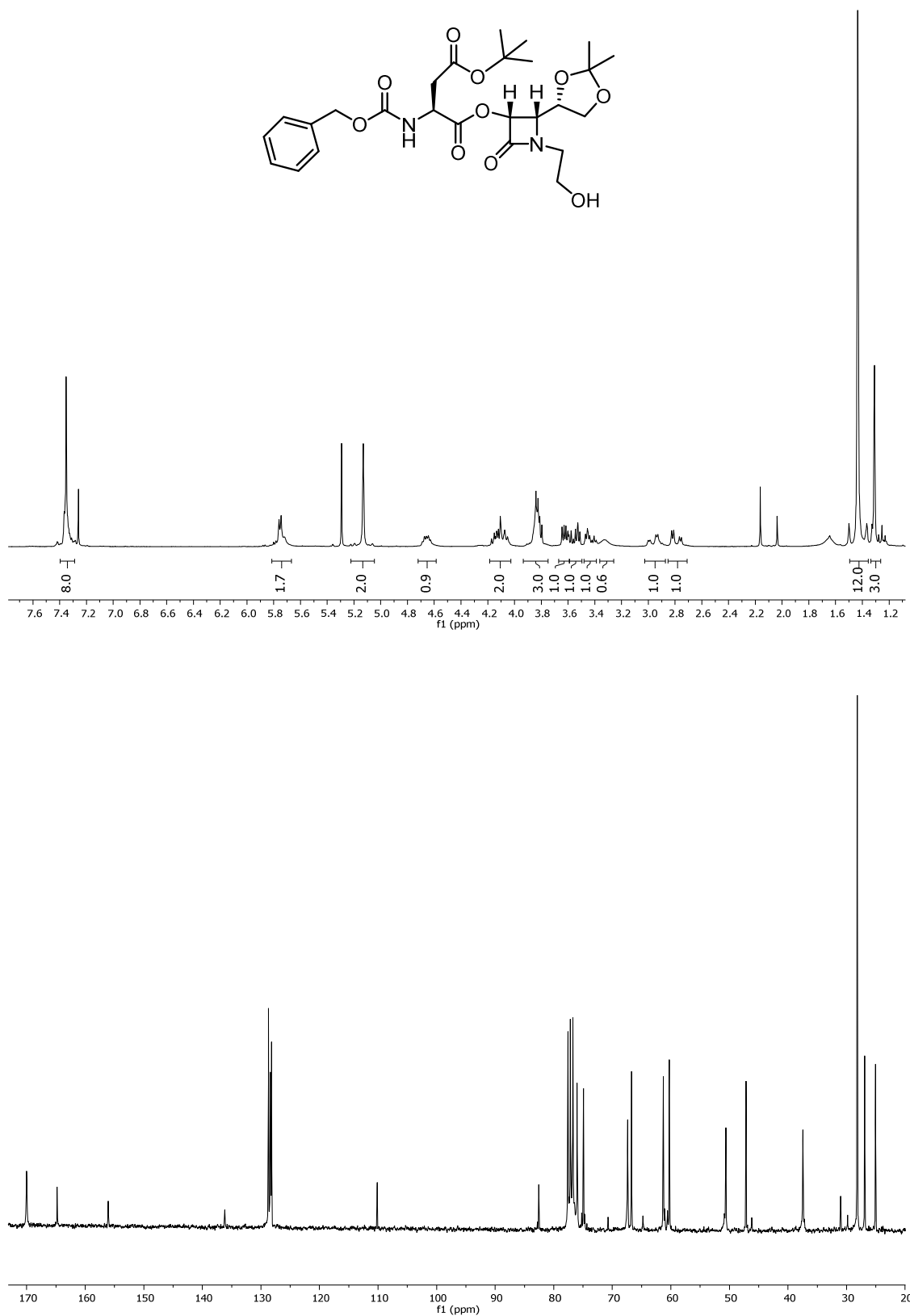




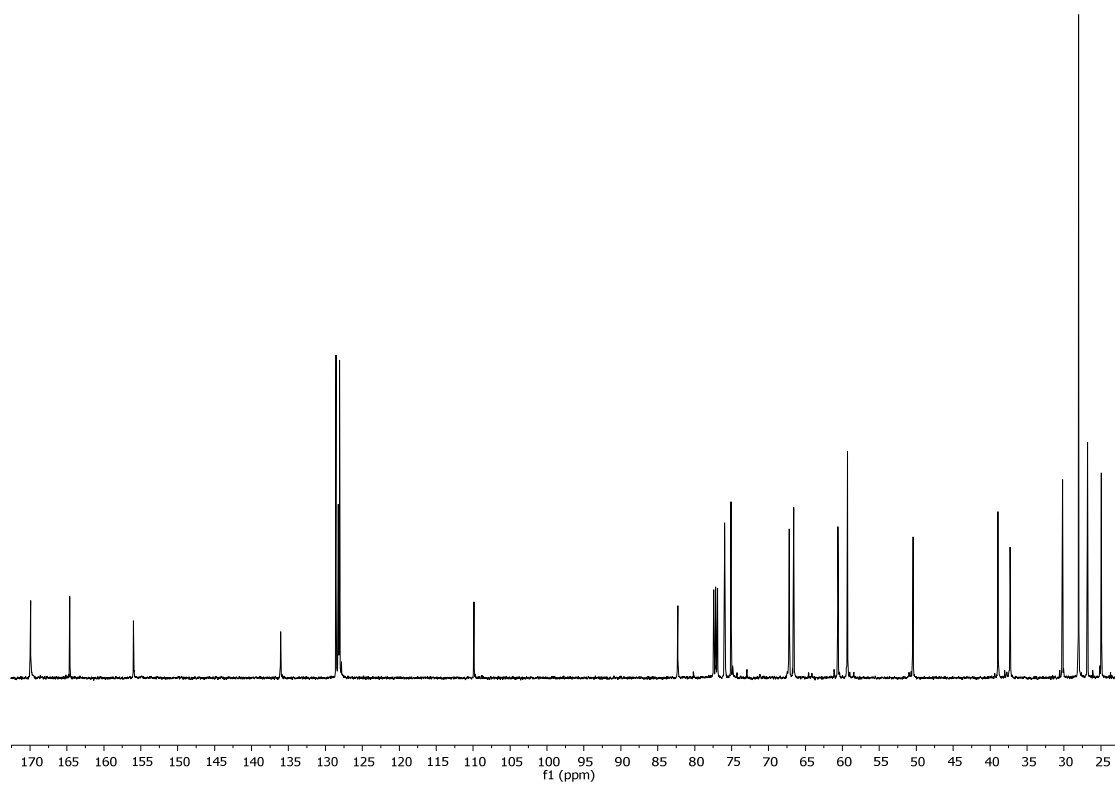
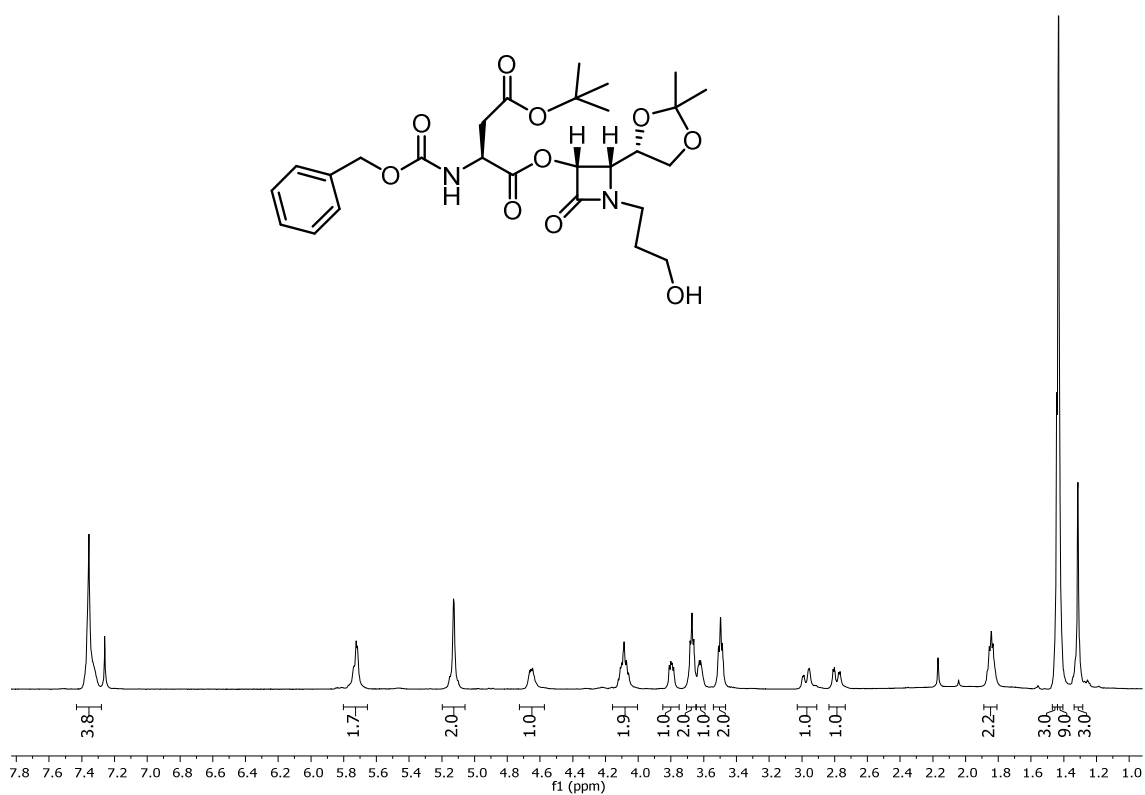
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (8.7):**



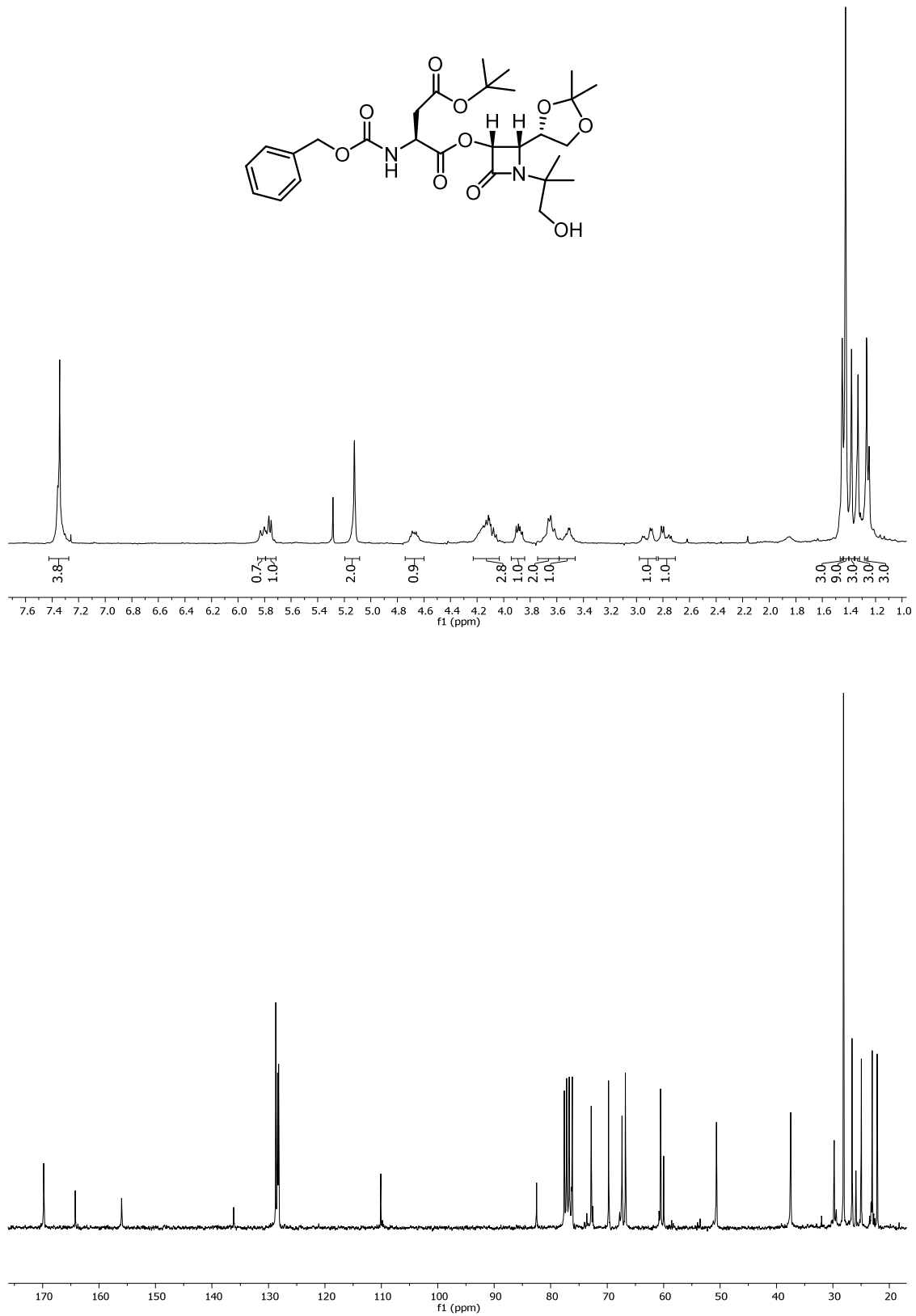
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (1.7):**



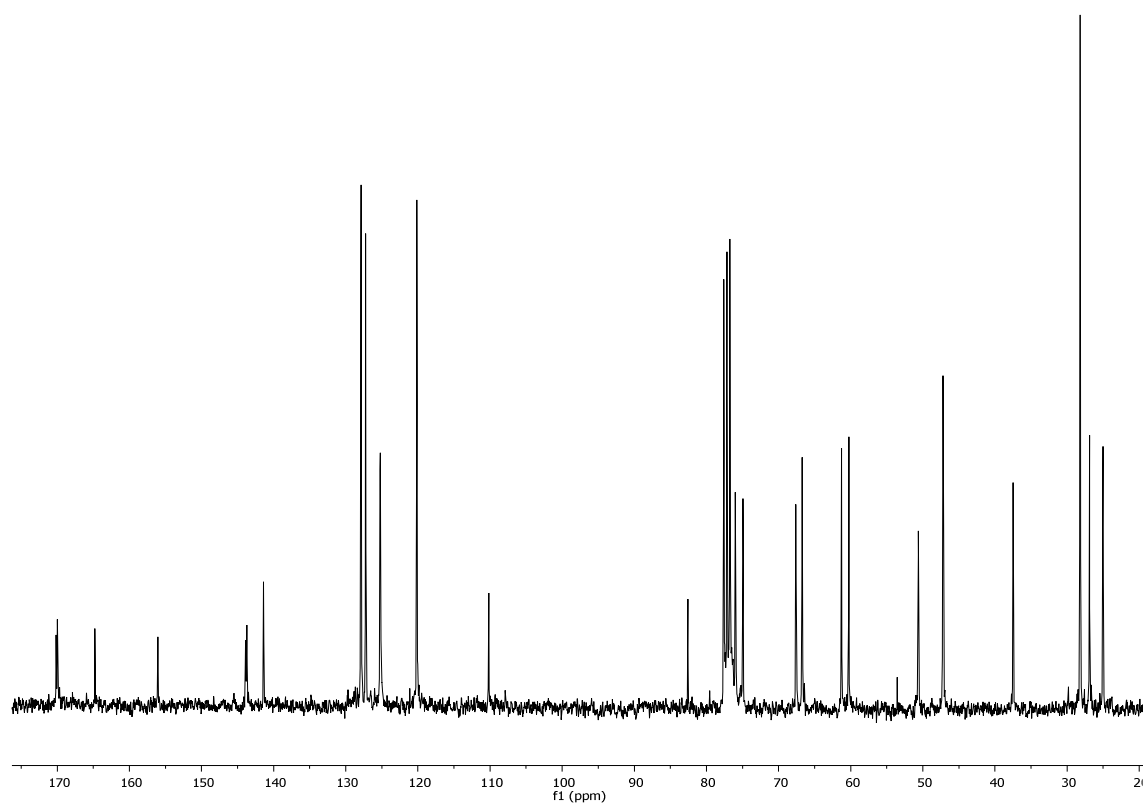
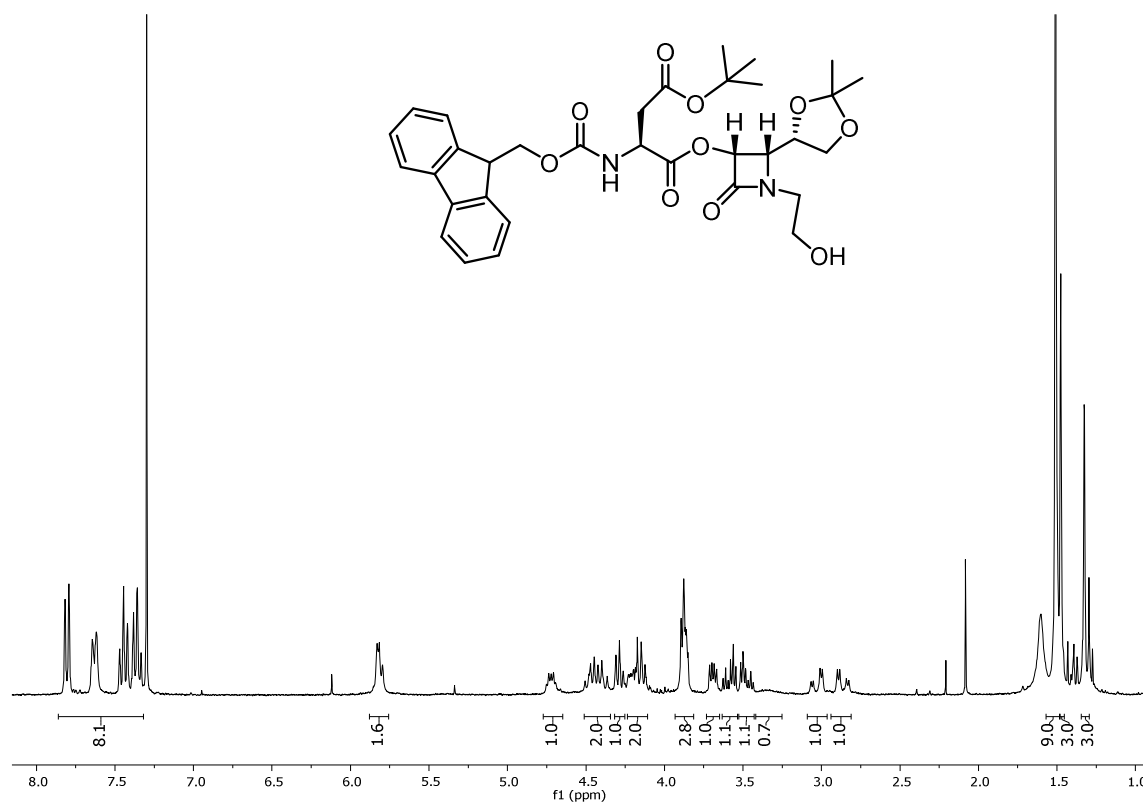
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (9.7):**



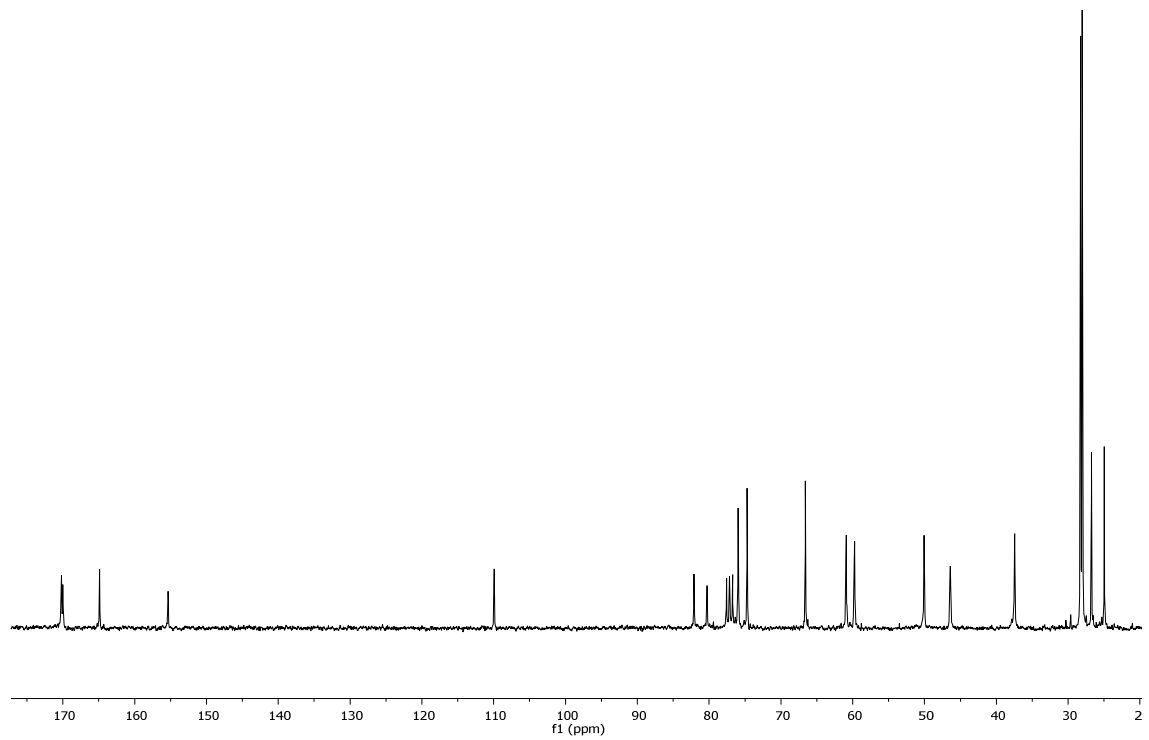
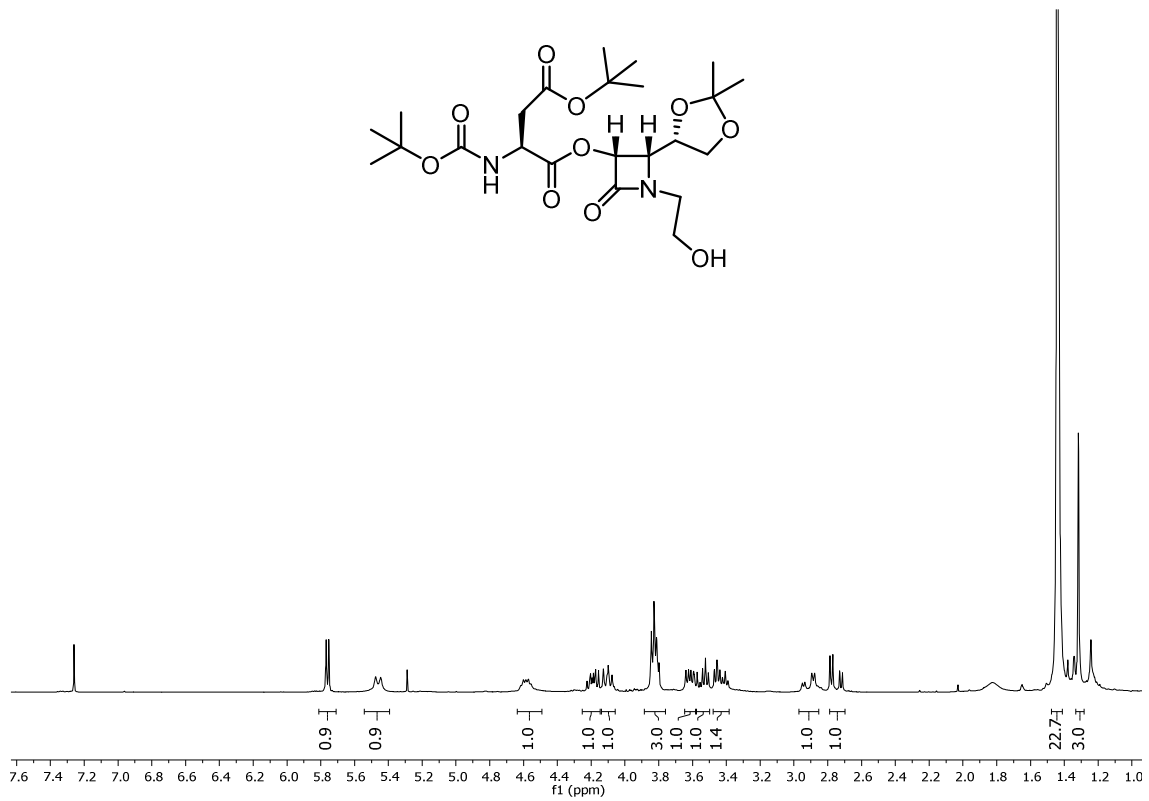
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxi-1,1-dimetil)etil]-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona] (15.7):**



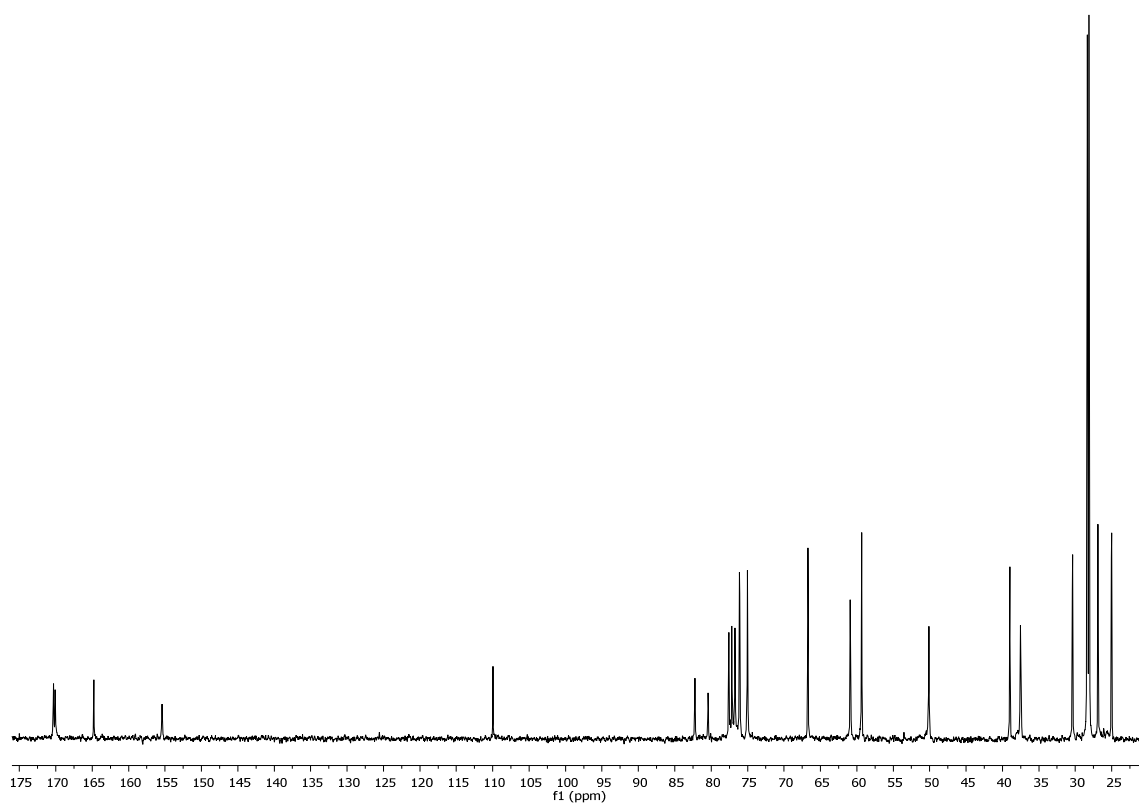
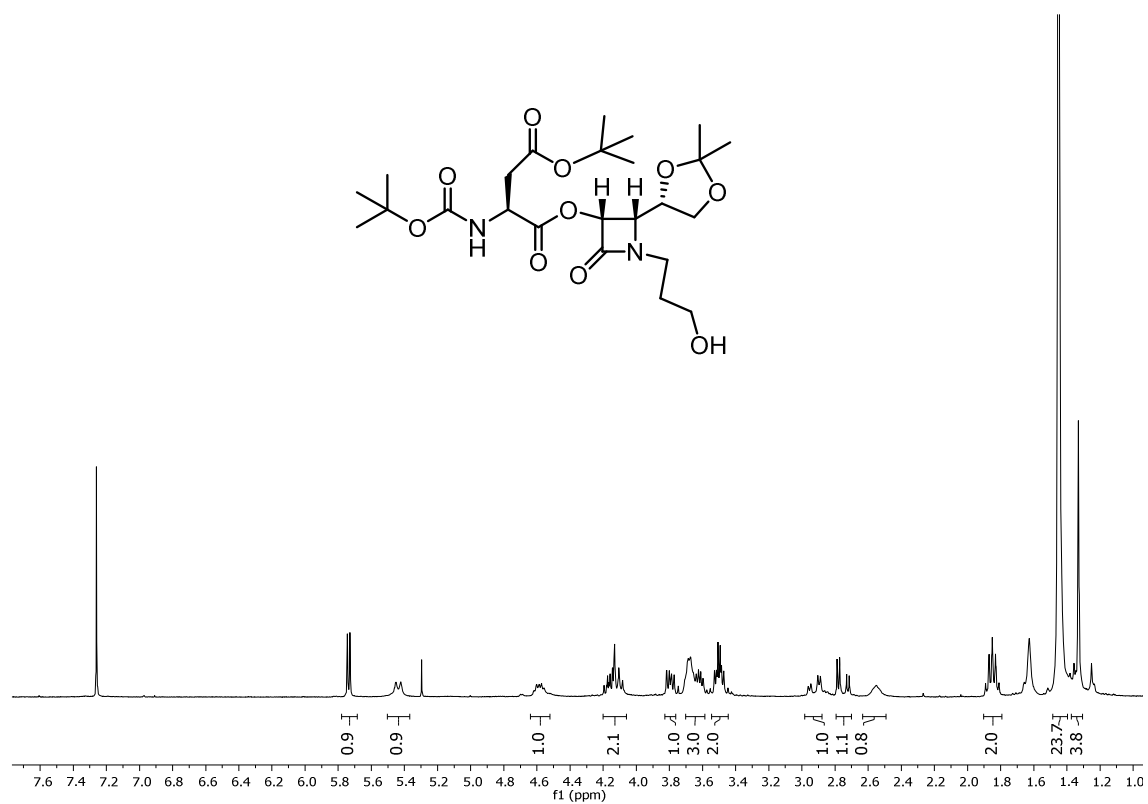
**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.7a):**



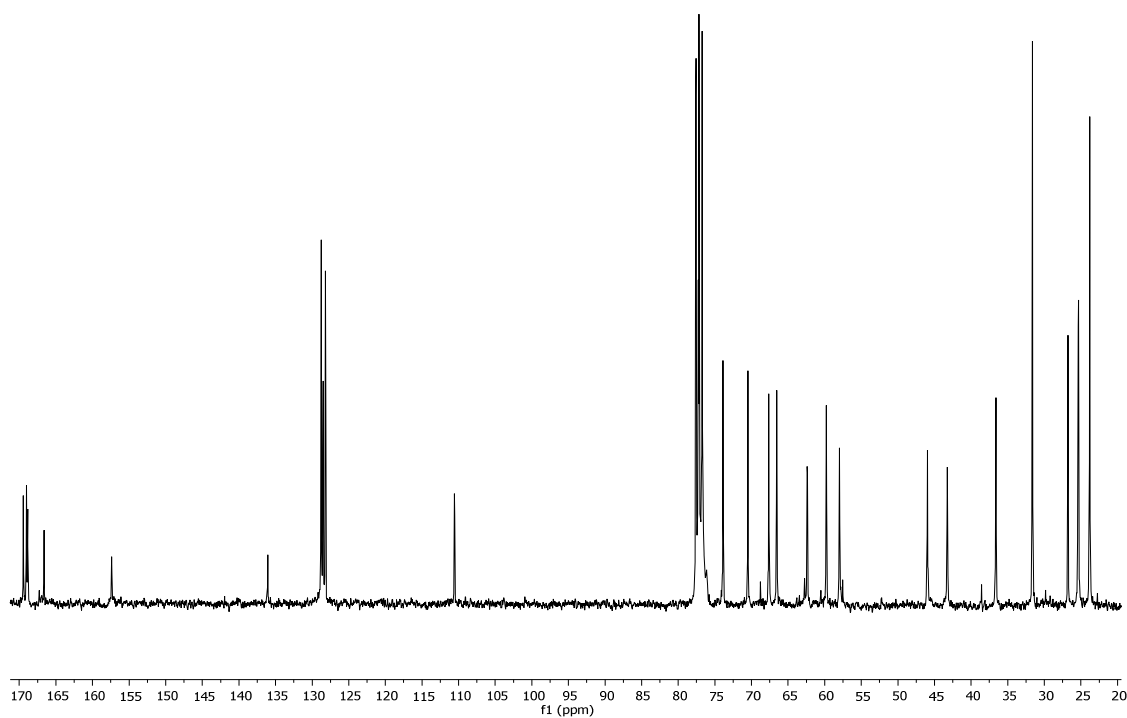
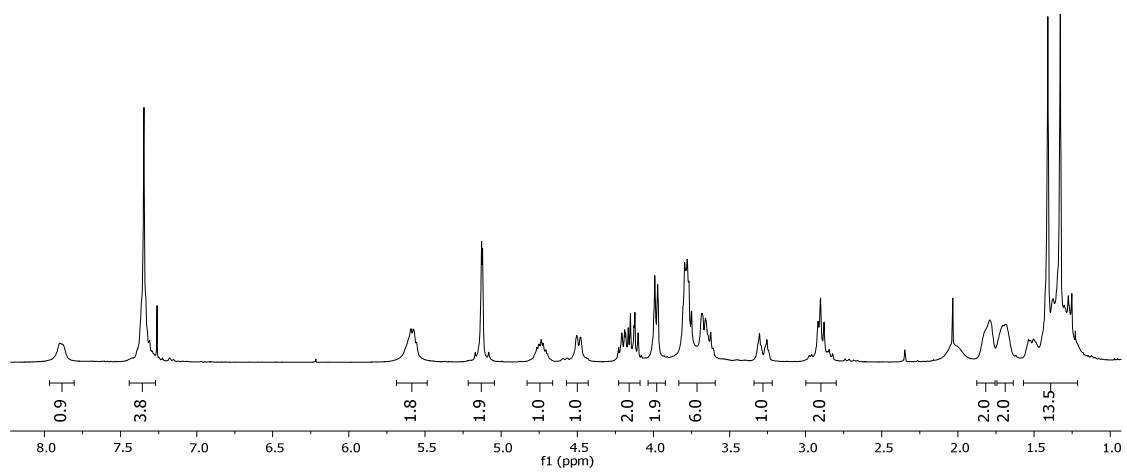
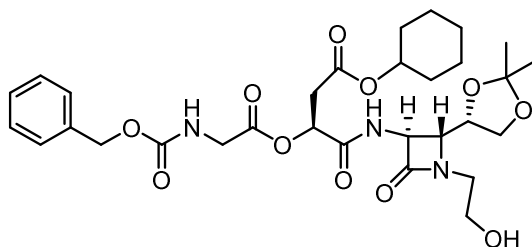
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(2-hidroxietyl)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.7b):**



**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(3-hidroxiopropil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (21.7):**

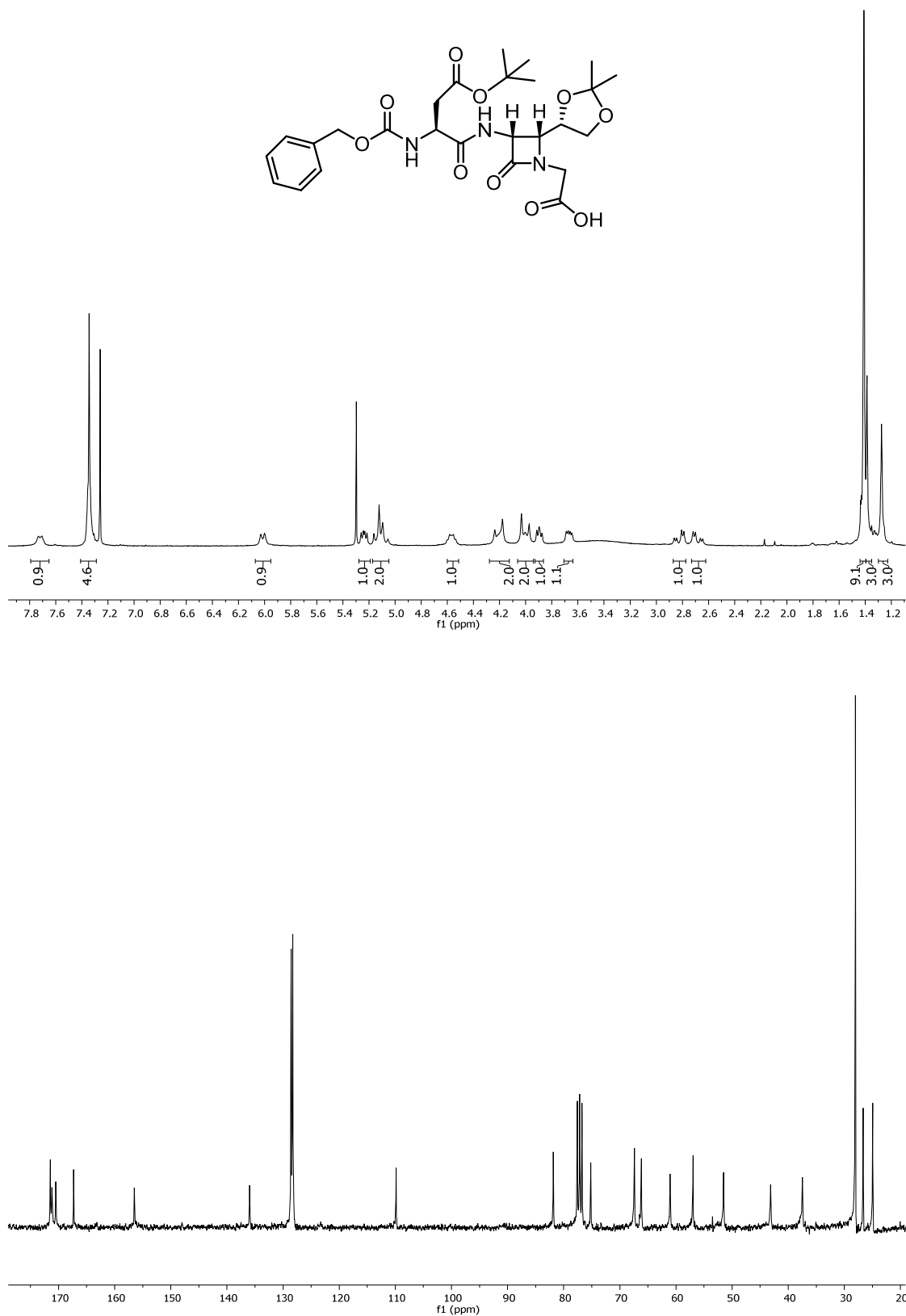


**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-(2-hidroxietil)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona] (16.7):**

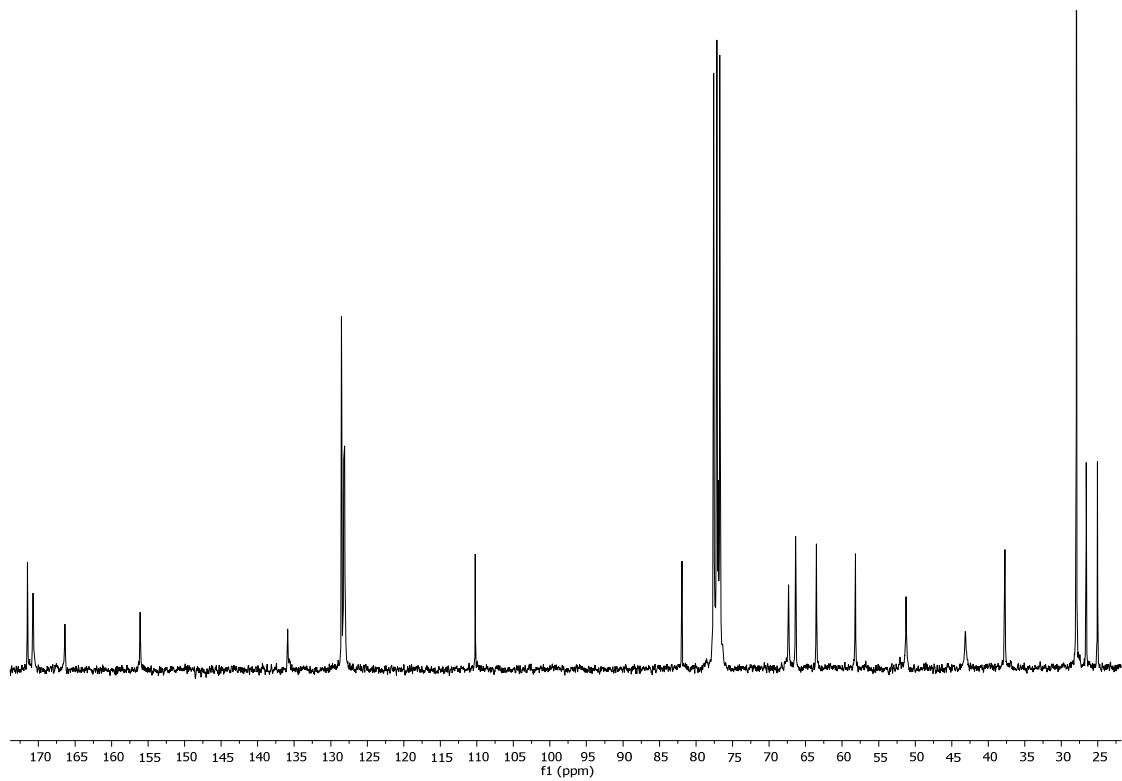
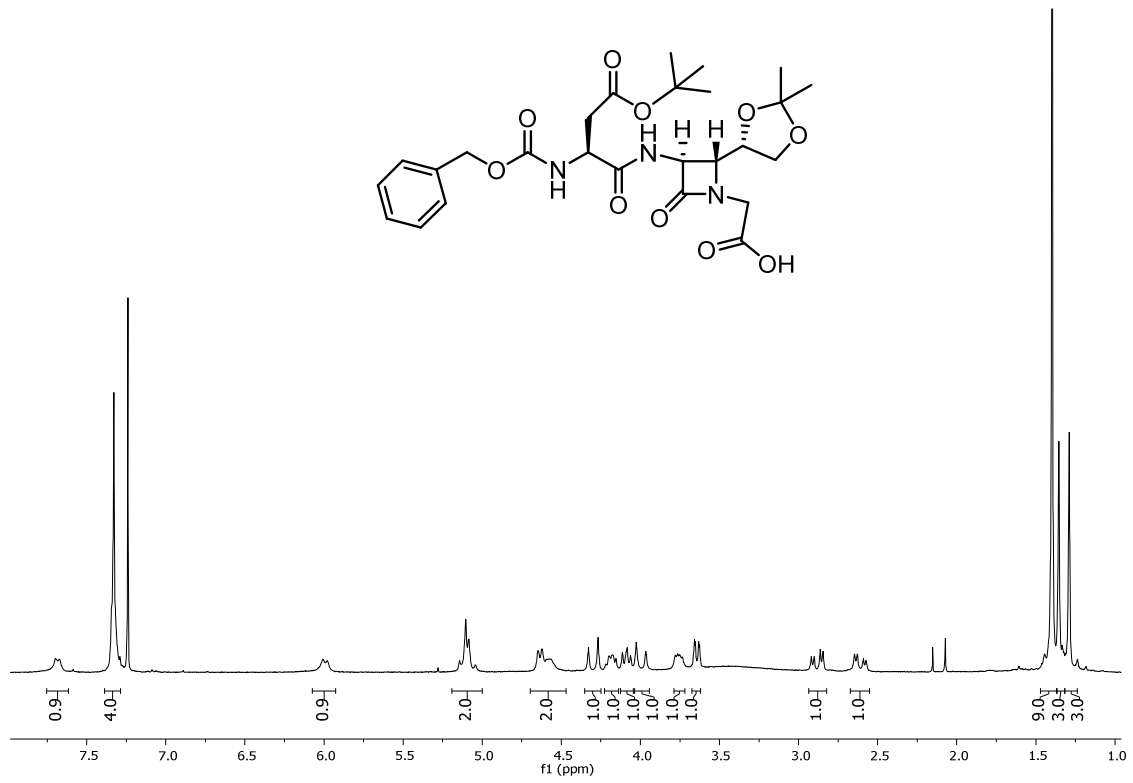




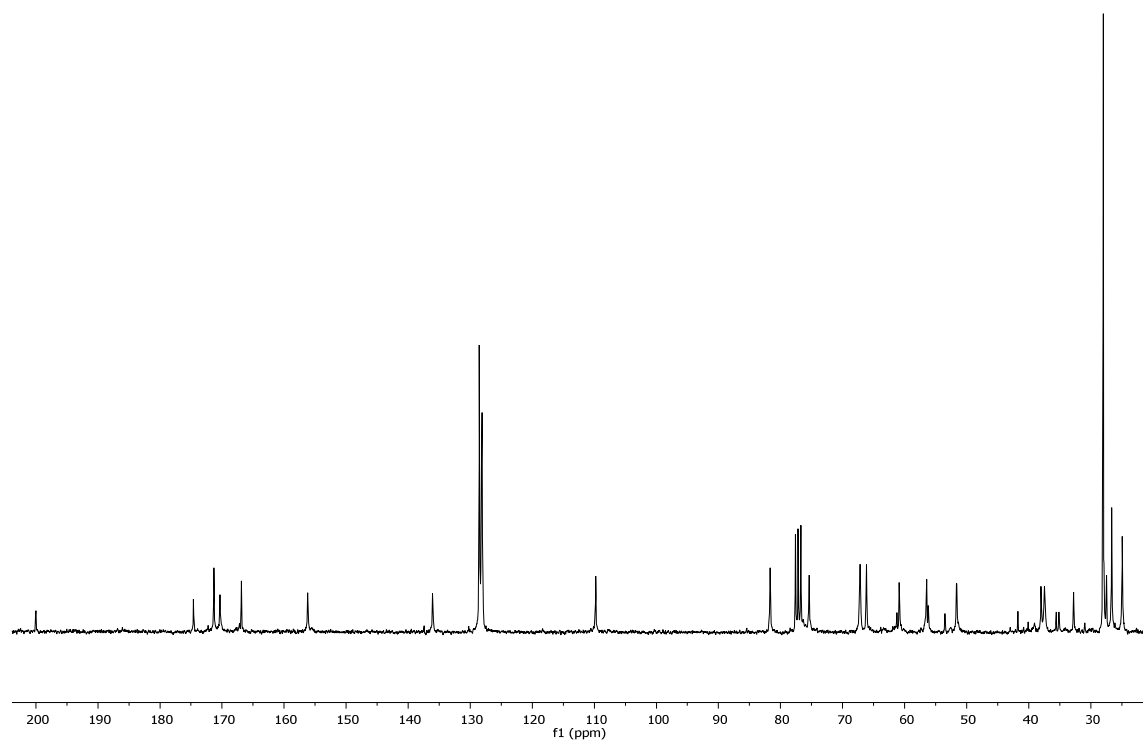
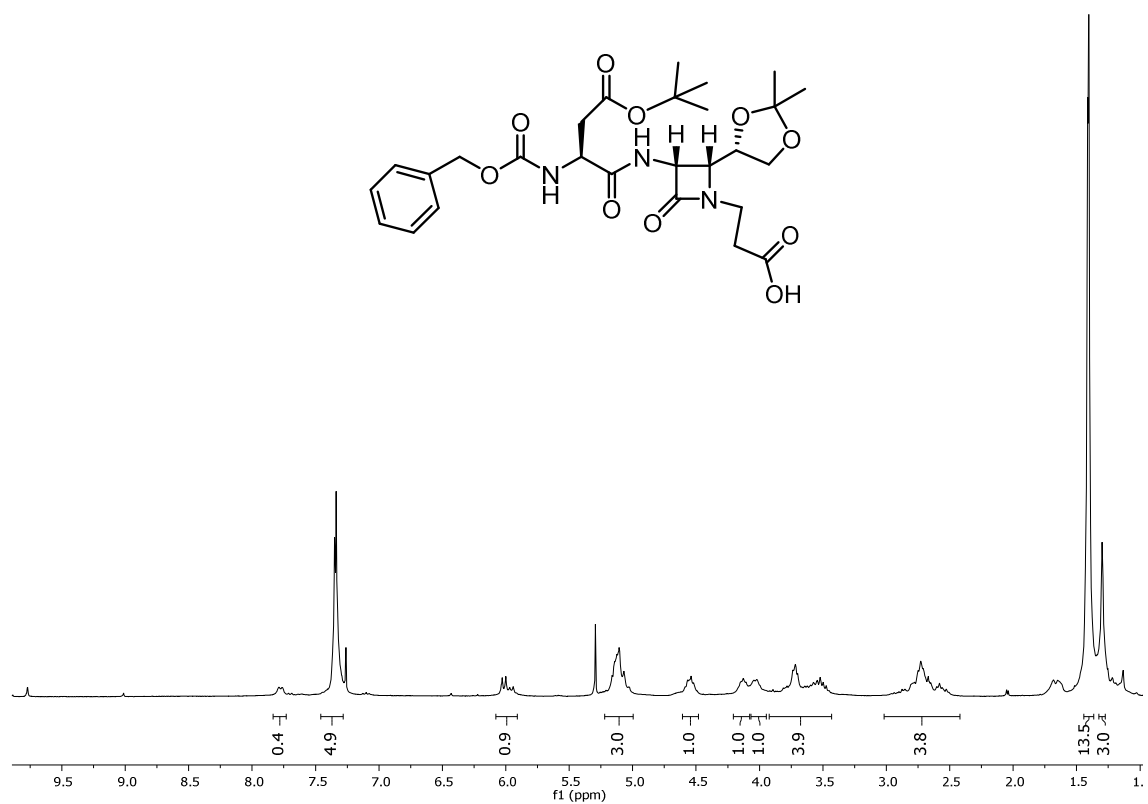
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-carboximetilen-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (2.8):**



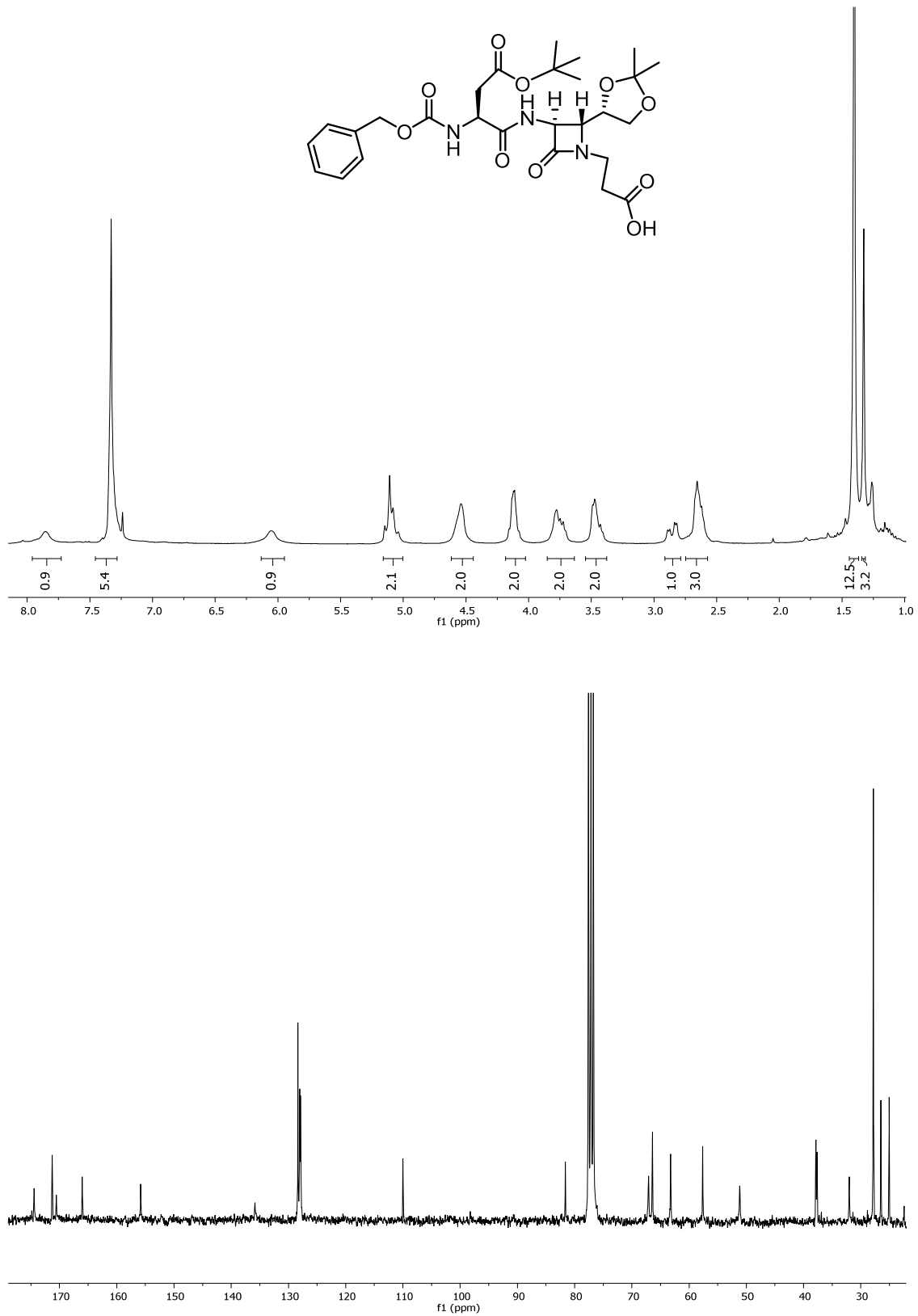
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-carboximetilen-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (4.8):**



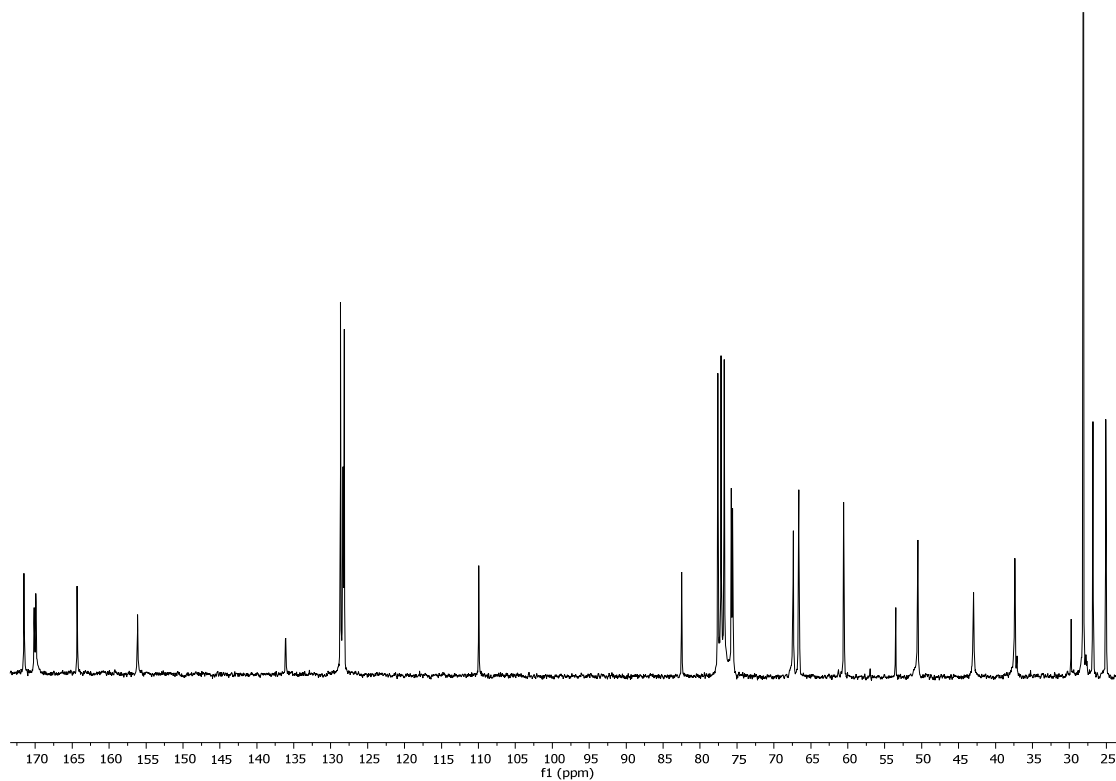
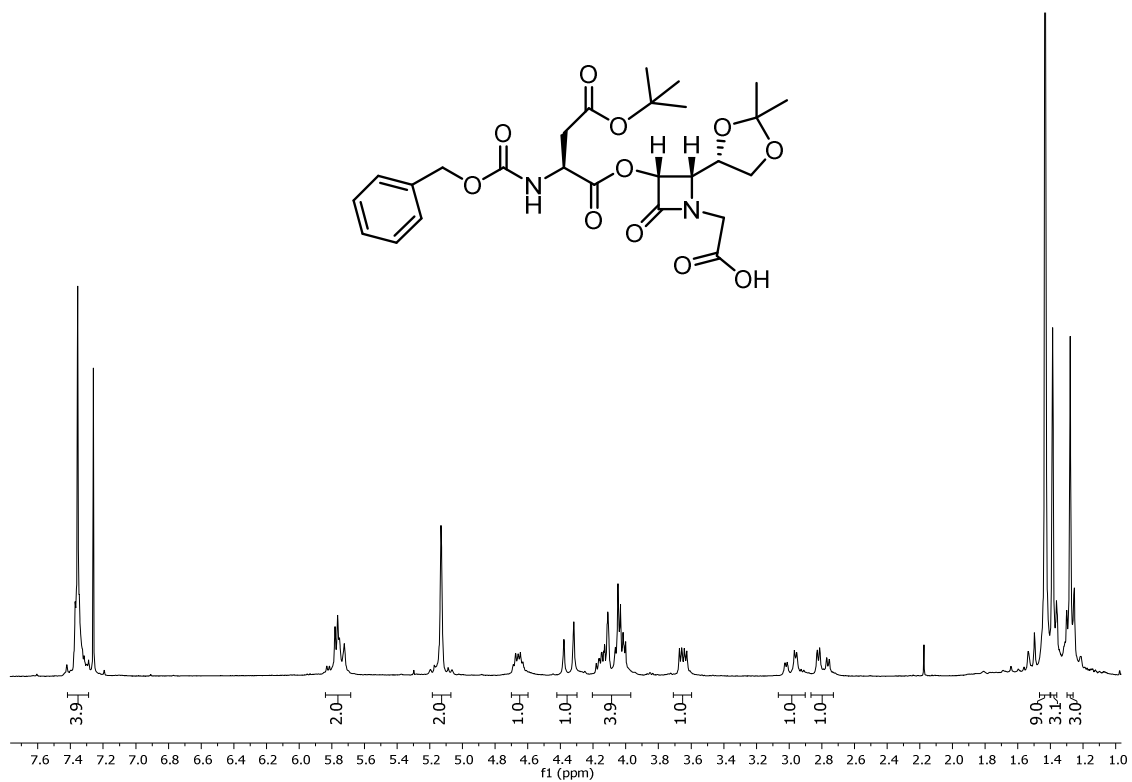
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-1-carboxietilen-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (7.8):**



**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-carboxietilen-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (8.8):**

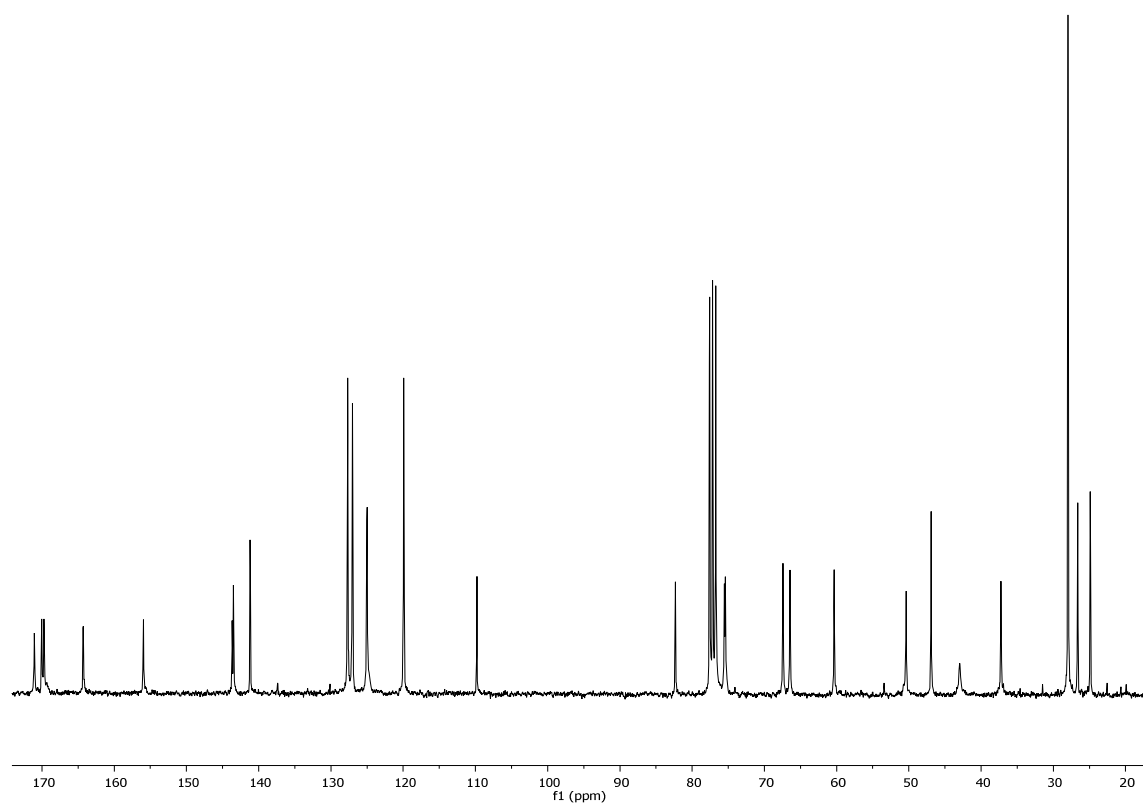
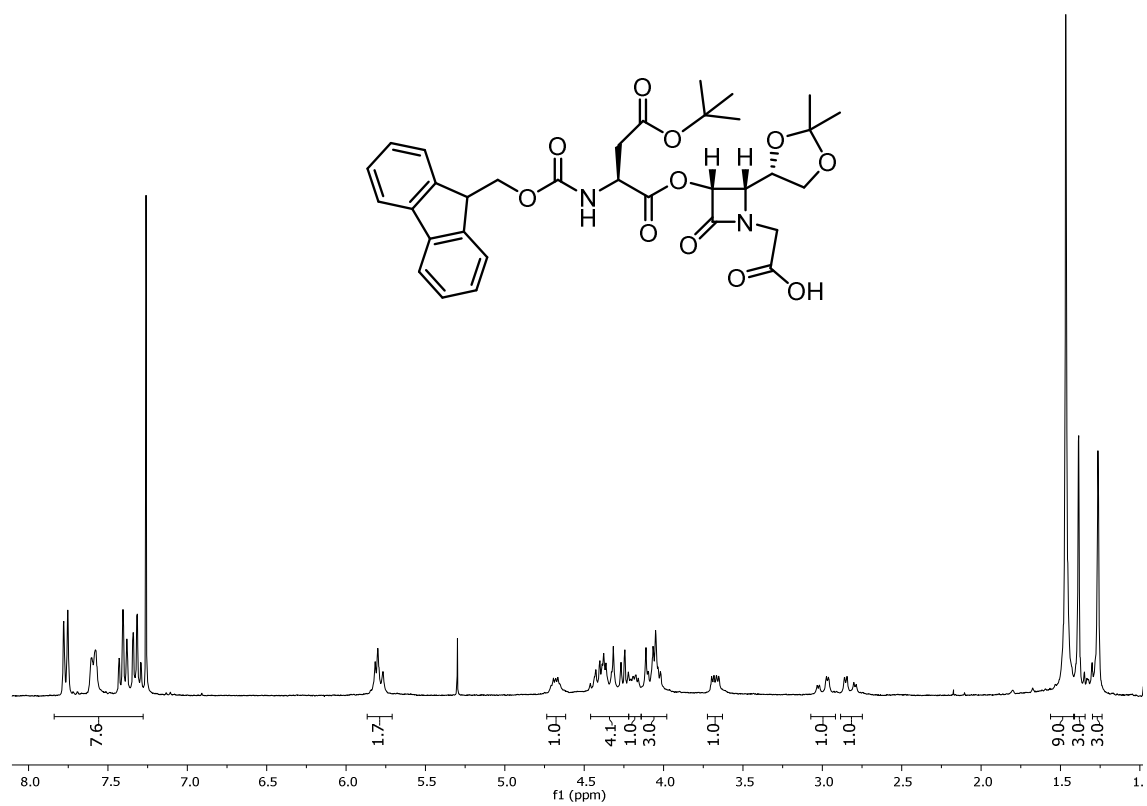


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (1.8):**

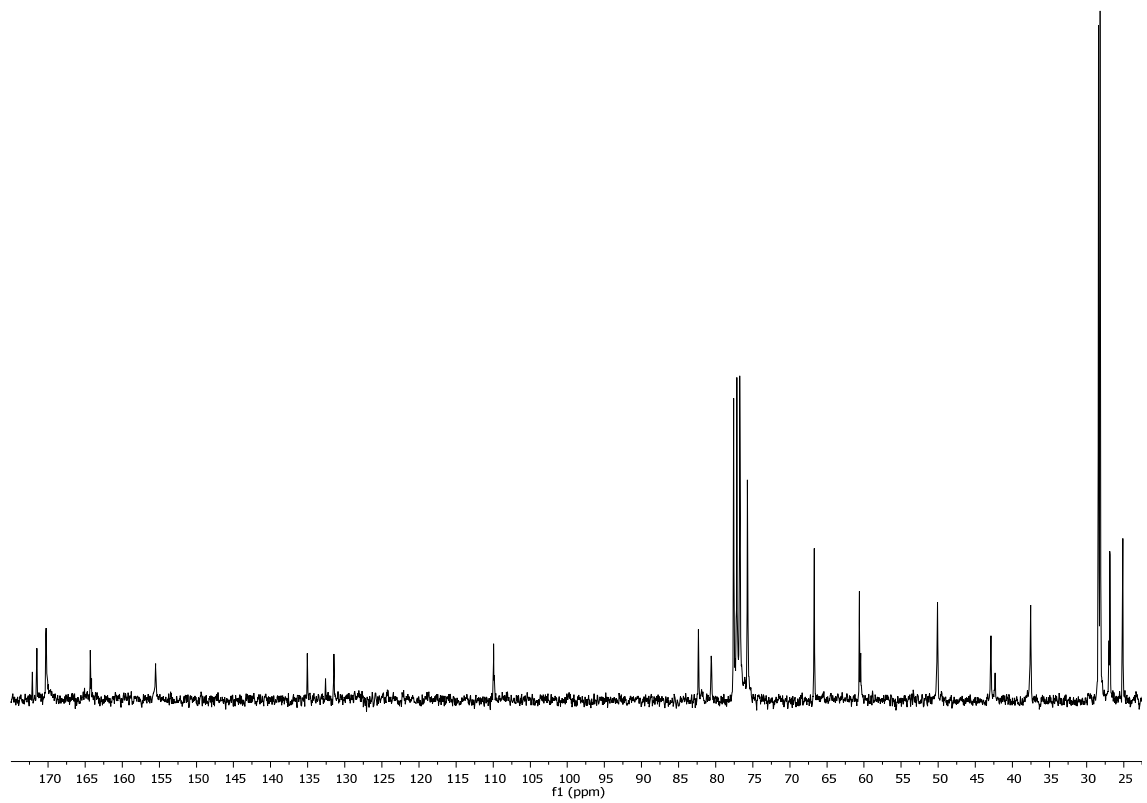
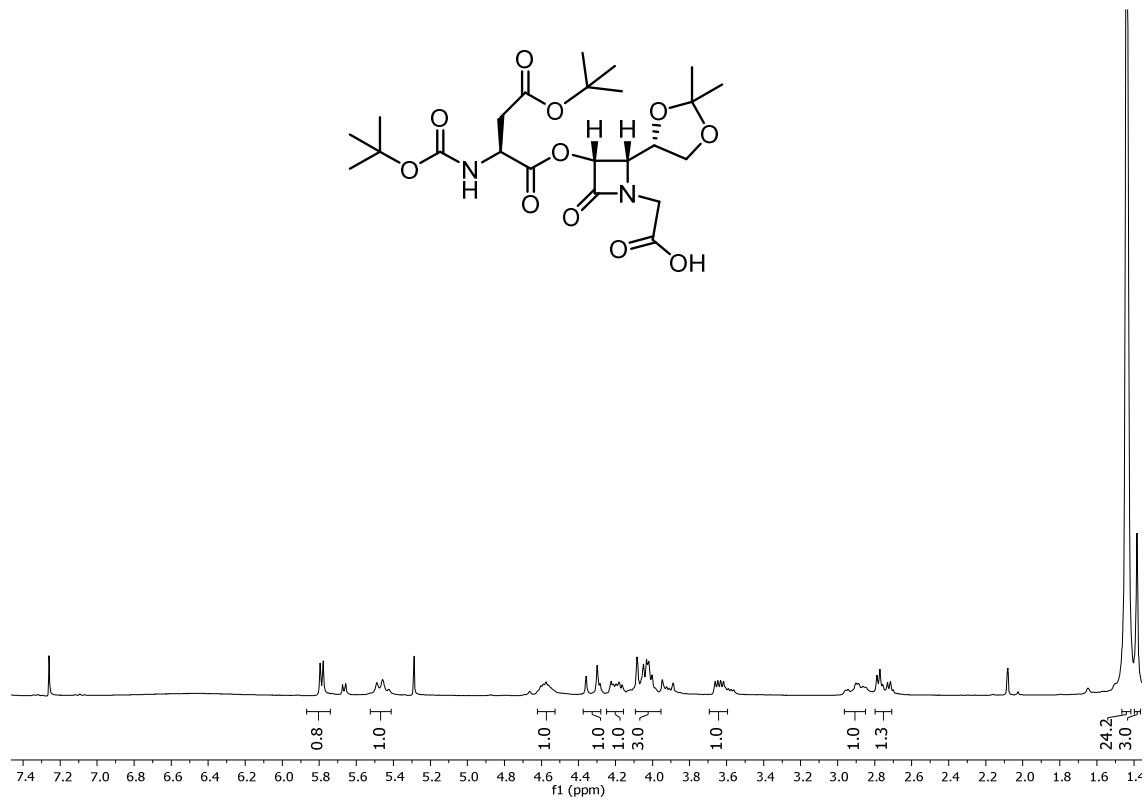




**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.8a):**

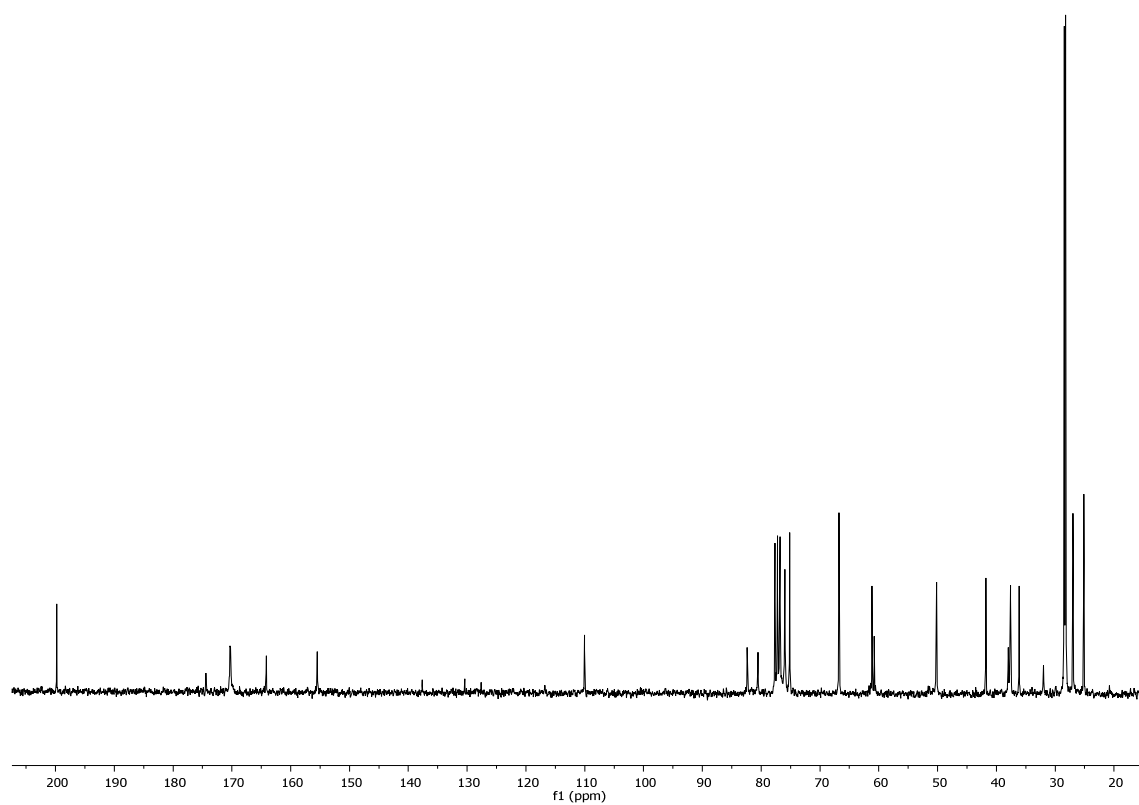
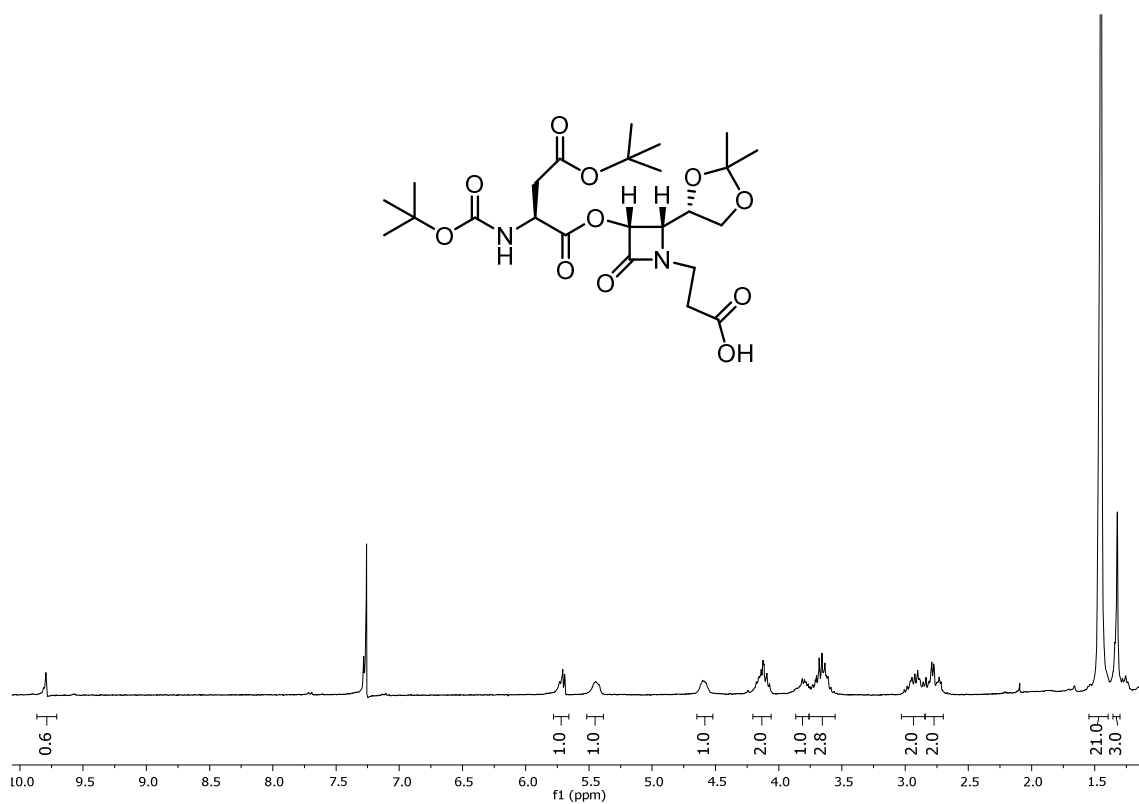


**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboximetilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (24.8b):**

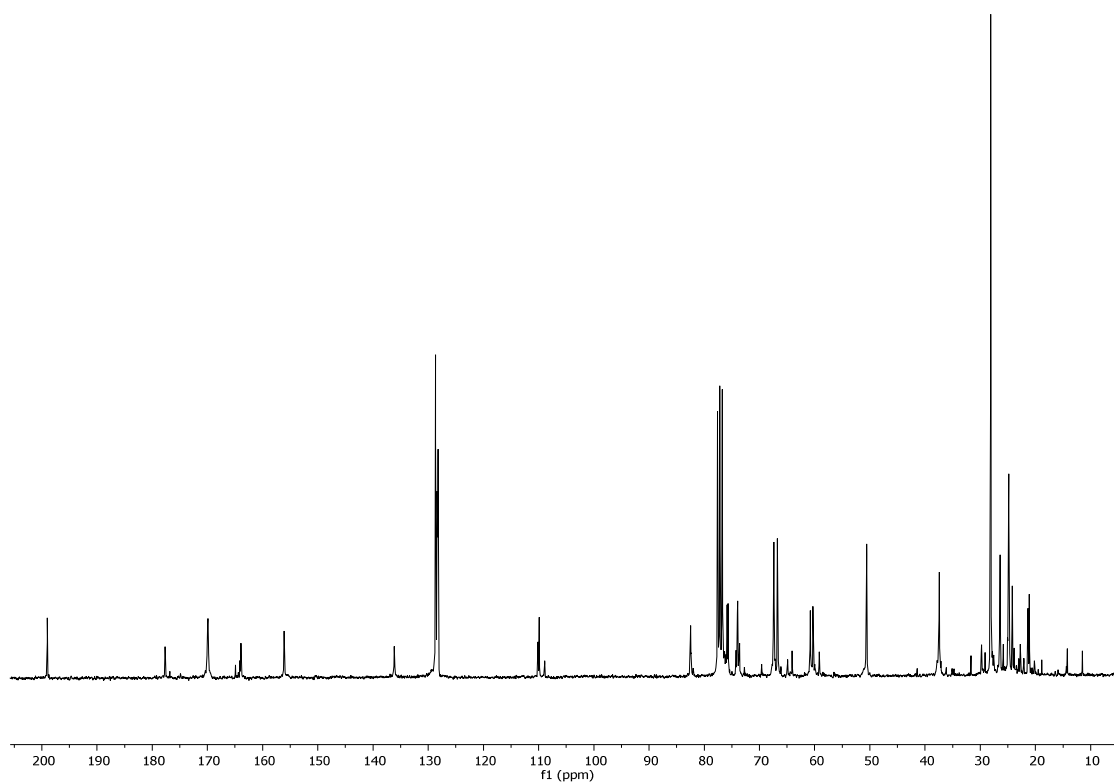
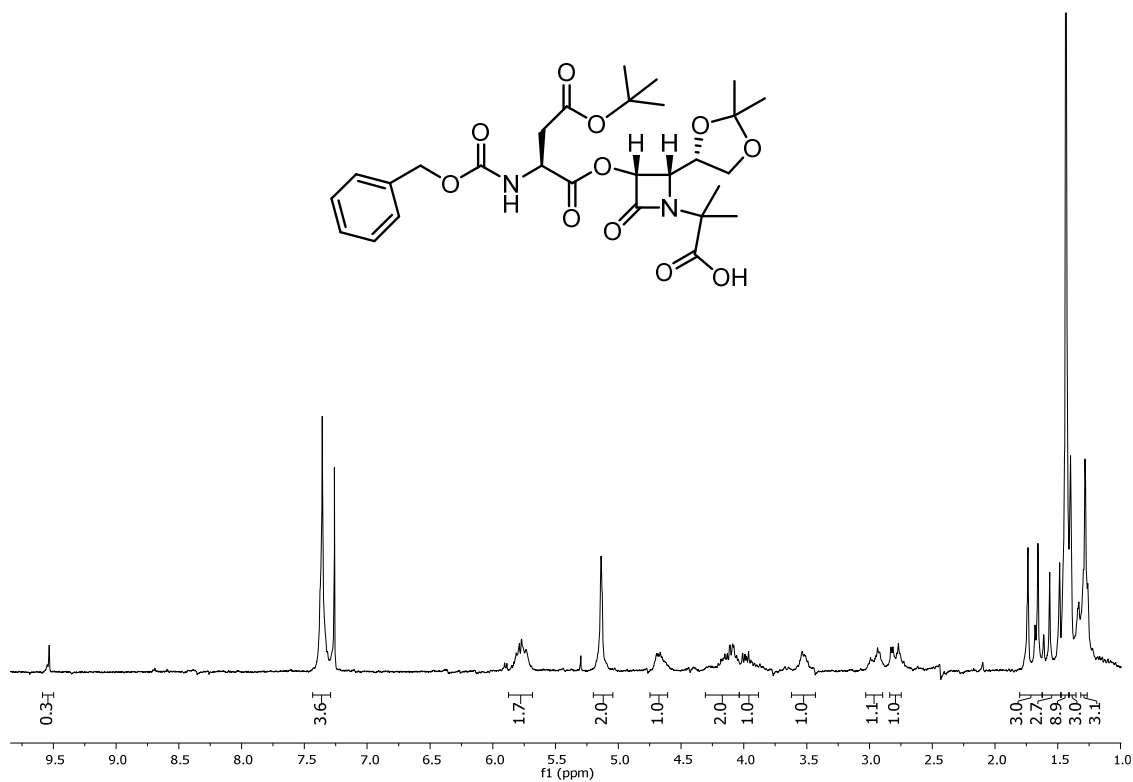




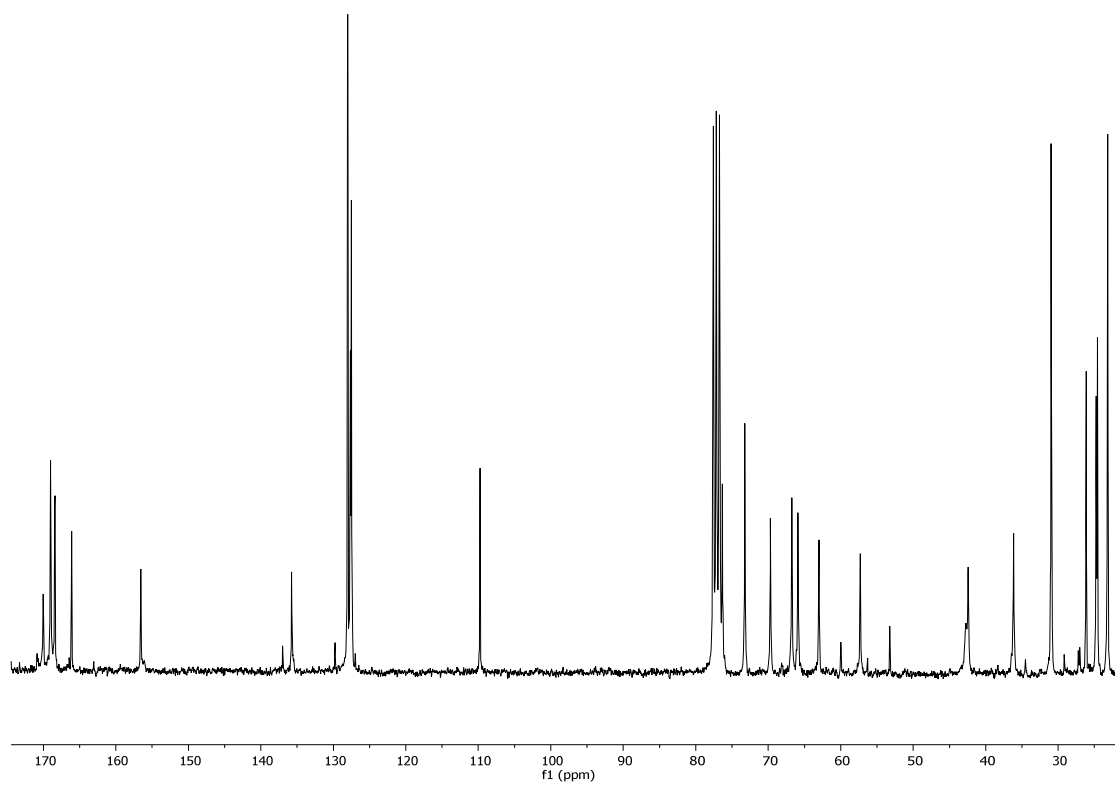
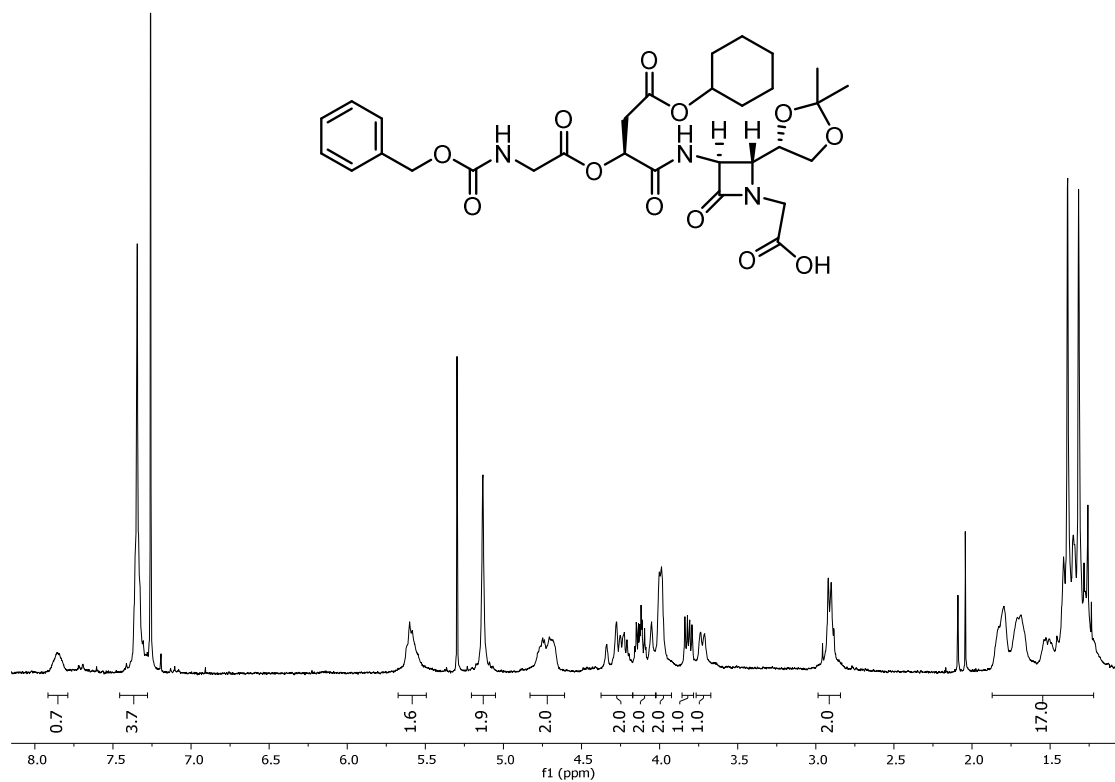
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-1-carboxietilen-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (21.8):**



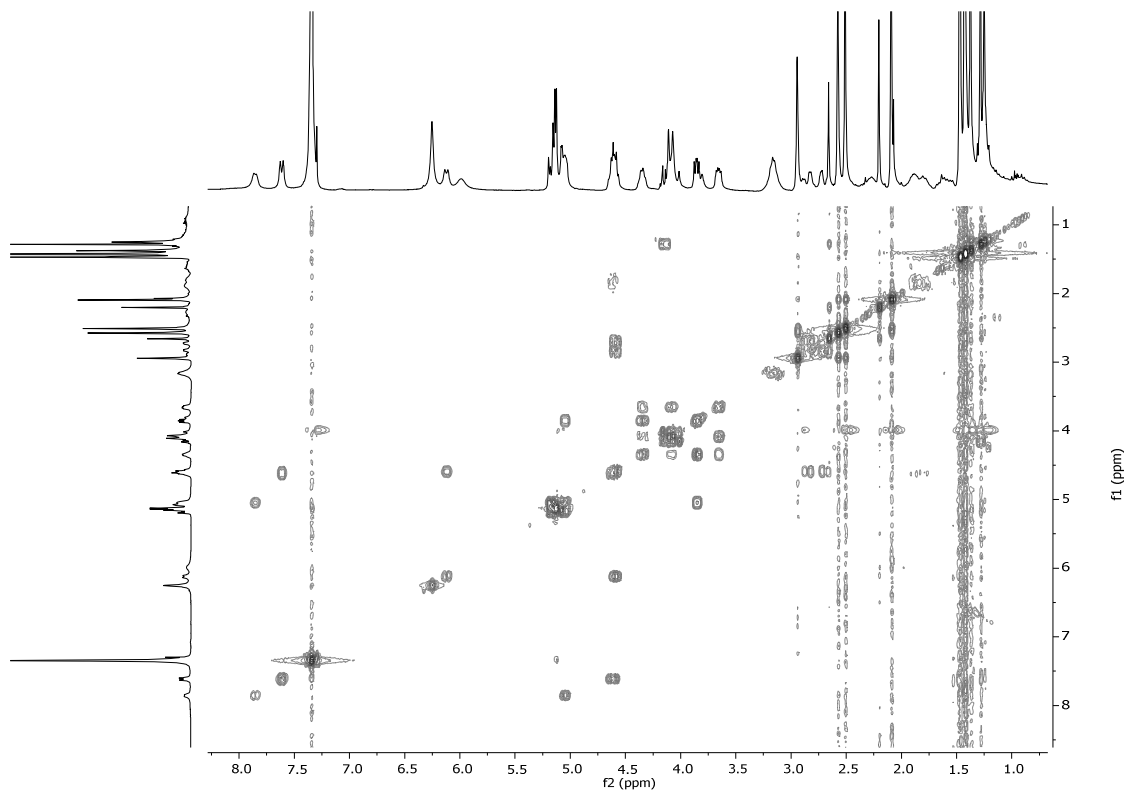
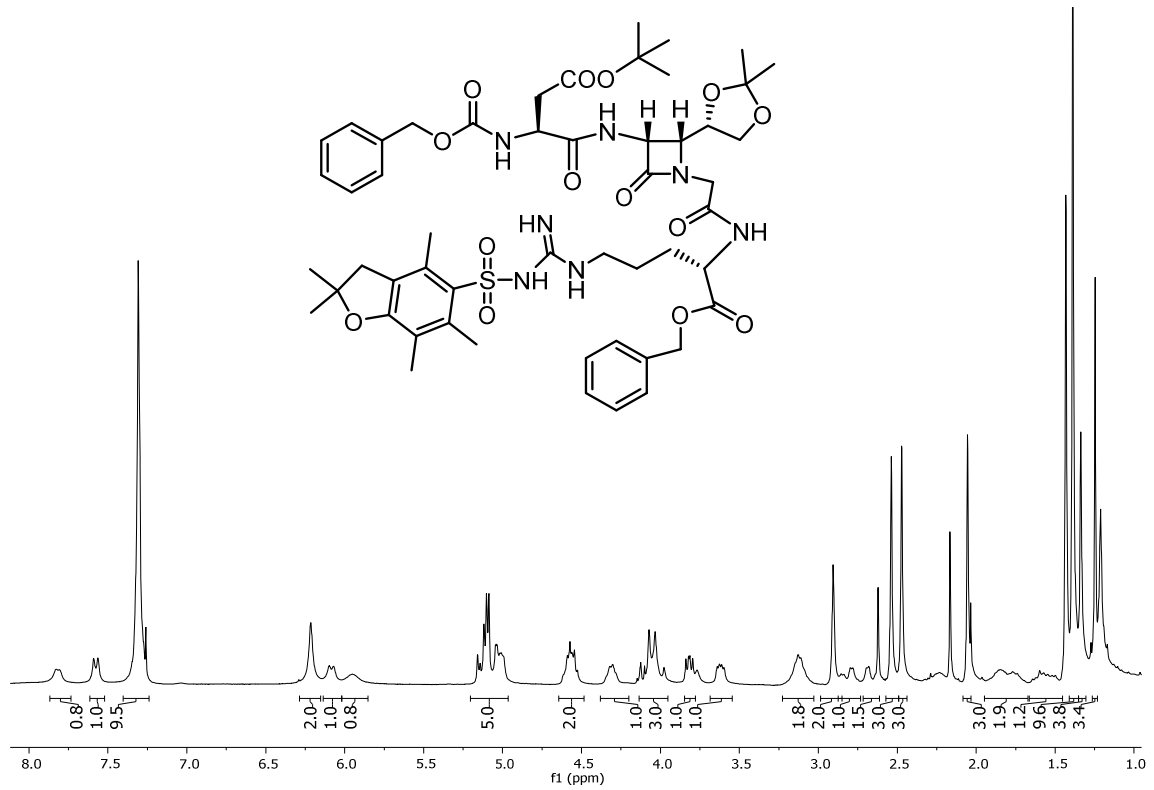
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-1-(1,1-dimetilcarboximetilen)-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidín-2-ona] (15.8):**

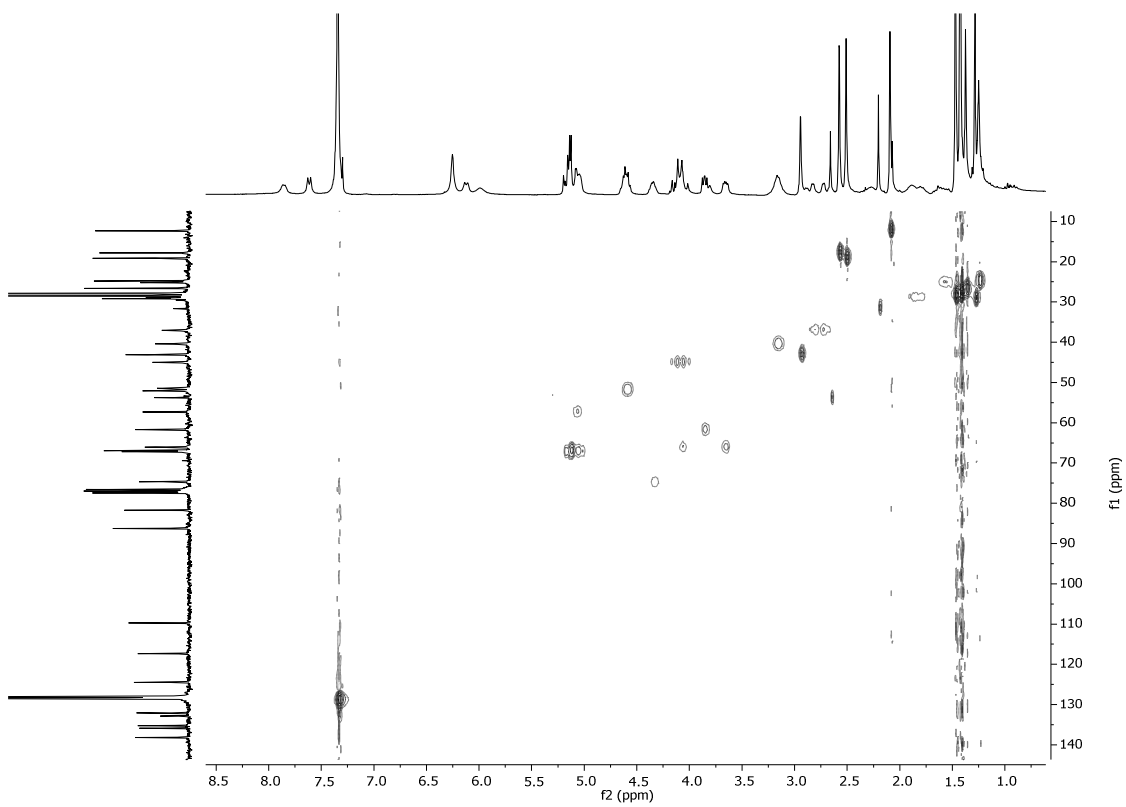
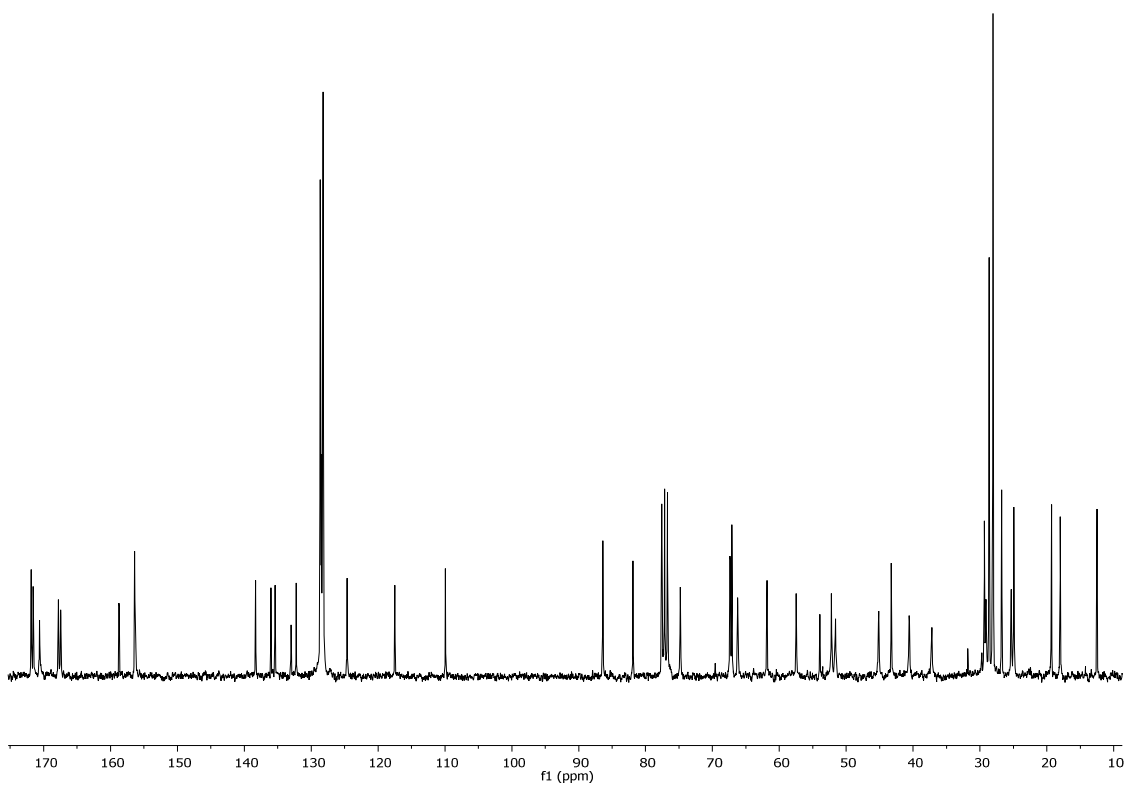


**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-1-carboximetilen-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)azetidina-2-ona] (16.8):**

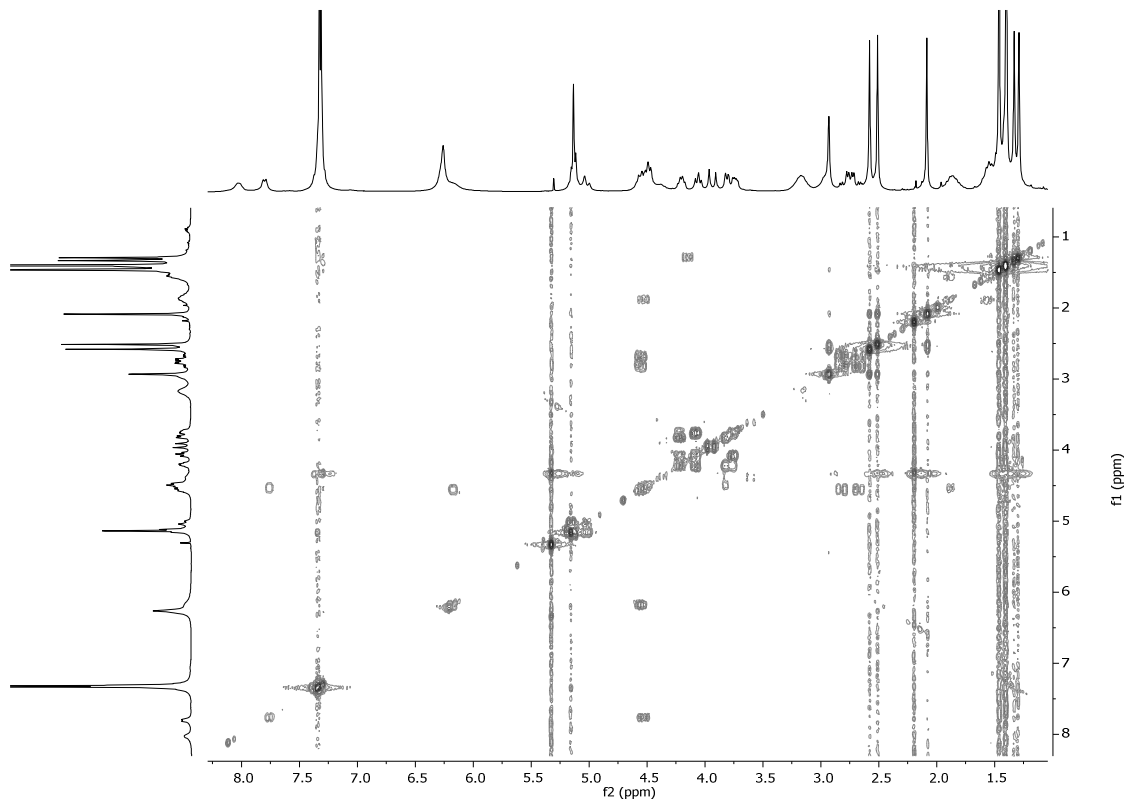
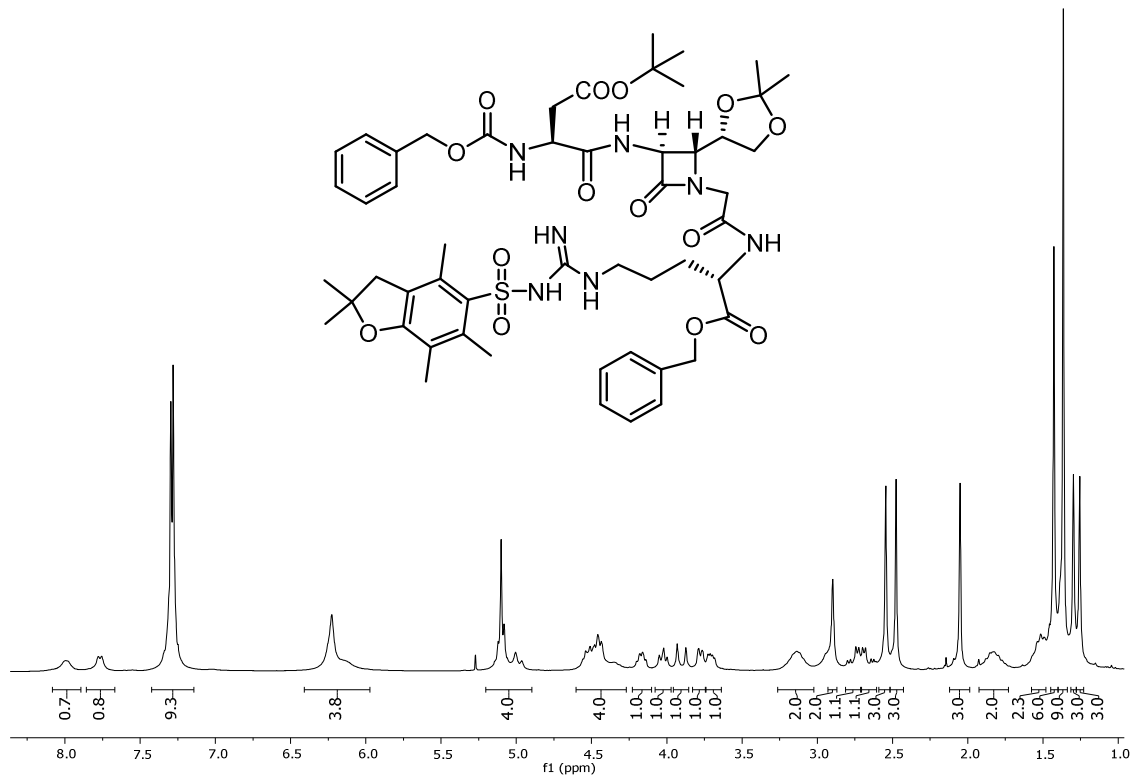


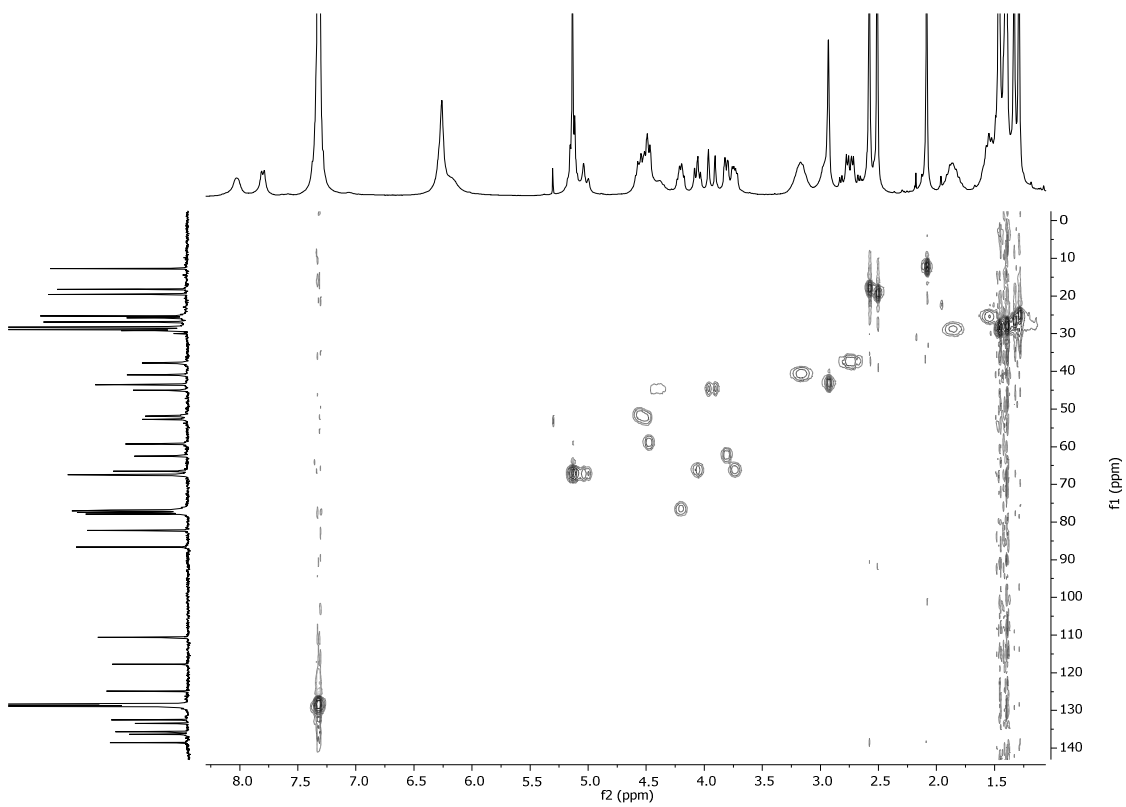
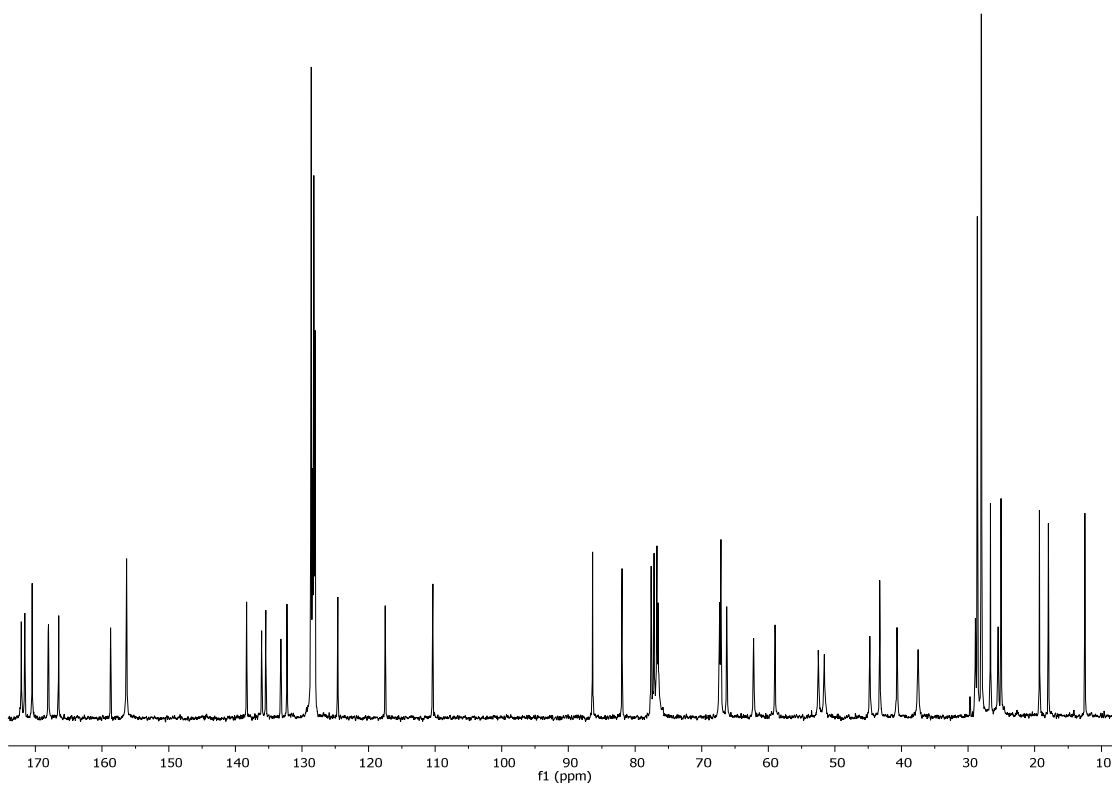
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina]-Arg(Pbf)-OBn (2.11):**

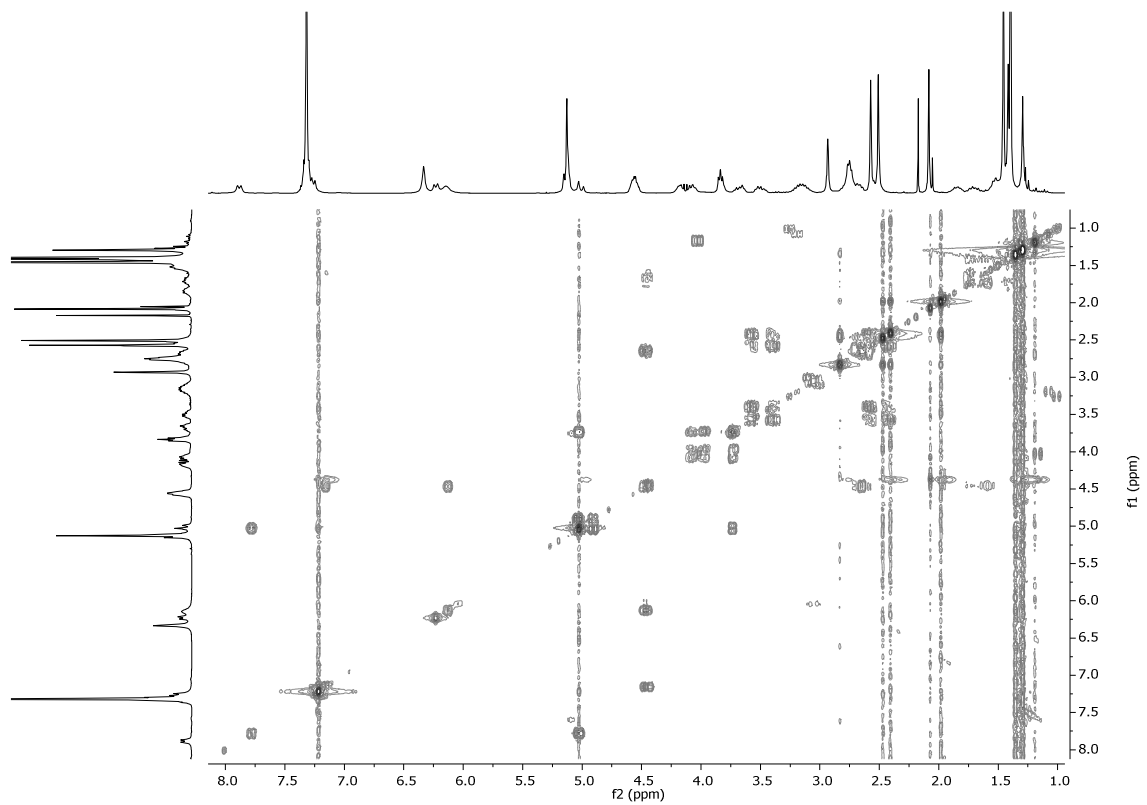
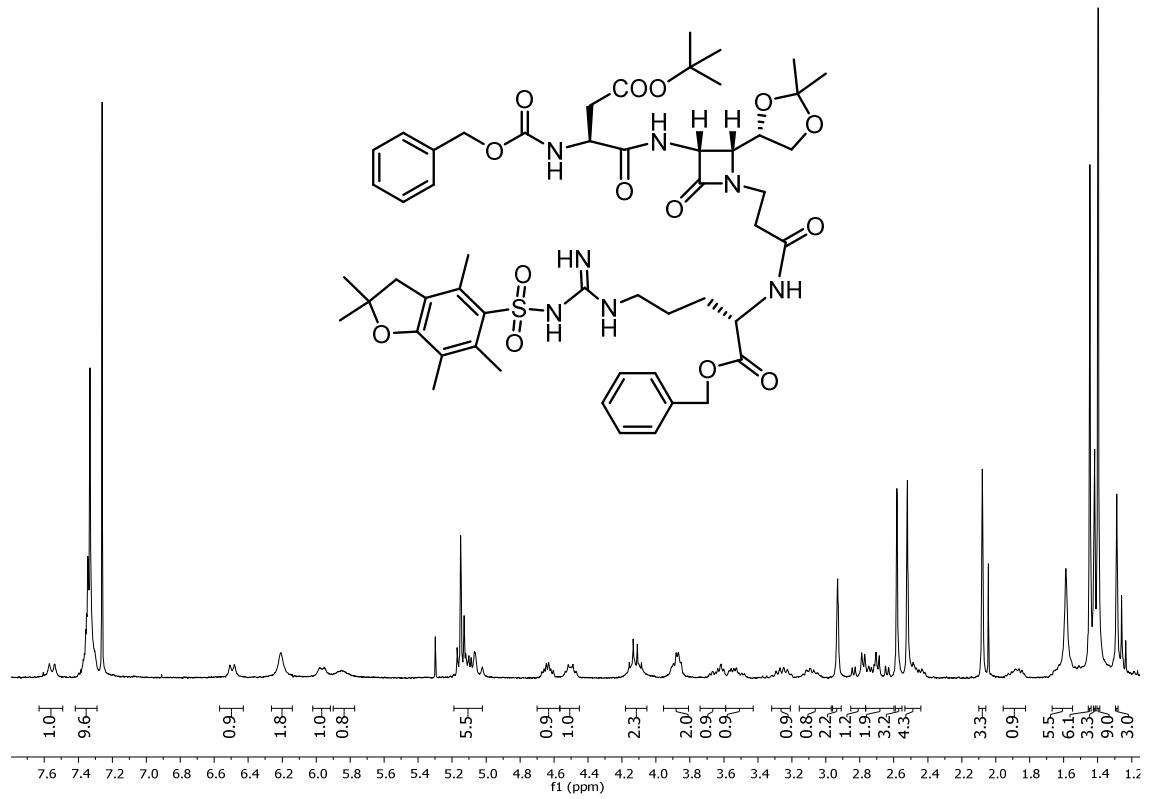




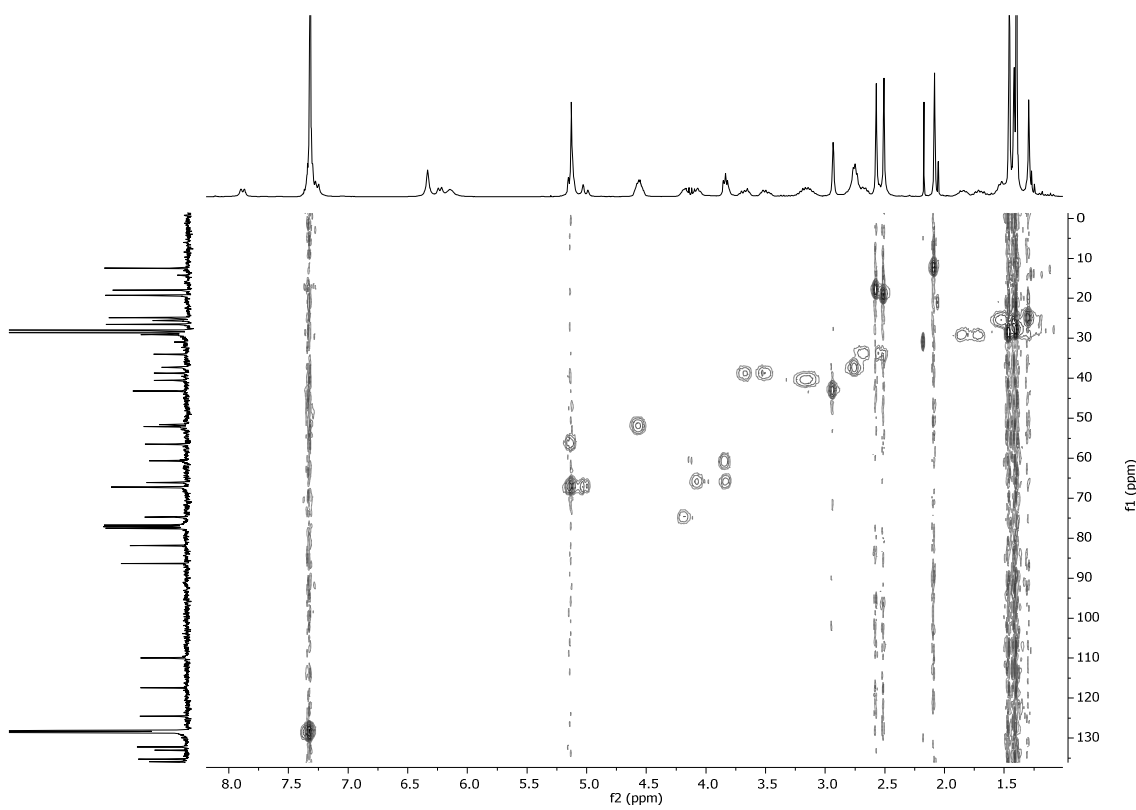
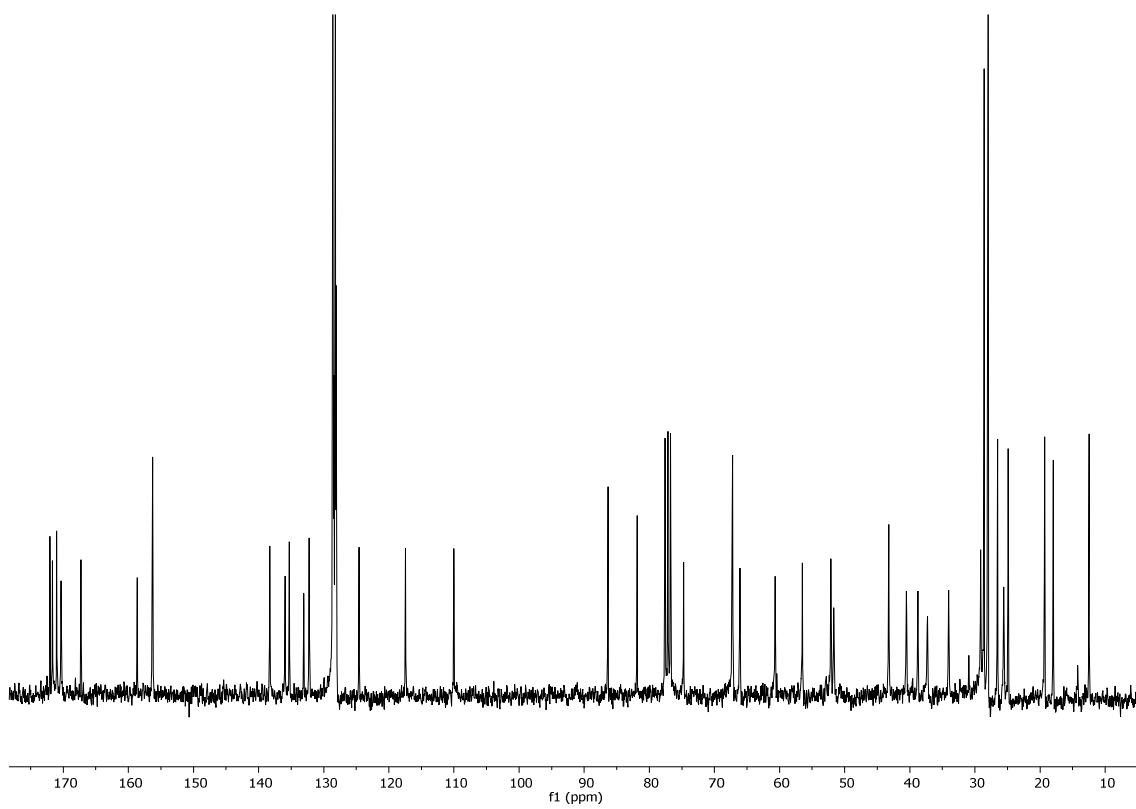
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidin-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (4.11):**



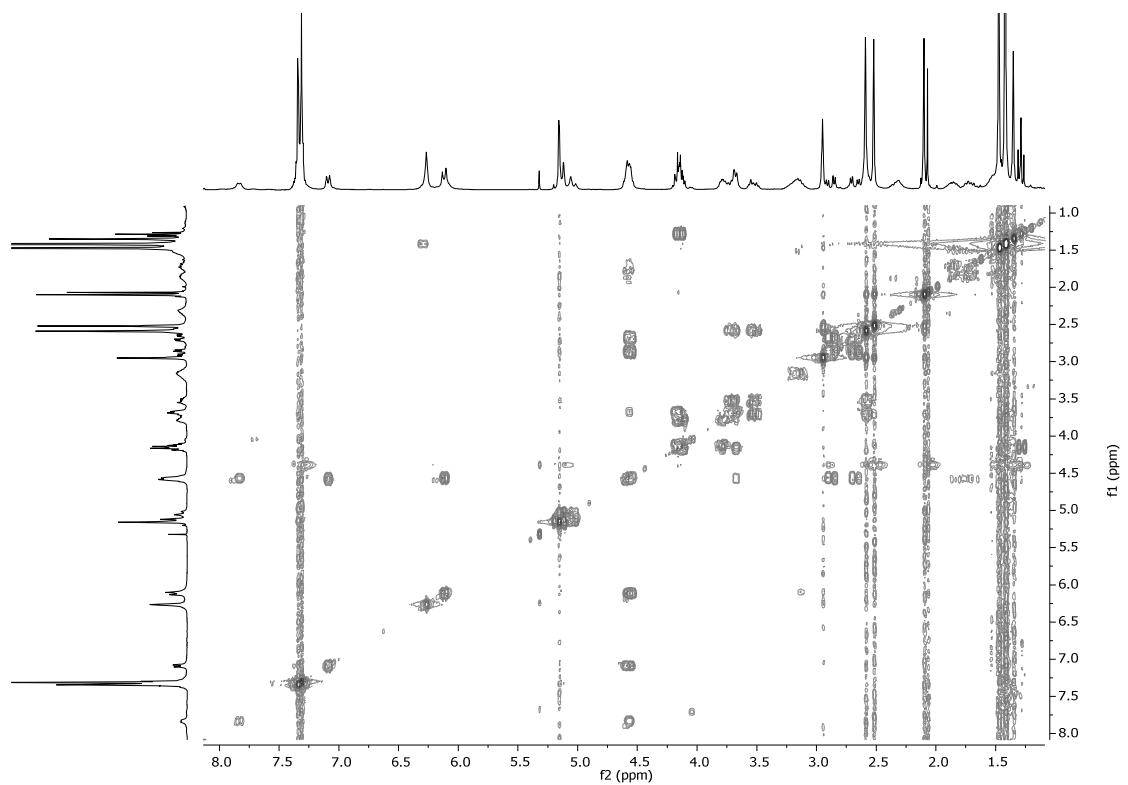
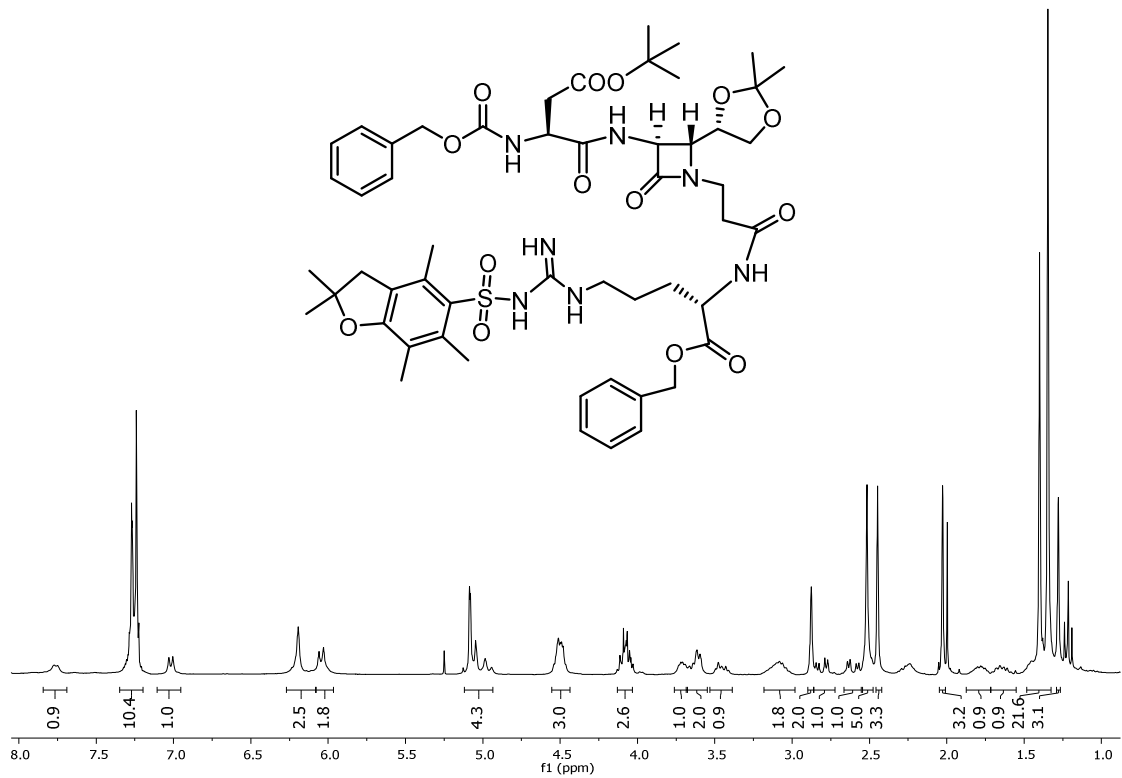


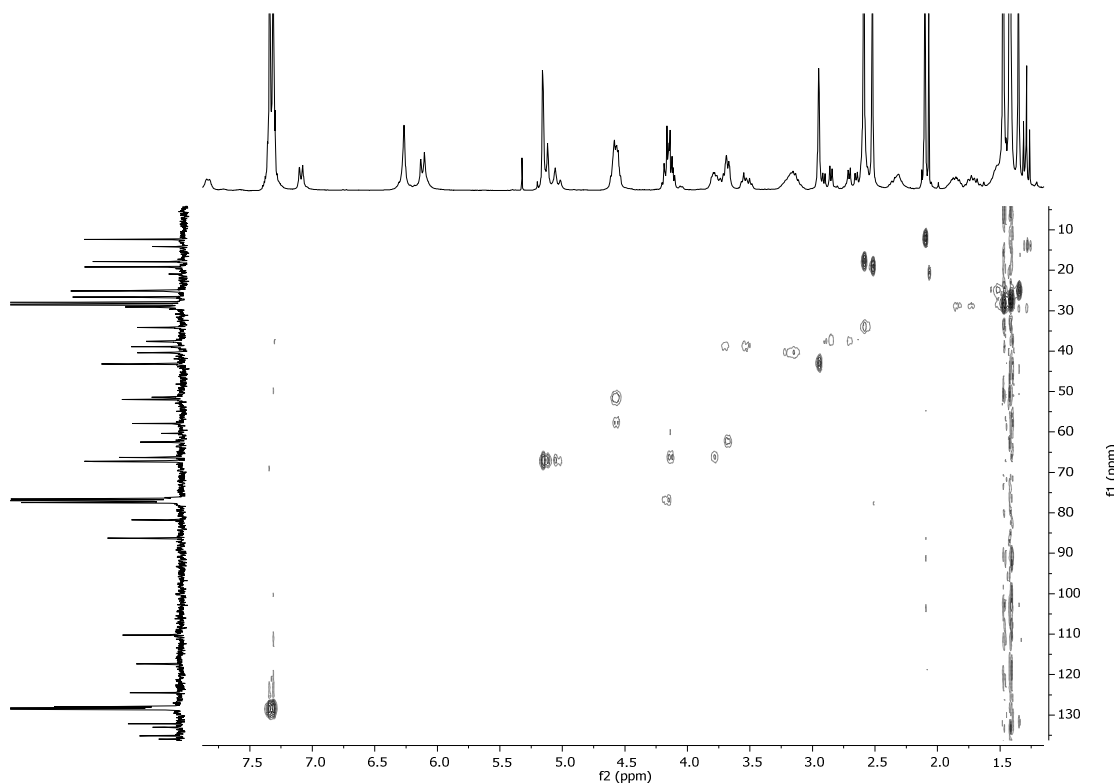
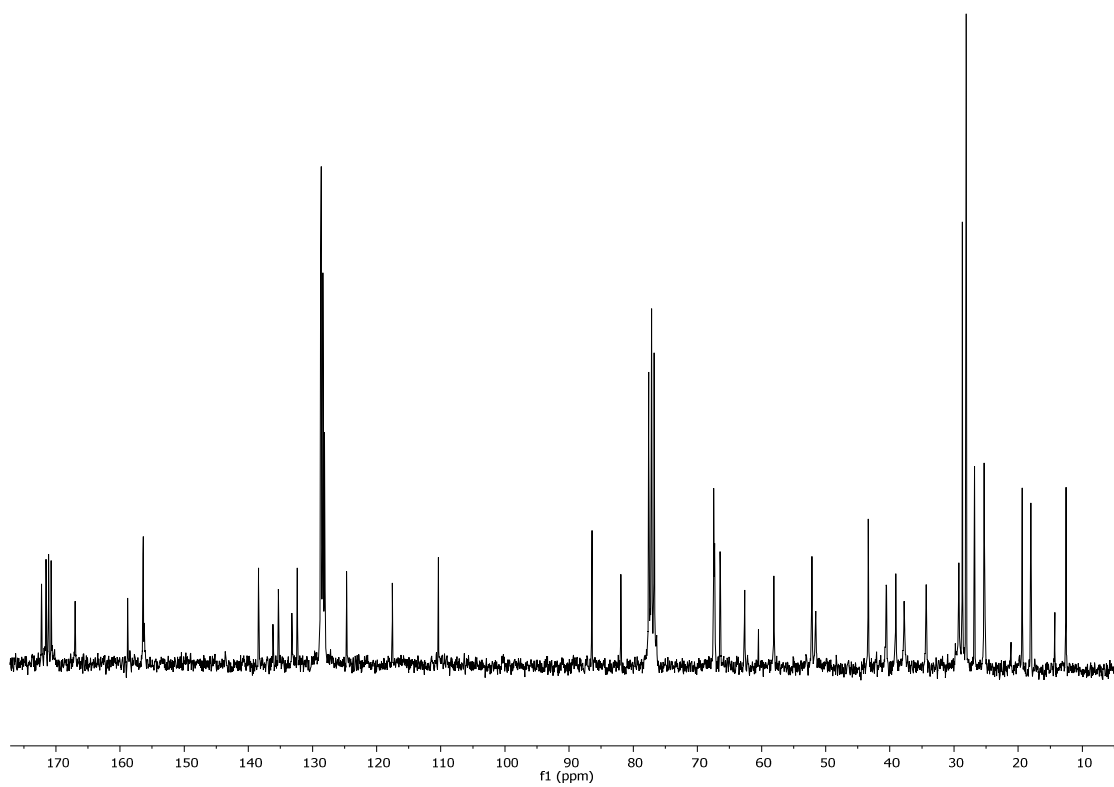
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (11.11):**



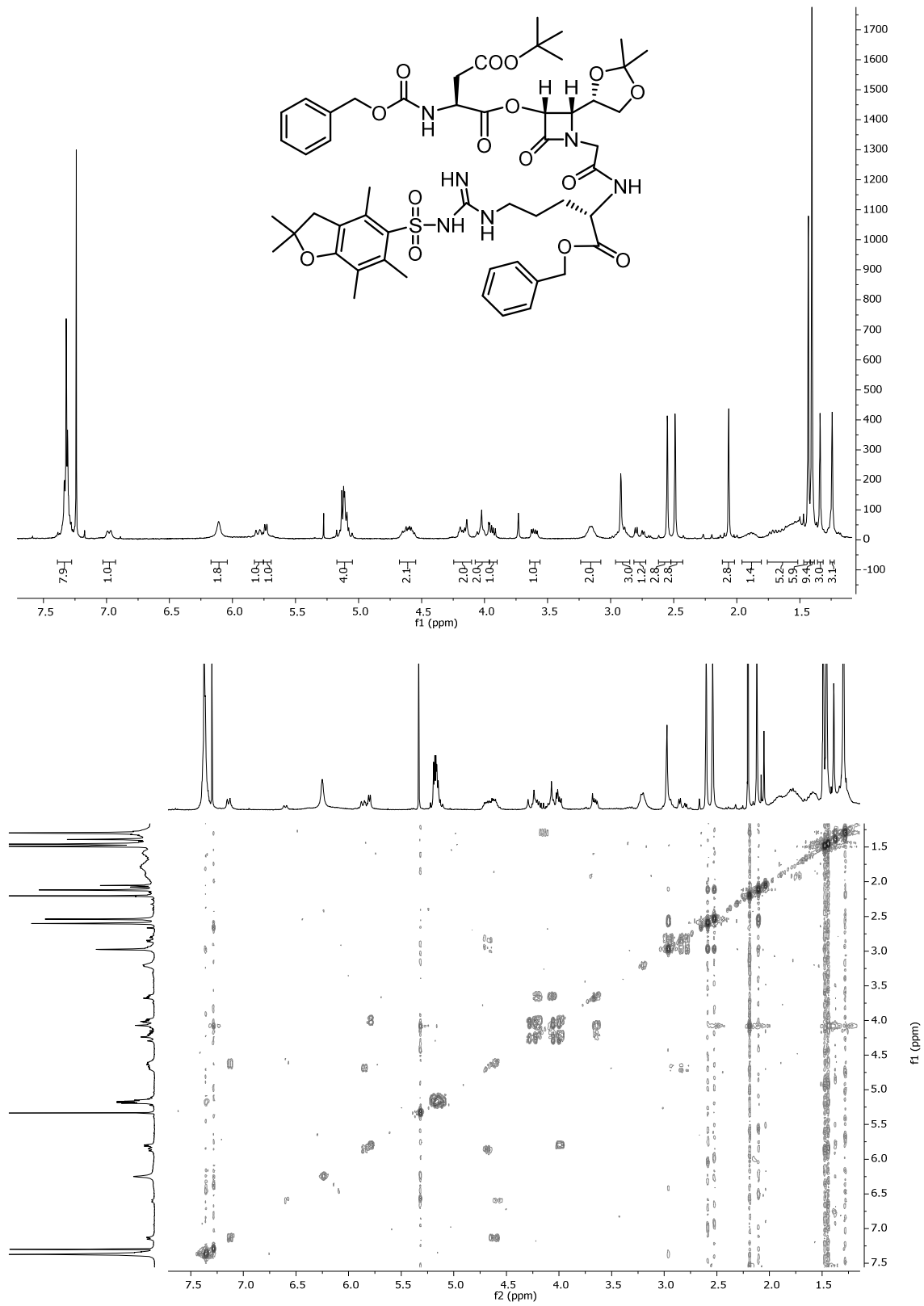


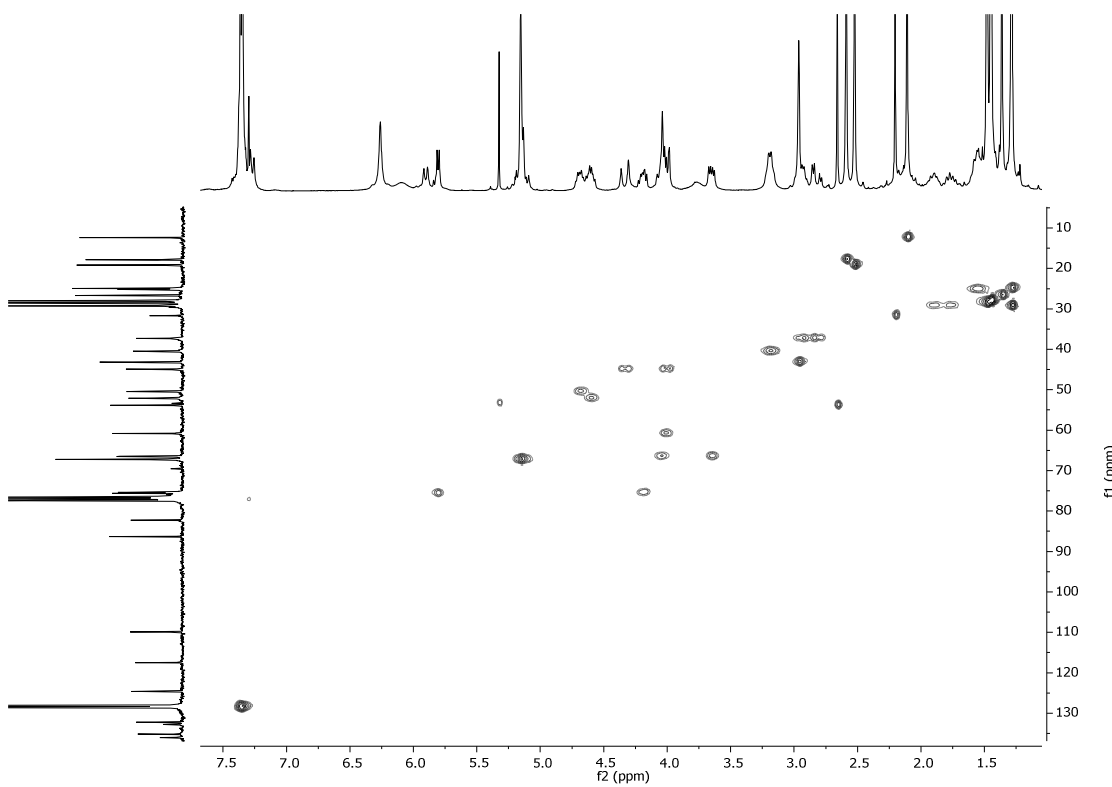
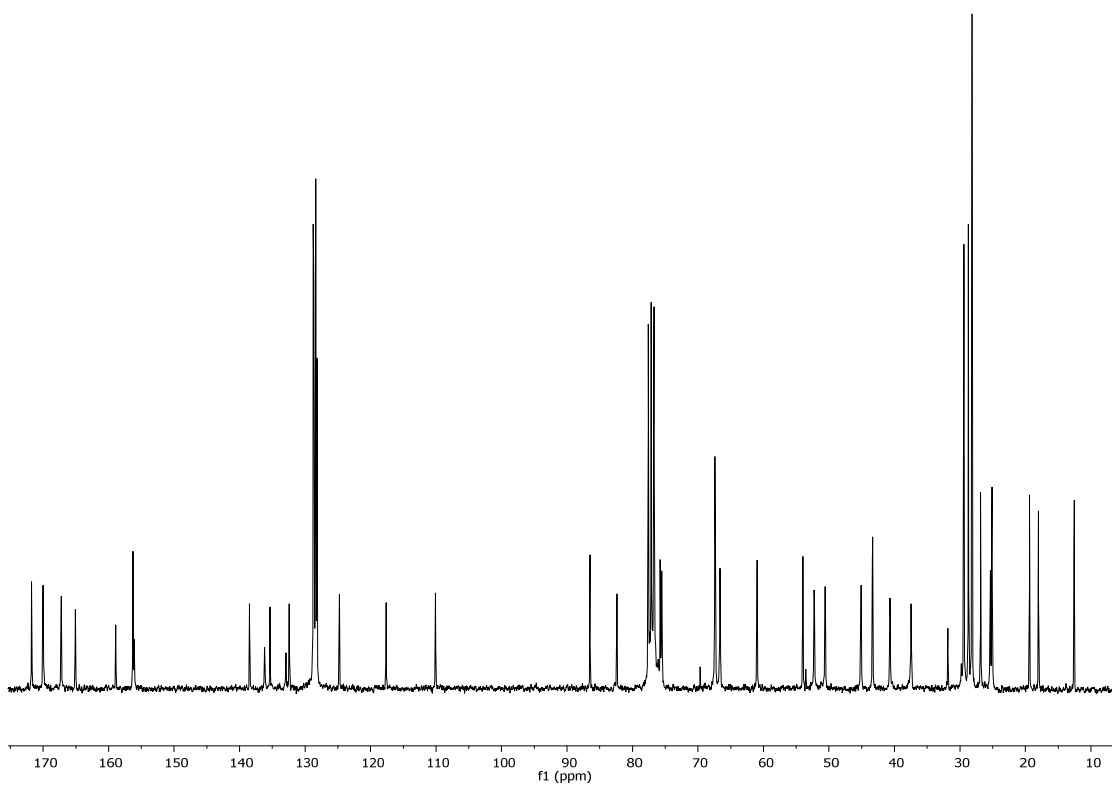
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (12.11):**



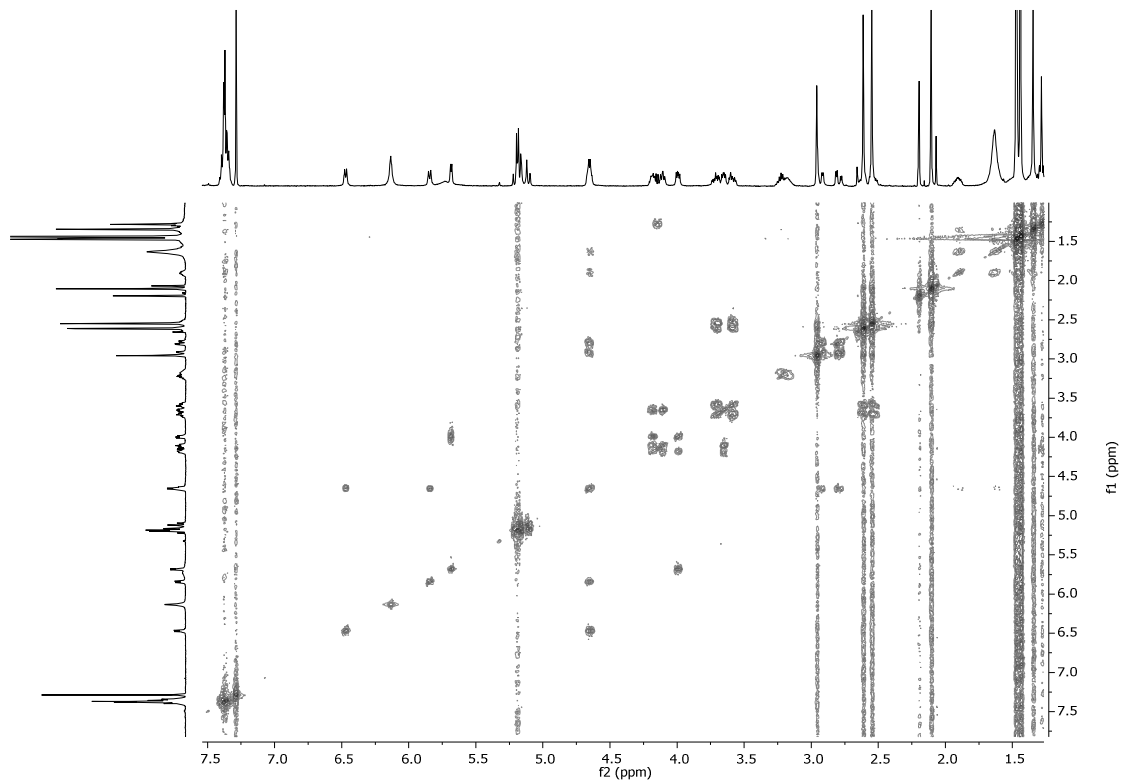
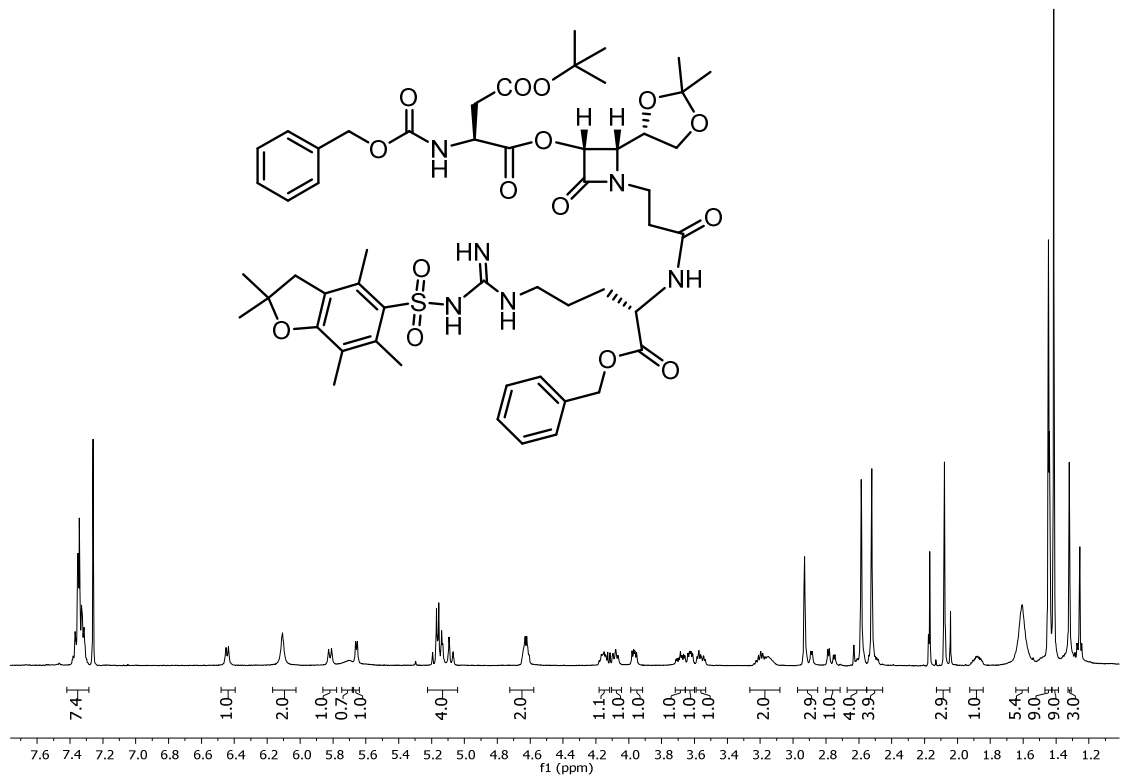


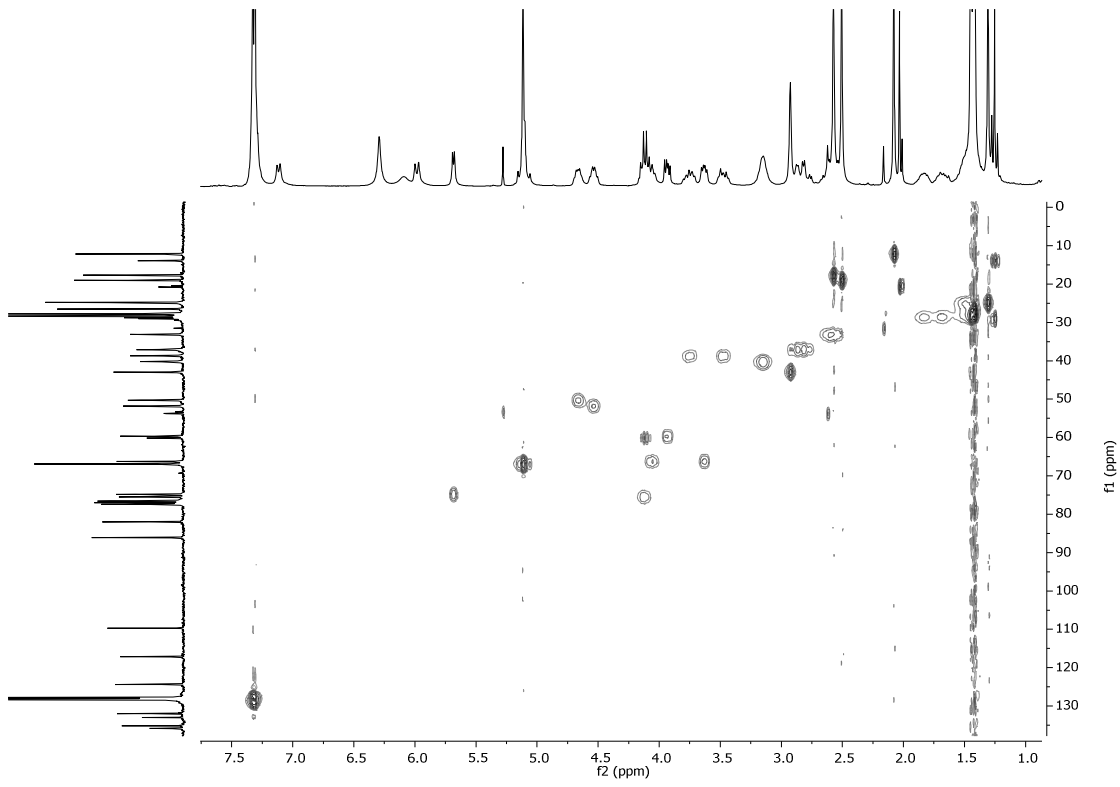
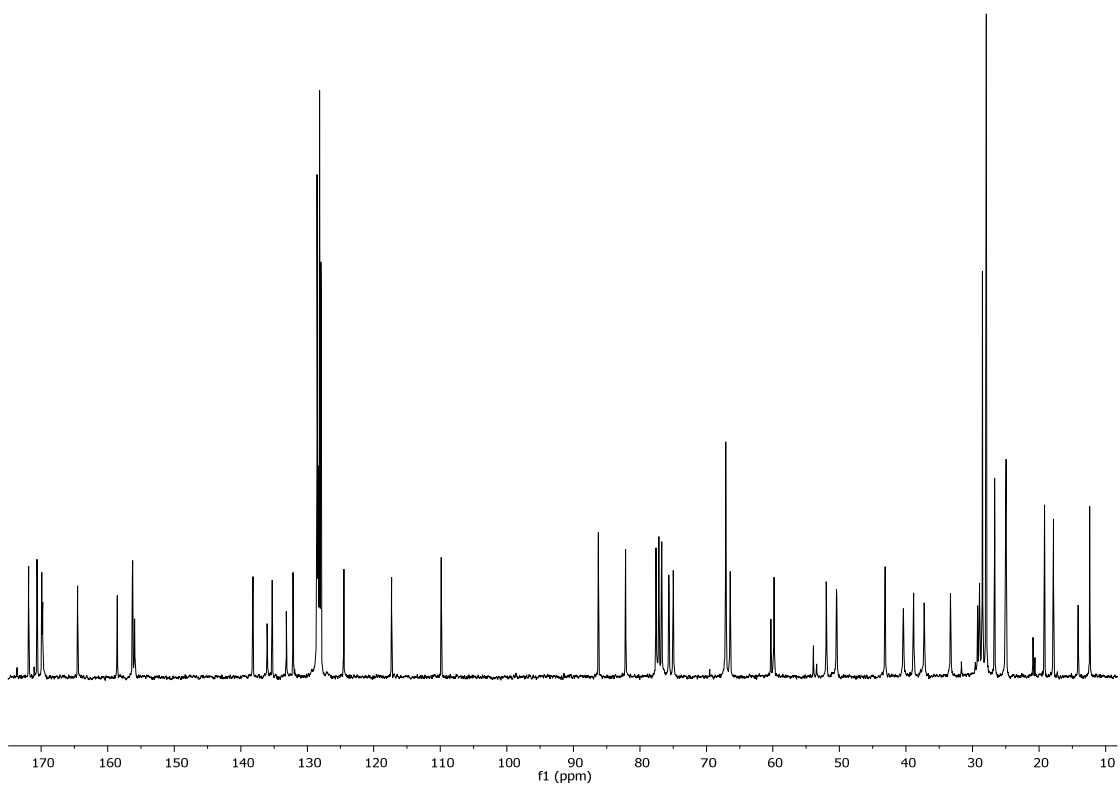
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (3.11):**



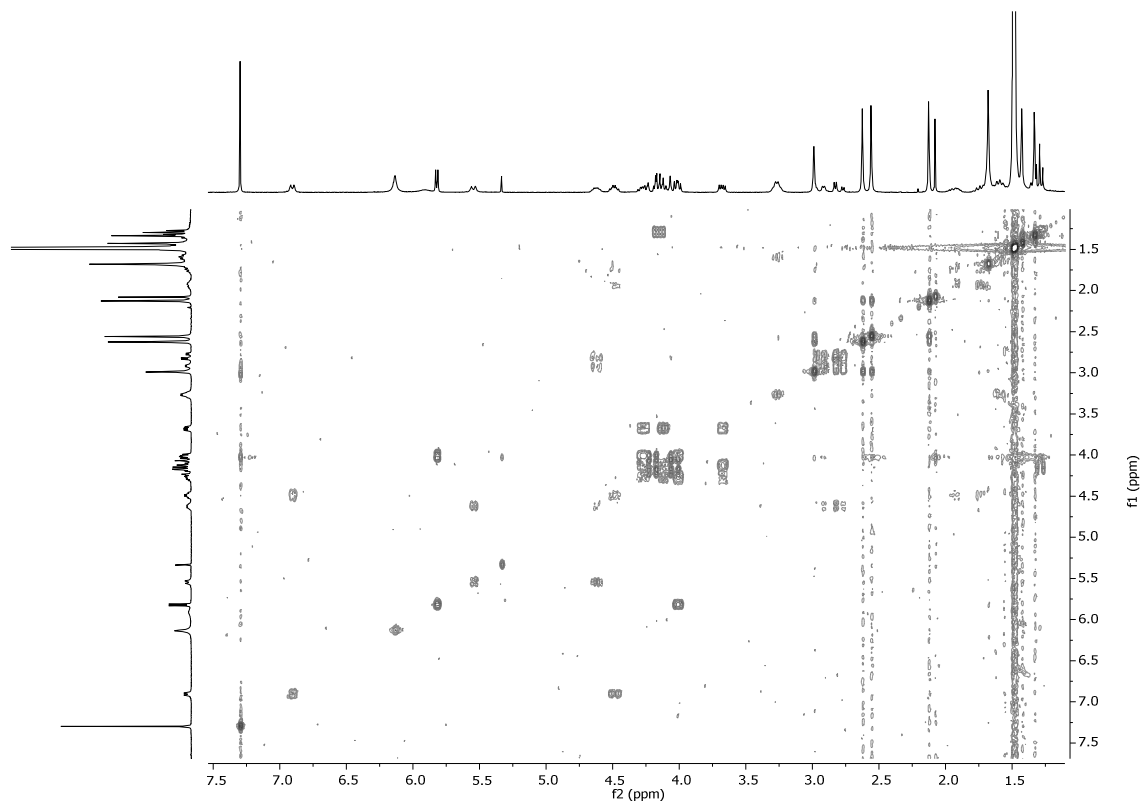
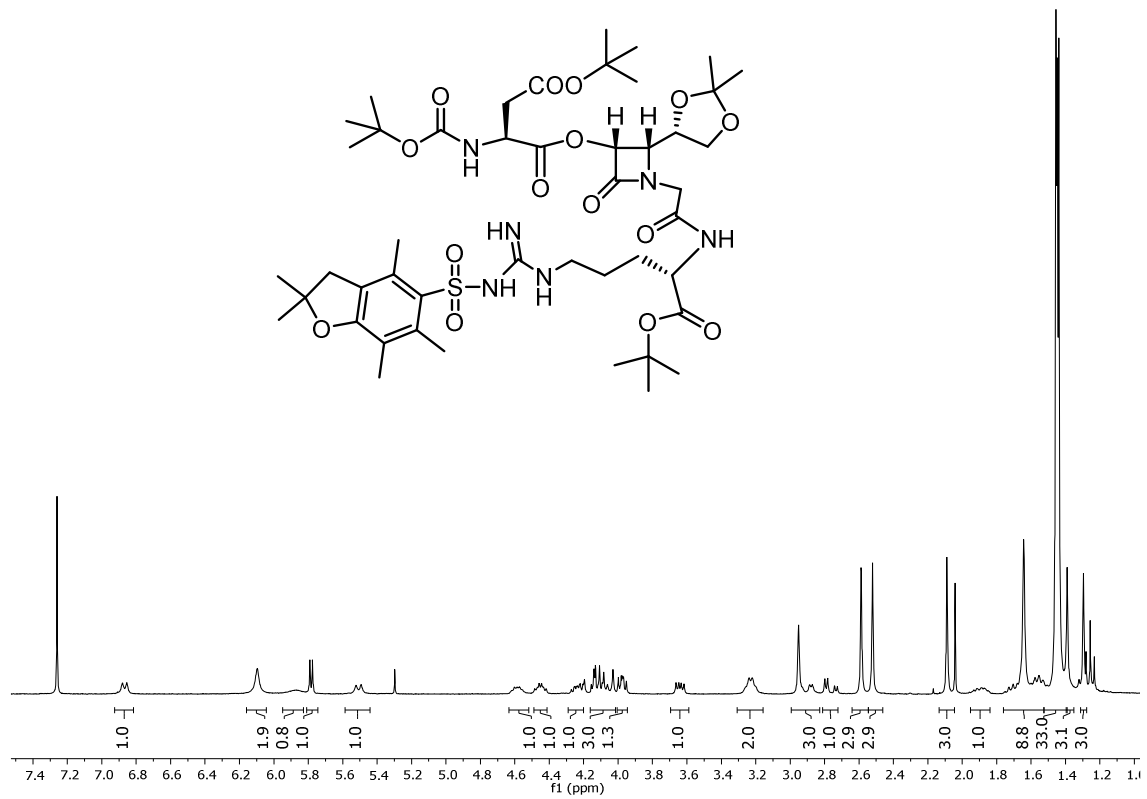


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (13.11):**

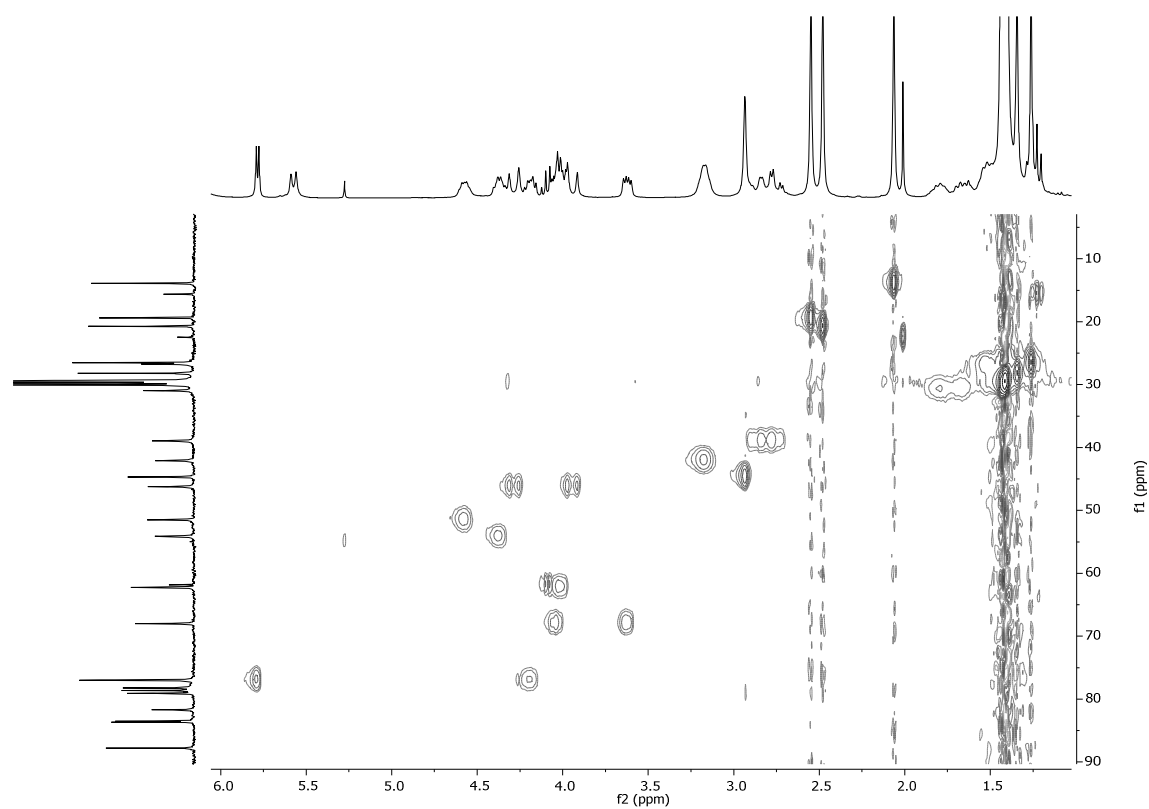
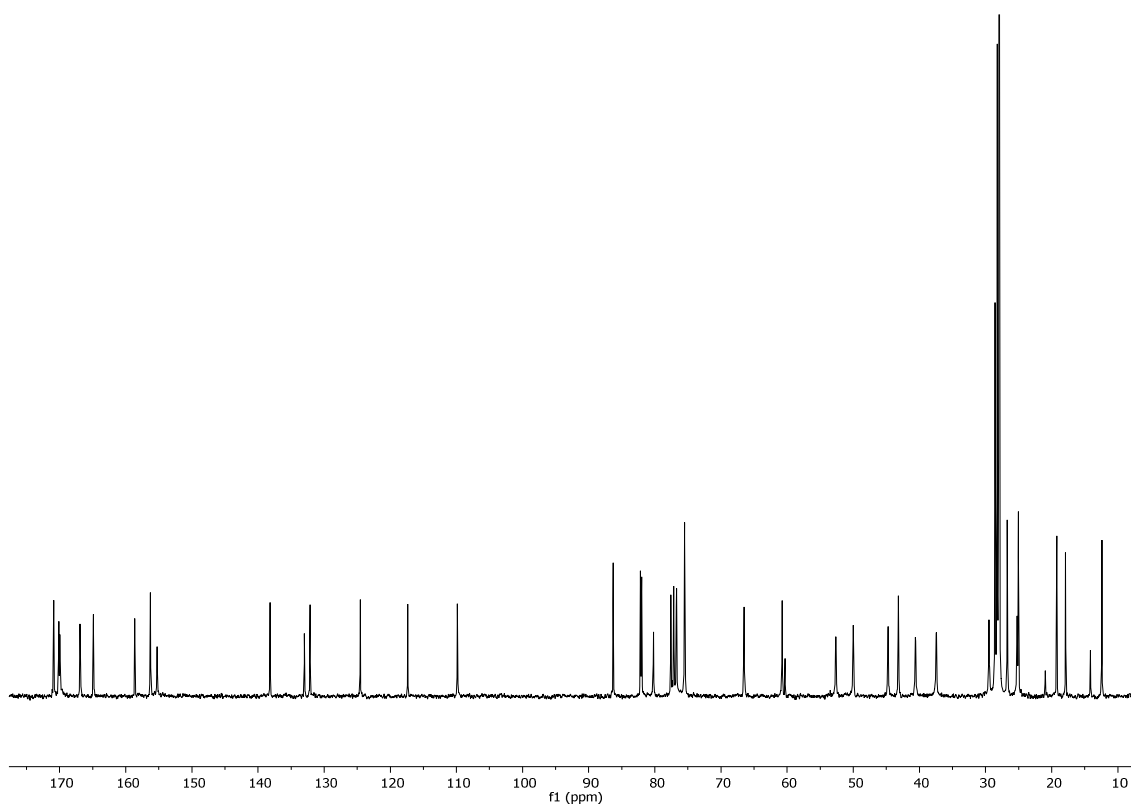


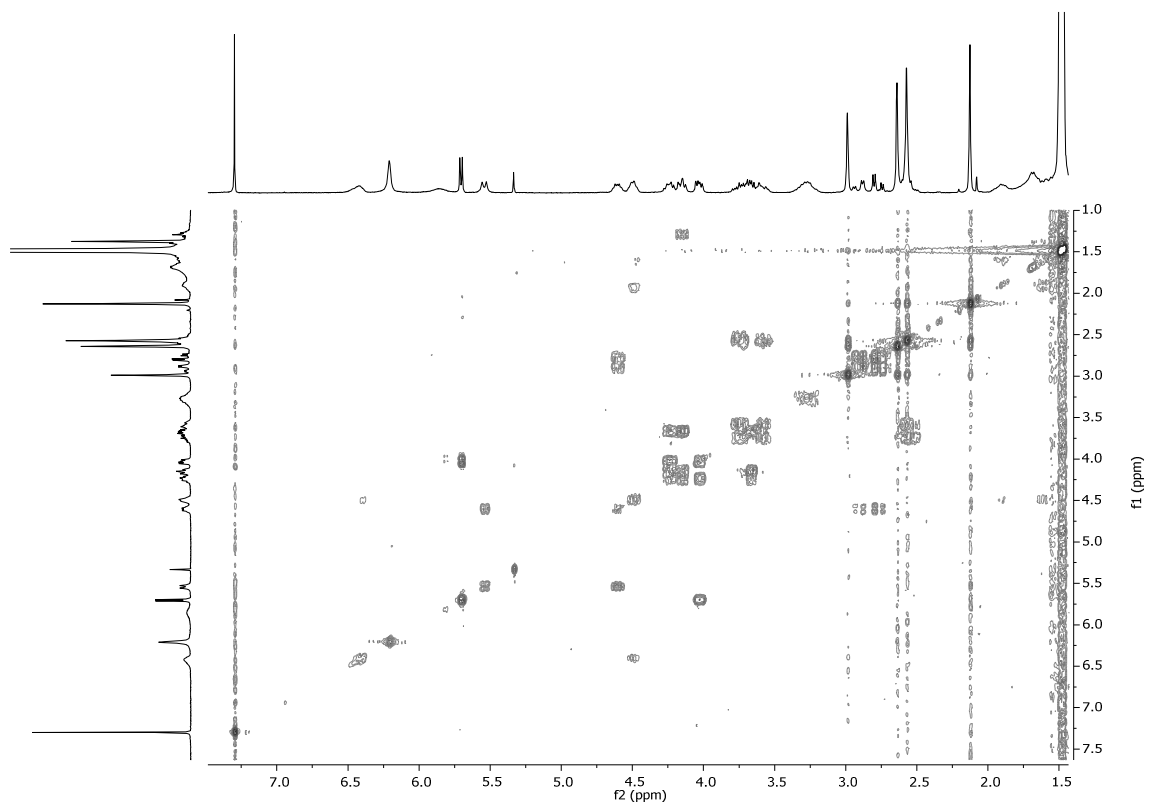
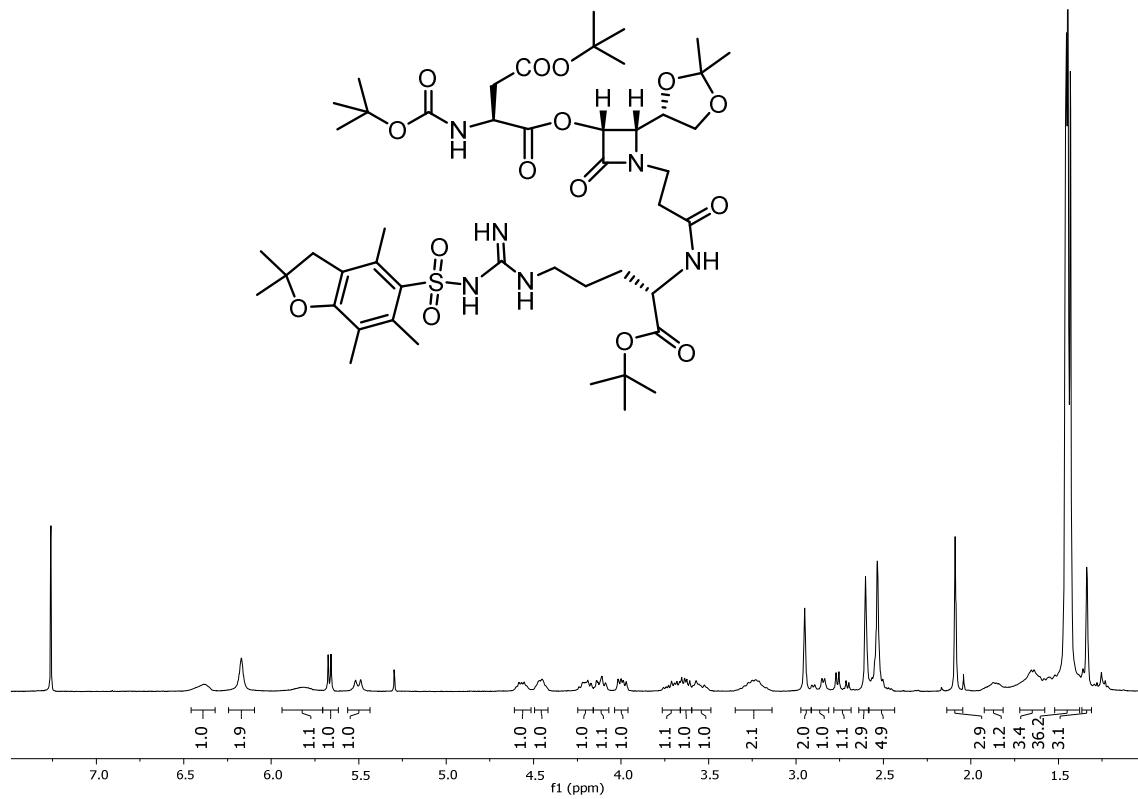


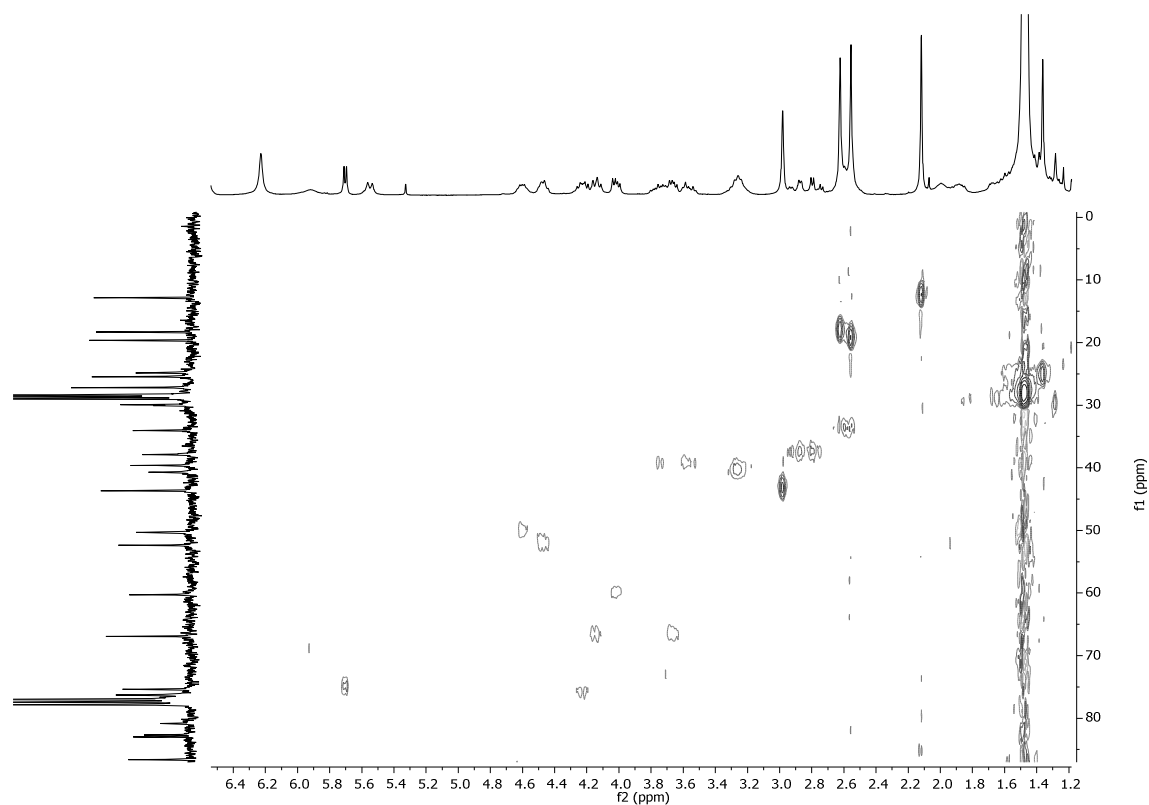
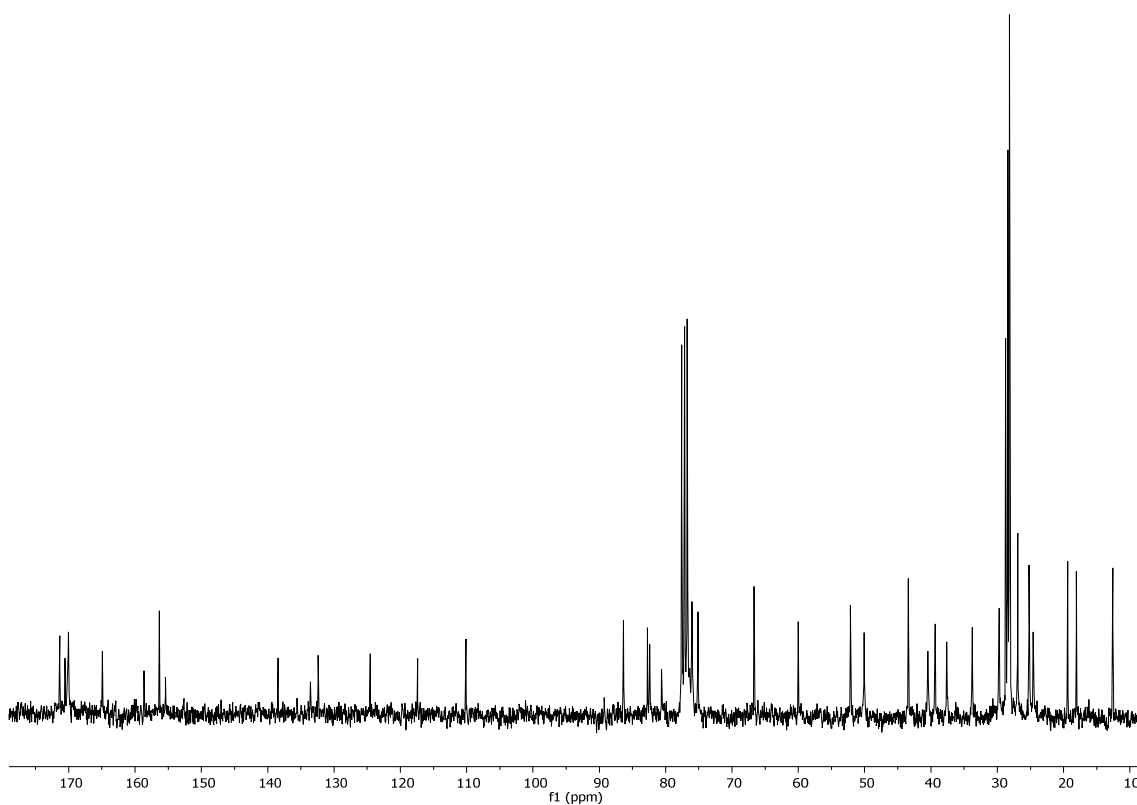
**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-O<sup>t</sup>Bu (19.11):**



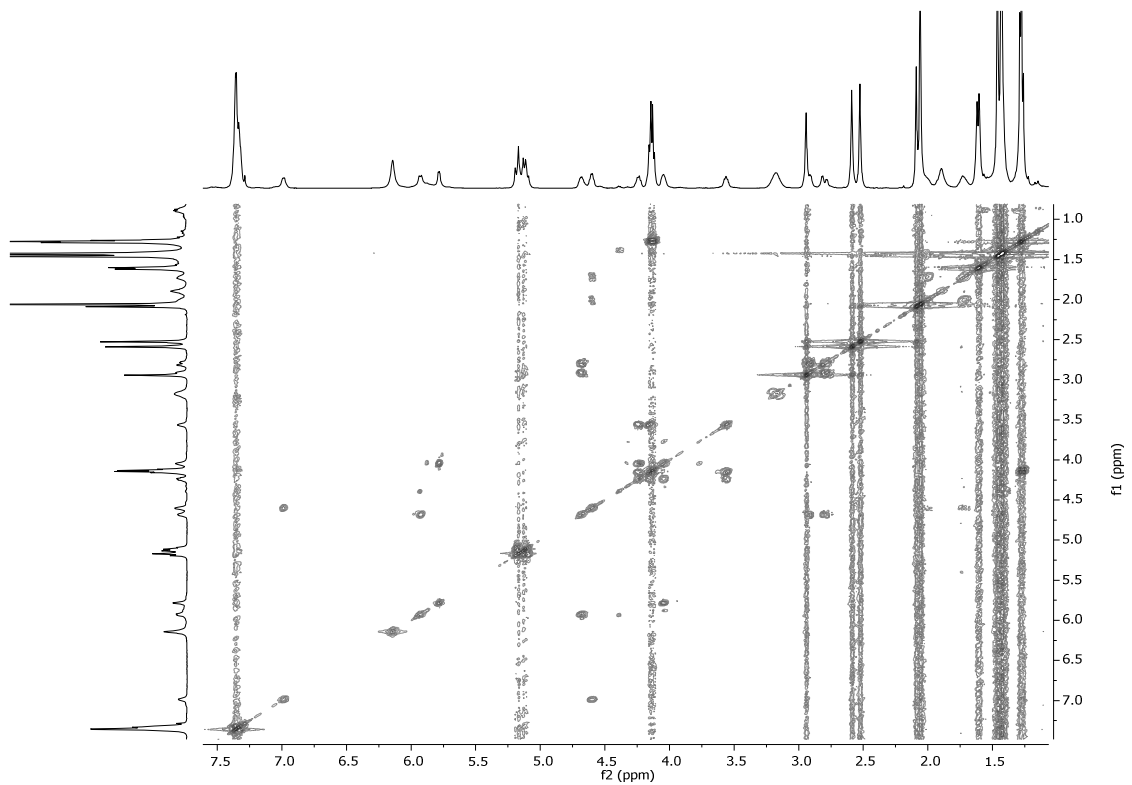
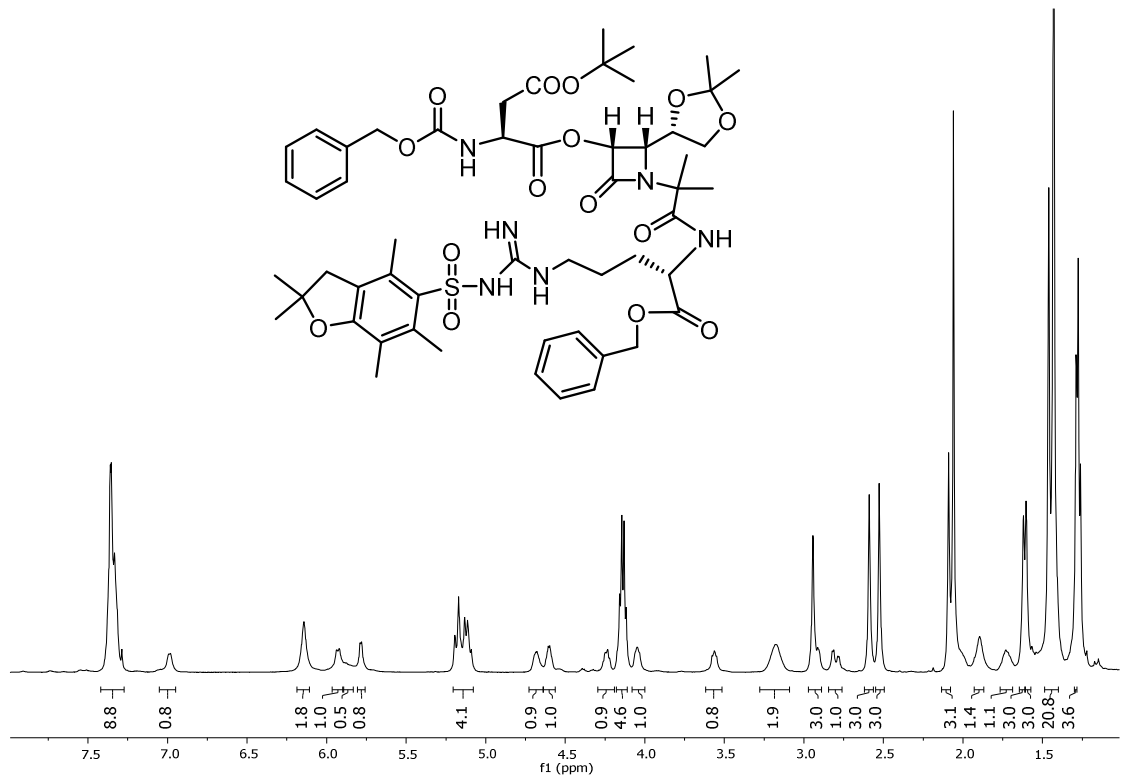


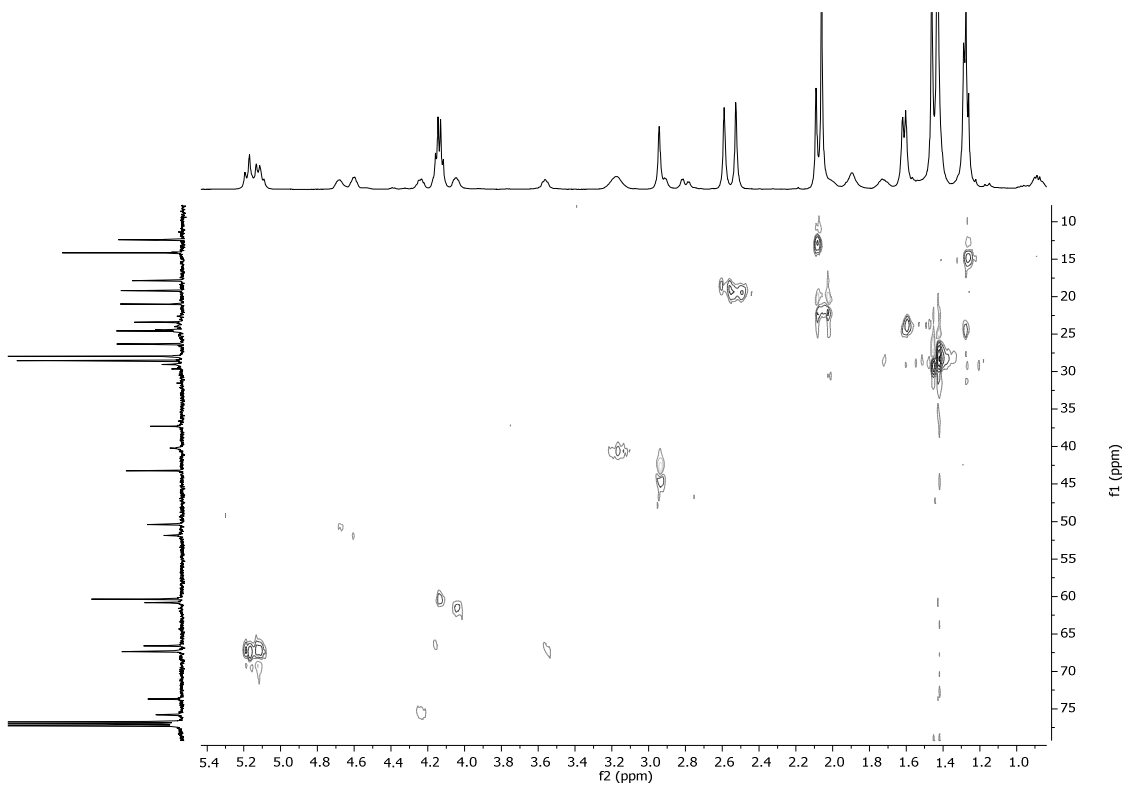
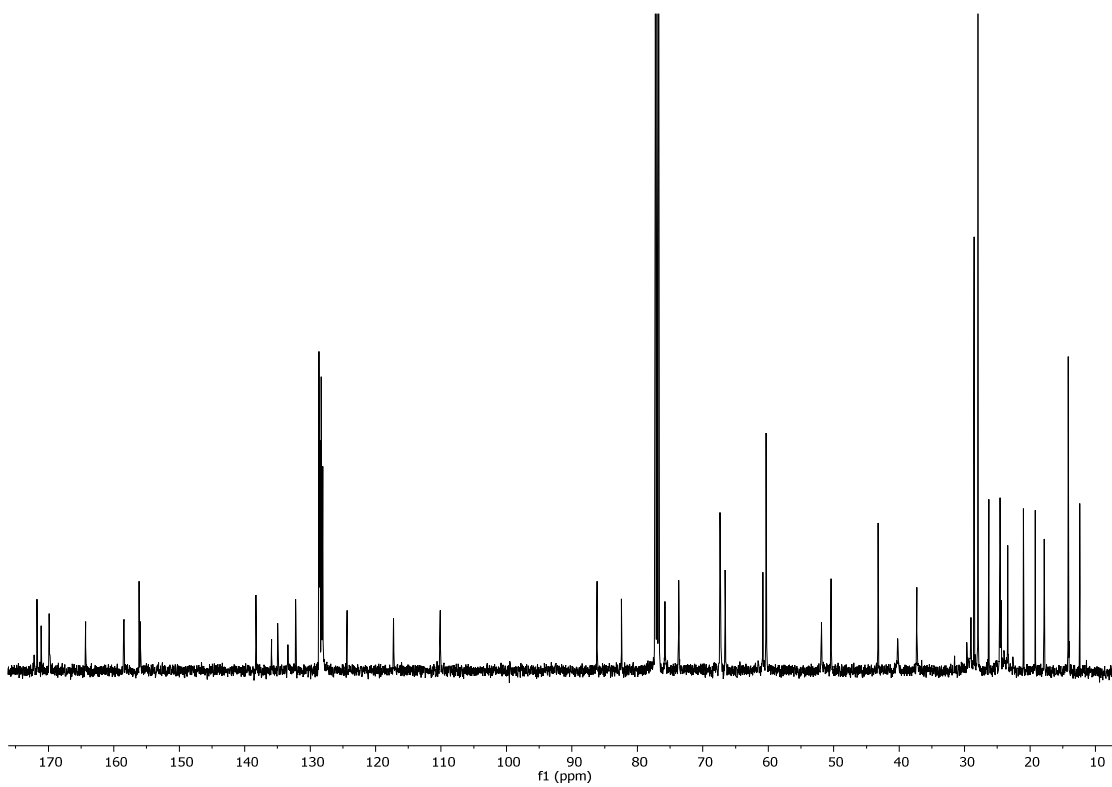


**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidín-2-ona]-Arg(O<sup>t</sup>Bu) (21.11):**

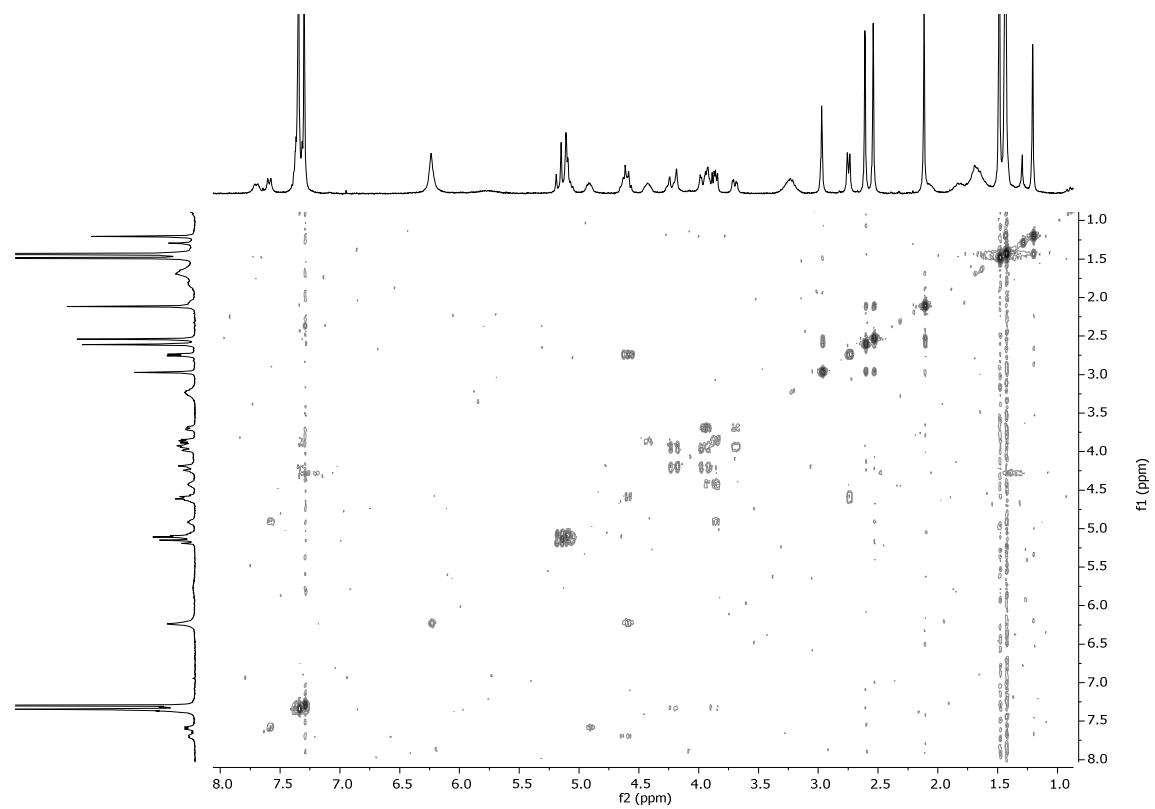
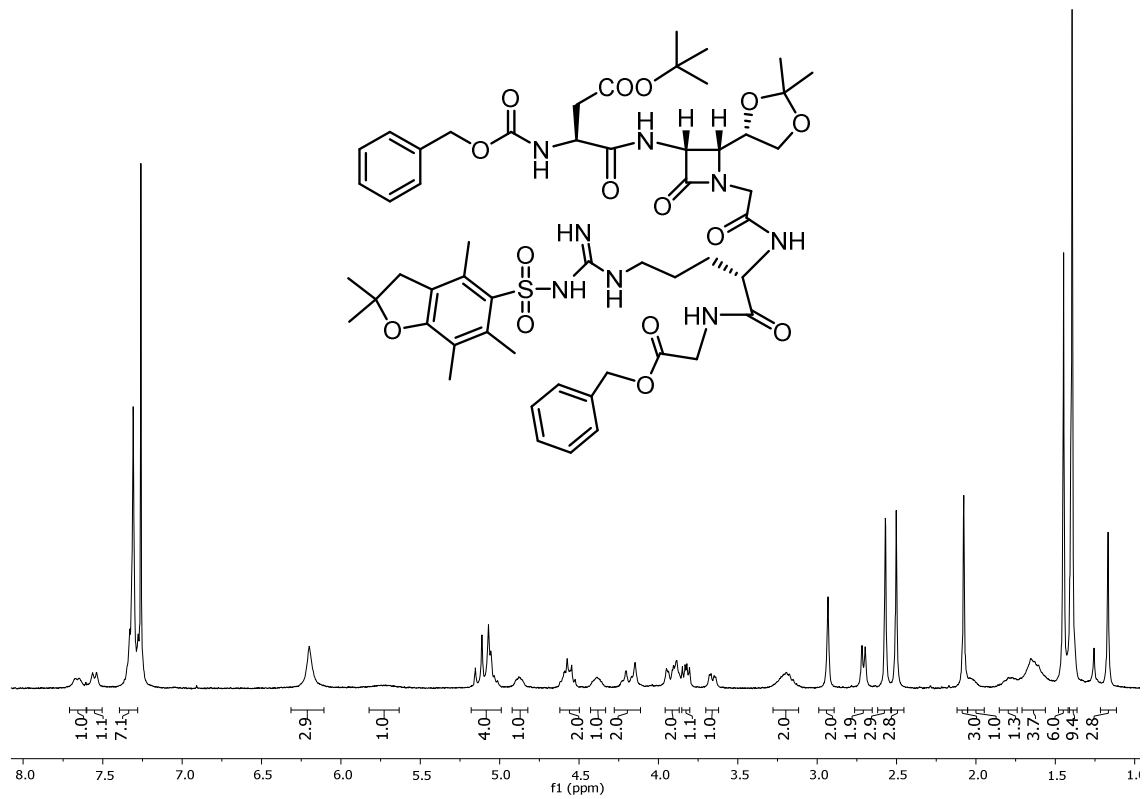


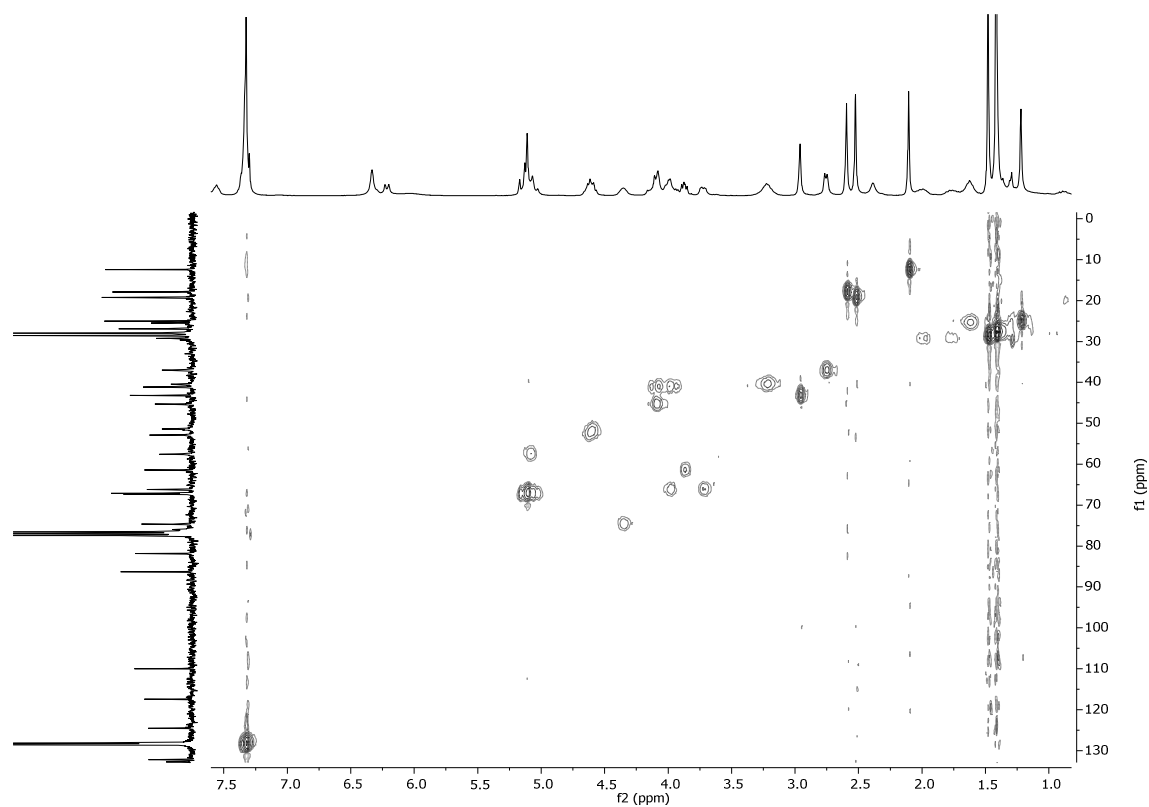
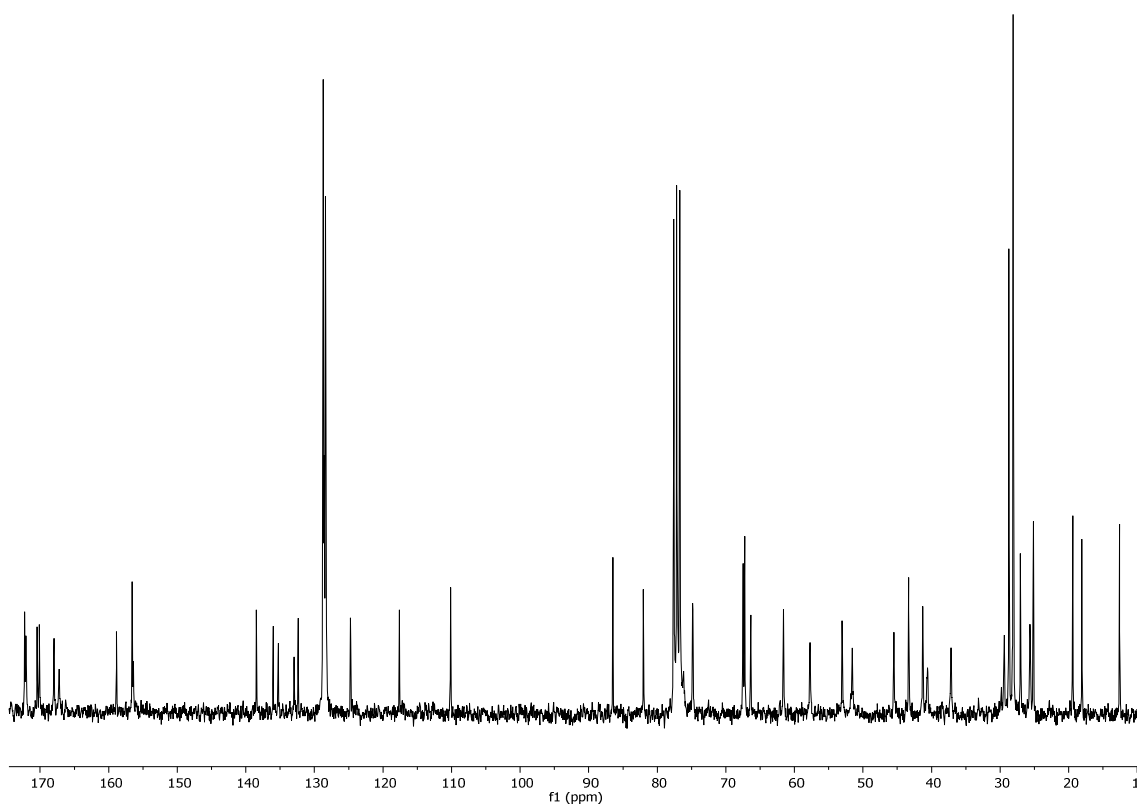
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(1,1-dimetil)metilencarbonil-azetidin-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (15.11):**



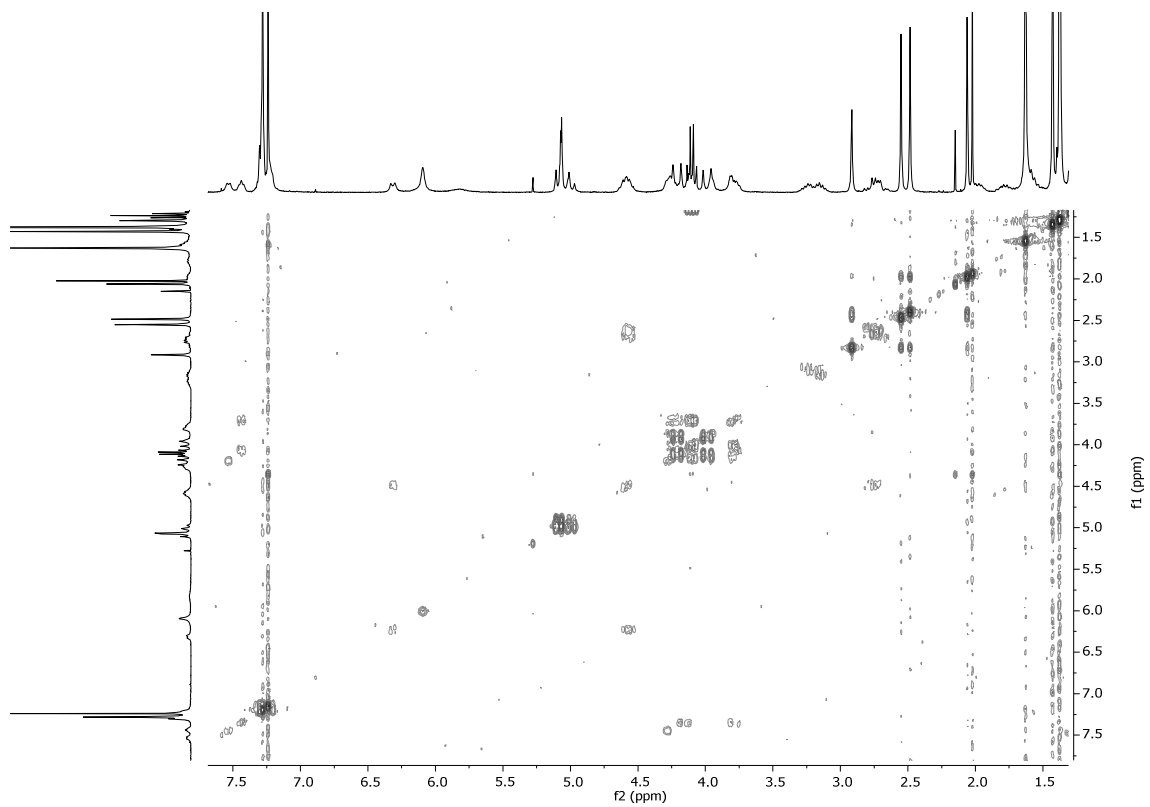
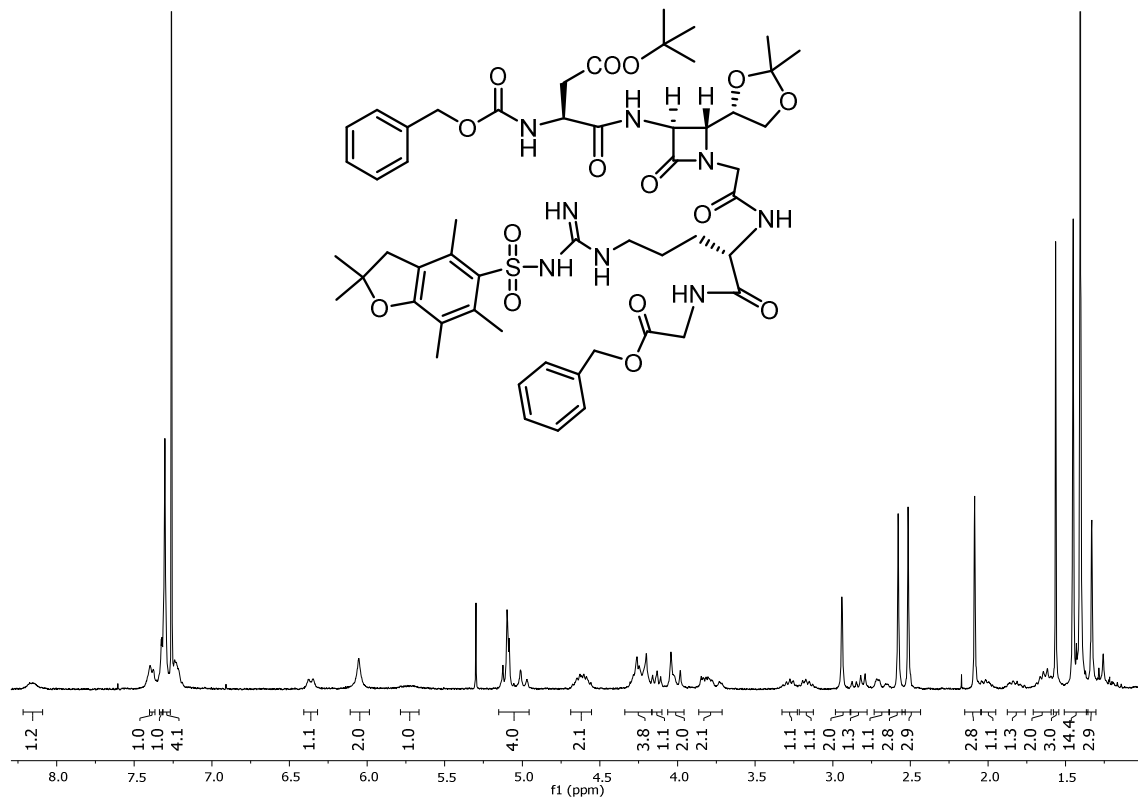


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (22.11):**

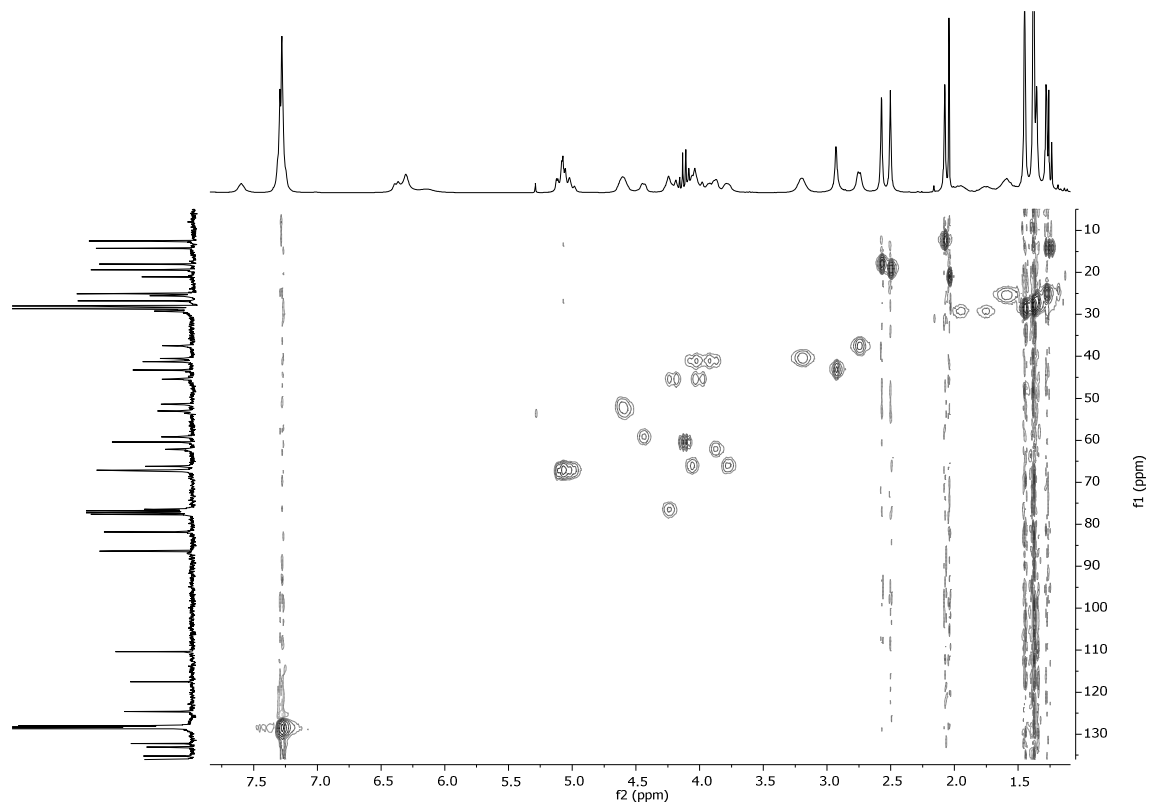
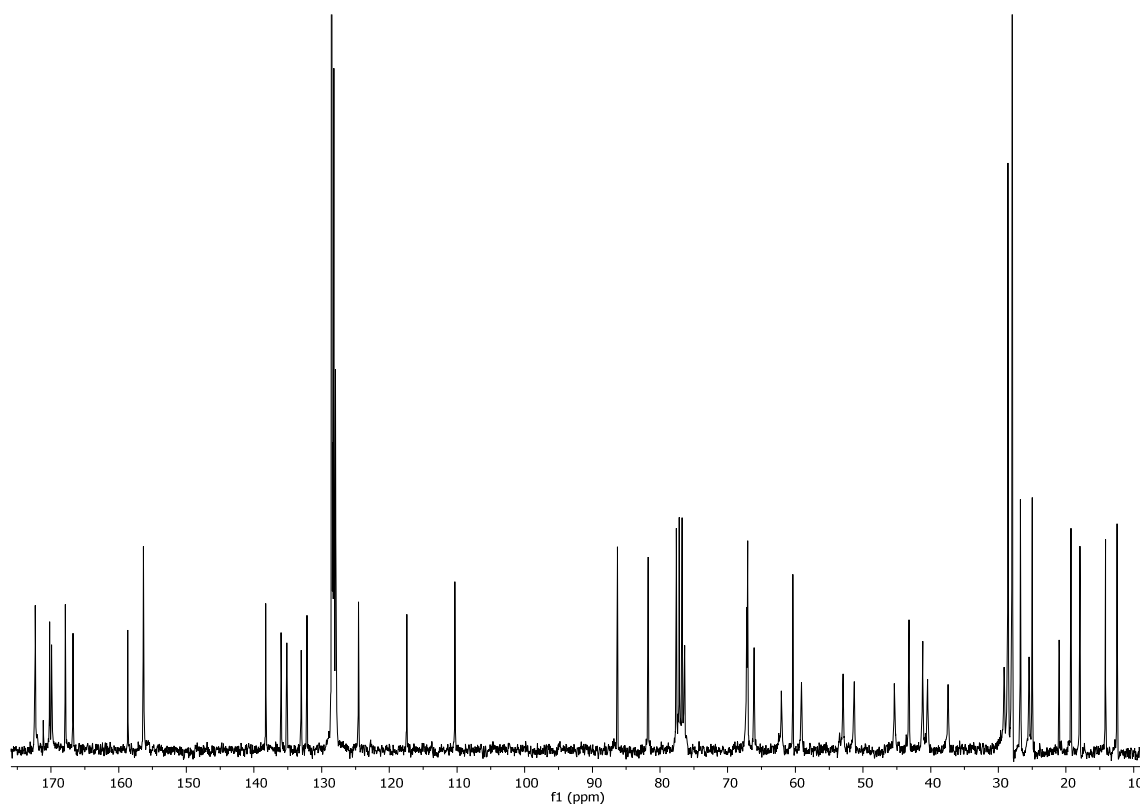




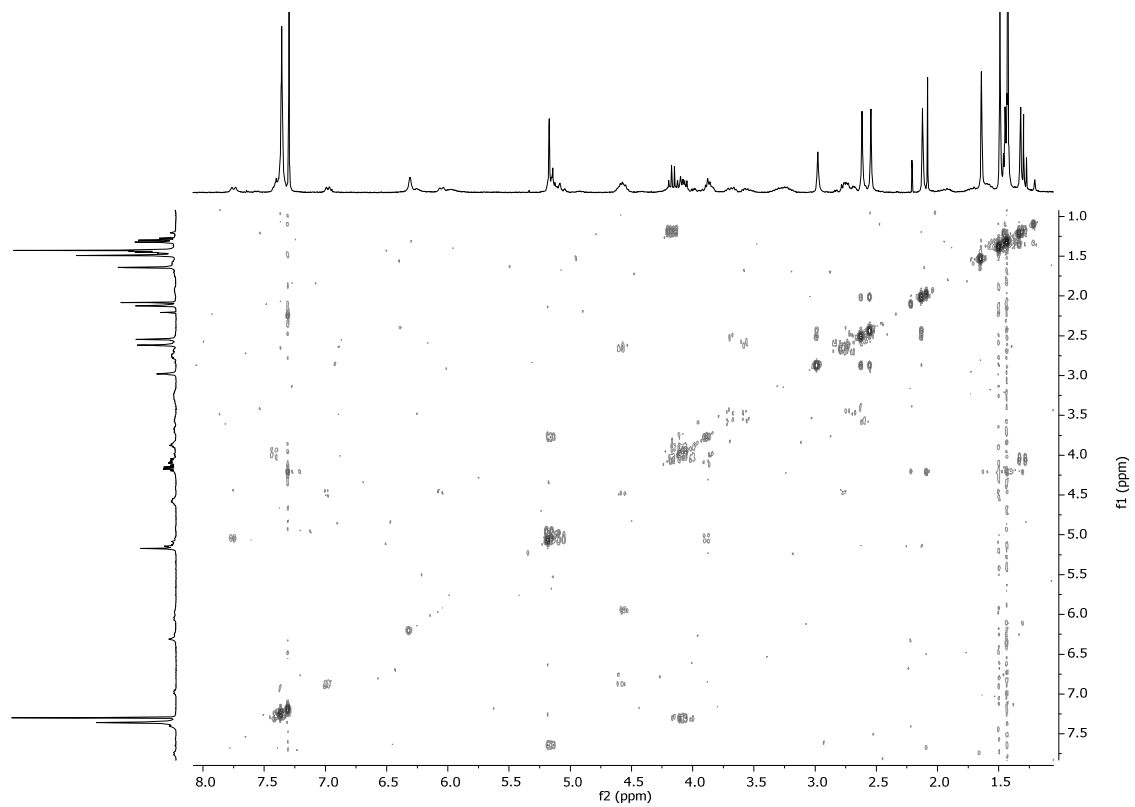
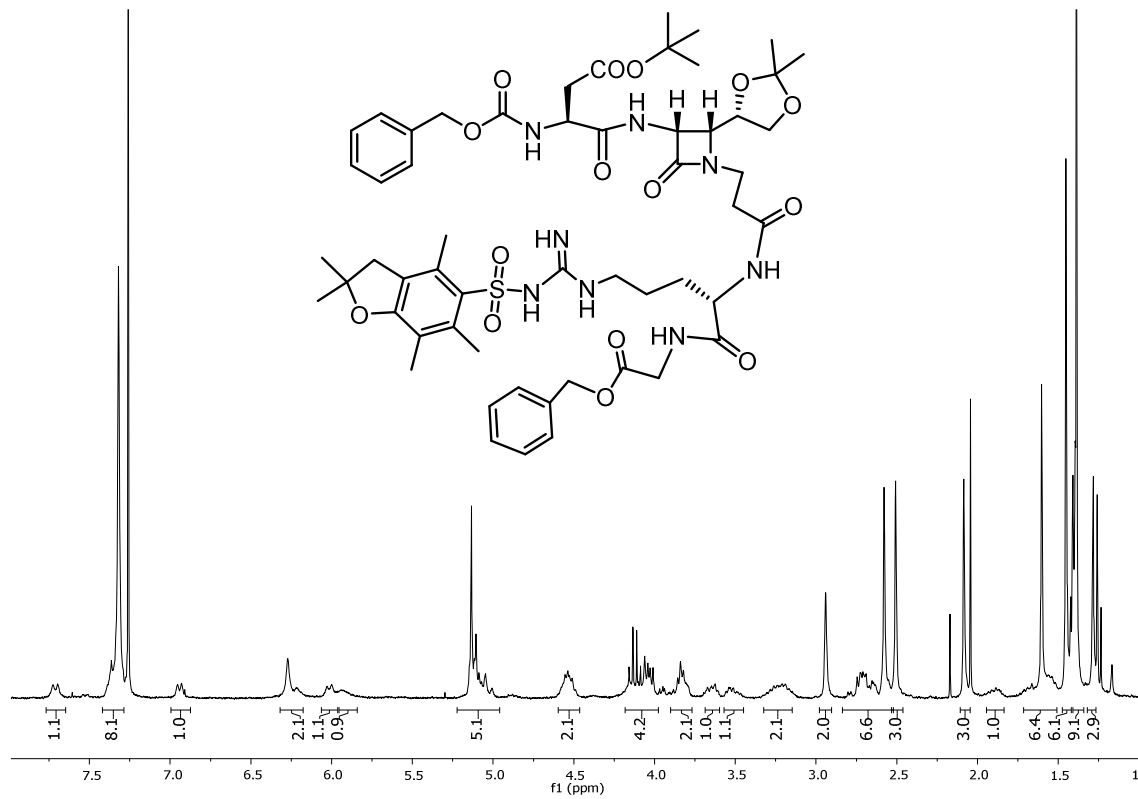
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (23.11):**

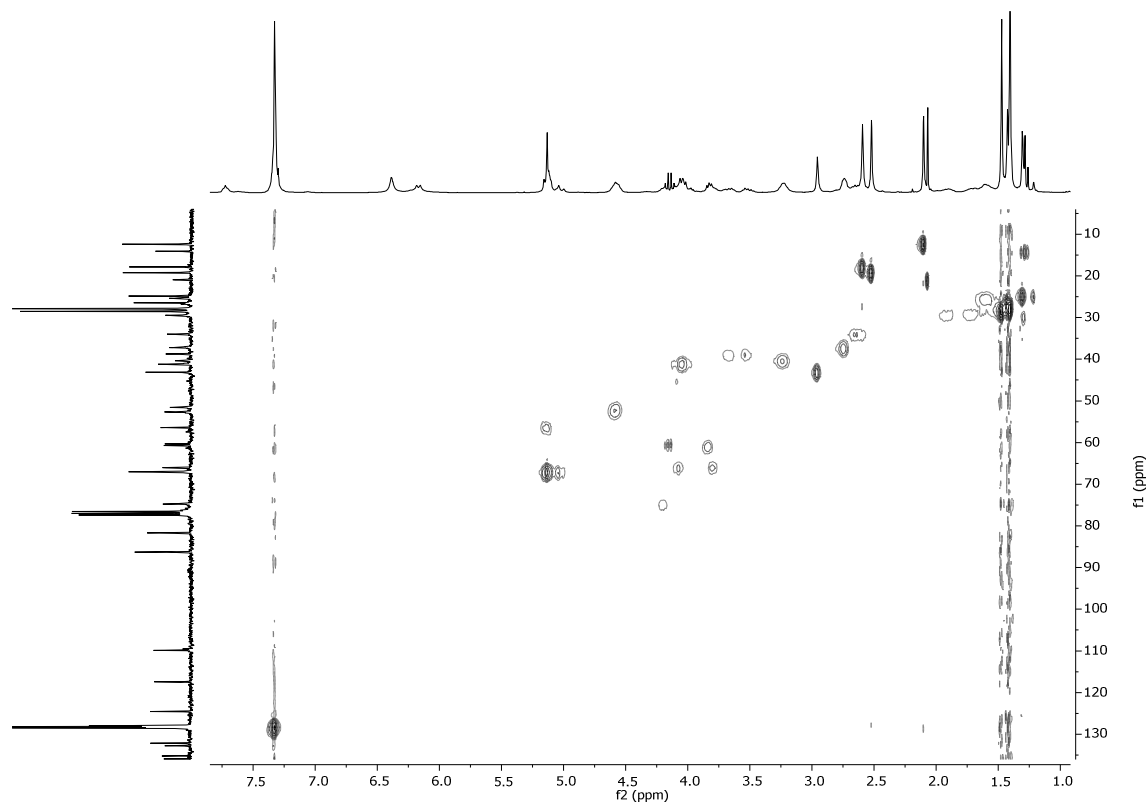
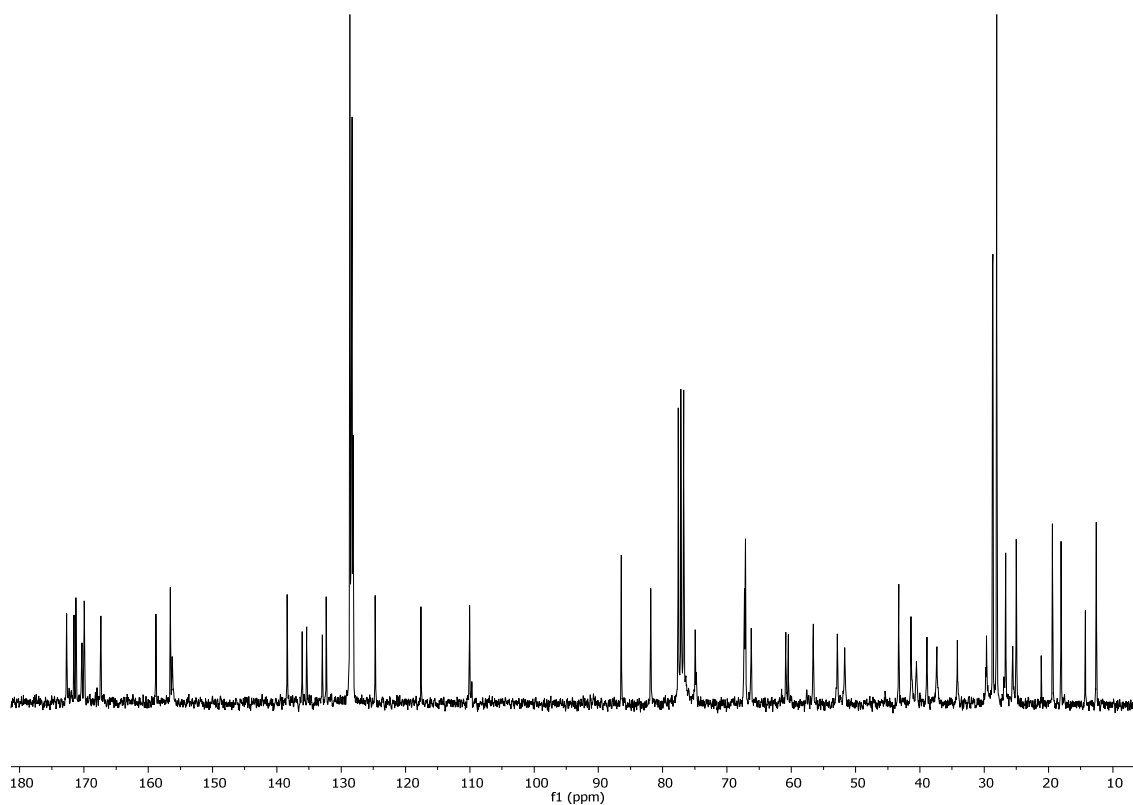




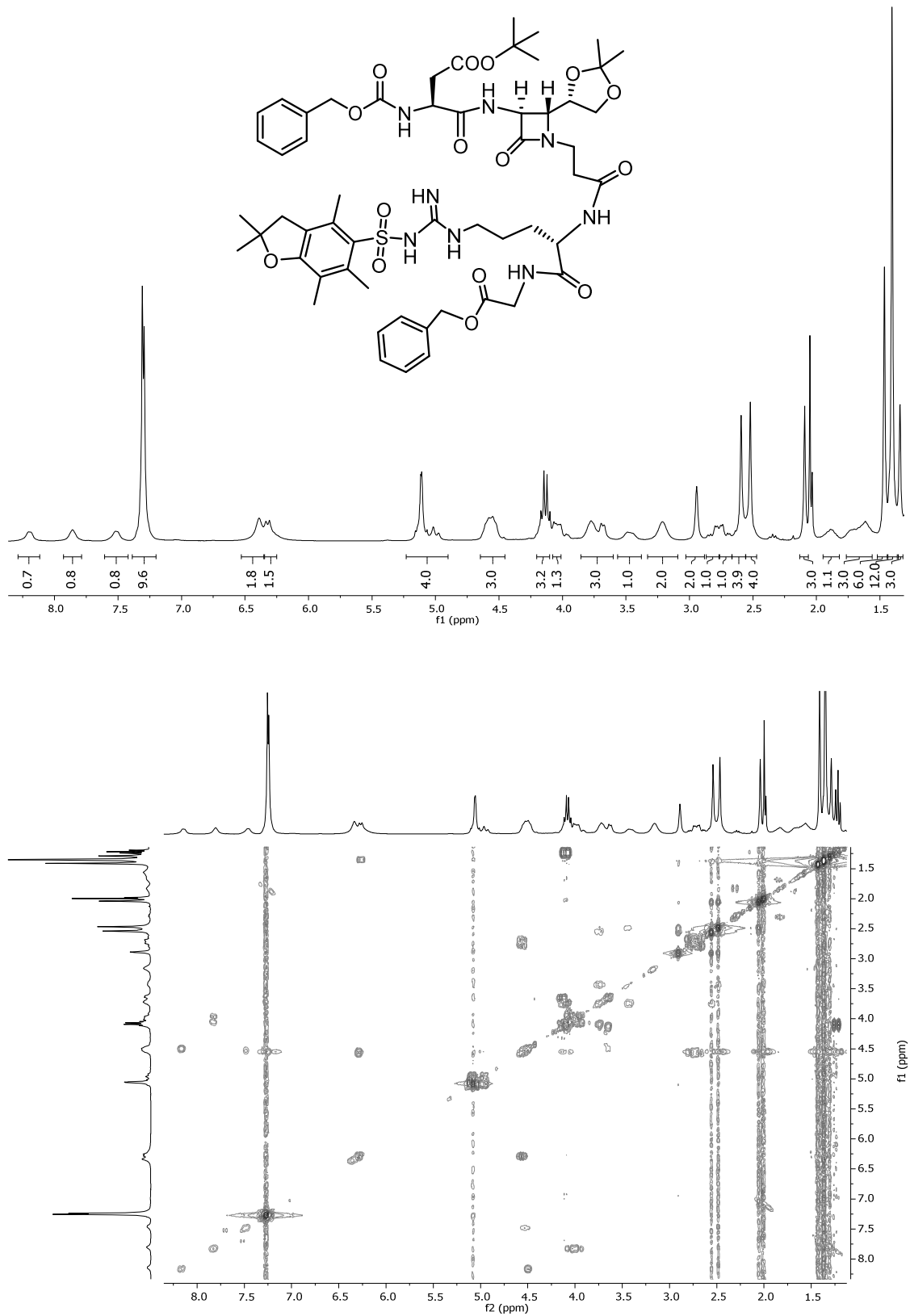


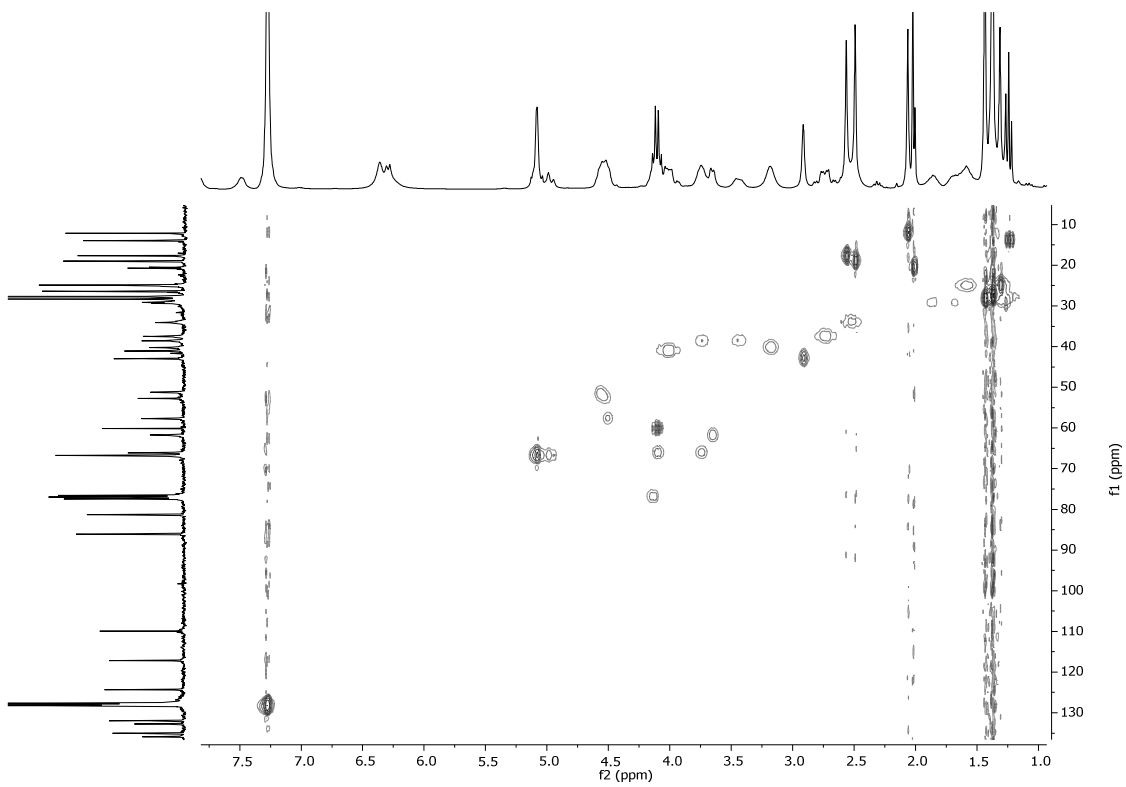
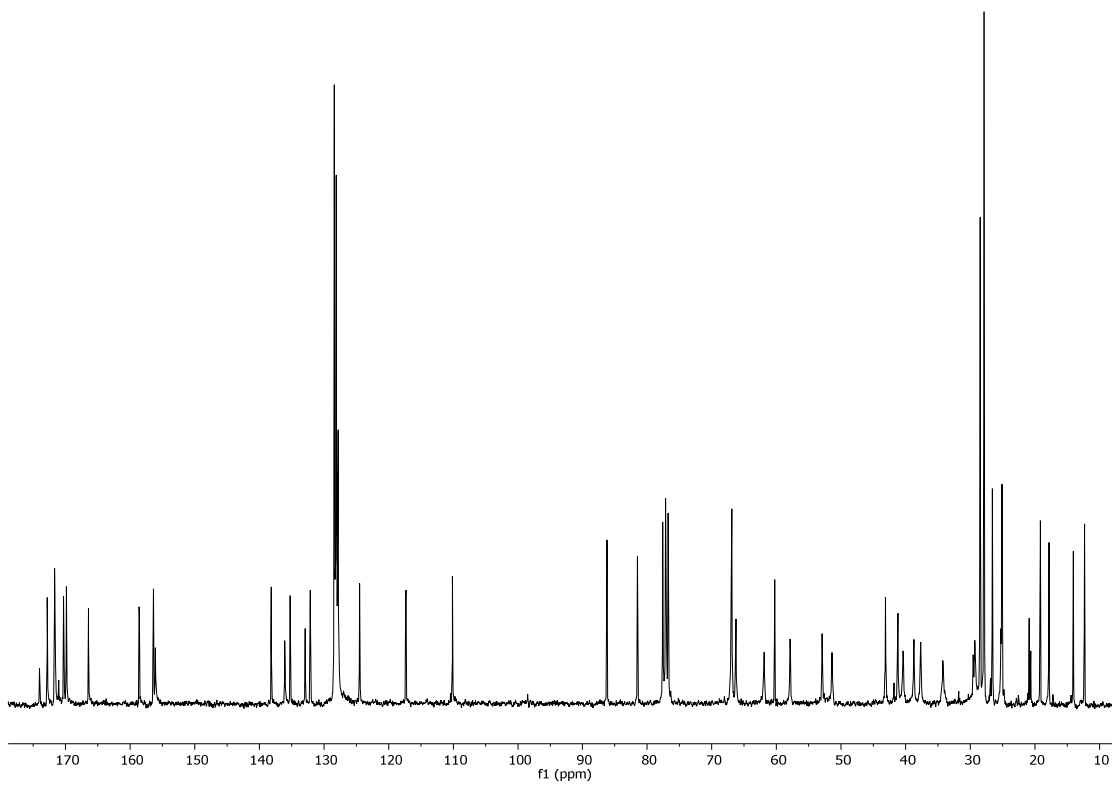
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (7.11):**



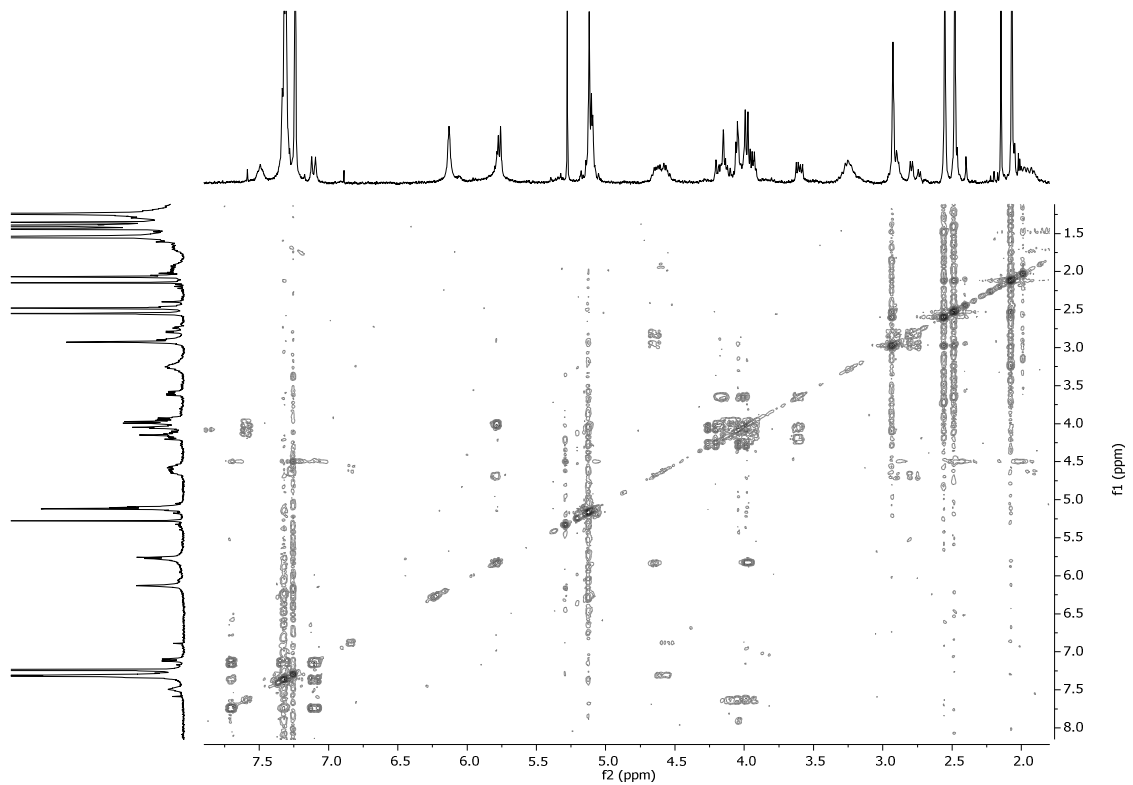
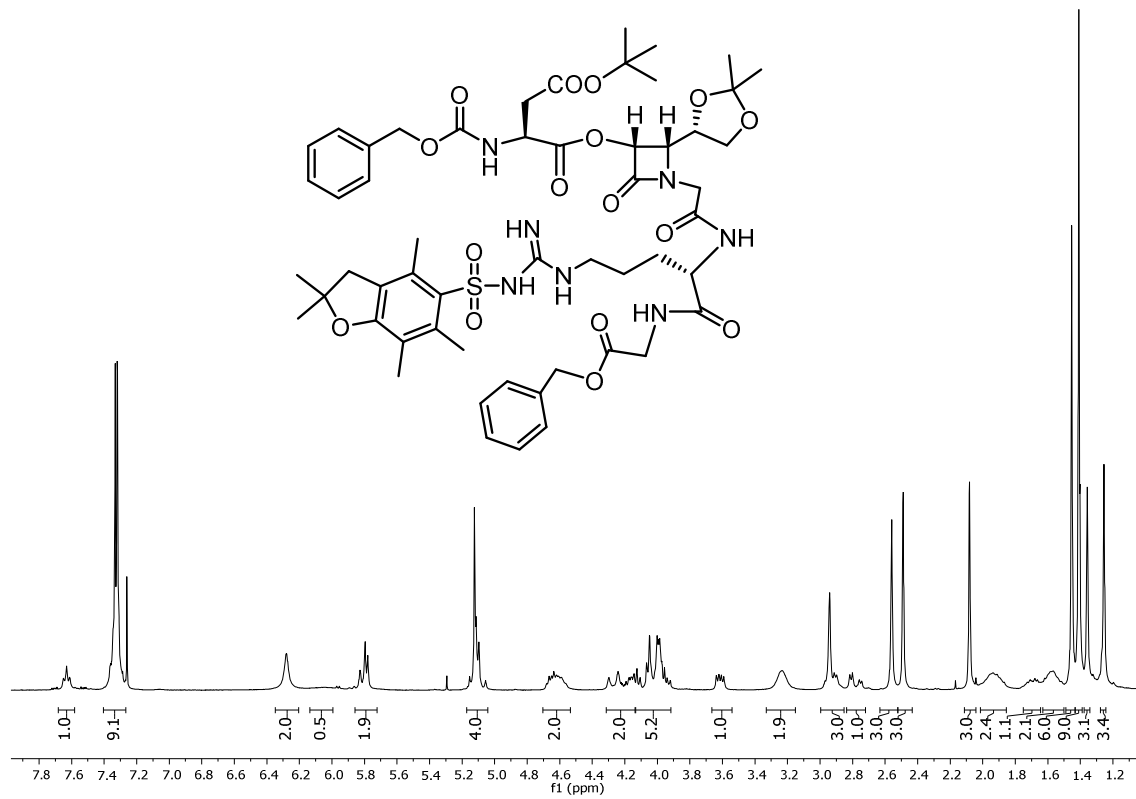


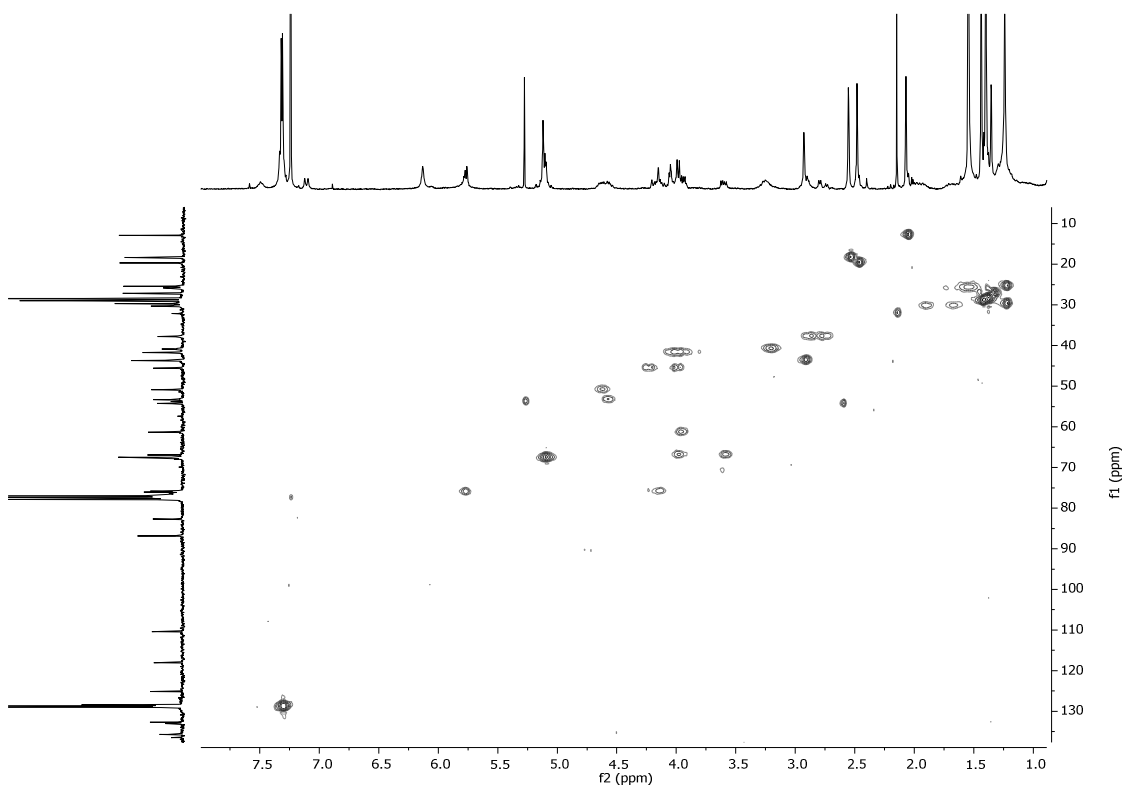
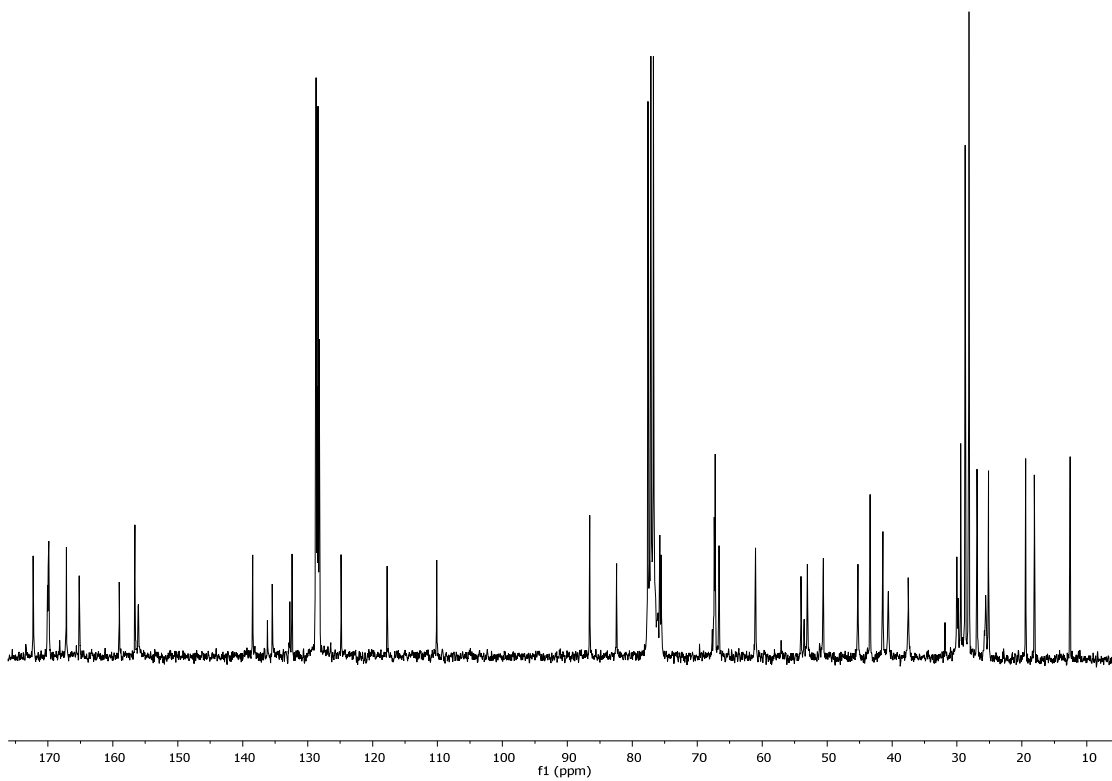
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (8.11):**



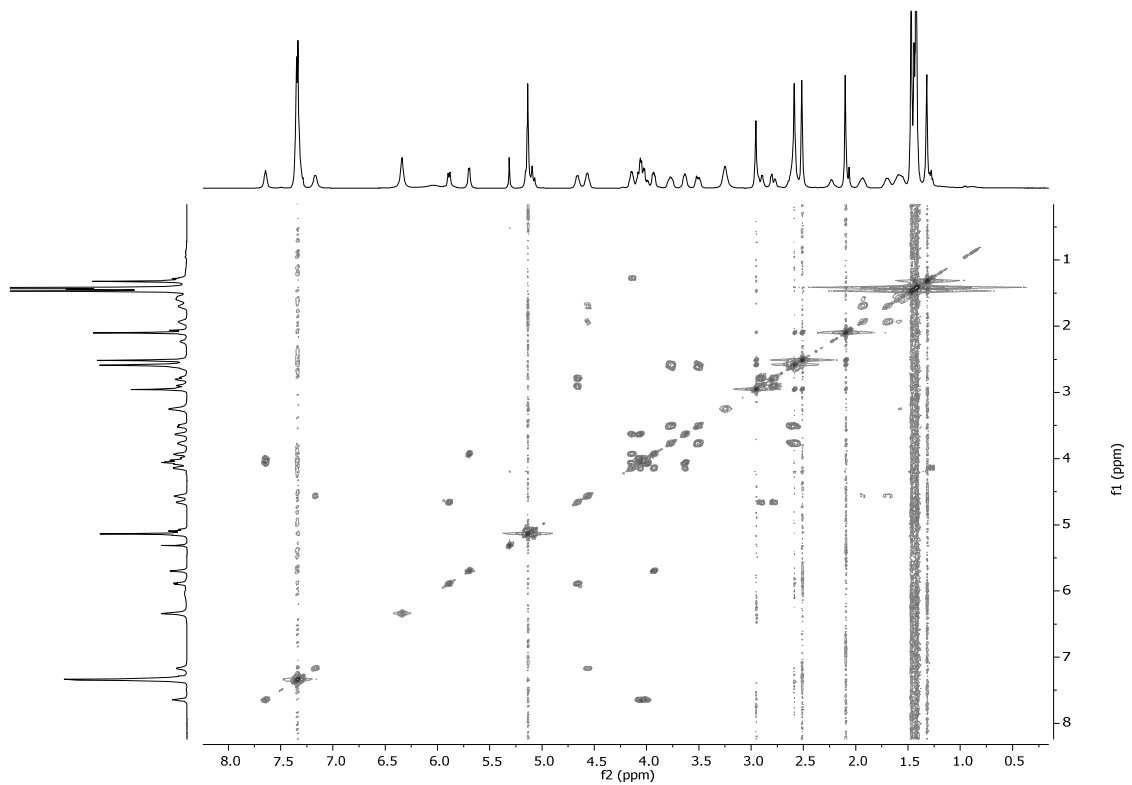
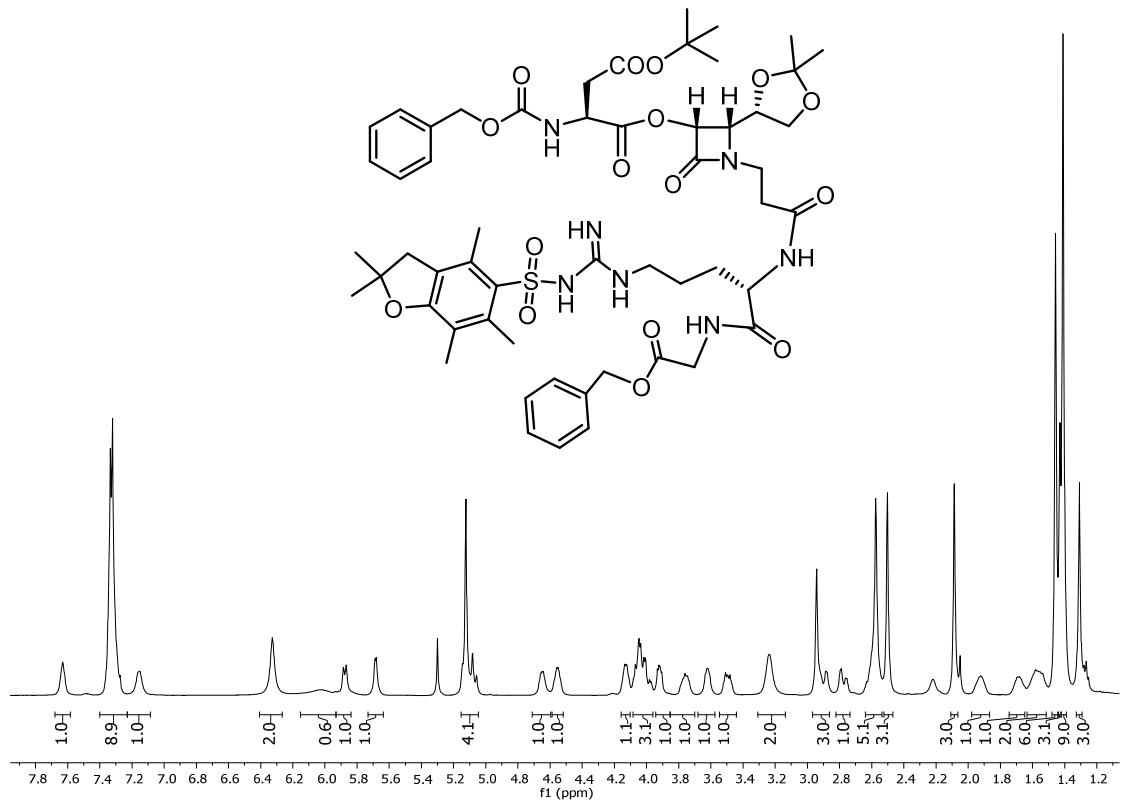


**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (1.11):**

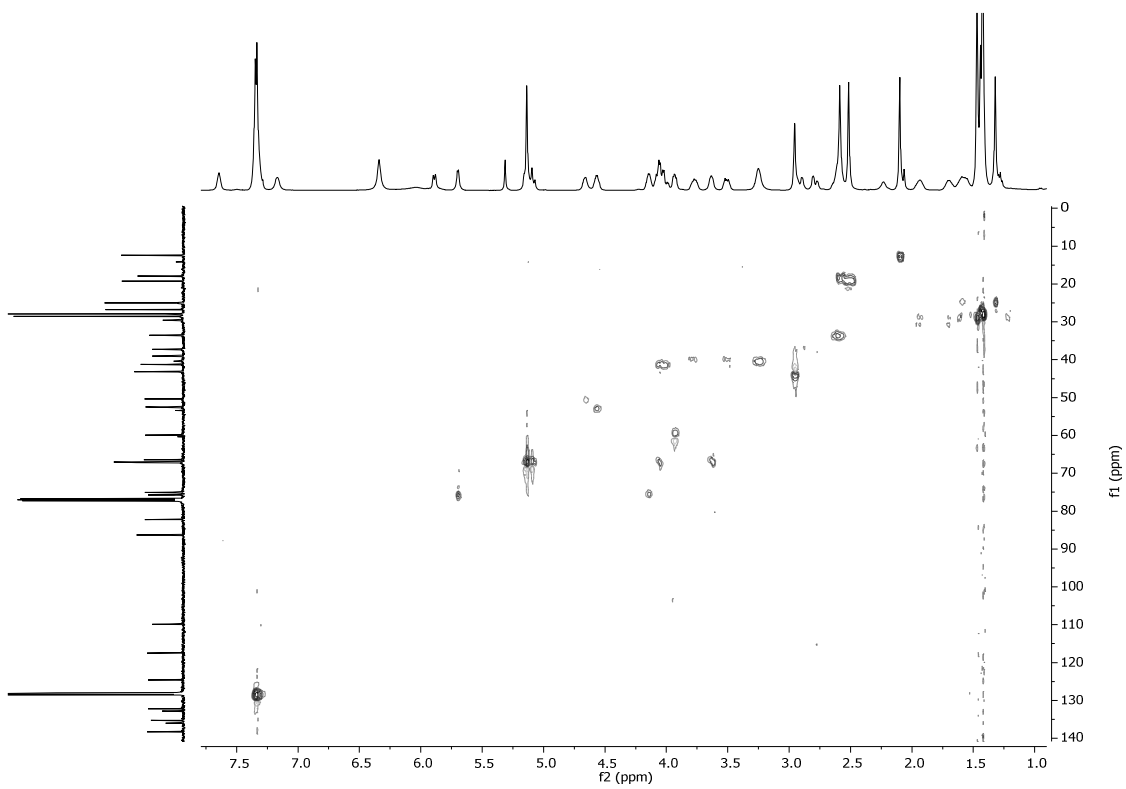
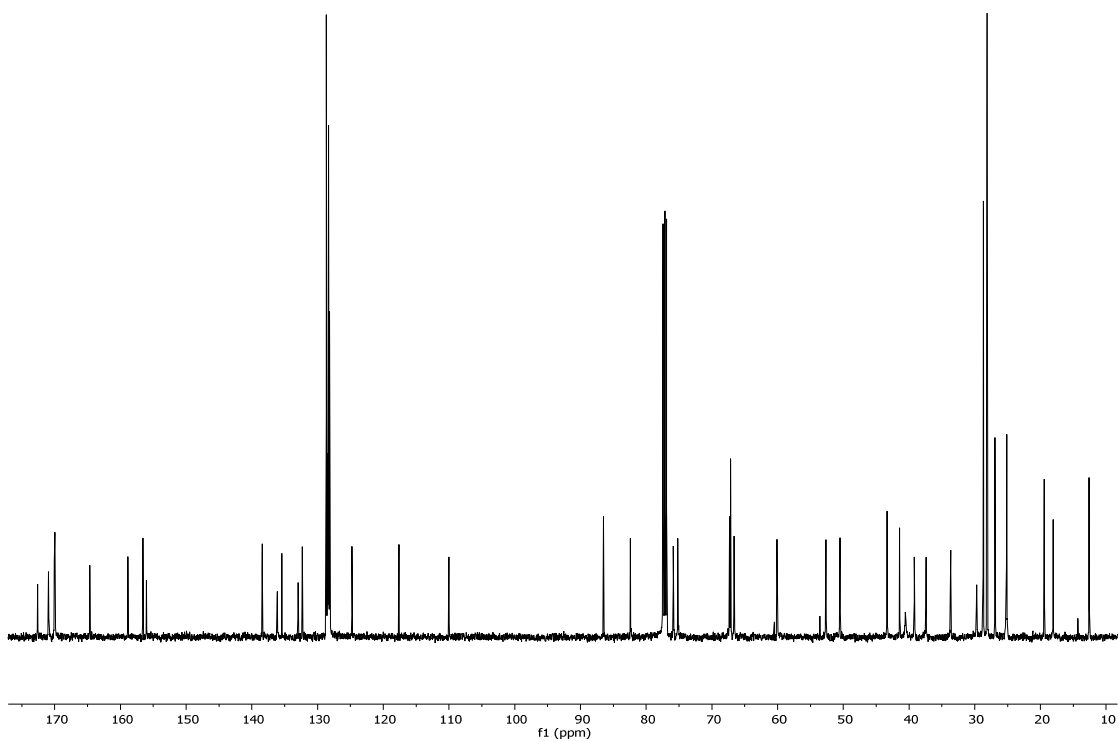




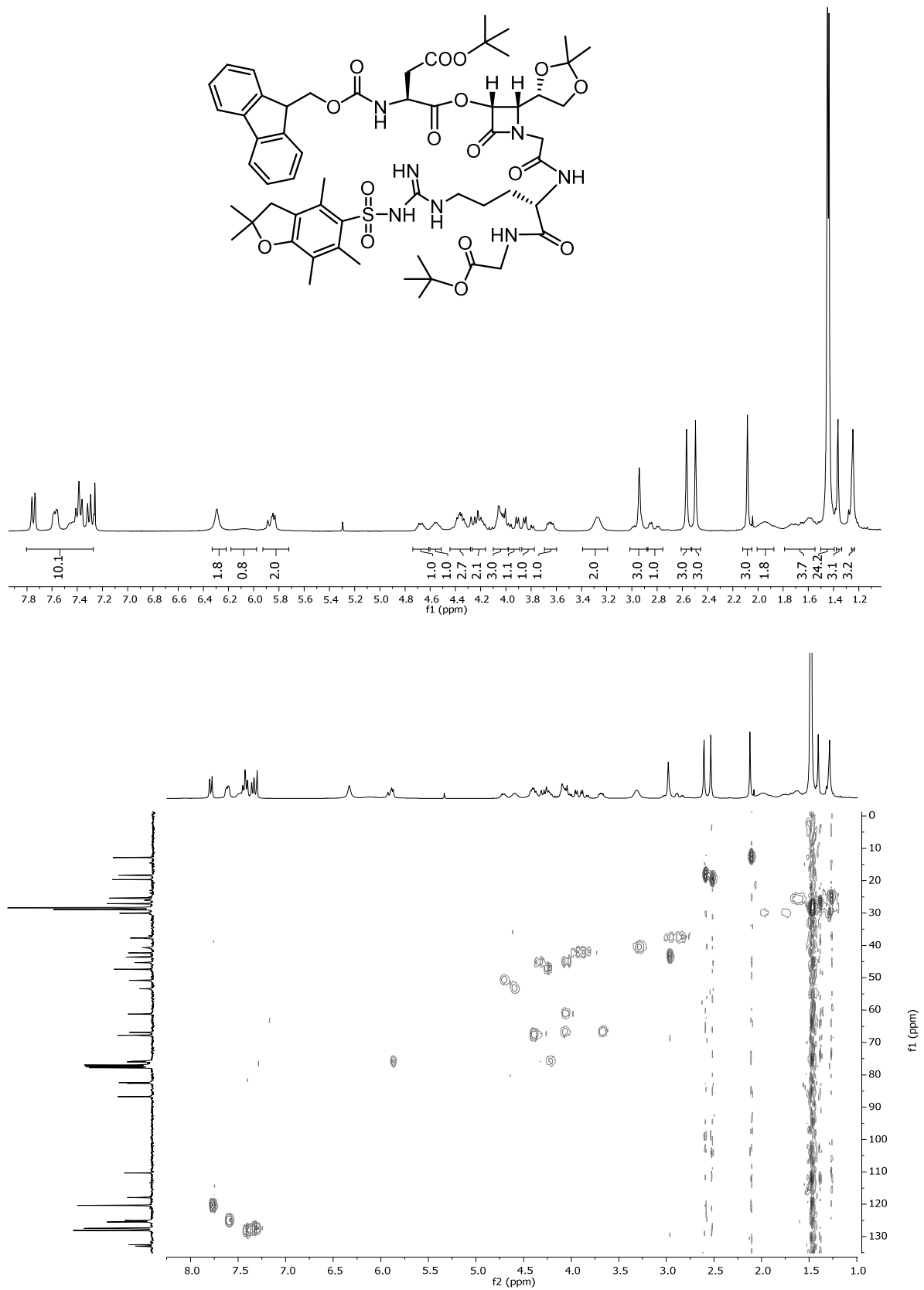
**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-OBn (9.11):**

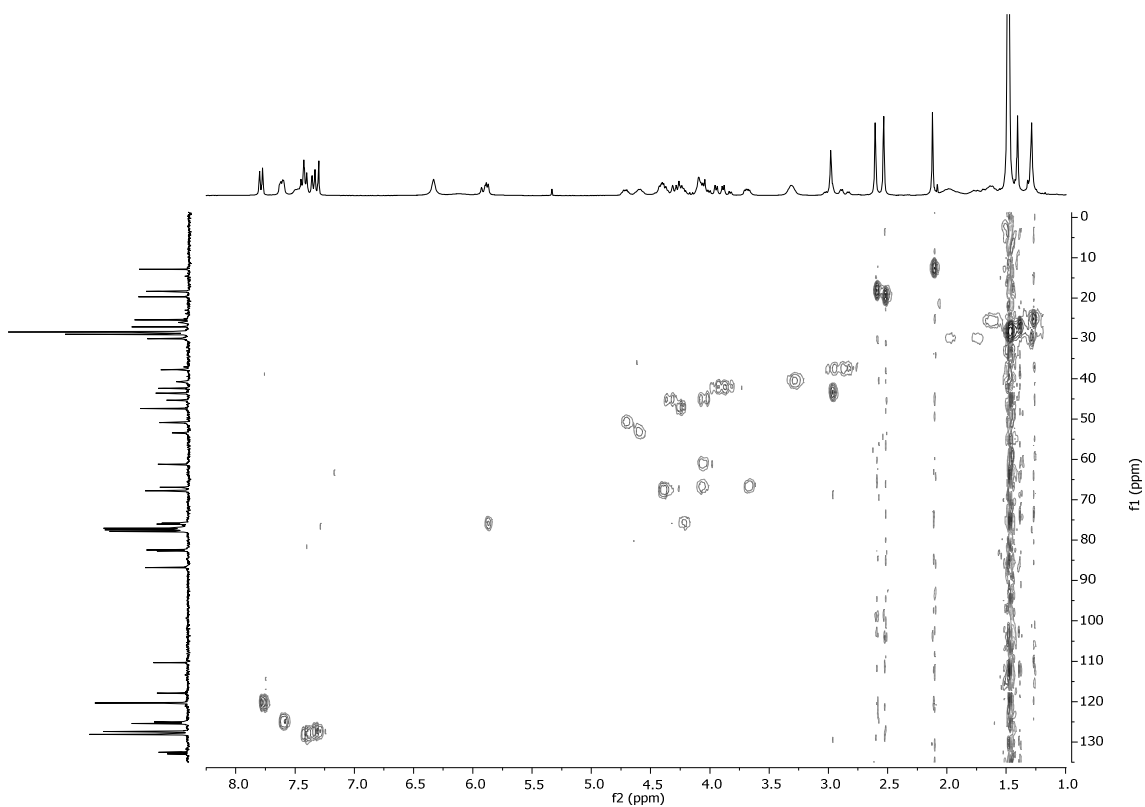
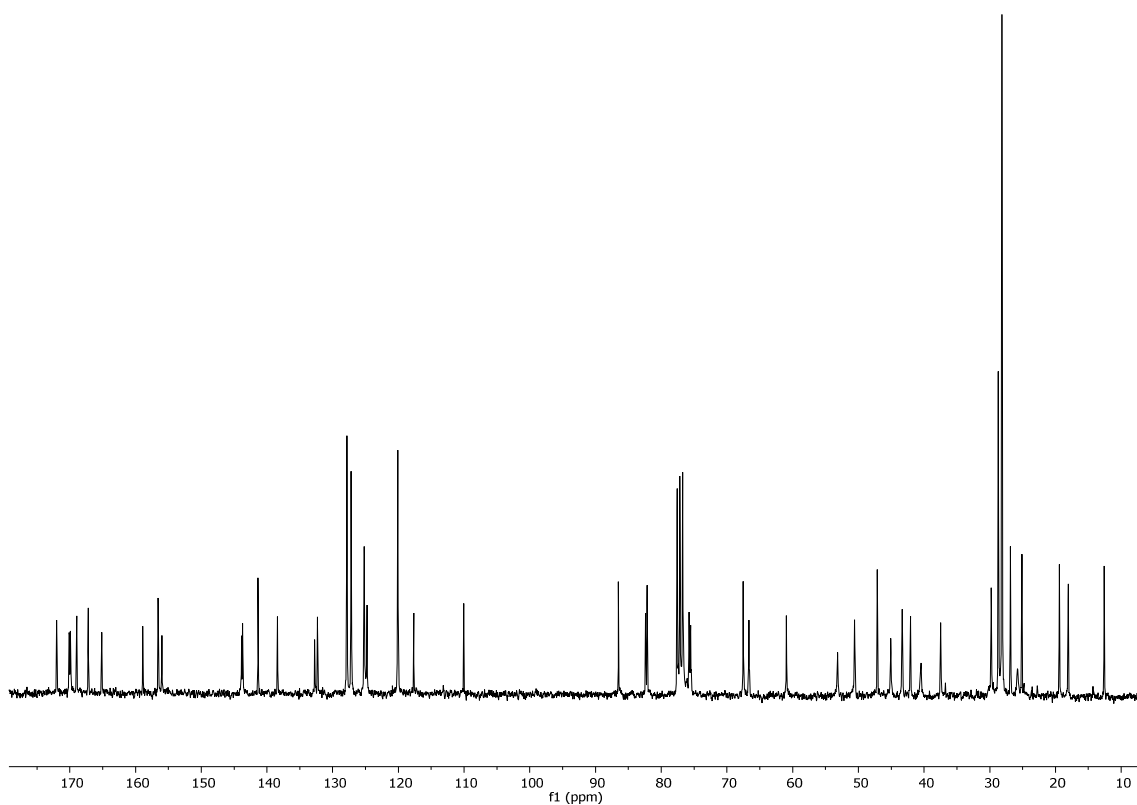




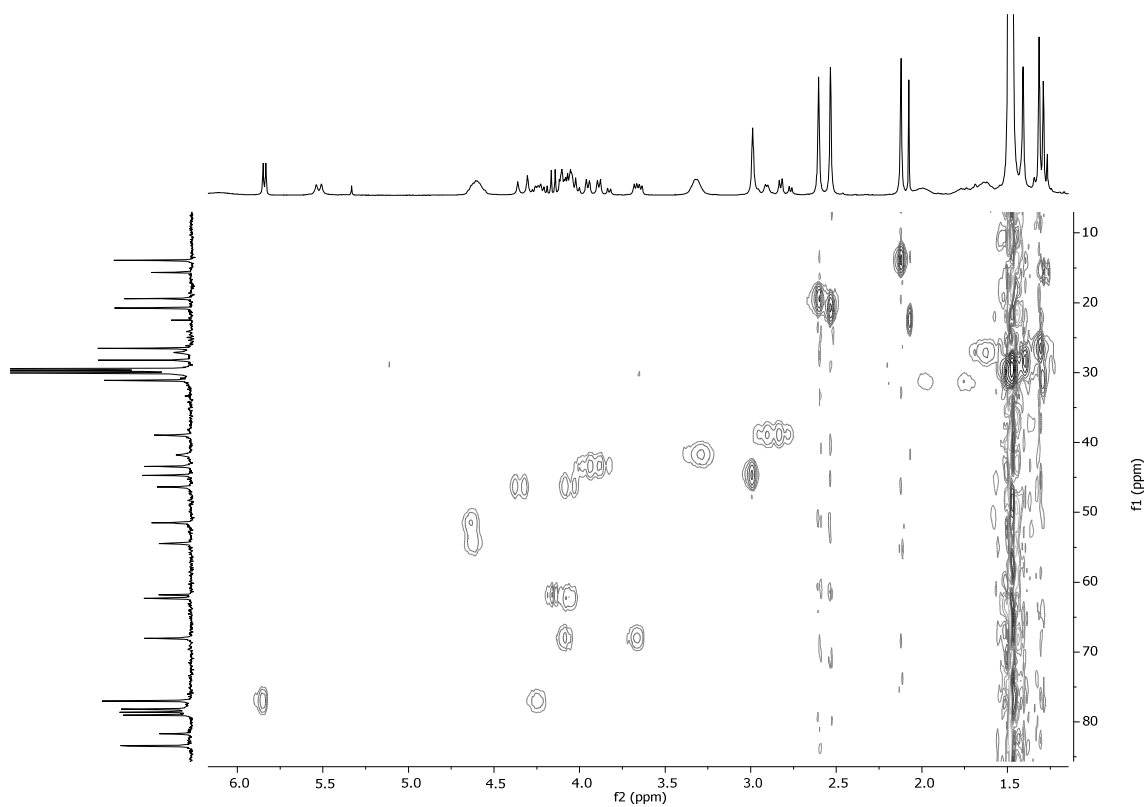
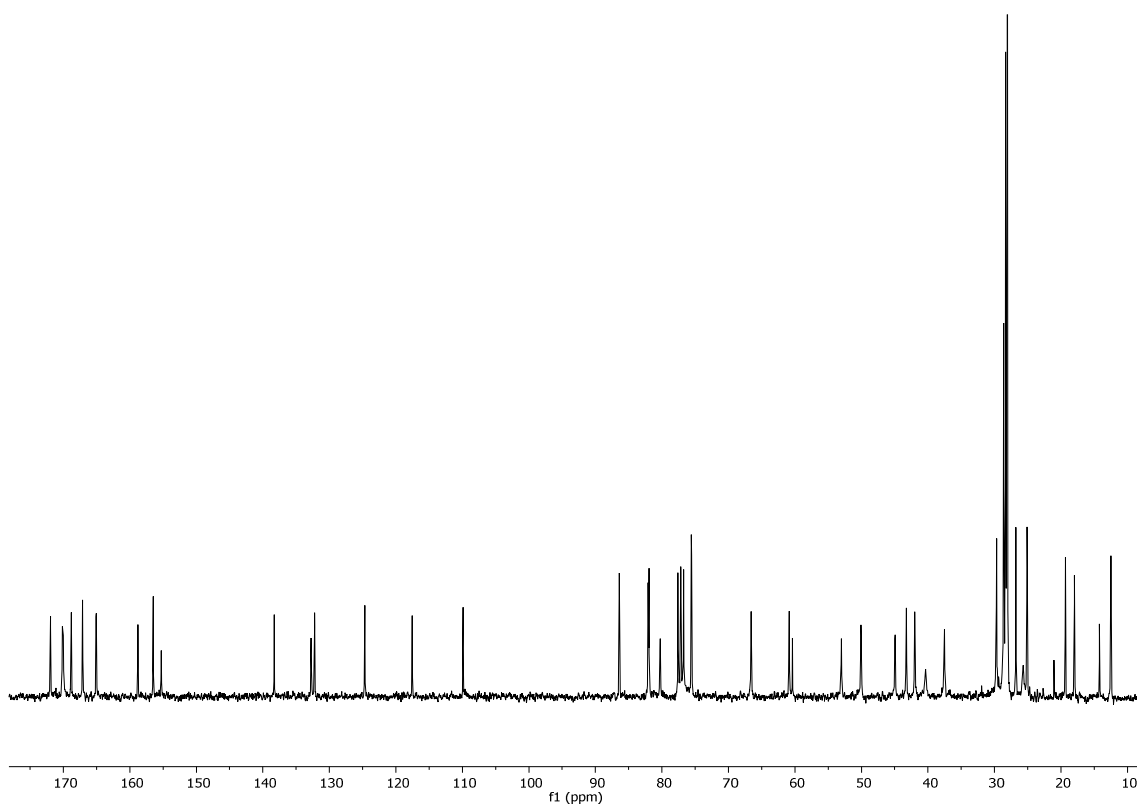


**Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidin-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (24.11a):**

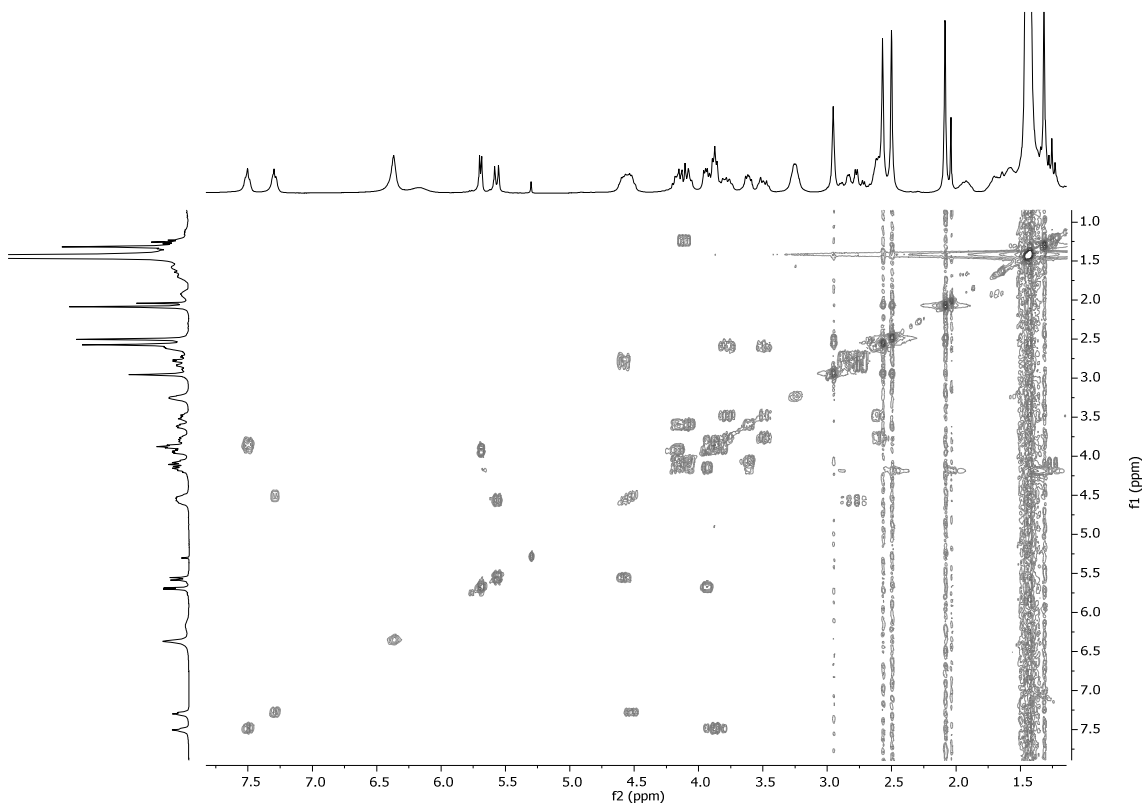
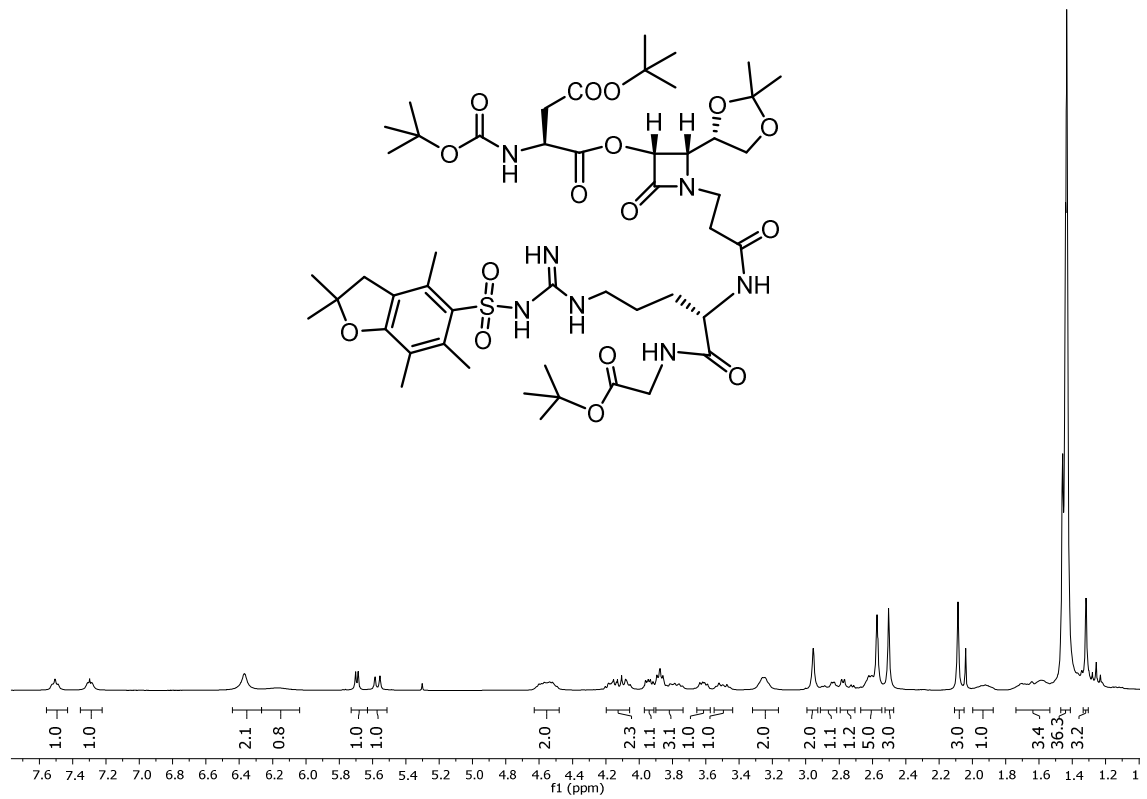


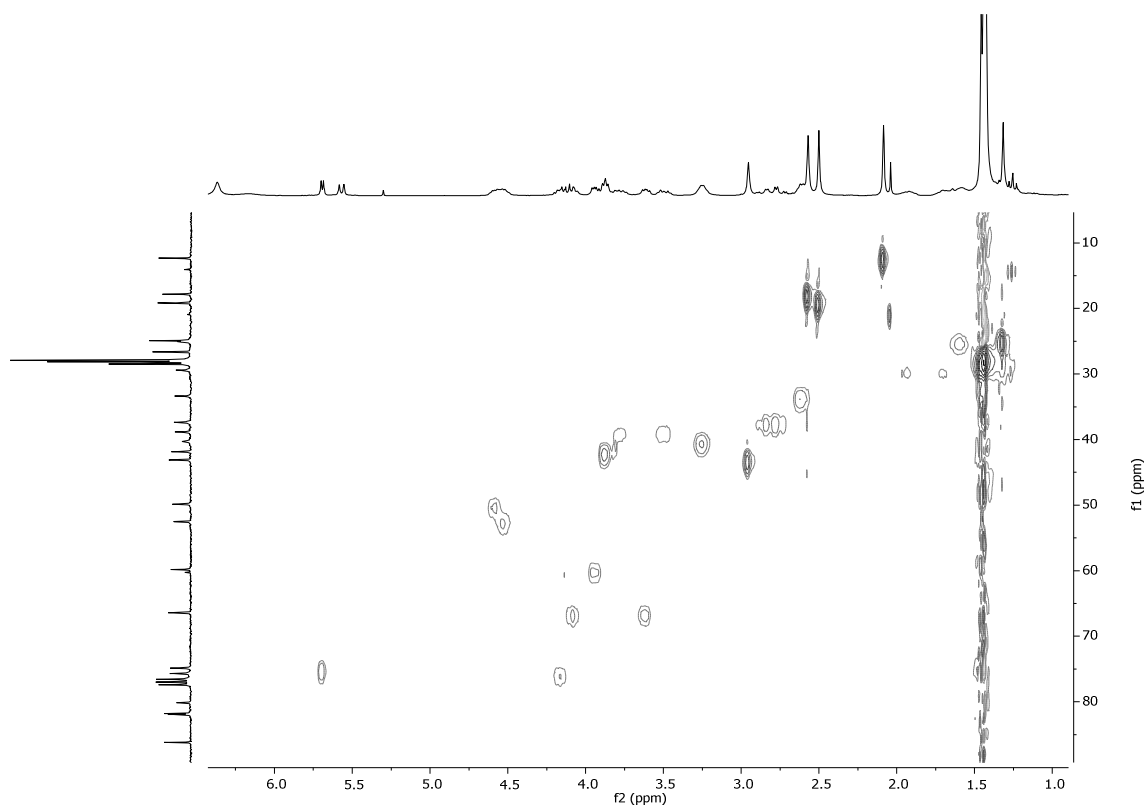
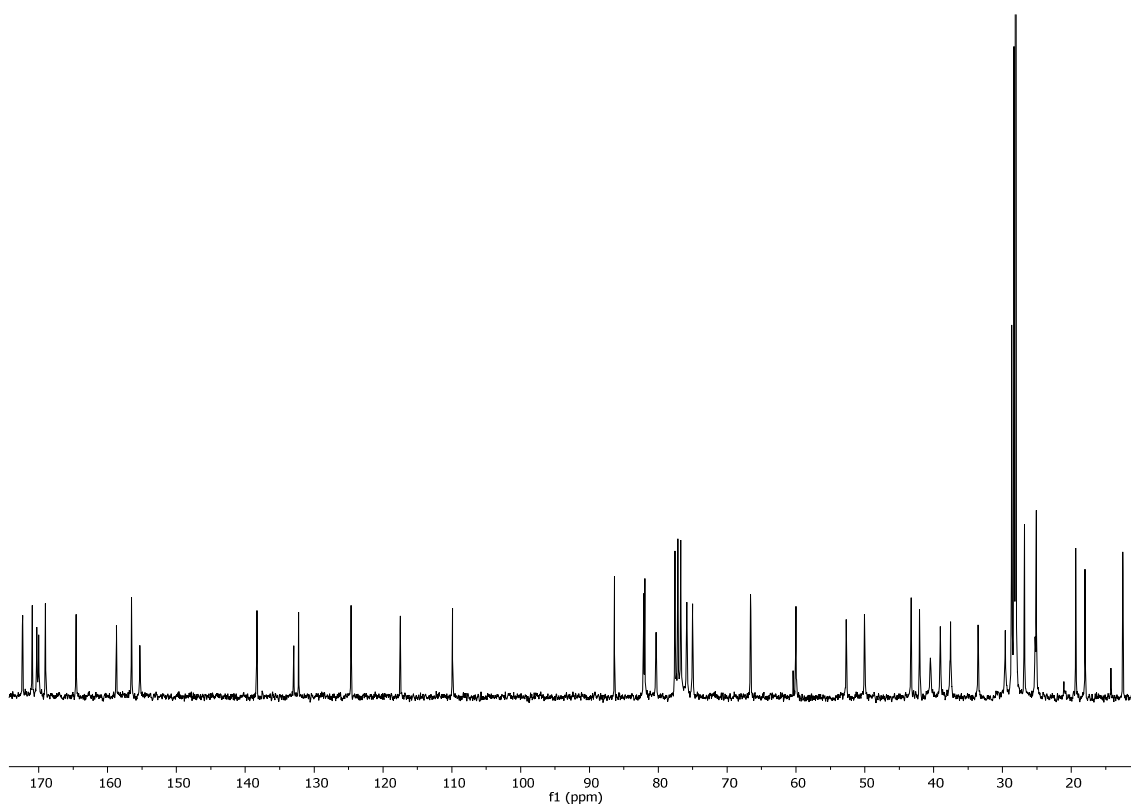




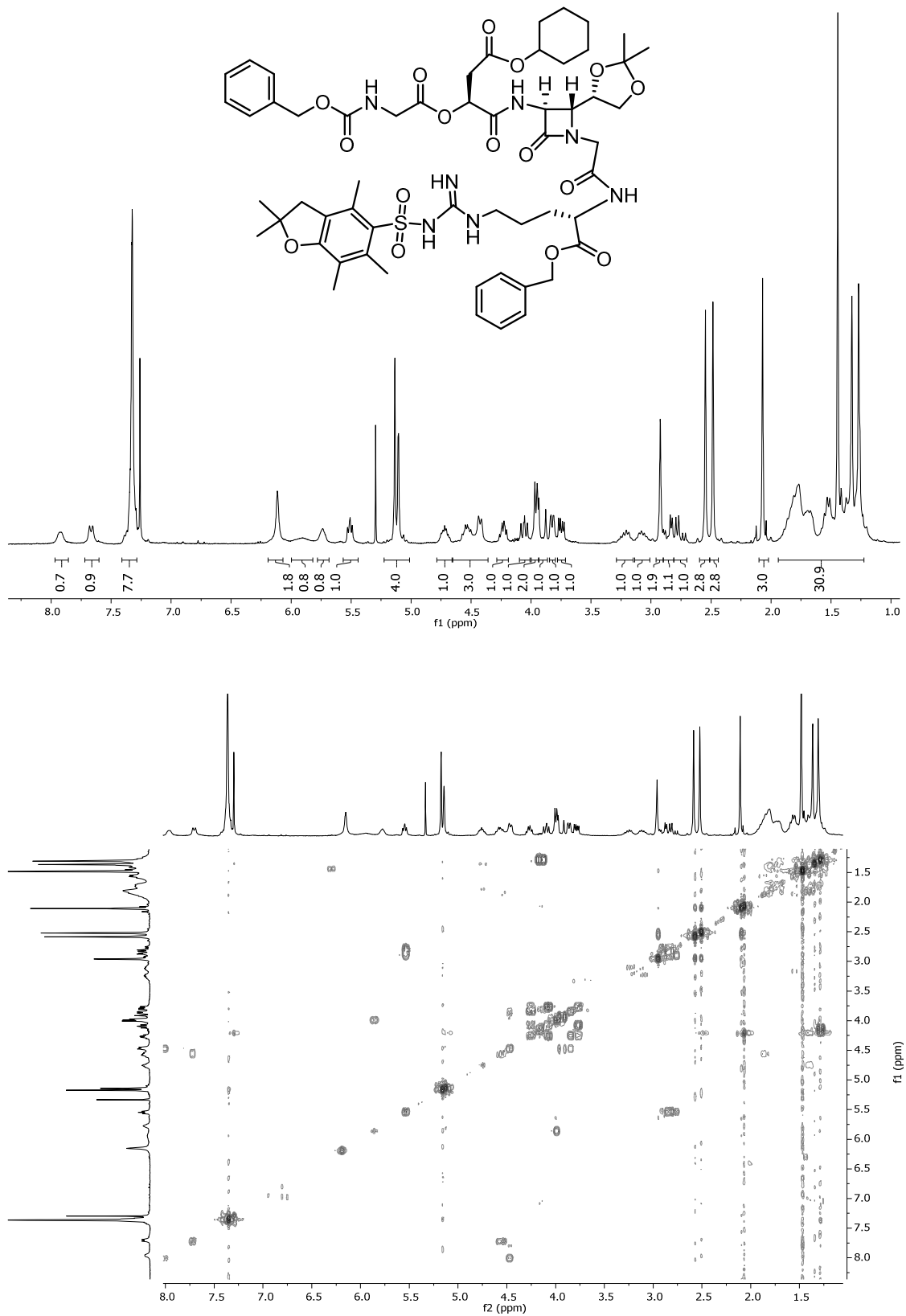


**Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-O<sup>t</sup>Bu (26.11):**

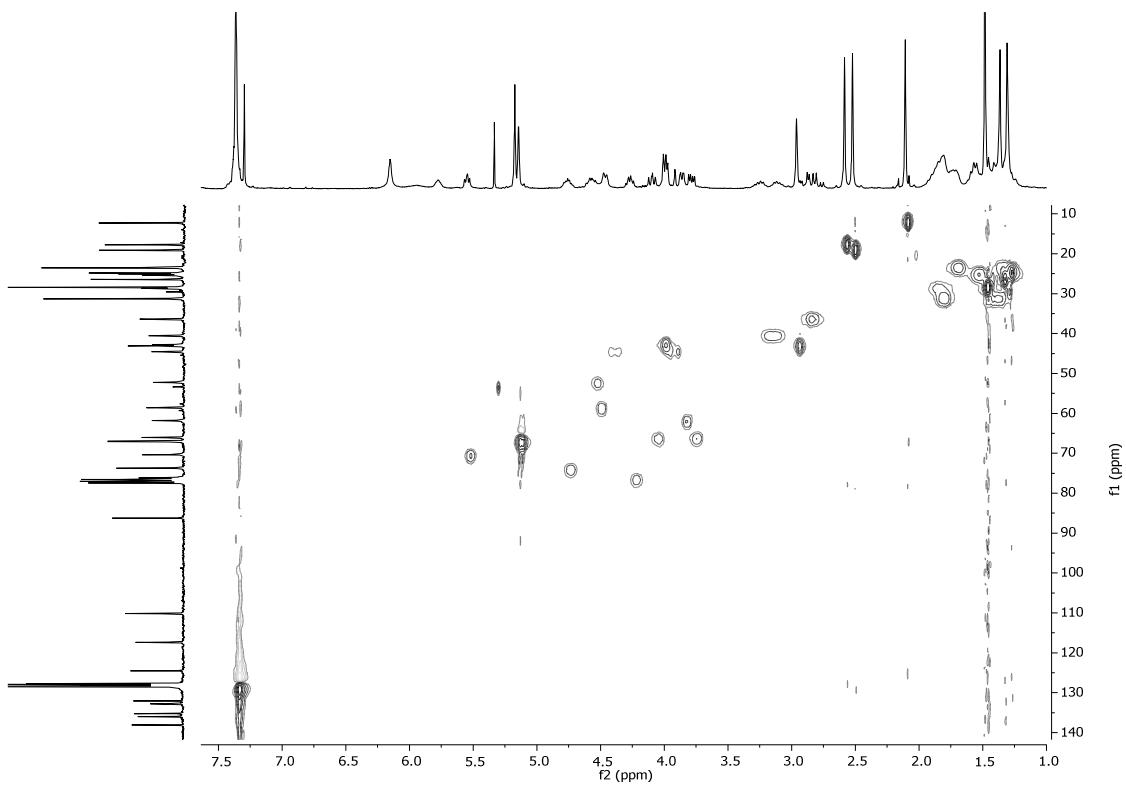
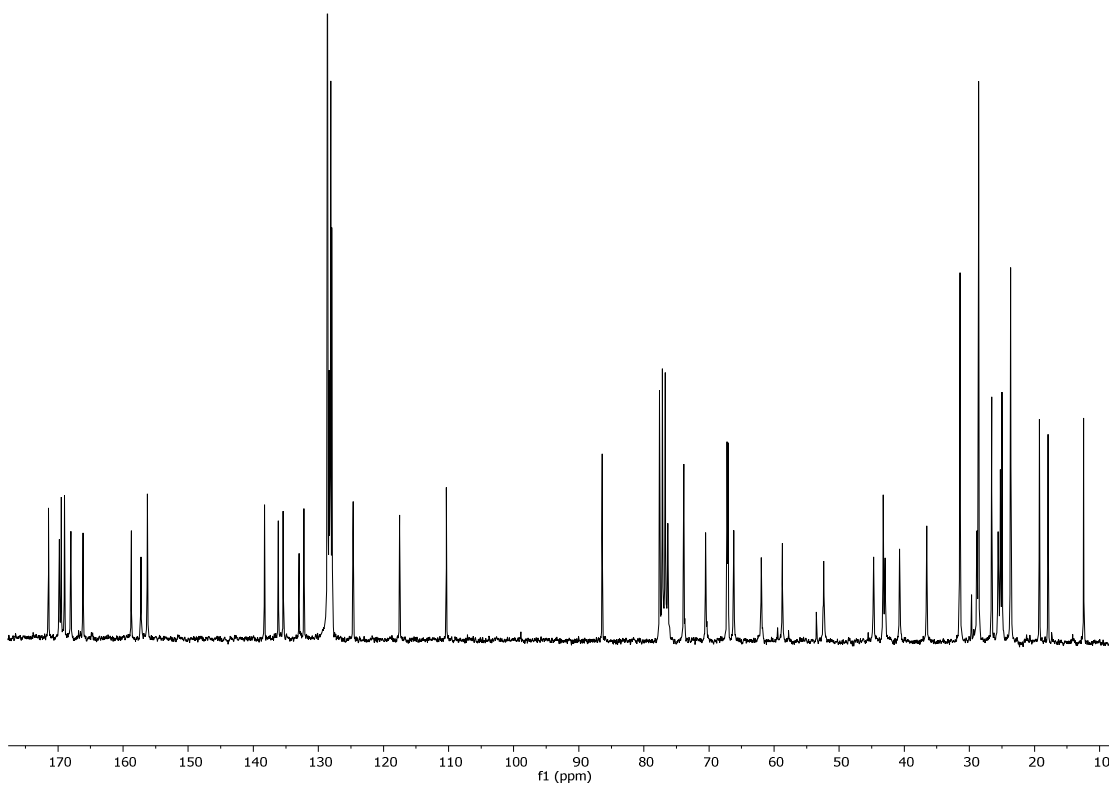




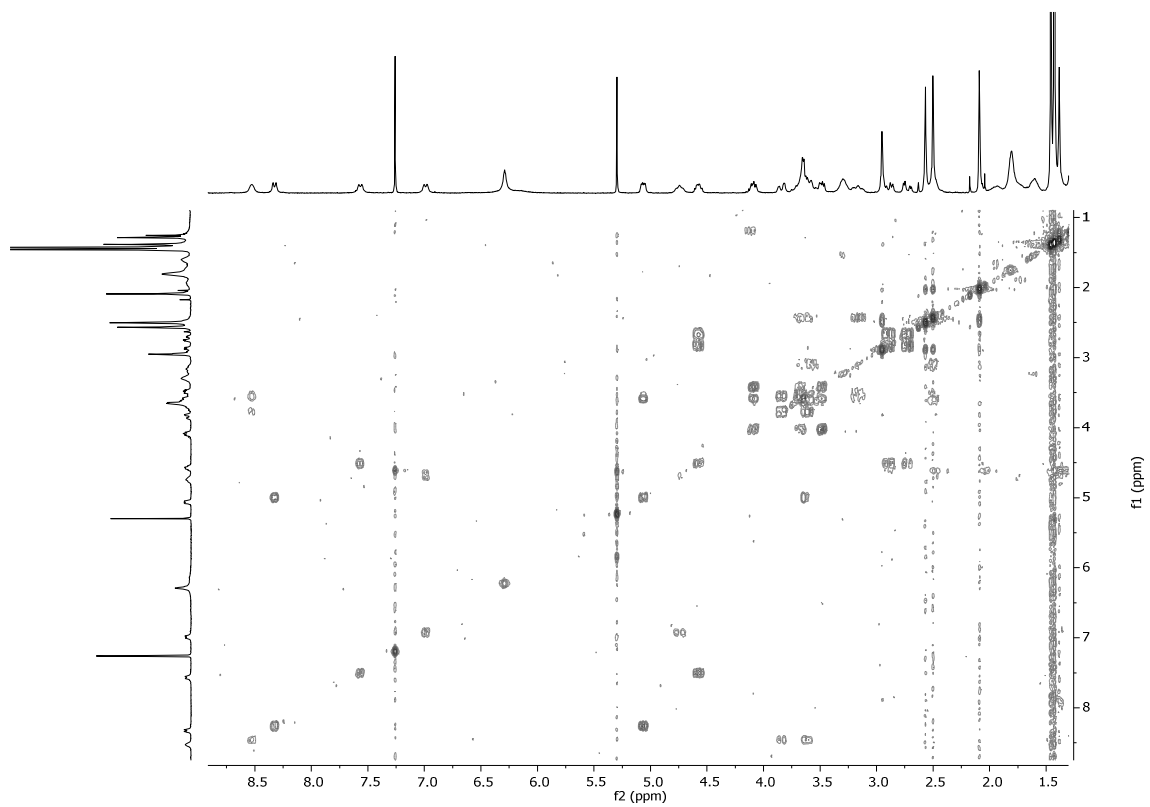
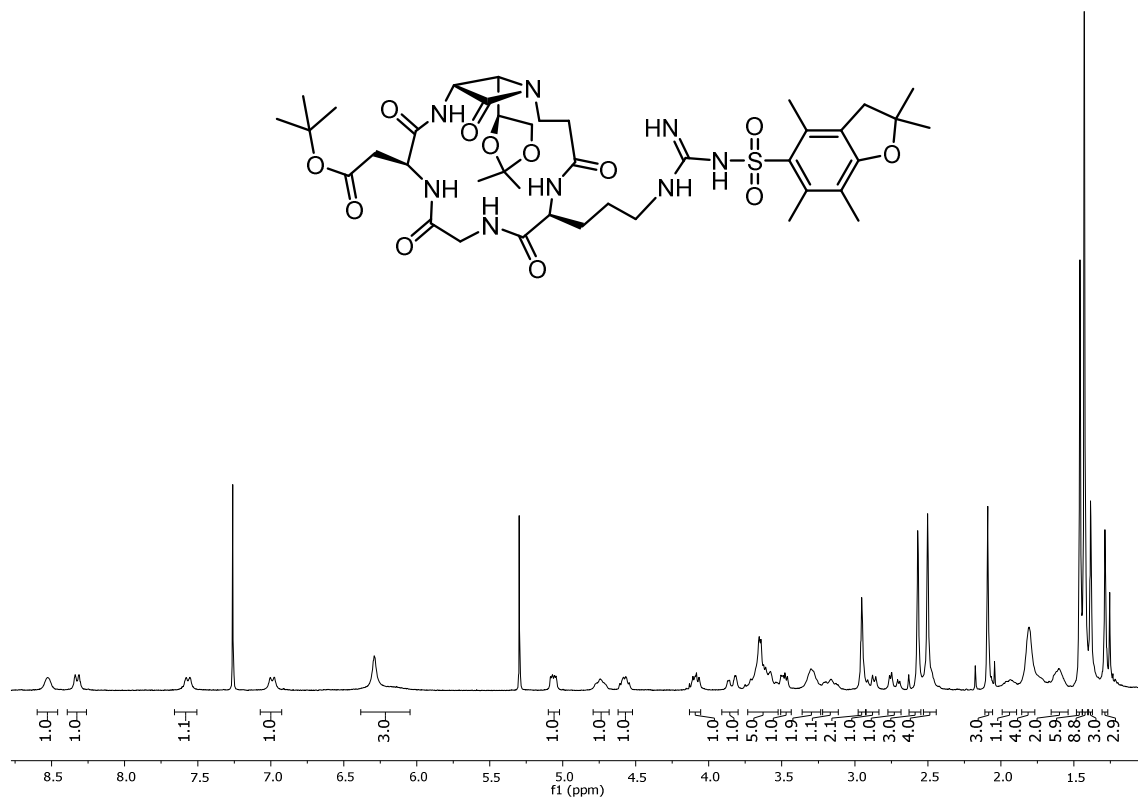
**Cbz-Gly-O-Asp(OcHx)-[(3*S*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidin-2-ona]-Arg(Pbf)-OBn (16.11):**

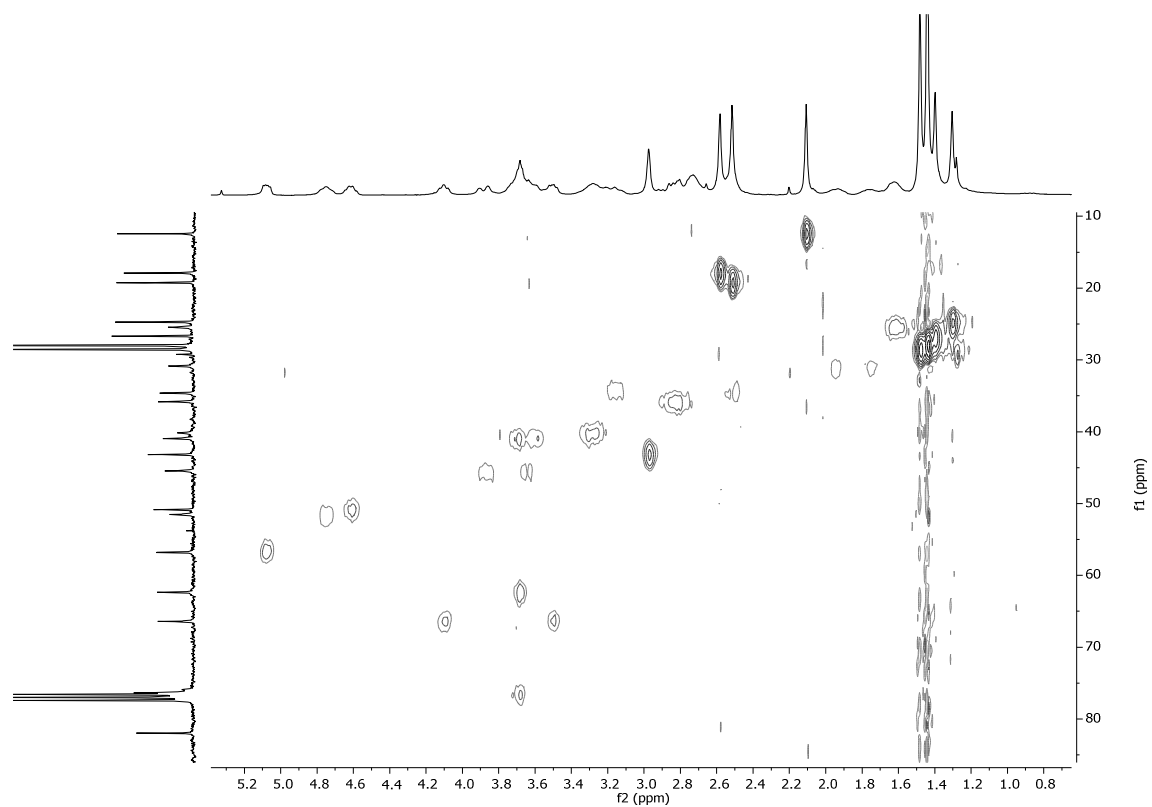
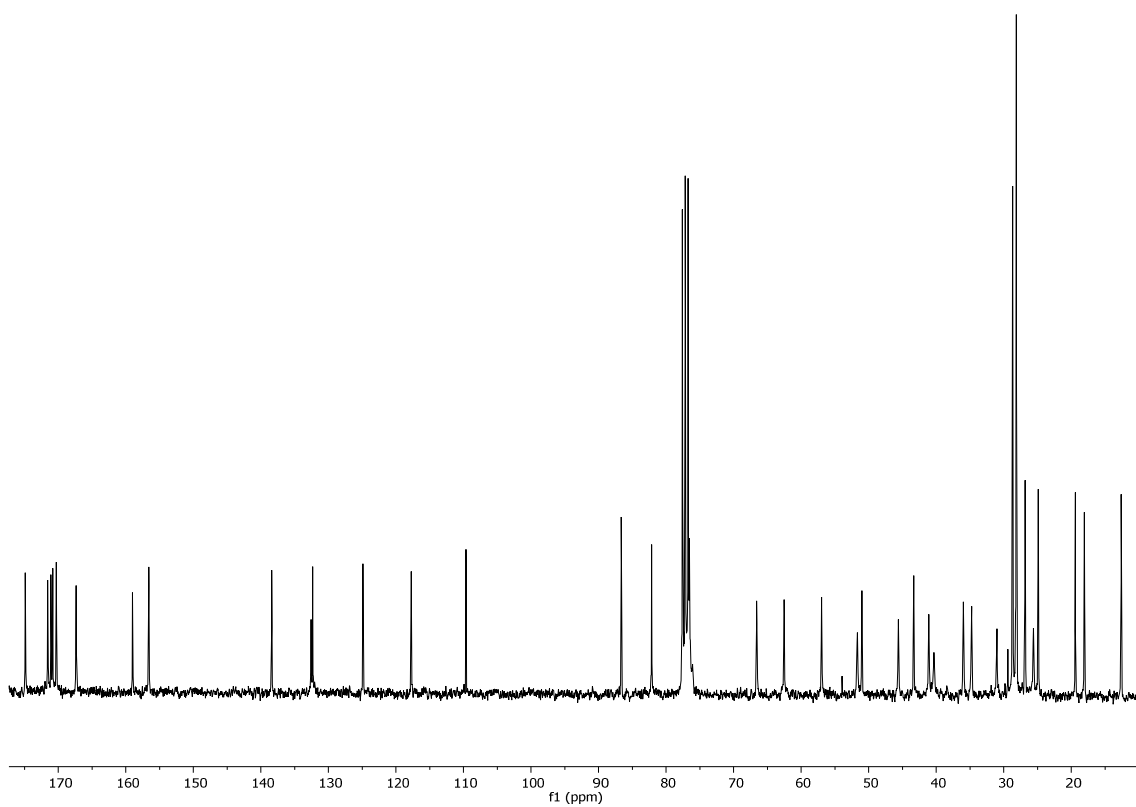




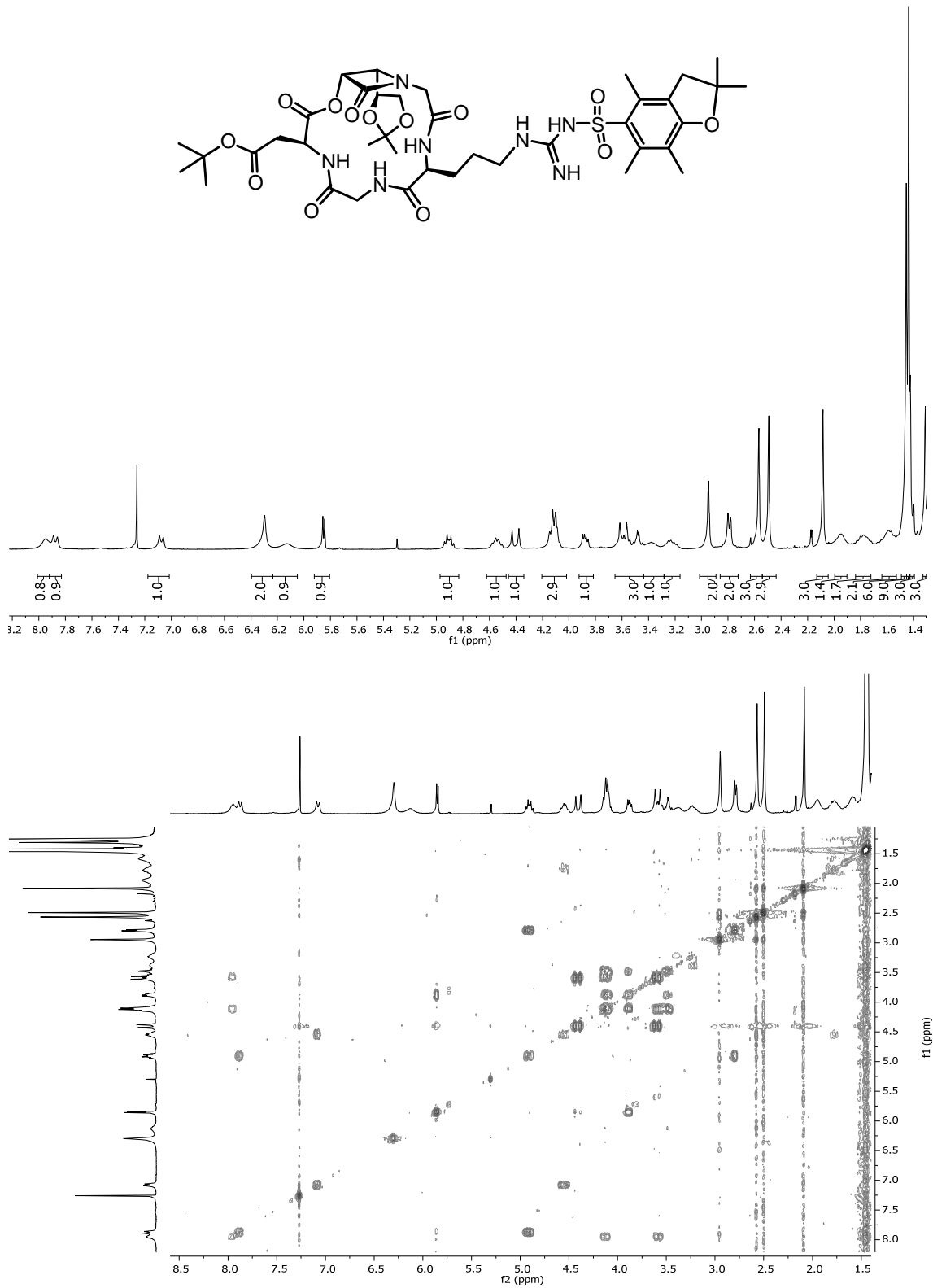


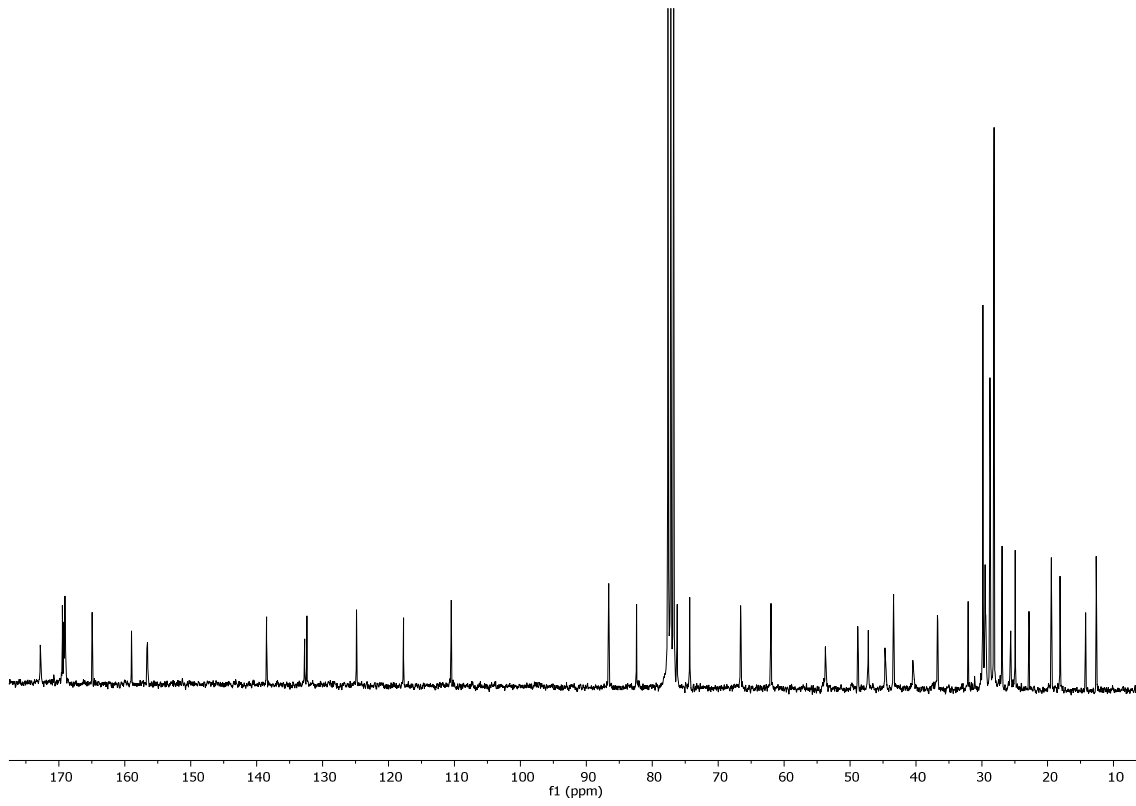
**Ciclo{[(3R,4R)-3-amino-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (7.13):**

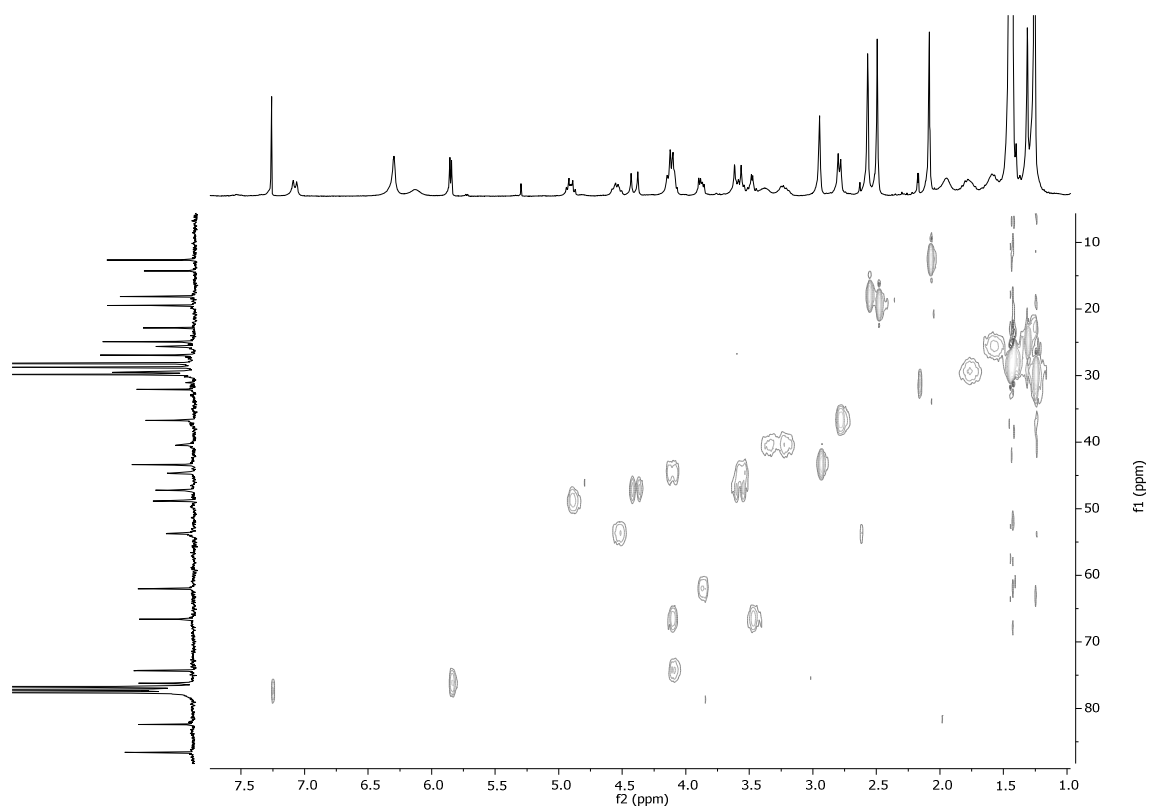




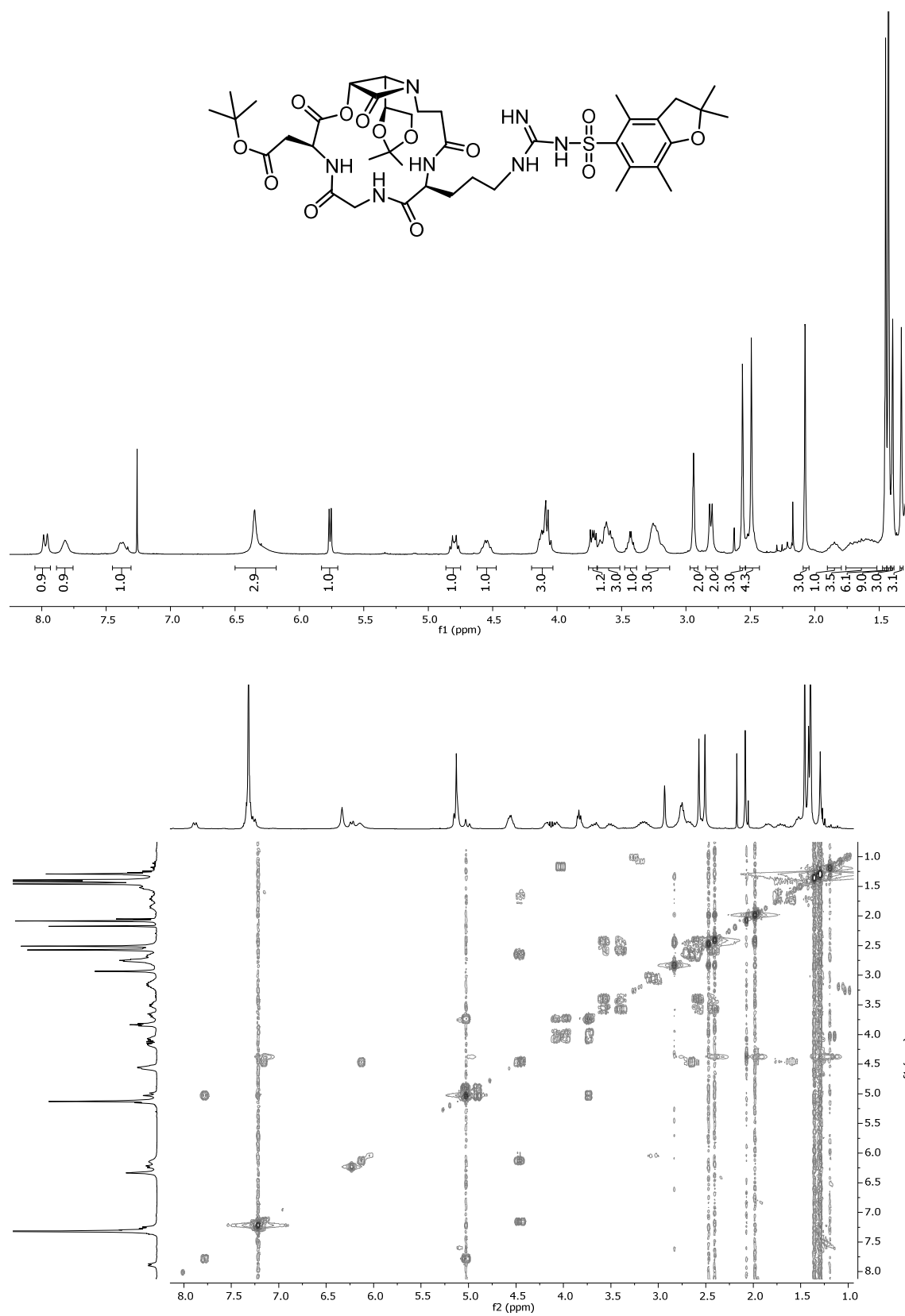
**Ciclo{[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-metilencarbonil-azetidin-2-ona]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (1.13):**

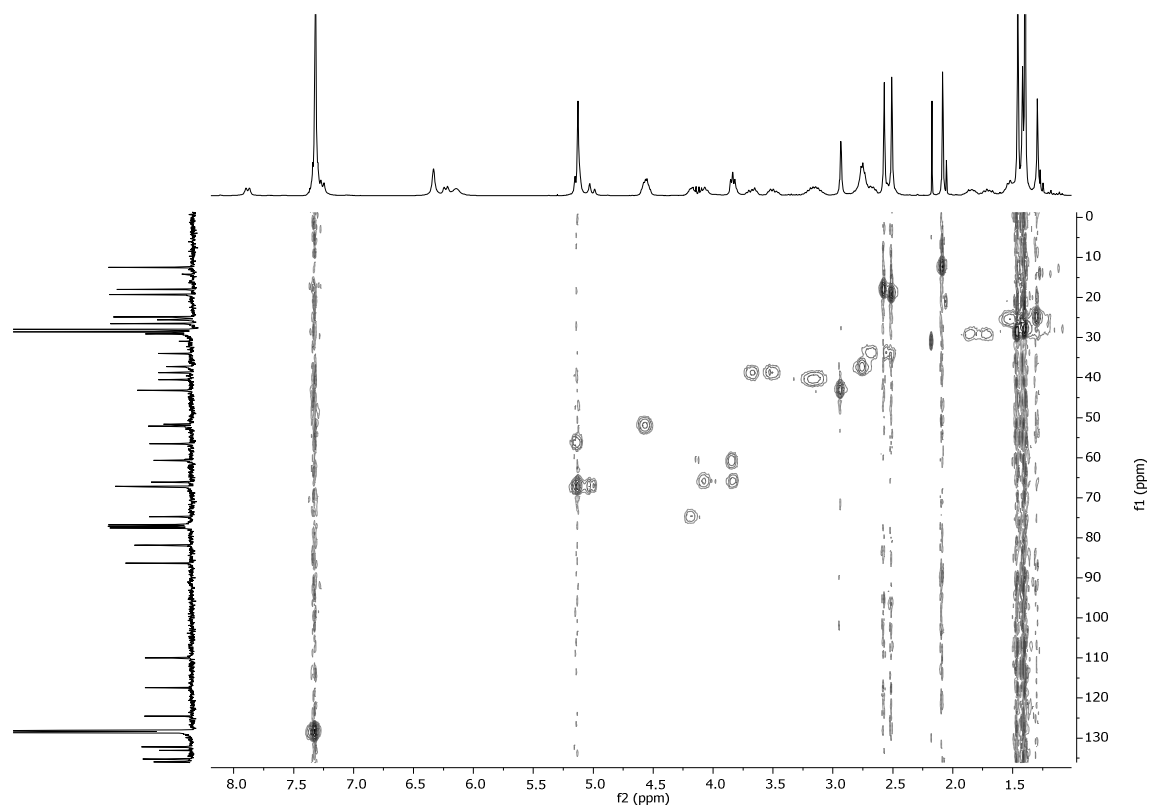
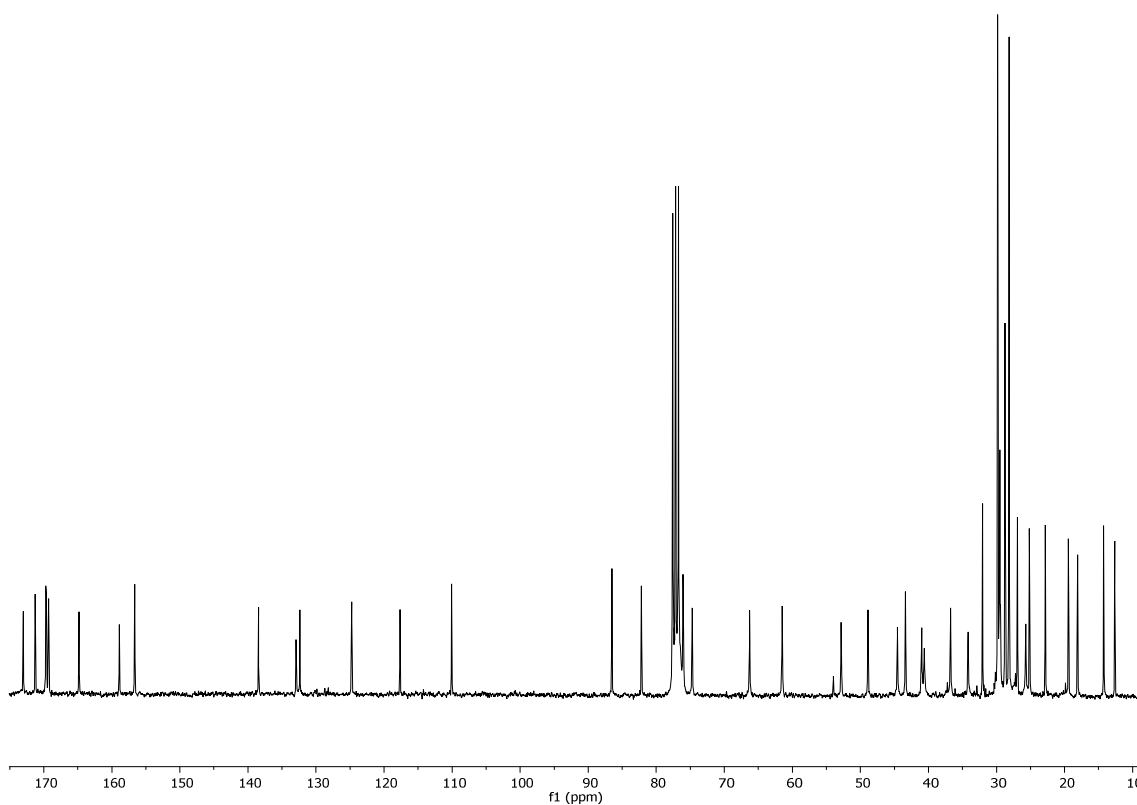






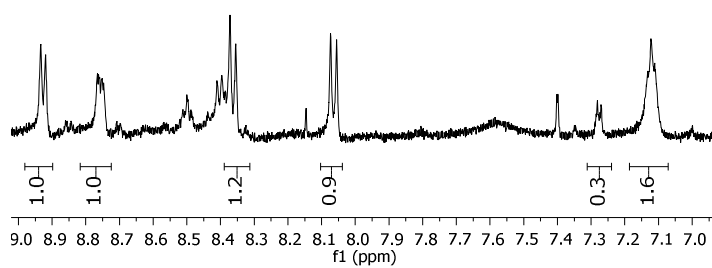
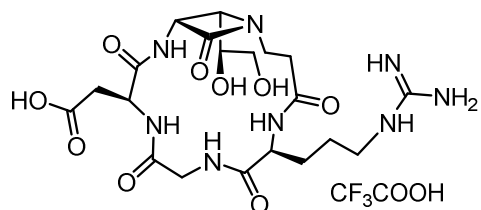
**Ciclo{[(3R,4S)-3-oxo-4-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-1-etilencarbonil-azetidina]-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)} (9.13):**



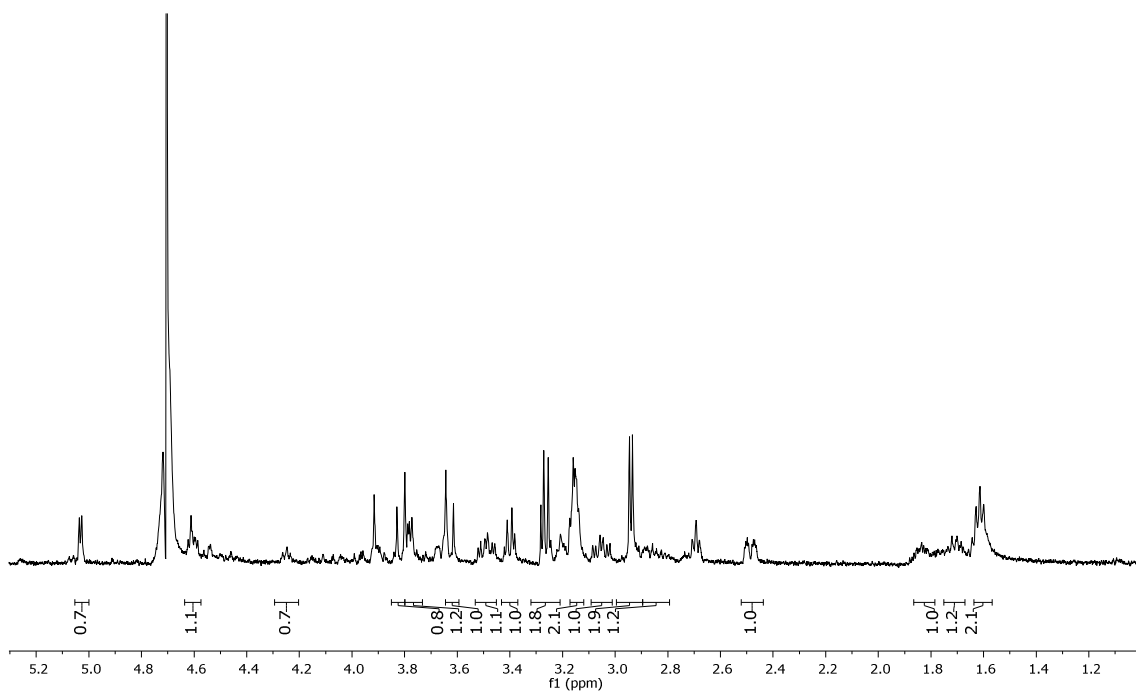




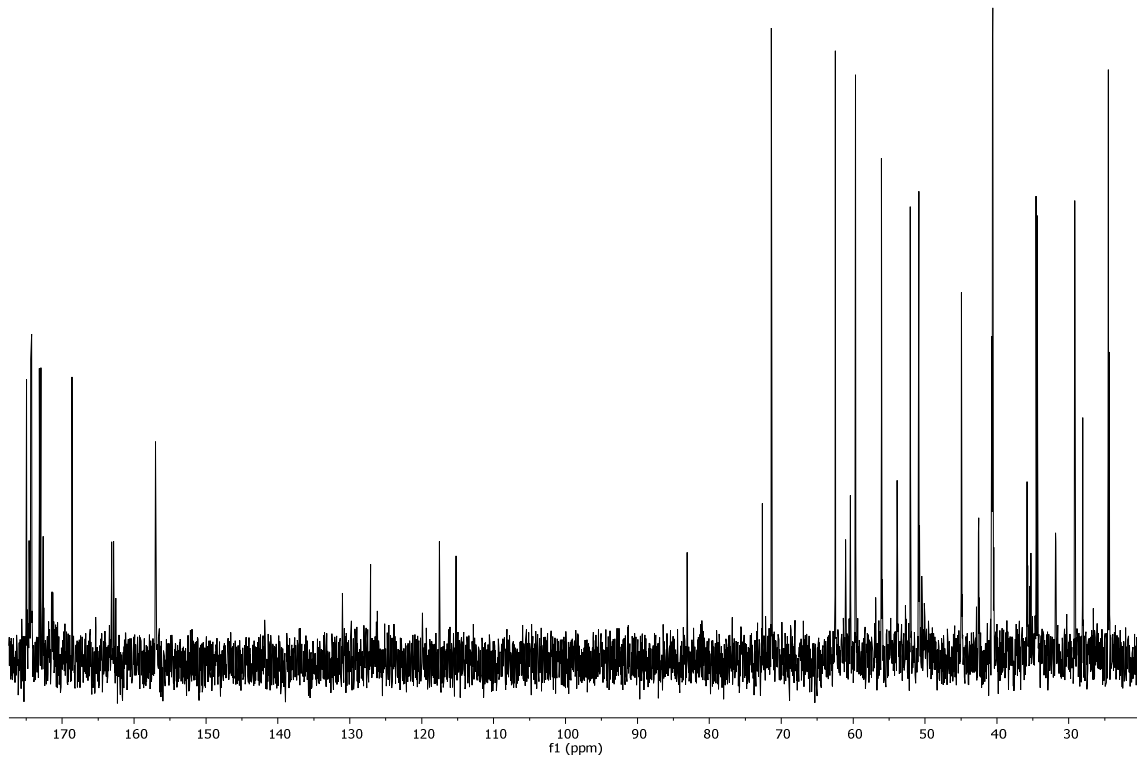
Trifluoro acetato de *ciclo*[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg-Gly-Asp (7):



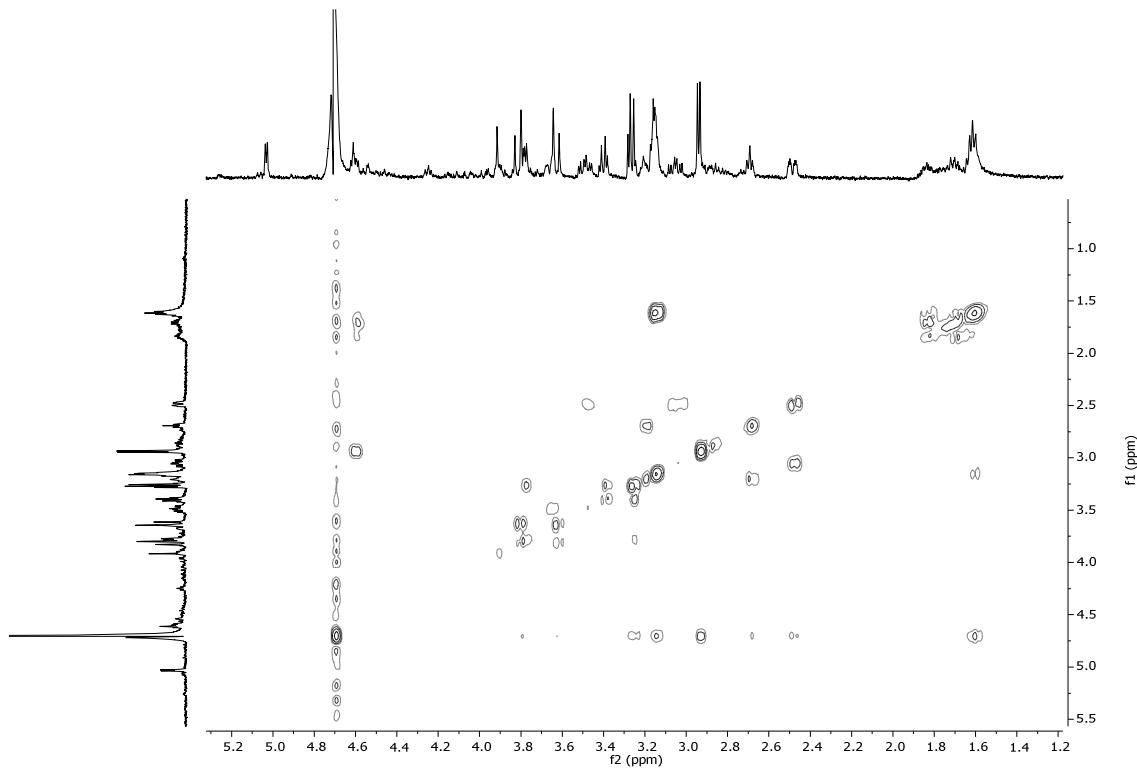
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1))



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )

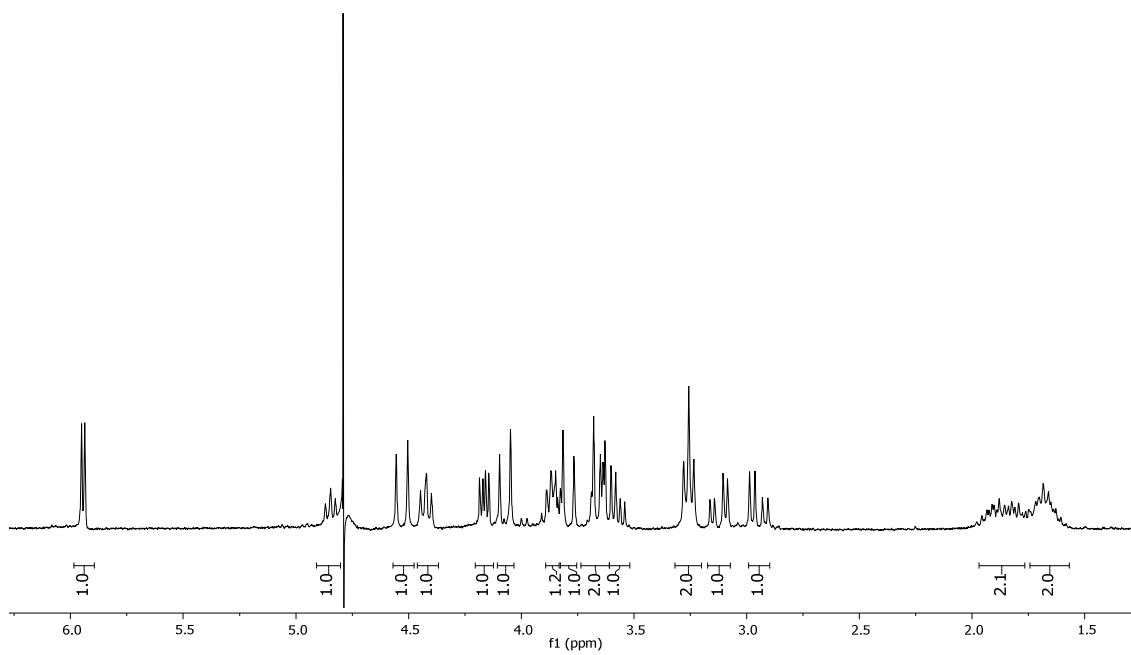
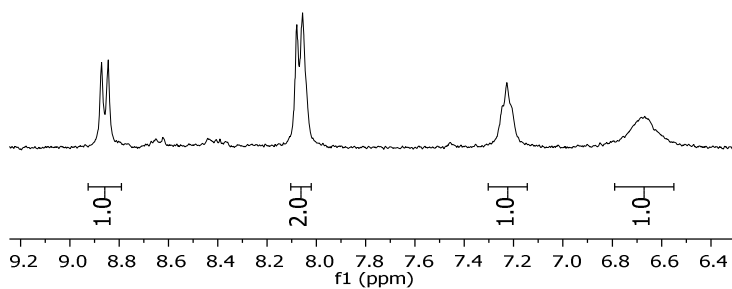
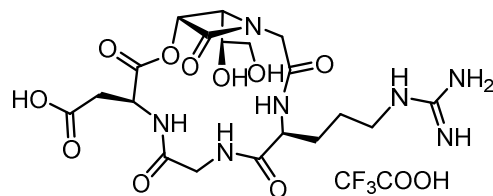


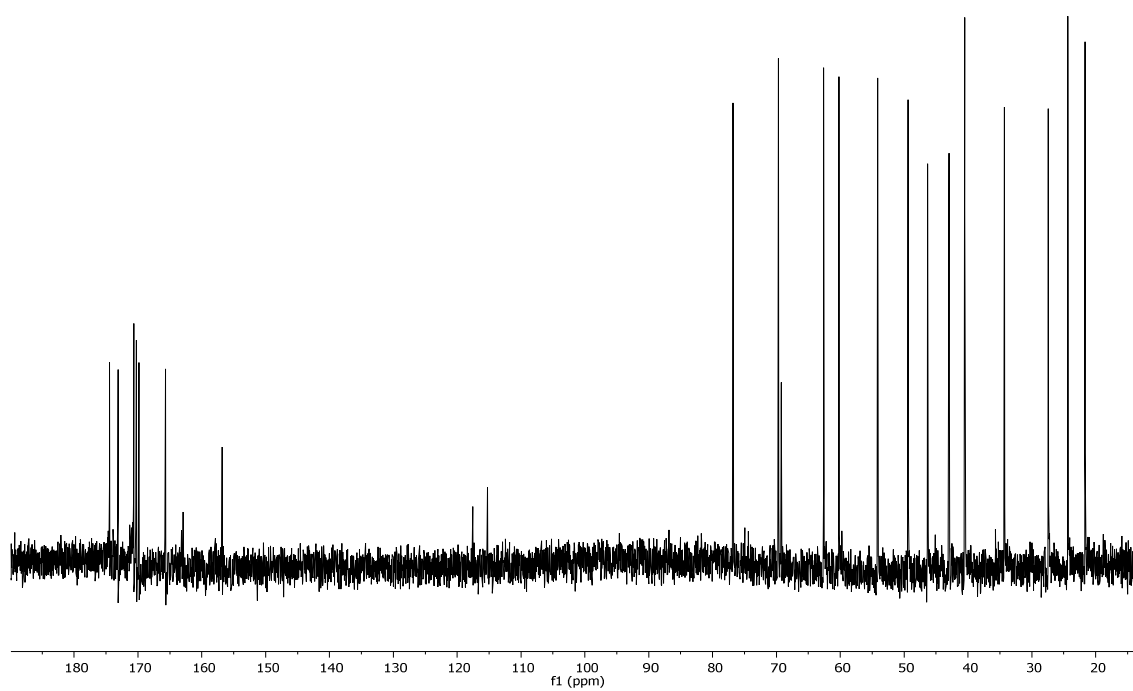
$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$



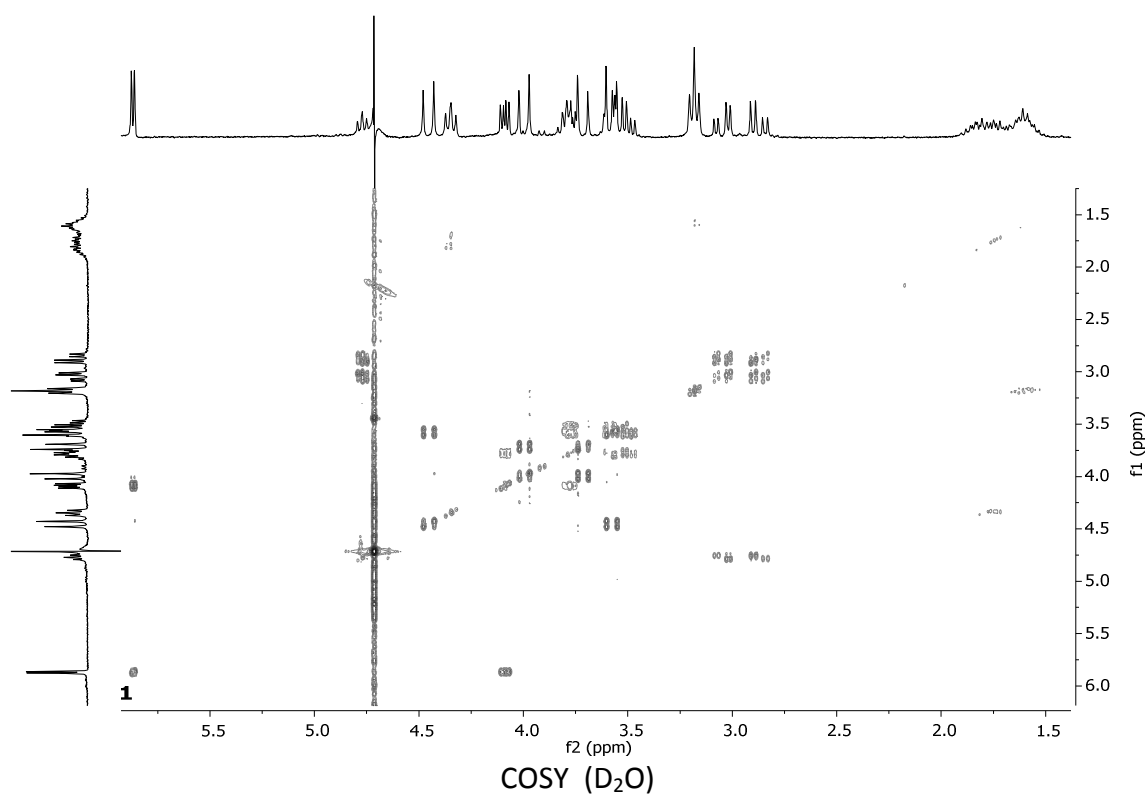
$\text{COSY (D}_2\text{O)}$

Trifluoro acetato de *ciclo*{[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg-Gly-Asp} (1):

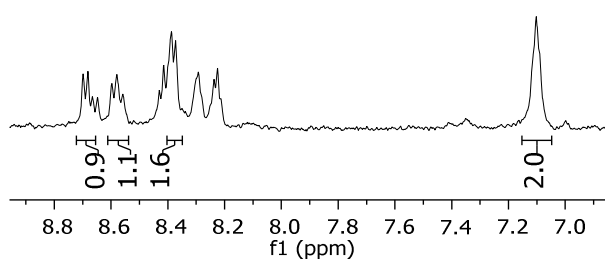
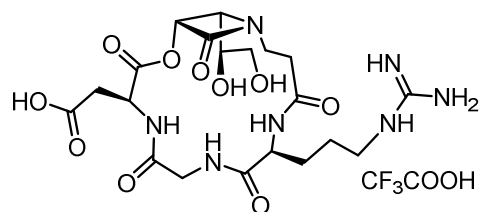




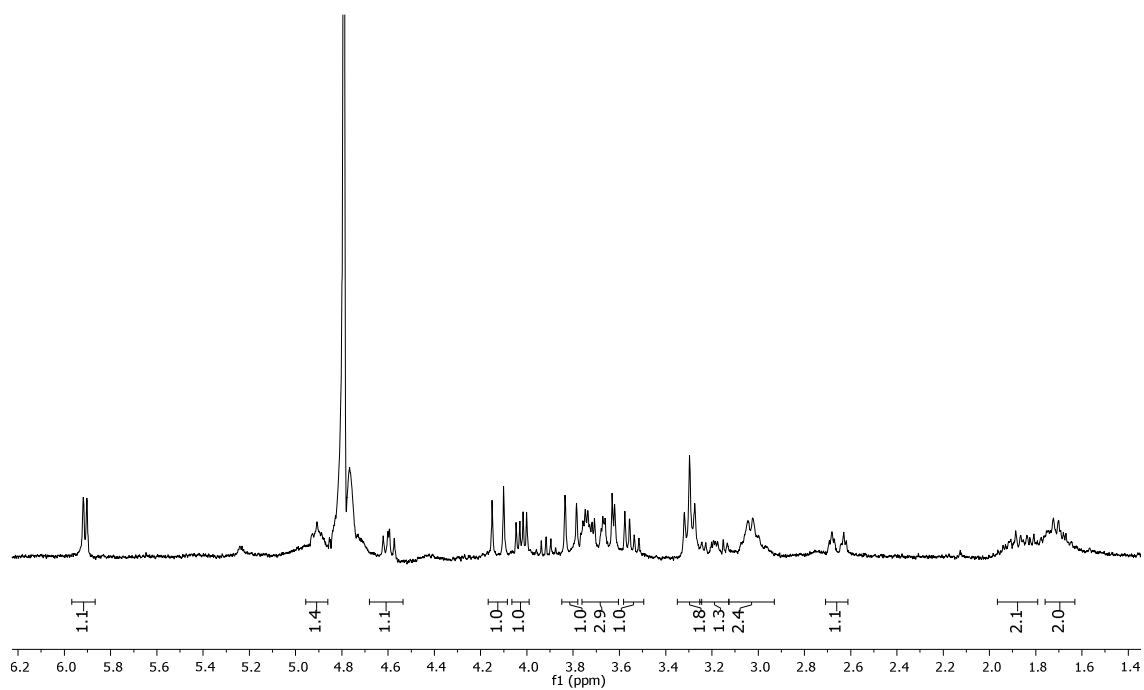
$^1\text{H-RMN } \gamma \text{ } ^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$



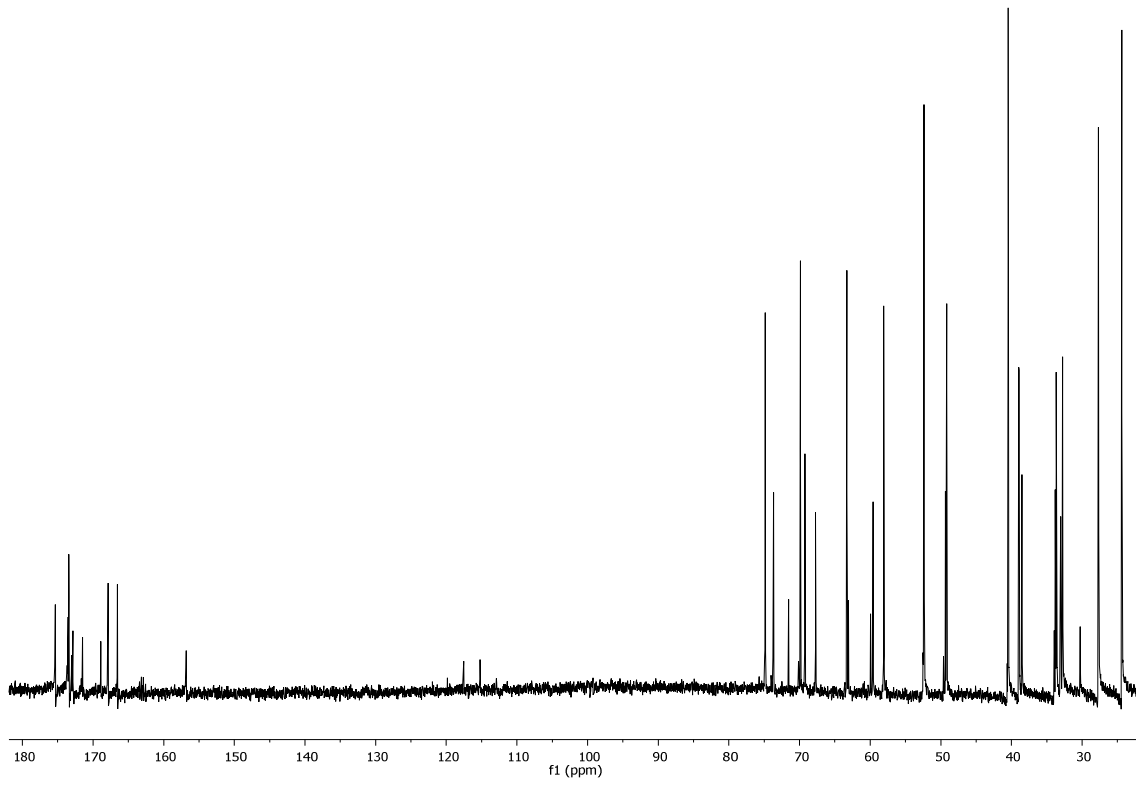
Trifluoro acetato de *ciclo*{[(3*R*,4*S*)-3-oxo-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg-Gly-Asp} (9):



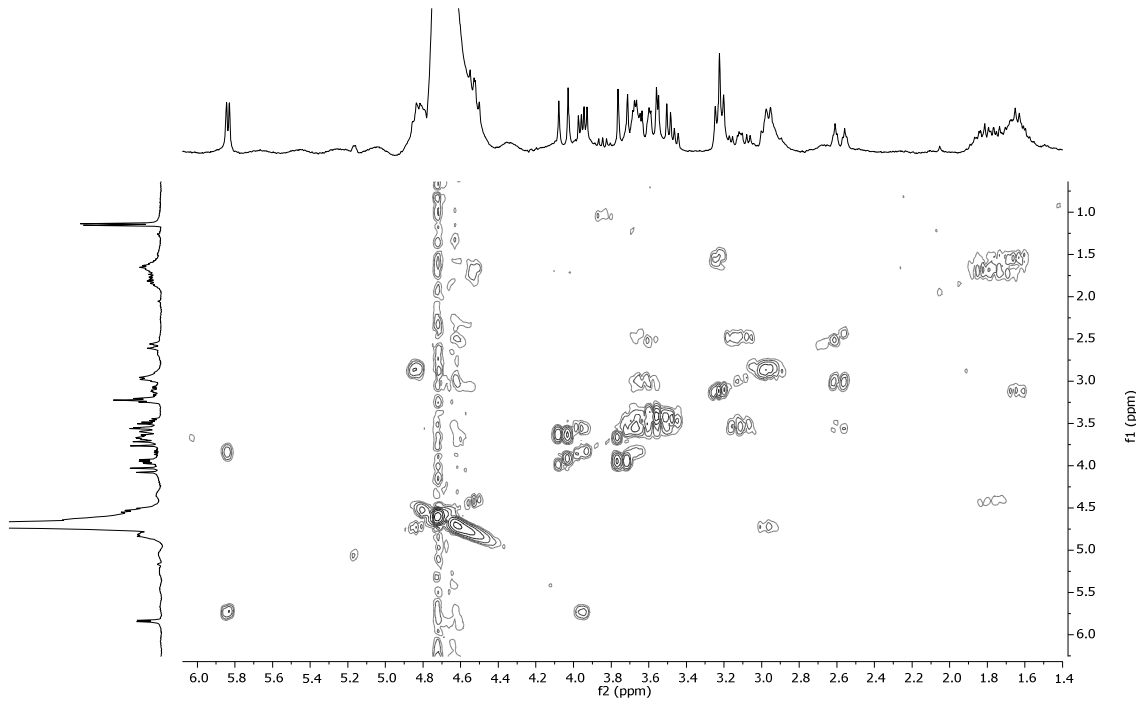
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1))



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )

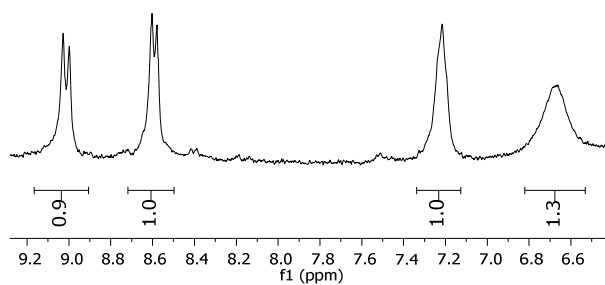
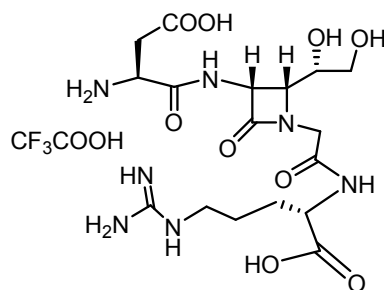


$^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )

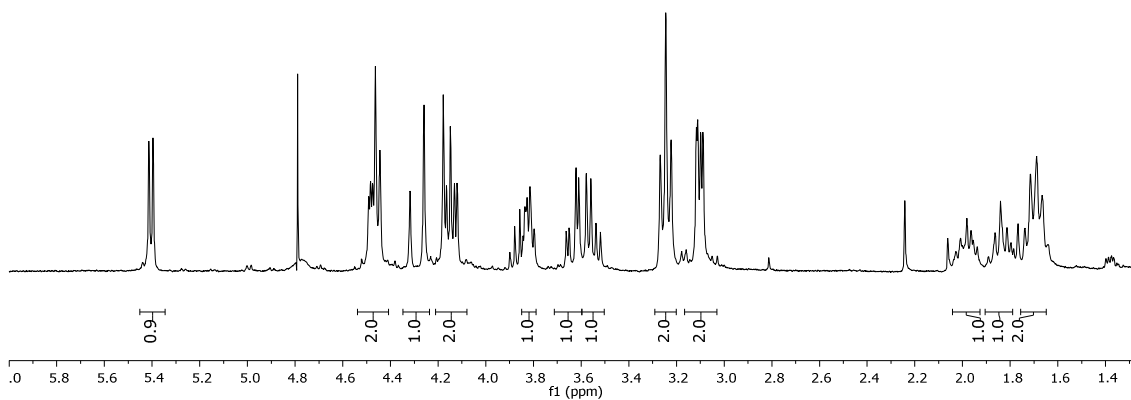


COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ )

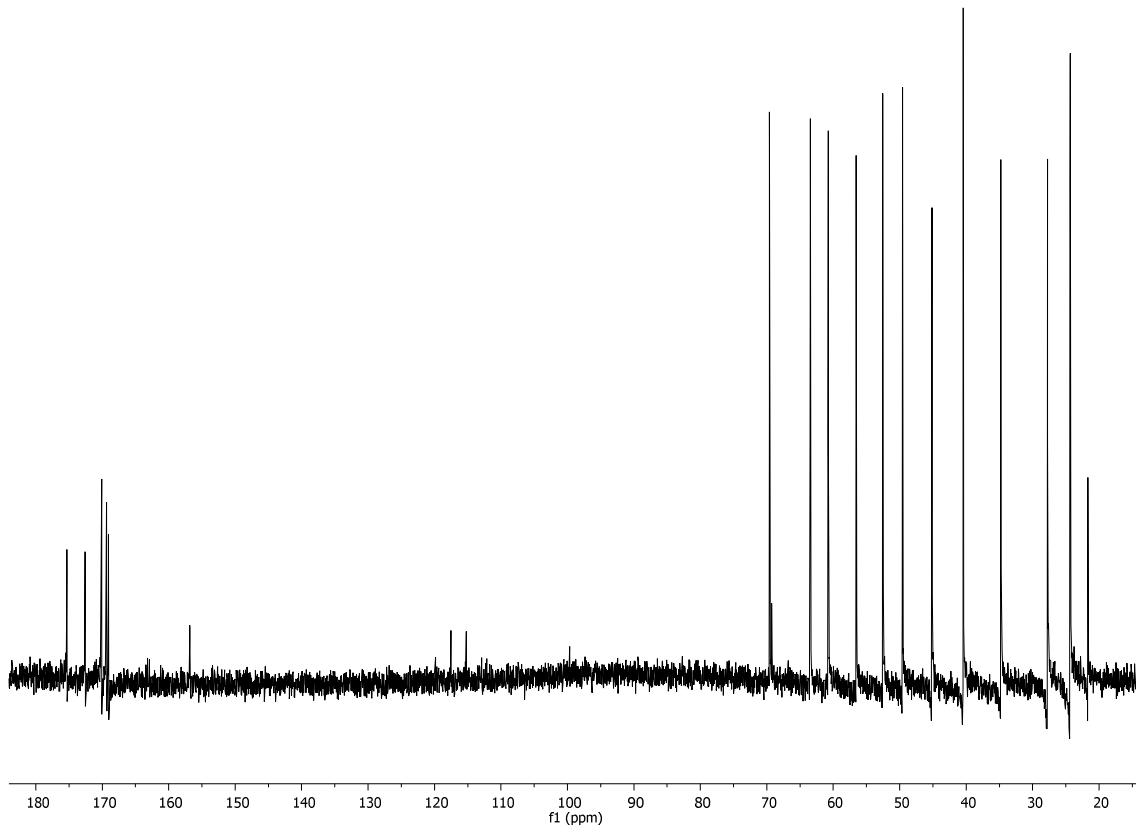
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-OH (17):}$



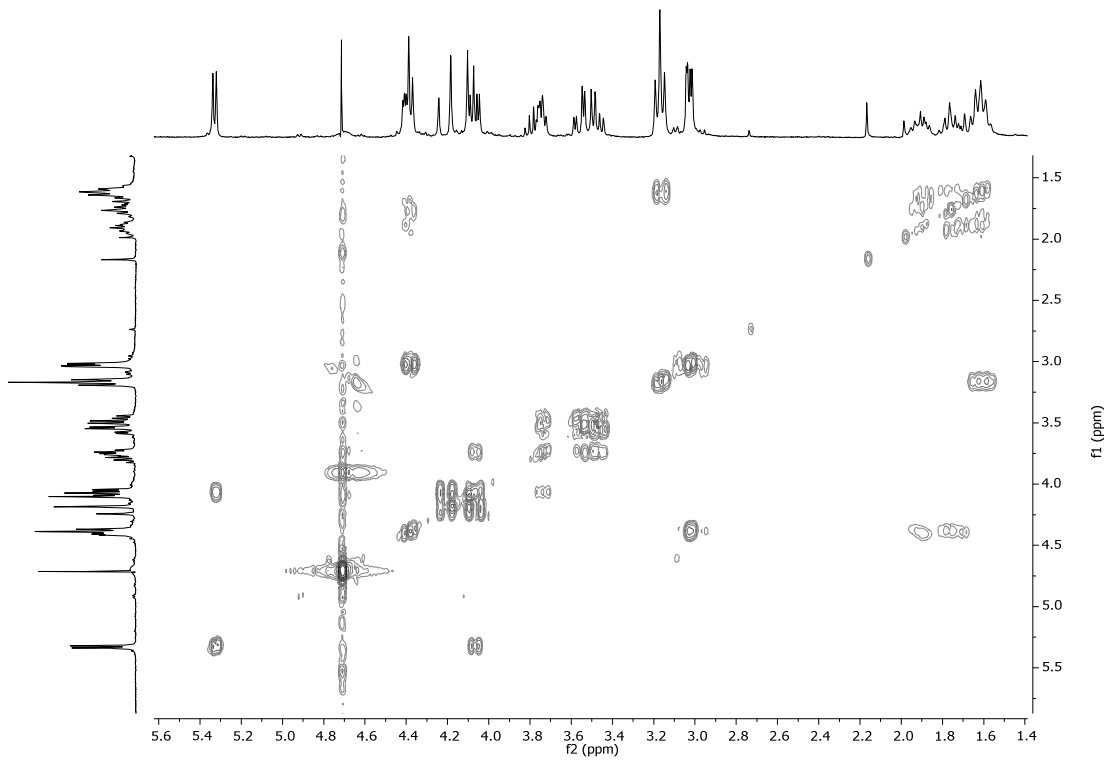
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$



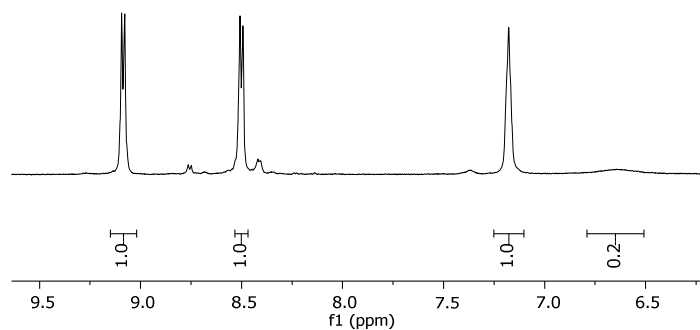
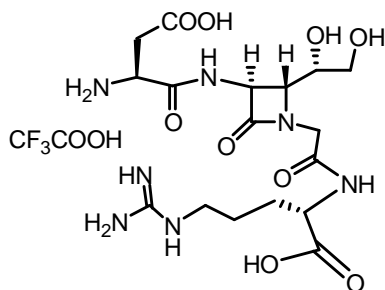
<sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O)



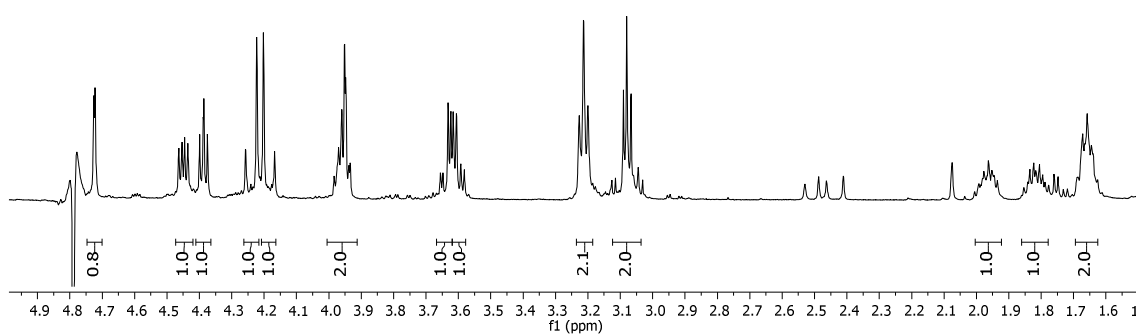
COSY (D<sub>2</sub>O)



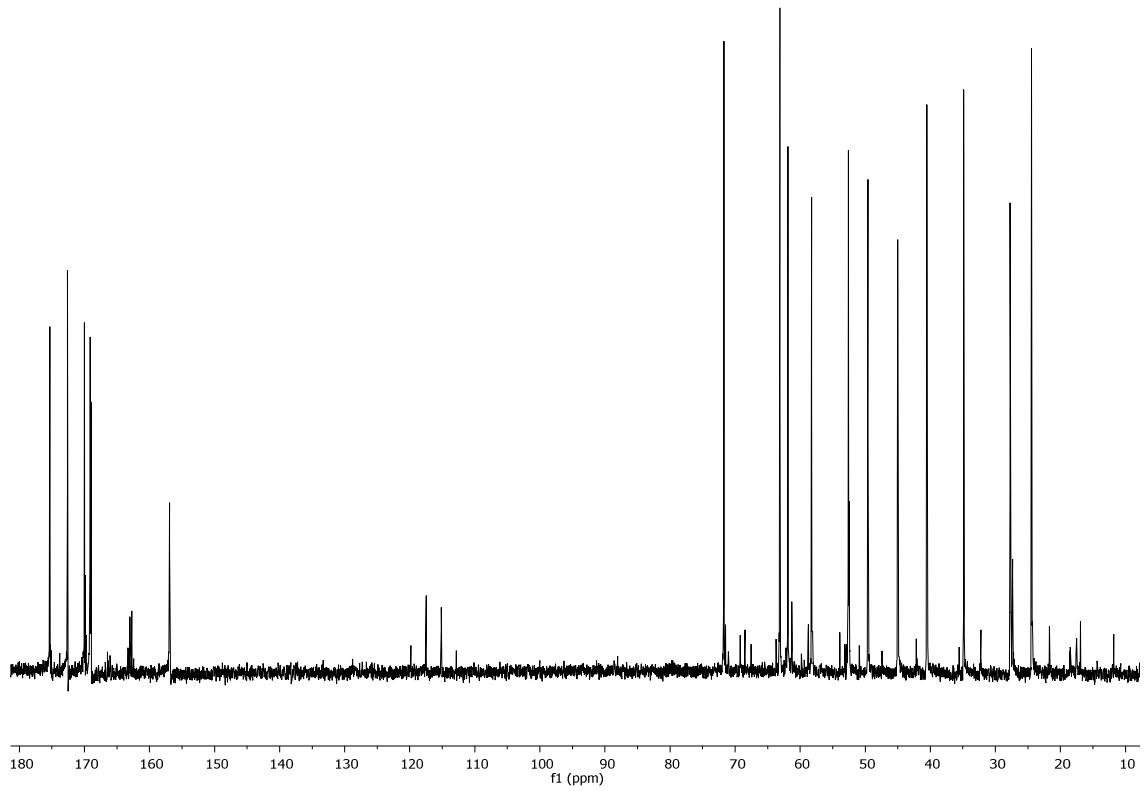
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3S,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-OH (18):}$



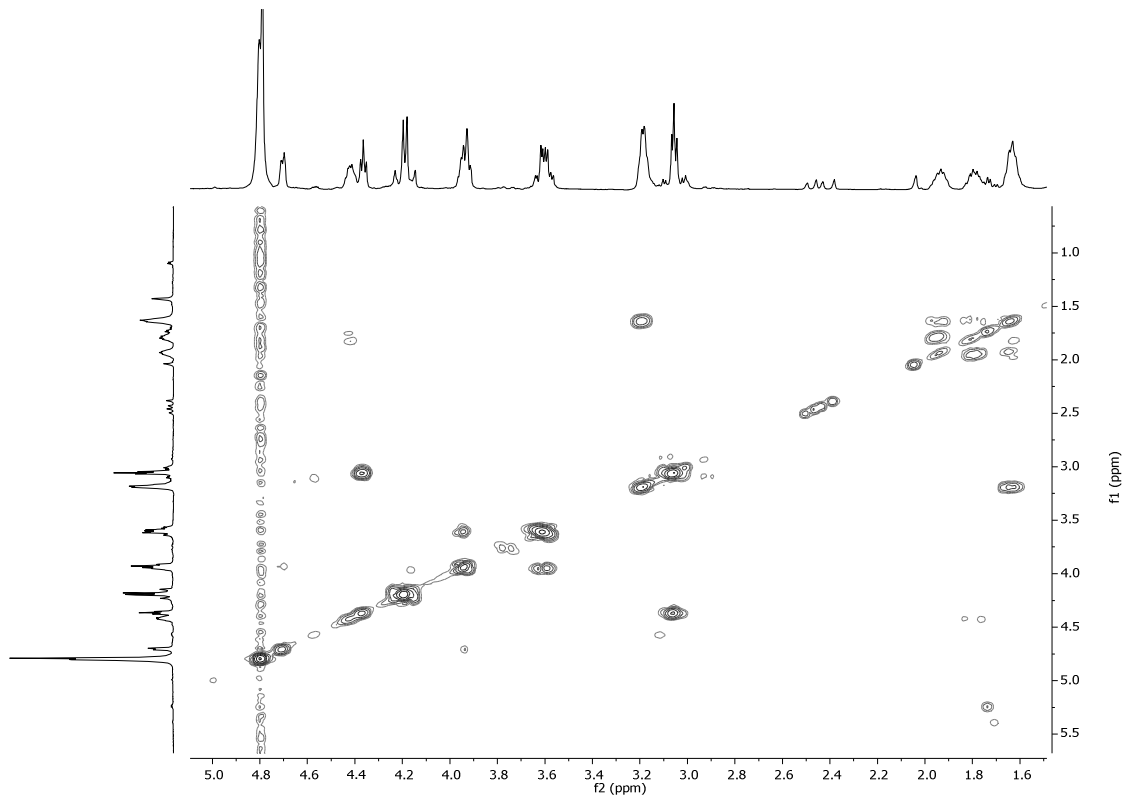
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$

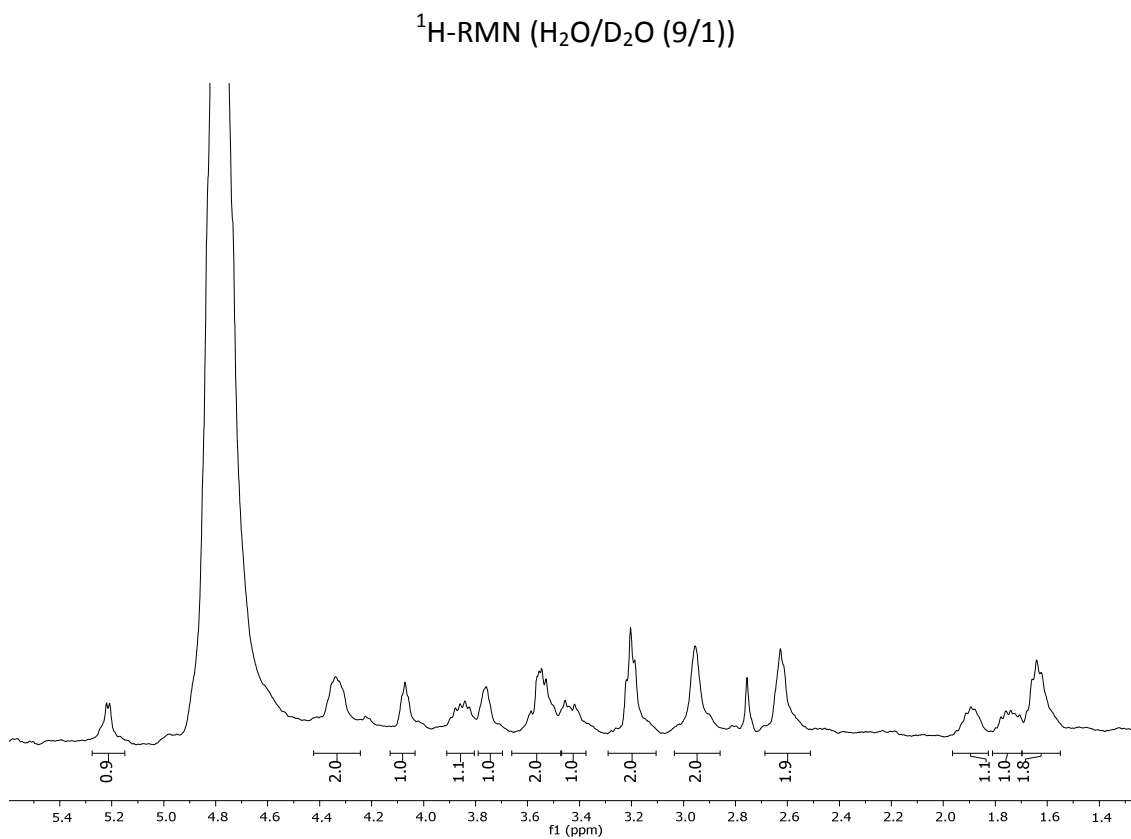
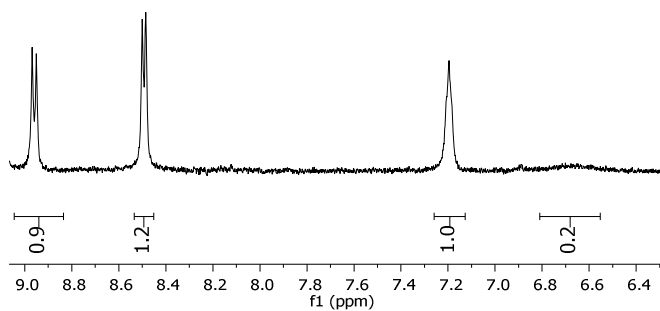
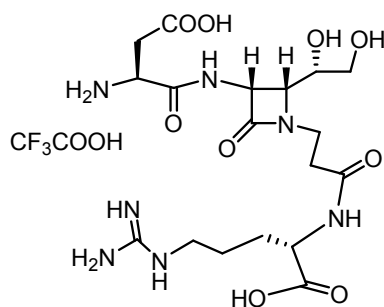


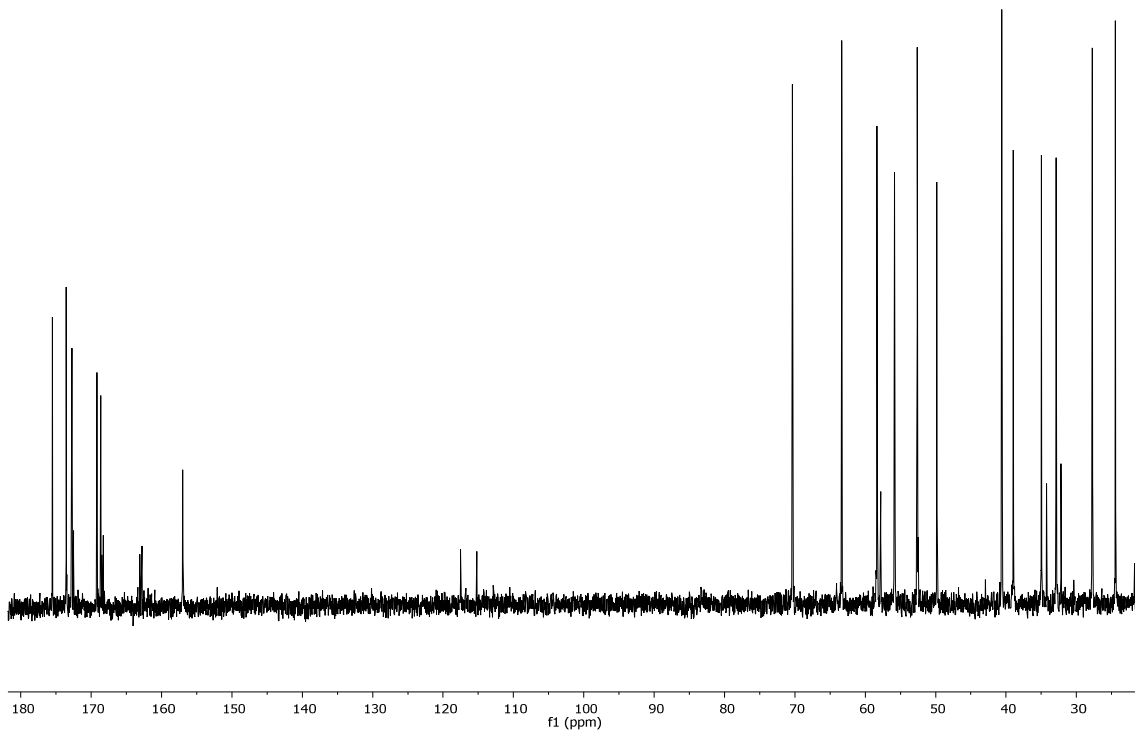
$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$



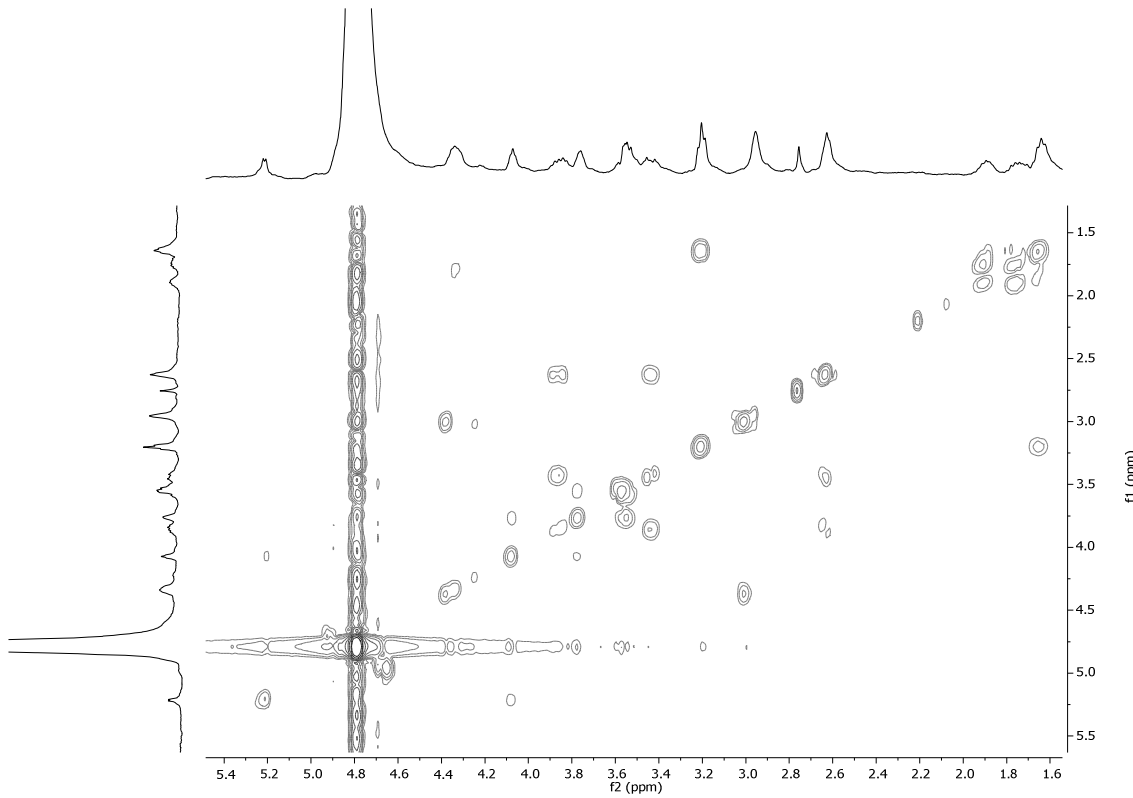
$\text{COSY (D}_2\text{O)}$

Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-OH (20)}$ :



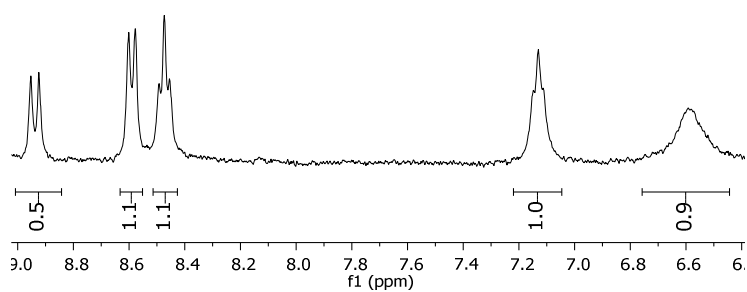
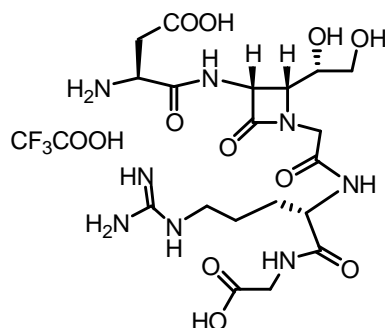


<sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O)

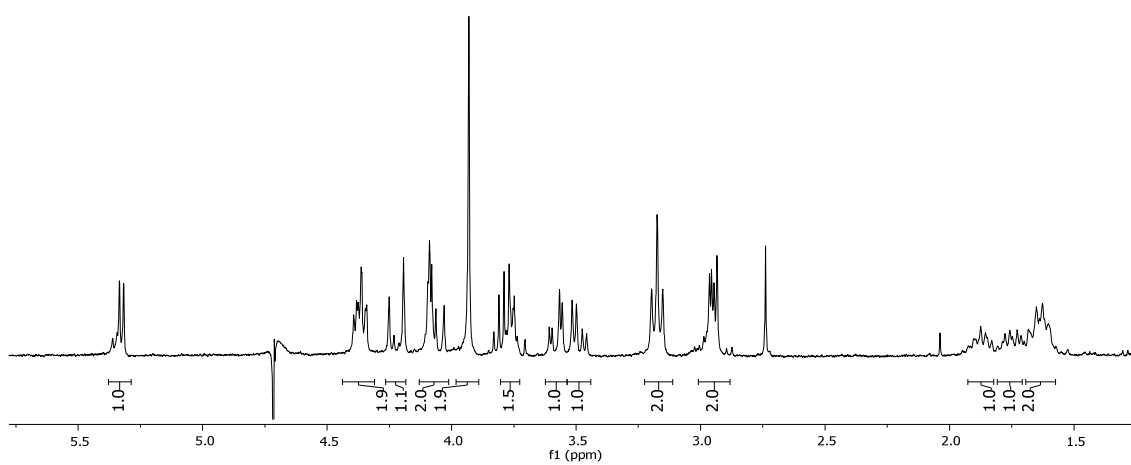


COSY (D<sub>2</sub>O)

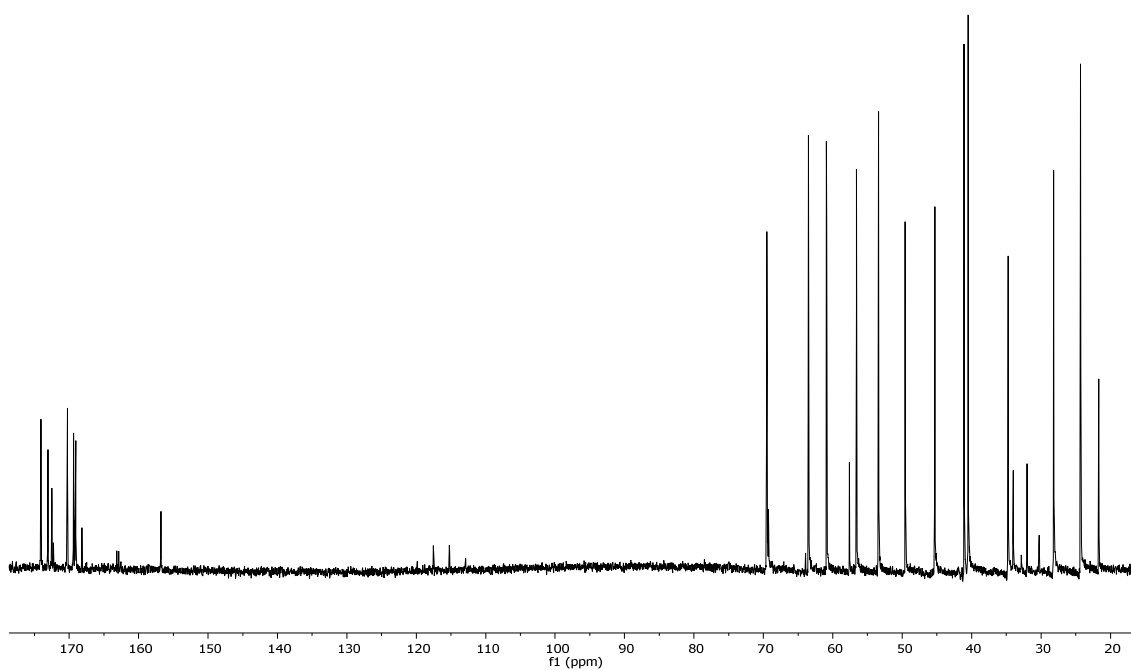
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4R)\text{-3-amino-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-Gly-OH (22)}$ :



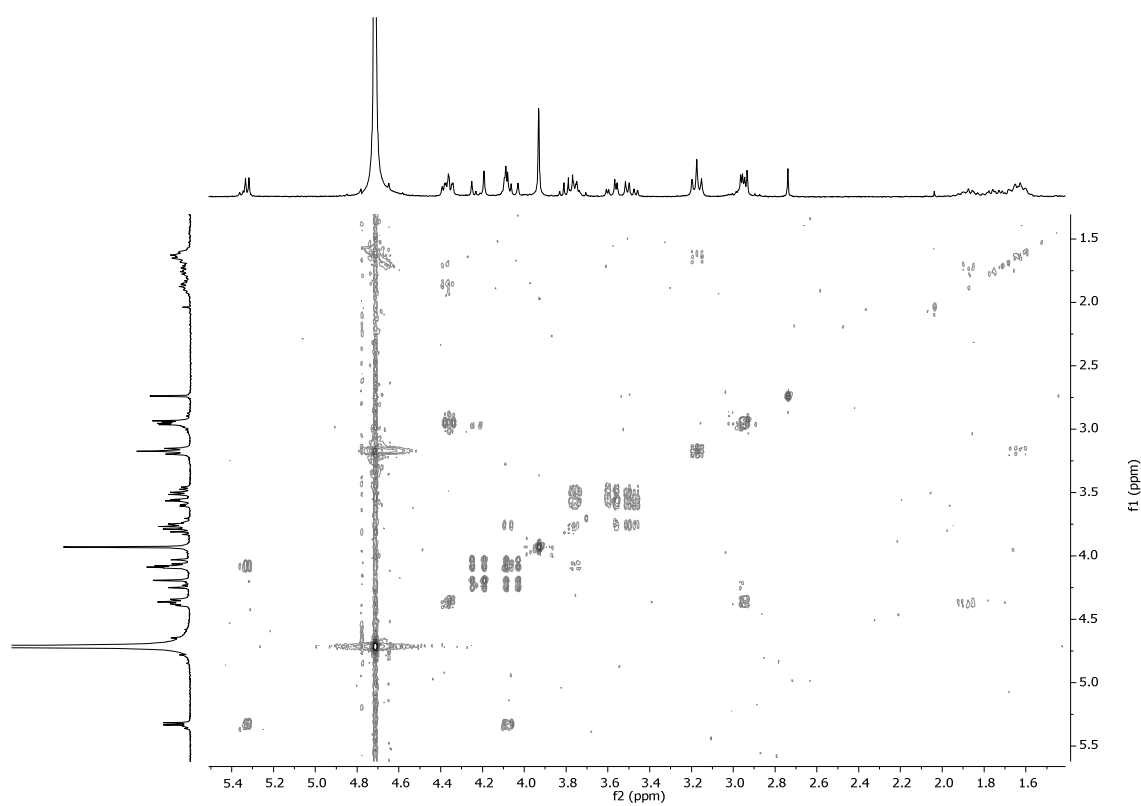
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$

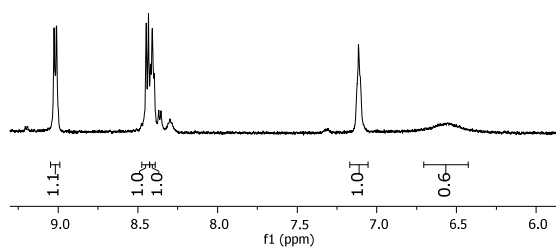
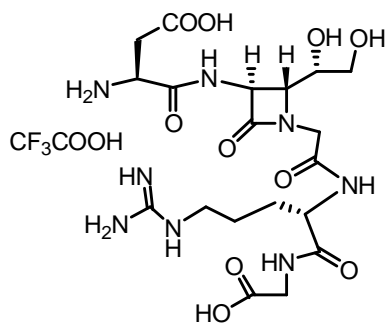


$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$

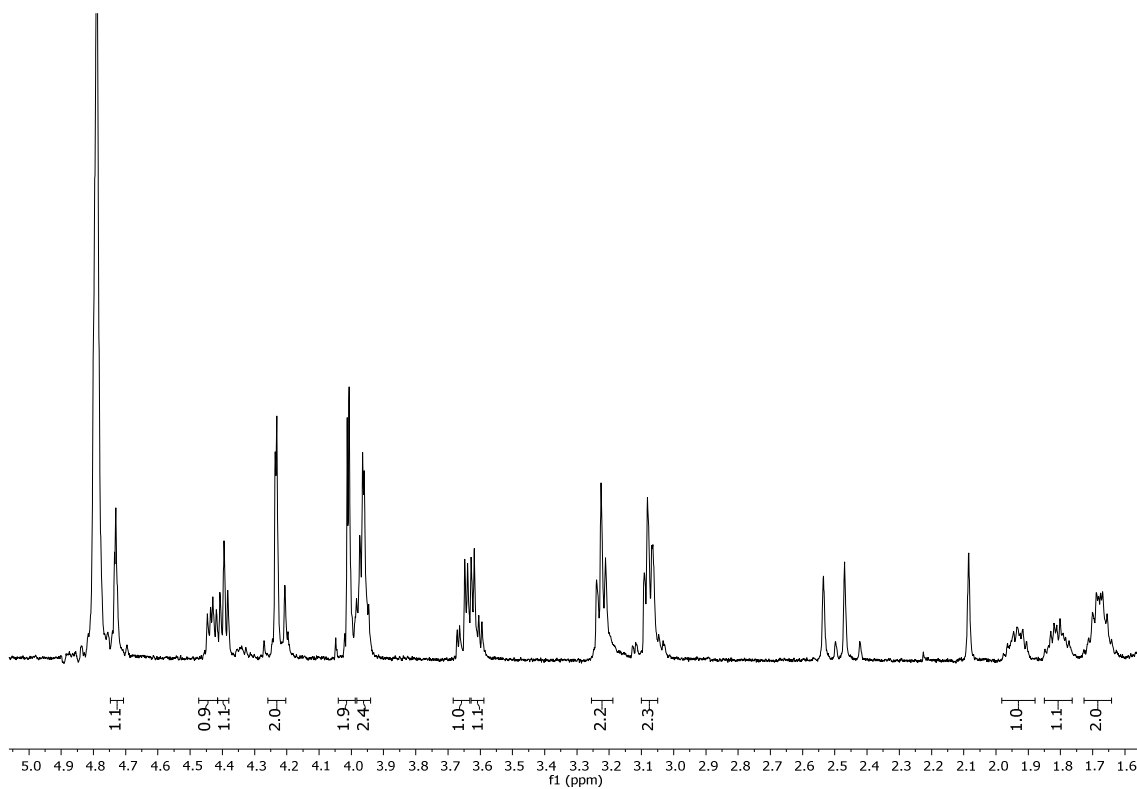


$\text{COSY (D}_2\text{O)}$

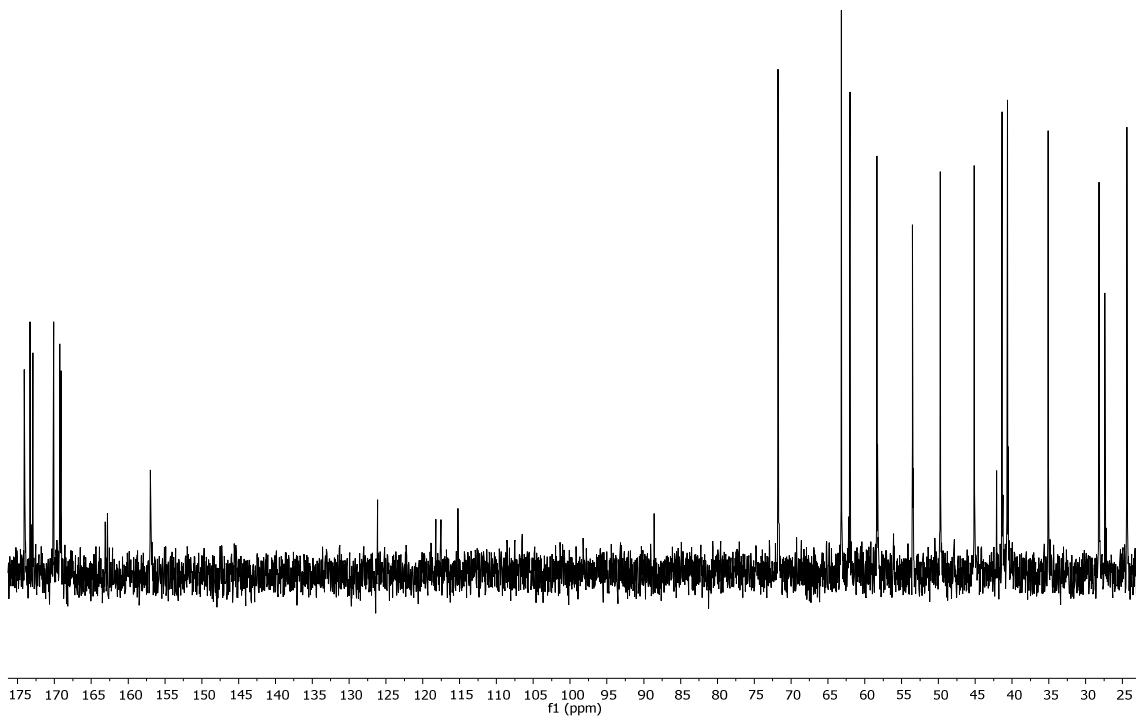
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3\text{S},4\text{R})\text{-3-amino-4-}((\text{S})\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-Gly-OH (23)}$ :



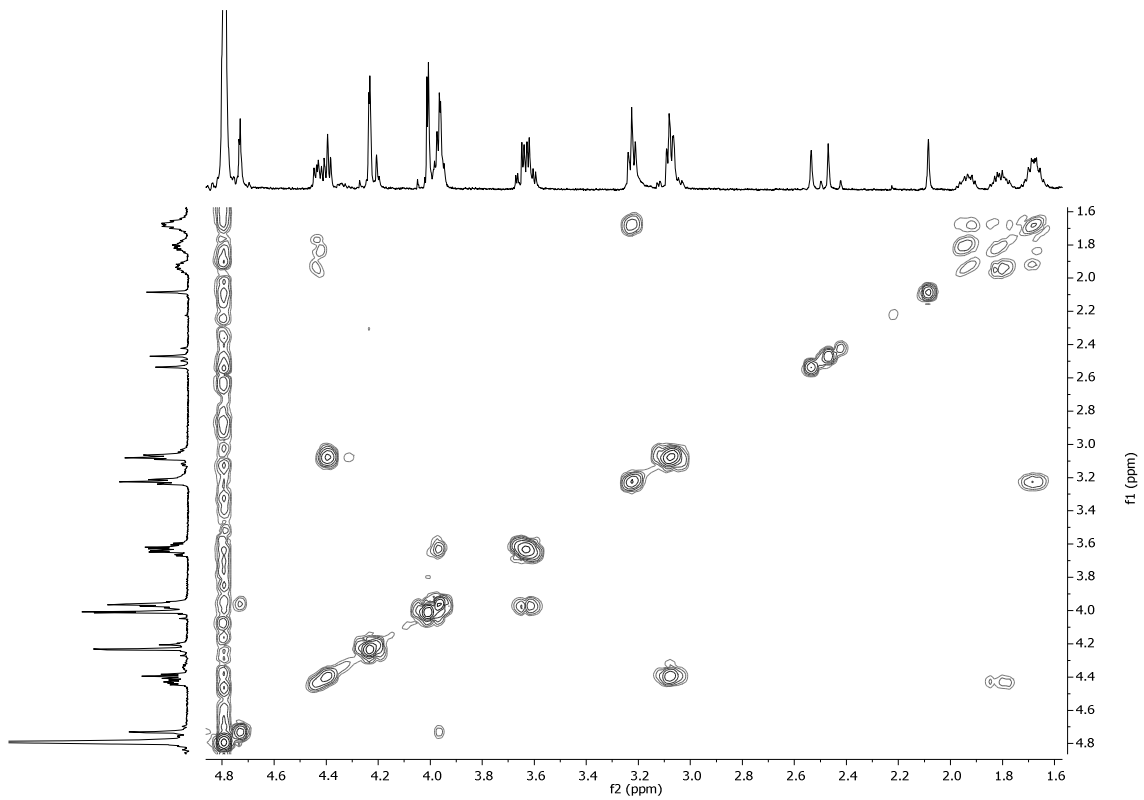
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$



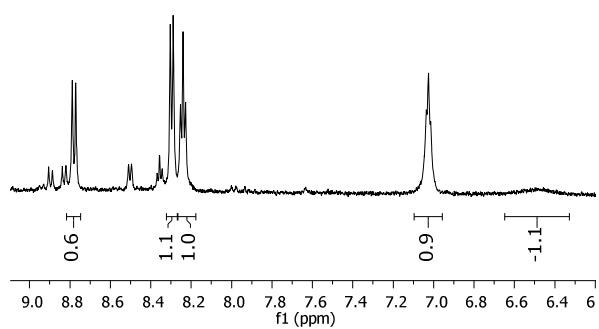
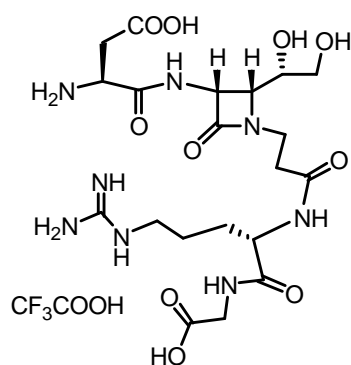
$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$



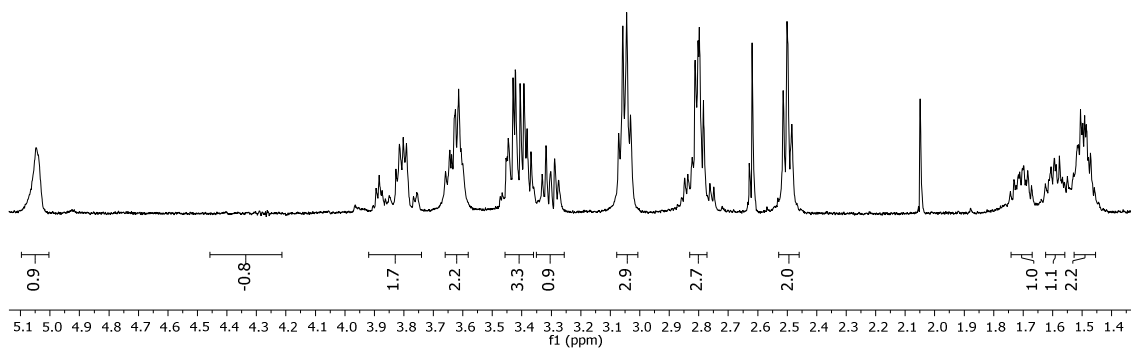
$\text{COSY (D}_2\text{O)}$



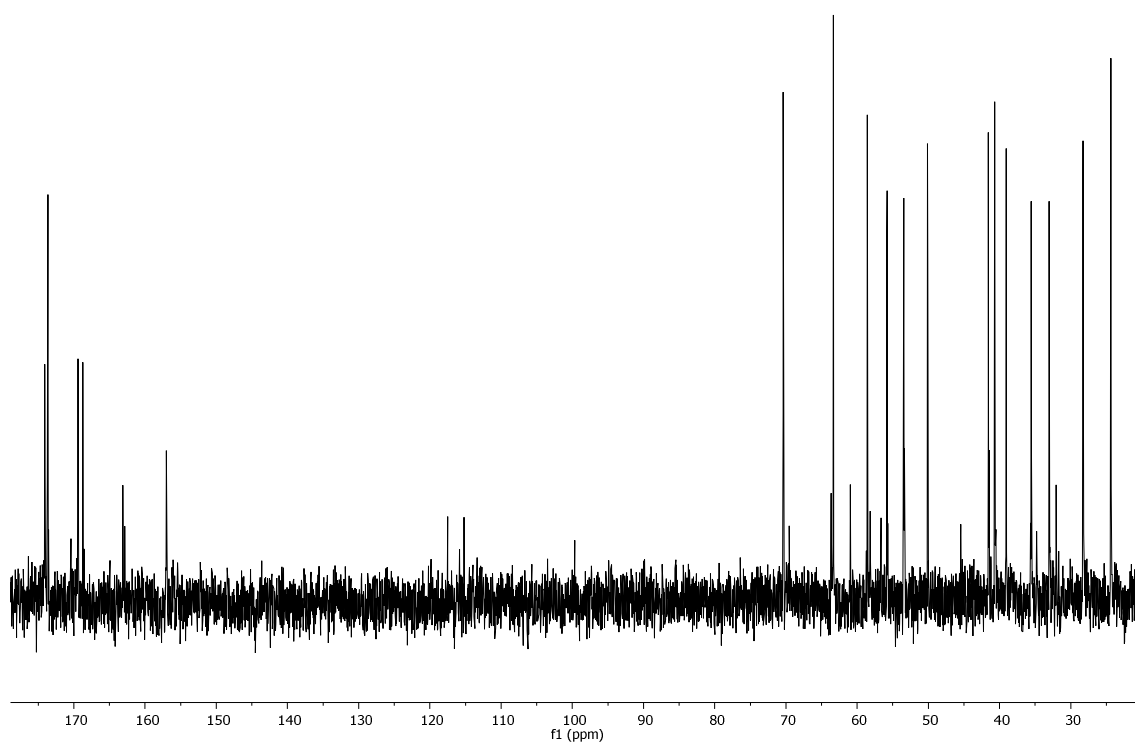
Trifluoro acetato de NH<sub>2</sub>-Asp-[(3*R*,4*R*)-3-amino-4-((*S*)-1,2-dihidroxi-etil)-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona]-Arg-Gly-OH (25):



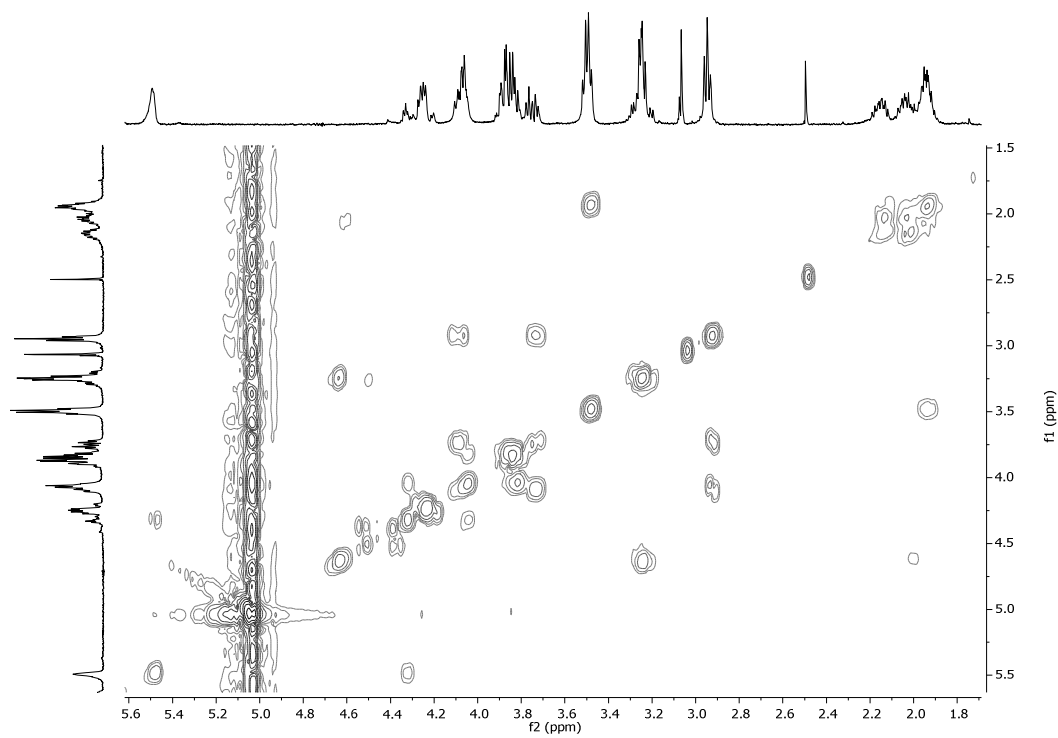
<sup>1</sup>H-RMN (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1))



<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O)

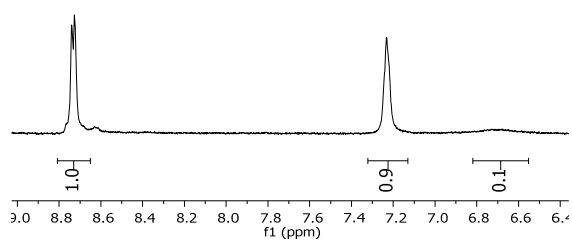
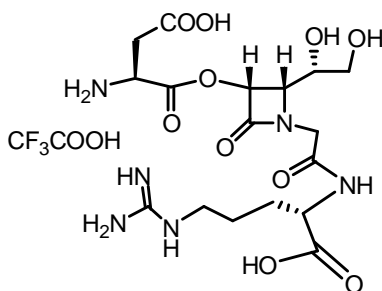


$^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )

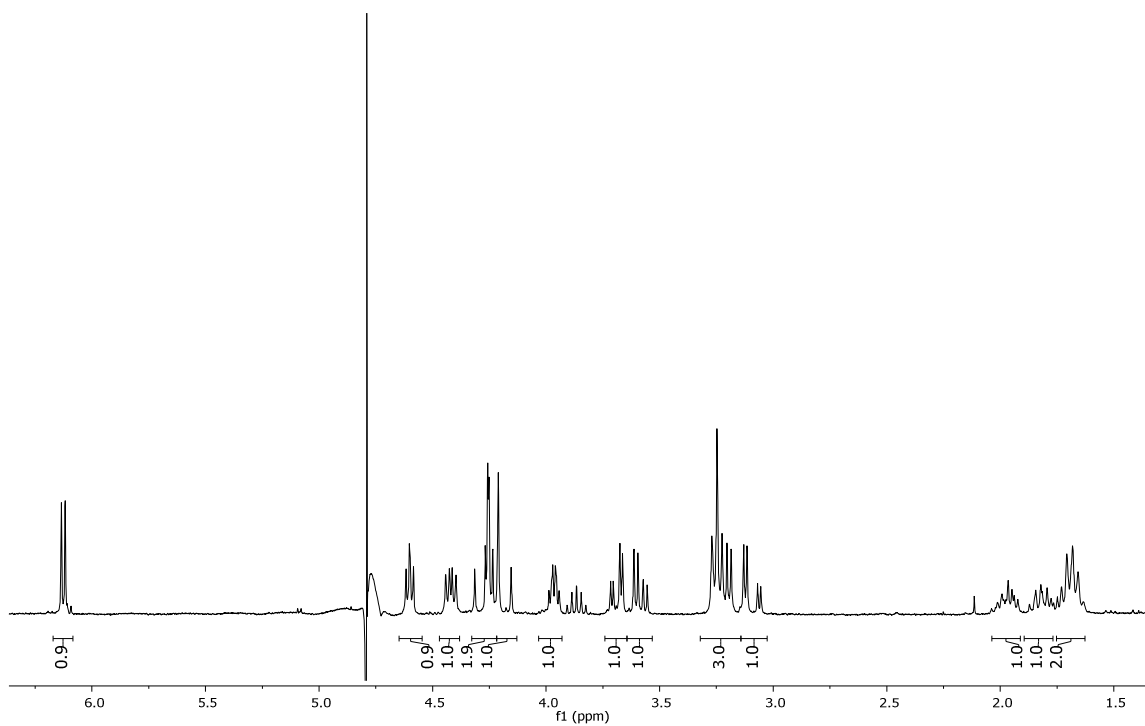


COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ )

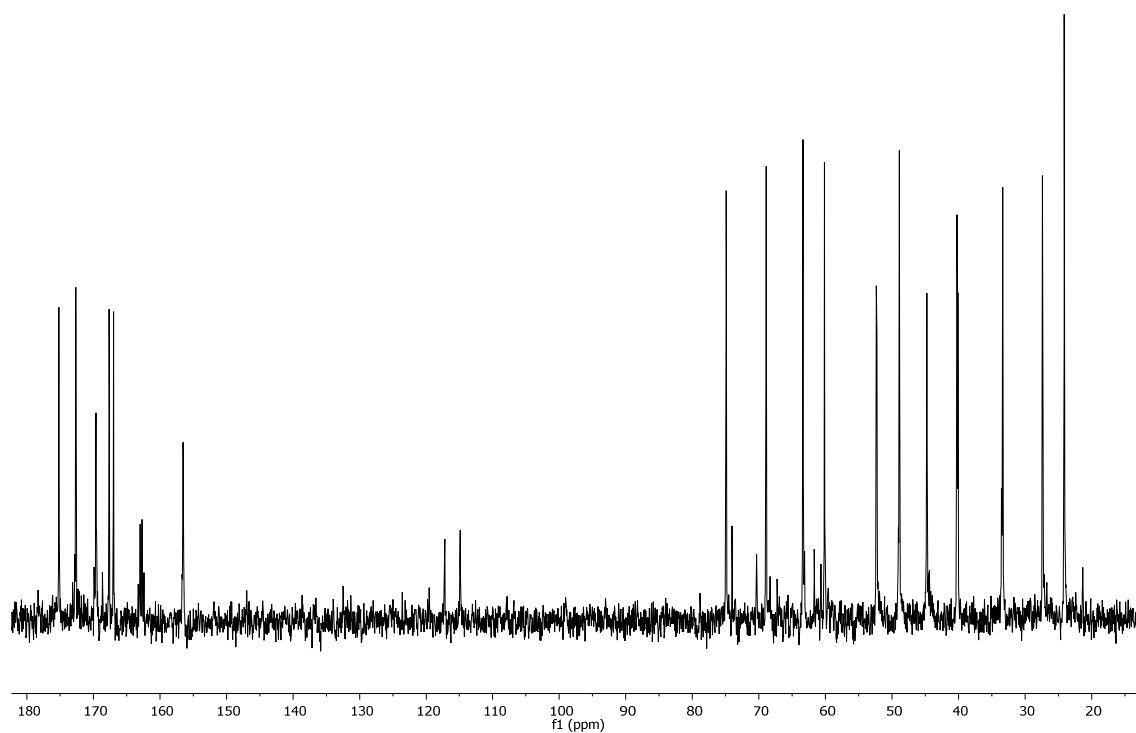
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4S)\text{-3-oxo-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-OH (19):}$



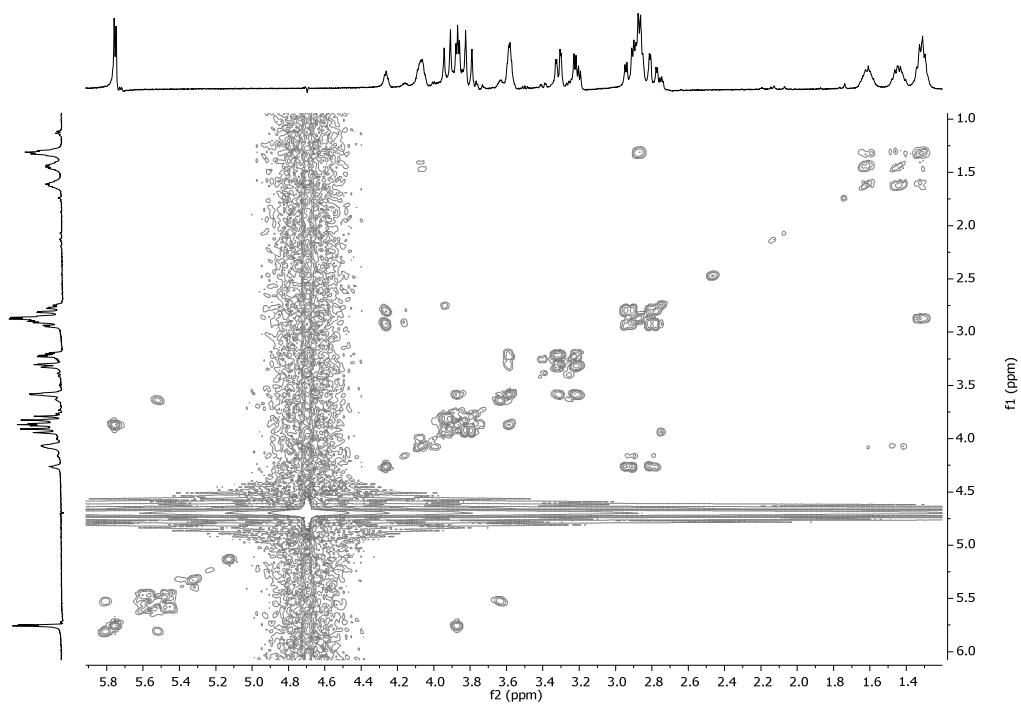
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$

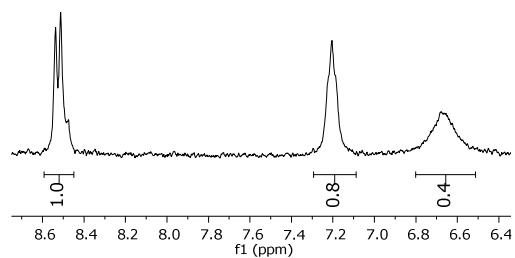
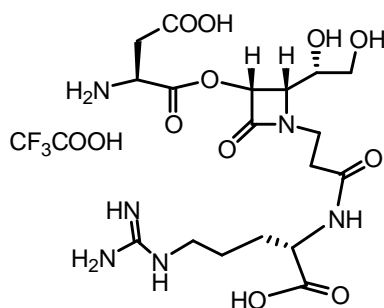


<sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O)

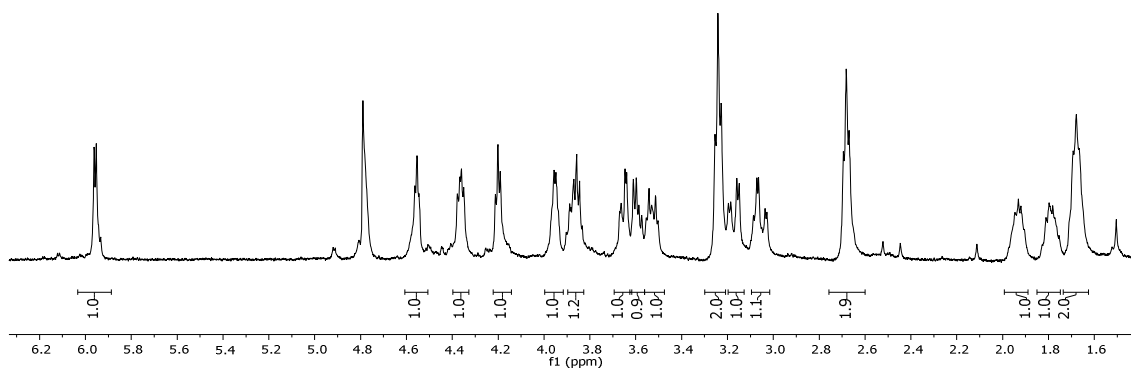


COSY (D<sub>2</sub>O)

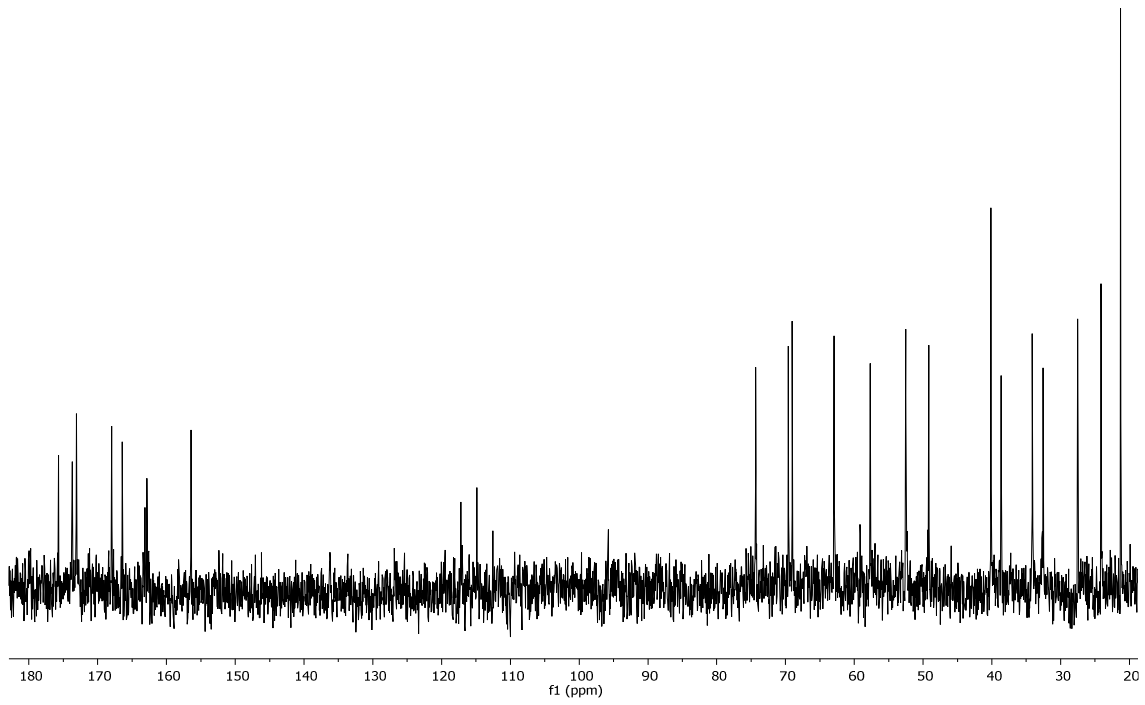
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4S)\text{-3-oxo-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-OH (21)}$ :



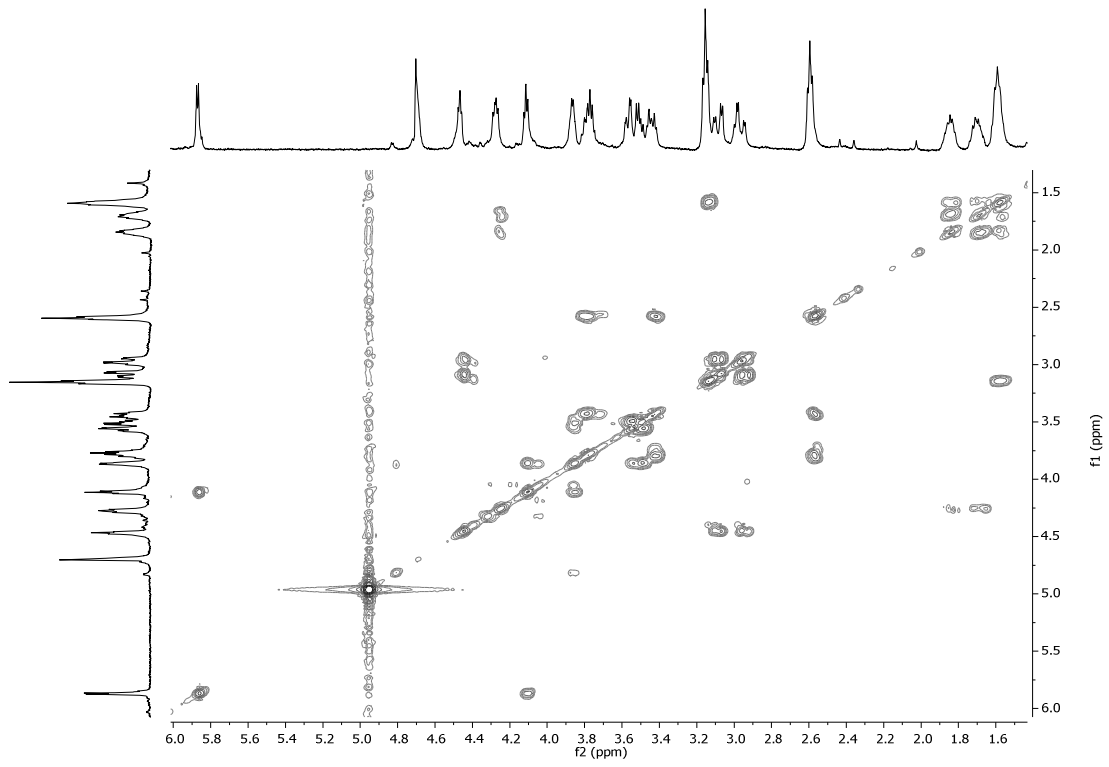
$^1\text{H-RMN (H}_2\text{O/D}_2\text{O (9/1))}$



$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$

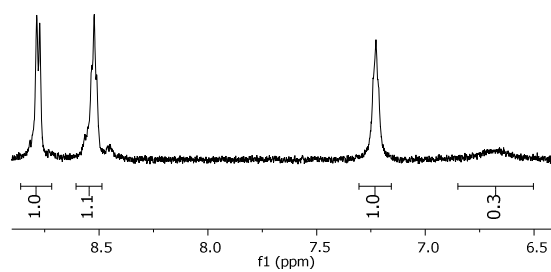
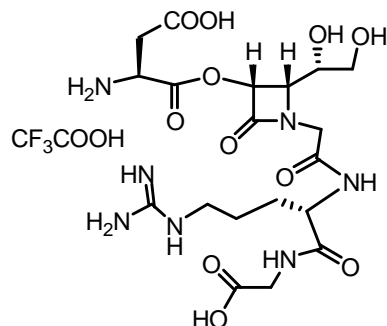


$^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )

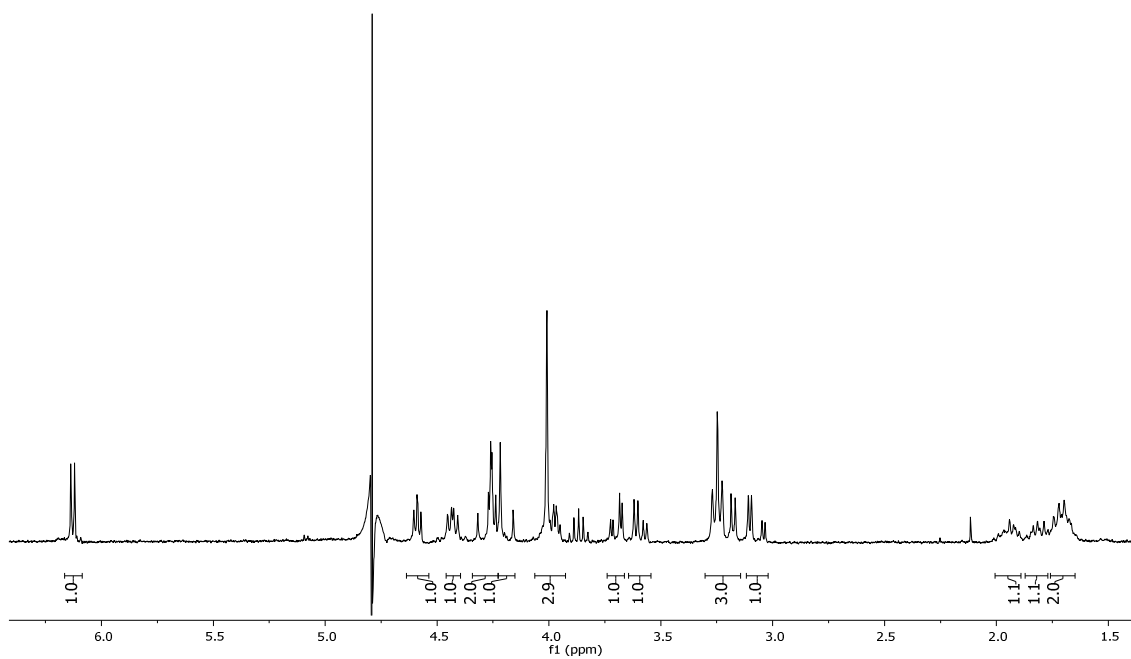


COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ )

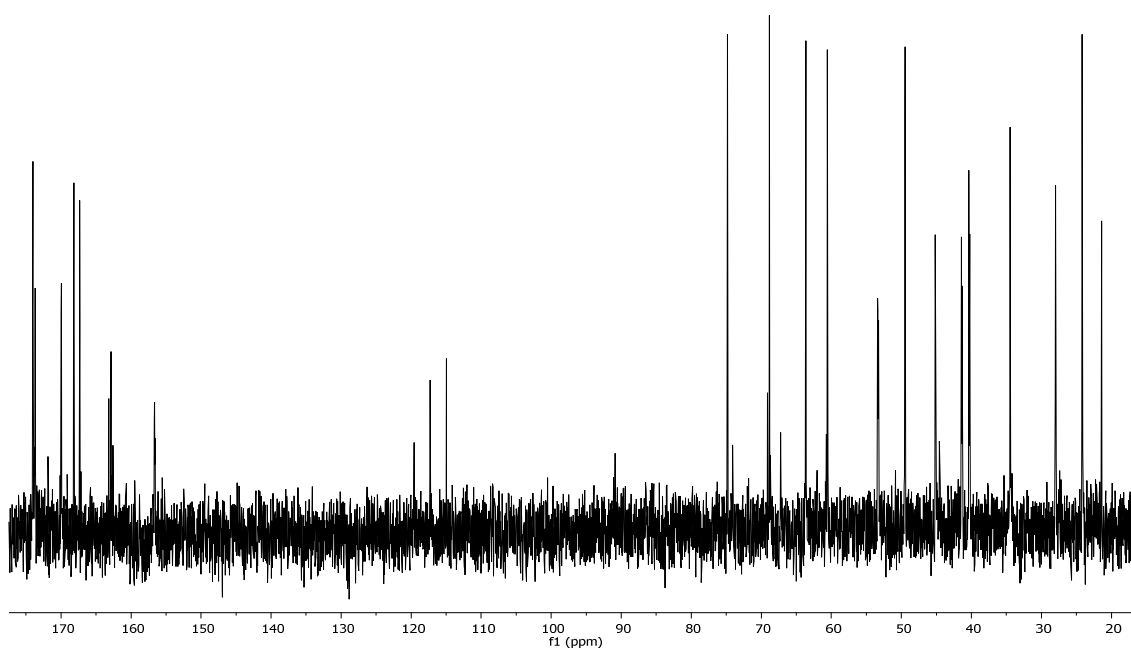
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4S)\text{-3-oxo-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-metilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-Gly-OH}$  (24):



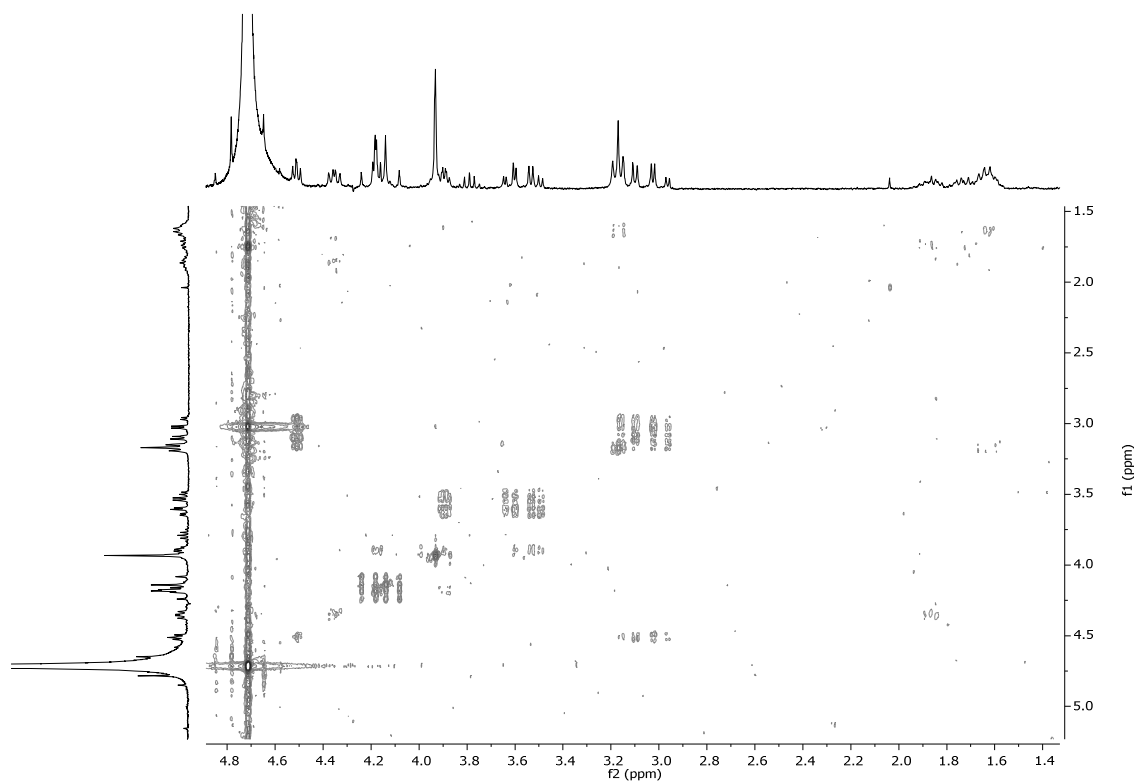
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1))



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )



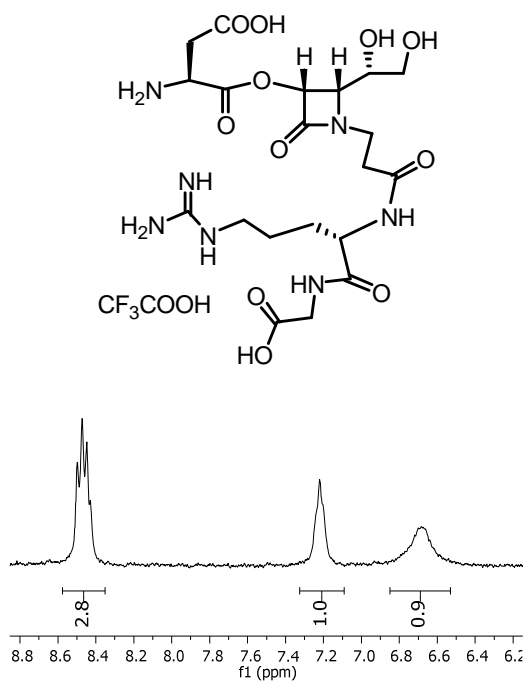
$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$



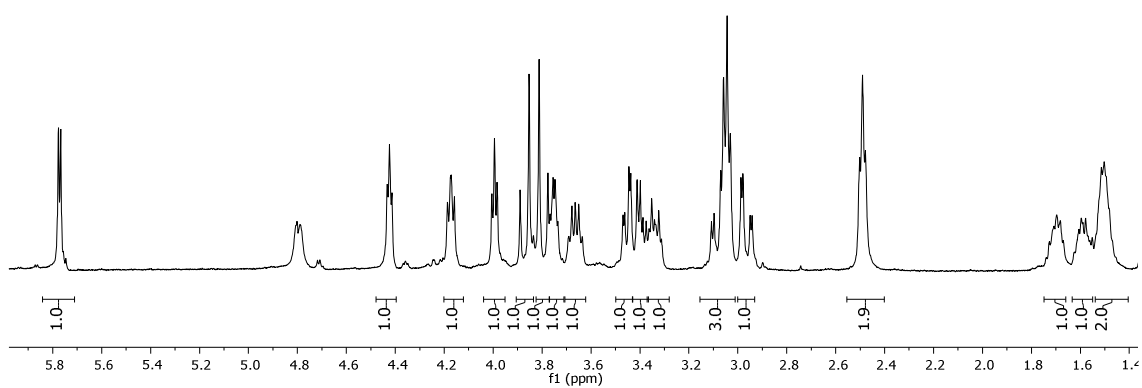
$\text{COSY (D}_2\text{O)}$



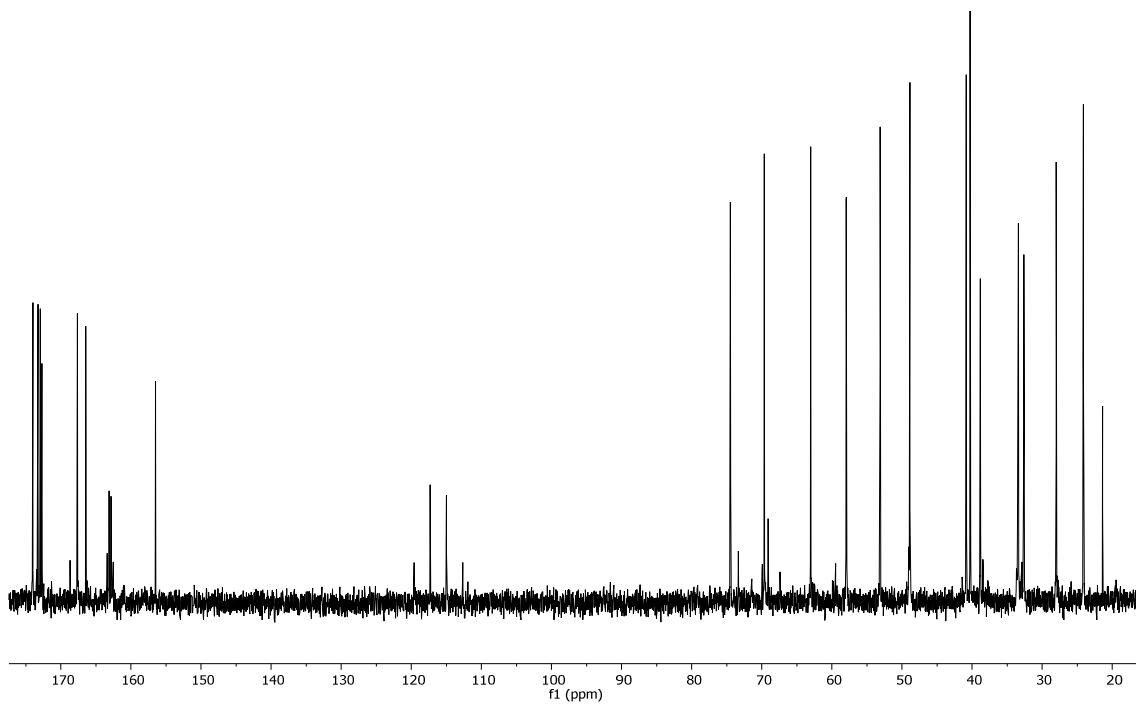
Trifluoro acetato de  $\text{NH}_2\text{-Asp-}[(3R,4S)\text{-3-oxo-4-}((S)\text{-1,2-dihidroxi-etil})\text{-1-etilencarbonil-azetidina-2-ona}]\text{-Arg-Gly-OH}$  (26):



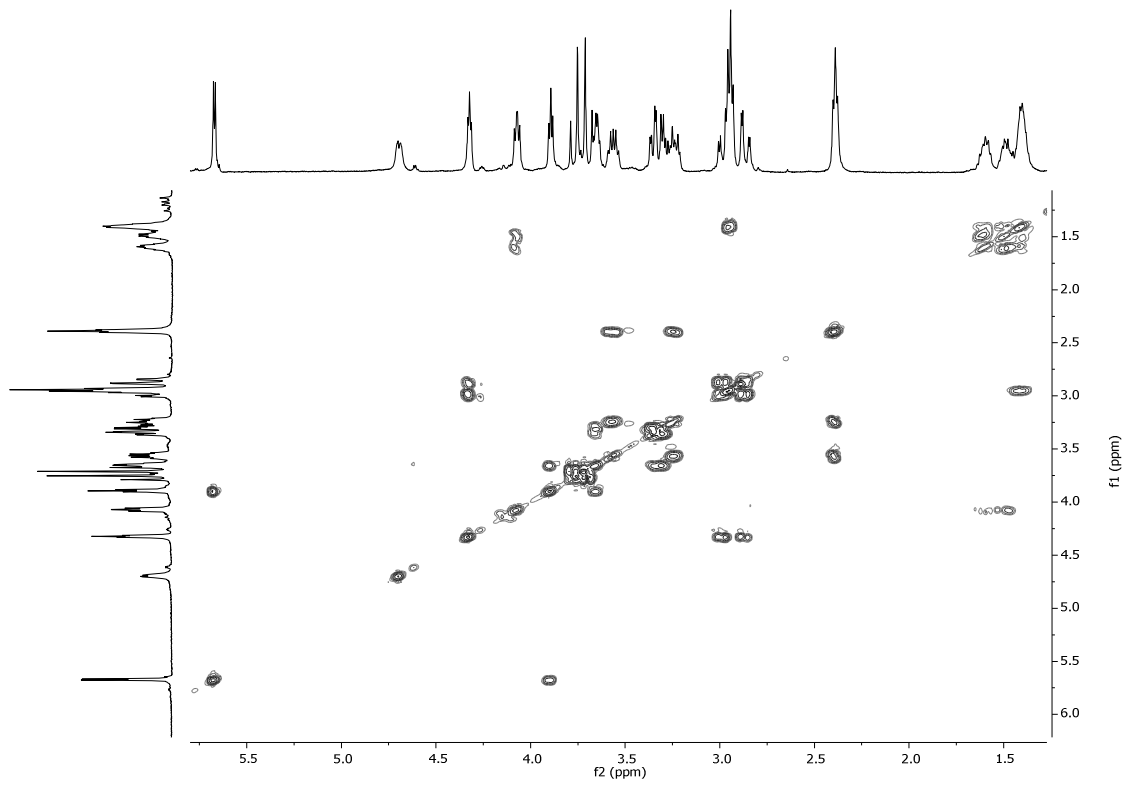
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1))



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )

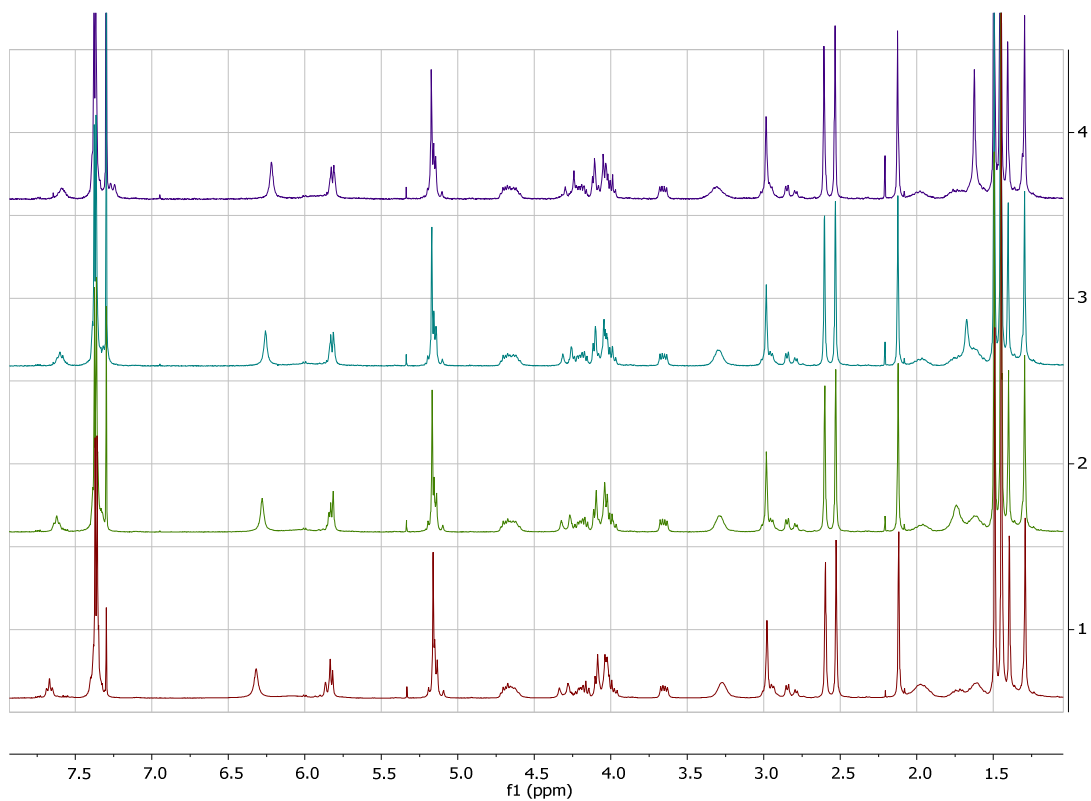


$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$

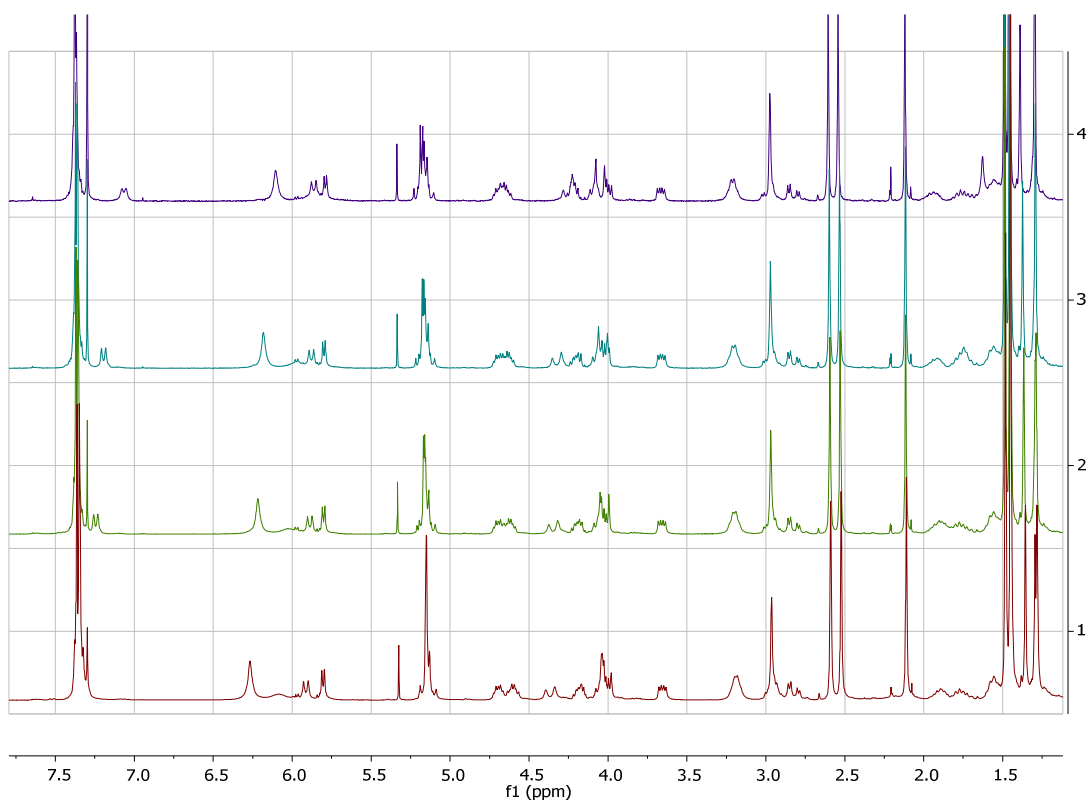


$\text{COSY (D}_2\text{O)}$

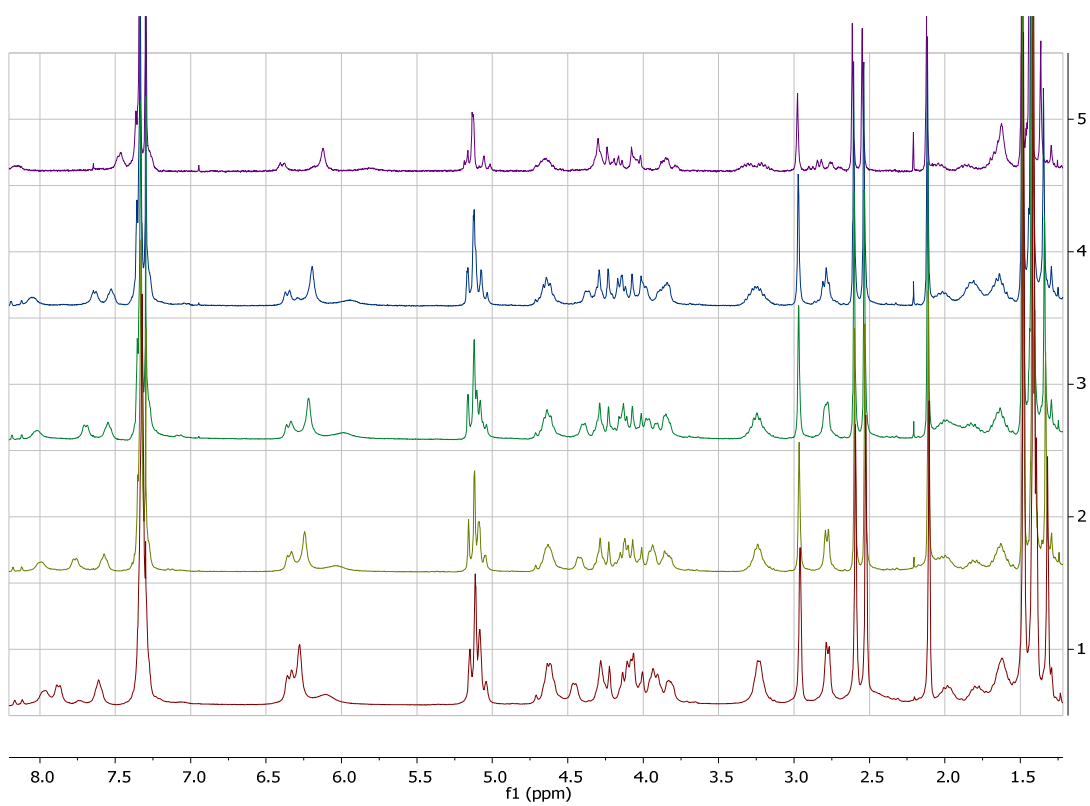
## 8.2. Efectos de la concentración de los compuestos en los espectros de $^1\text{H}$ -RMN



**Figura 184.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **1.11** a diferentes concentraciones.



**Figura 185.** Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **3.11** a diferentes concentraciones.

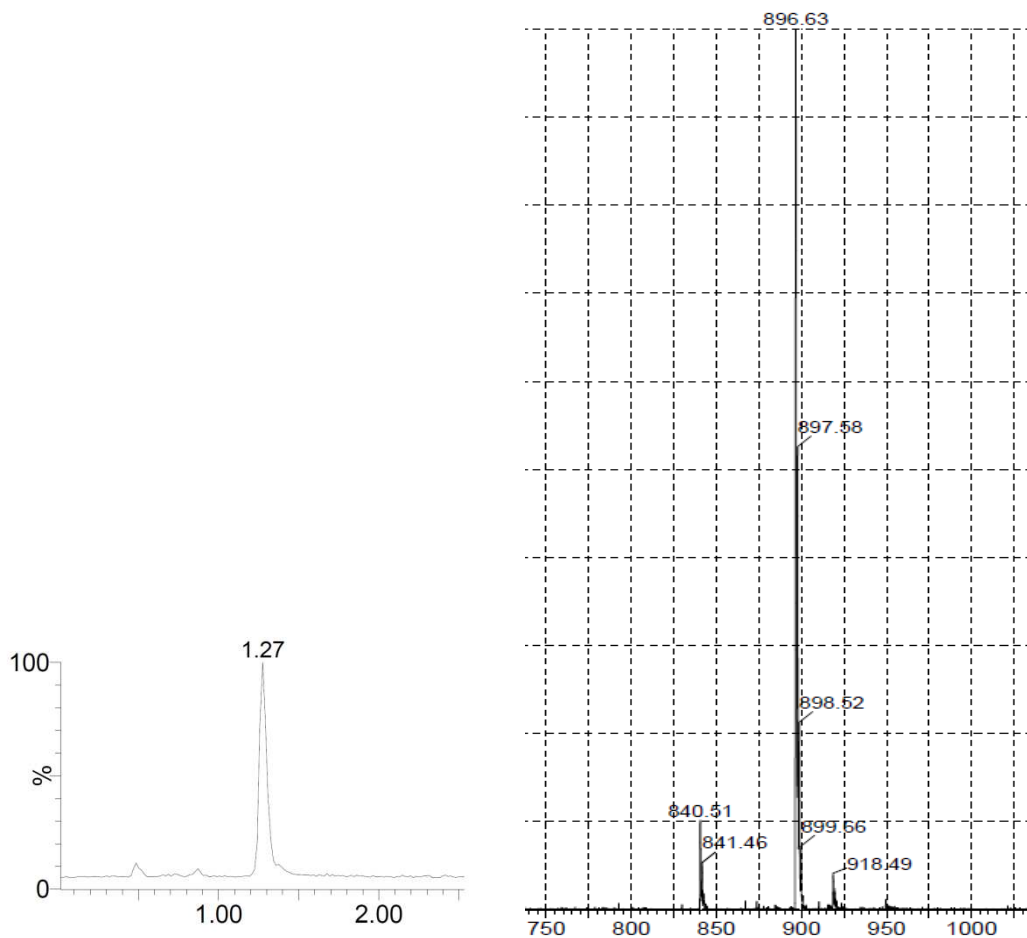


**Figura 186.** Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **23.11** a diferentes concentraciones.

### 8.3. UPLC-MS

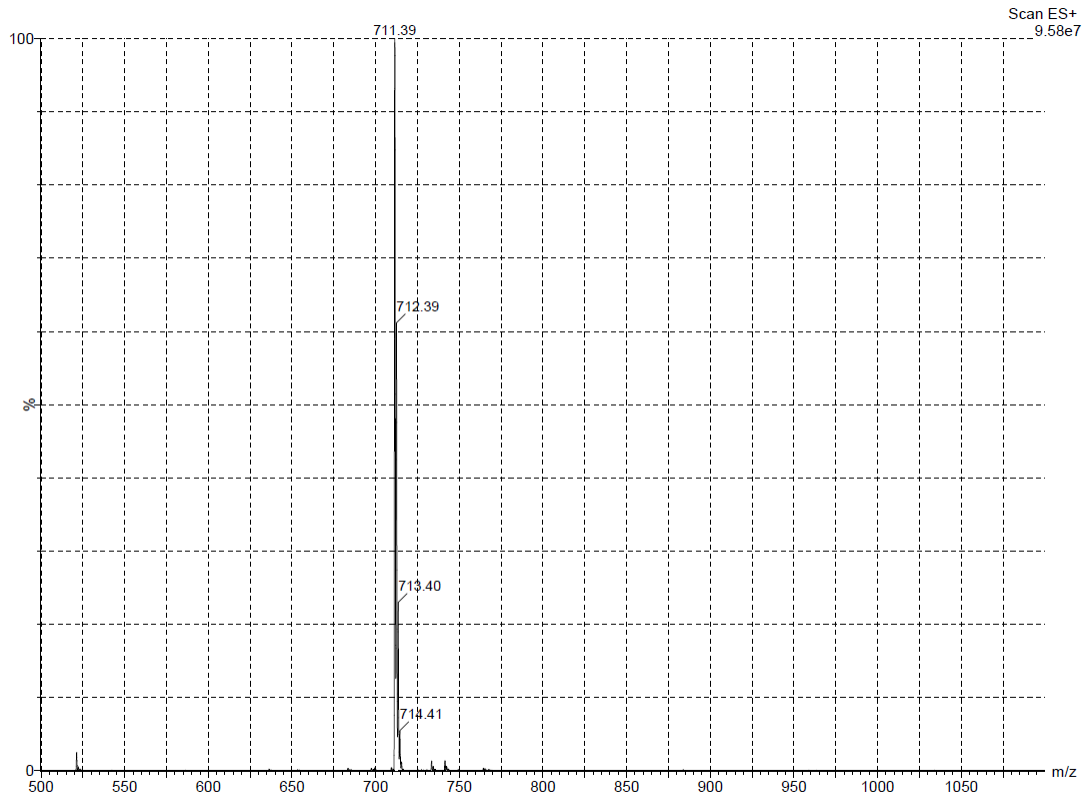
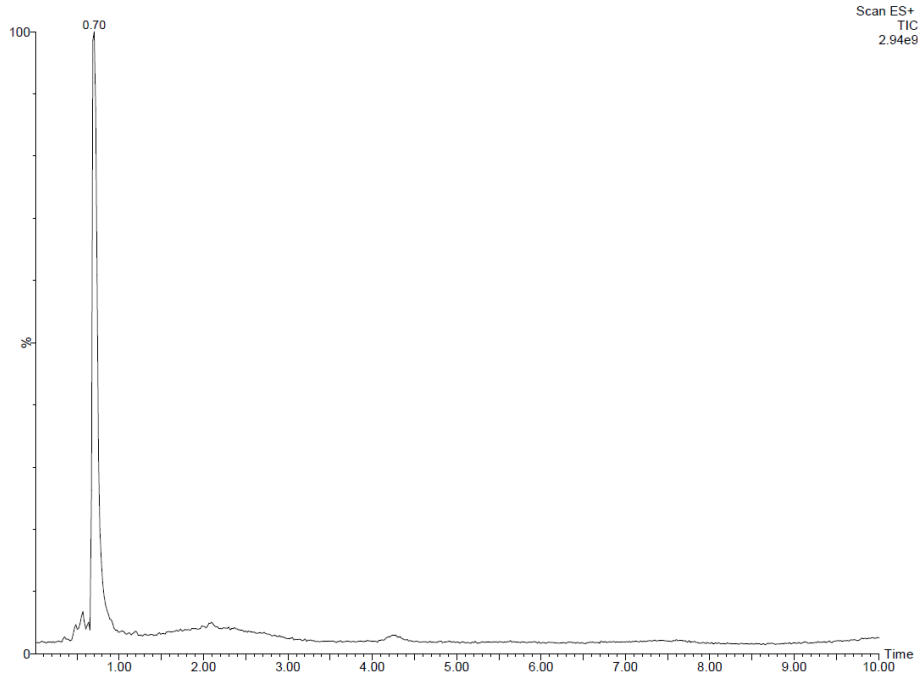
#### 8.3.1. UPLC-MS del producto 1.13b

UPLC-MS del producto mayoritario de la ciclación del compuesto **1.12** conseguido empleando las siguientes condiciones: hidrogenación: H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, t. a., 16 h; ciclación: HATU, HOAt, KHCO<sub>3</sub>, DMF, -15 °C, 16 h:

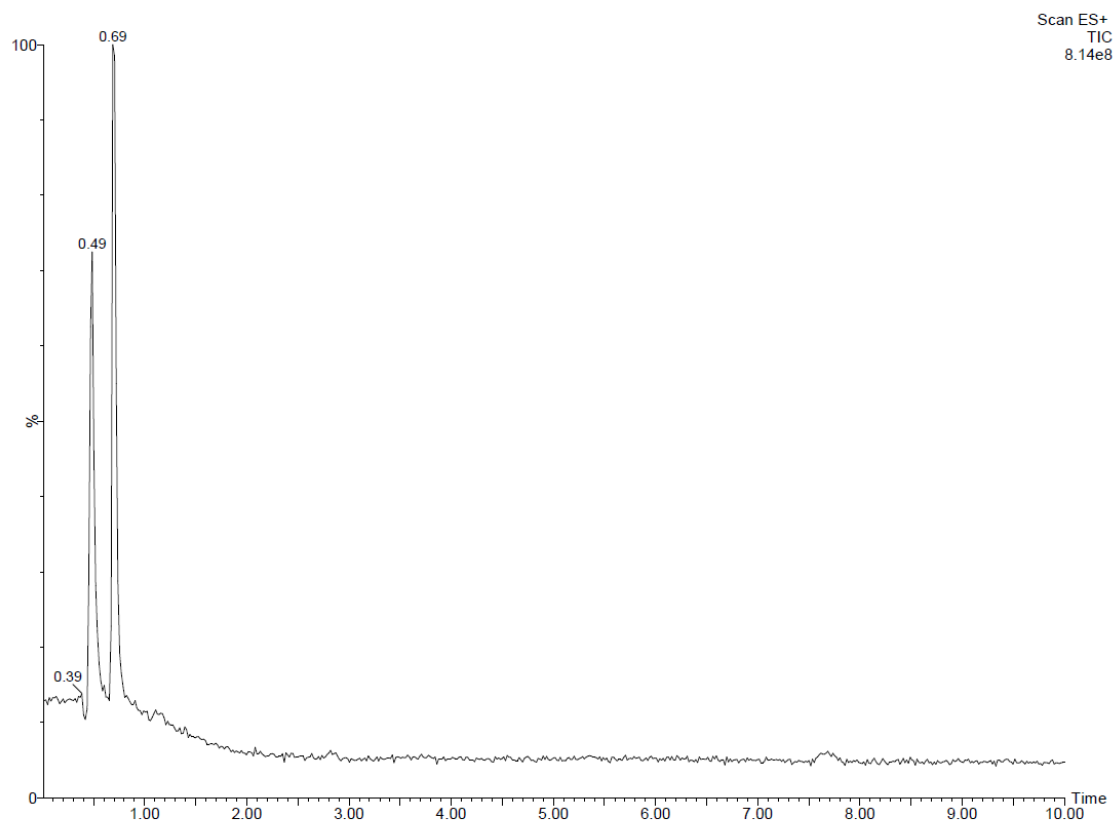


### 8.3.2. UPLC-MS de la hidrogenación del compuesto 1.11

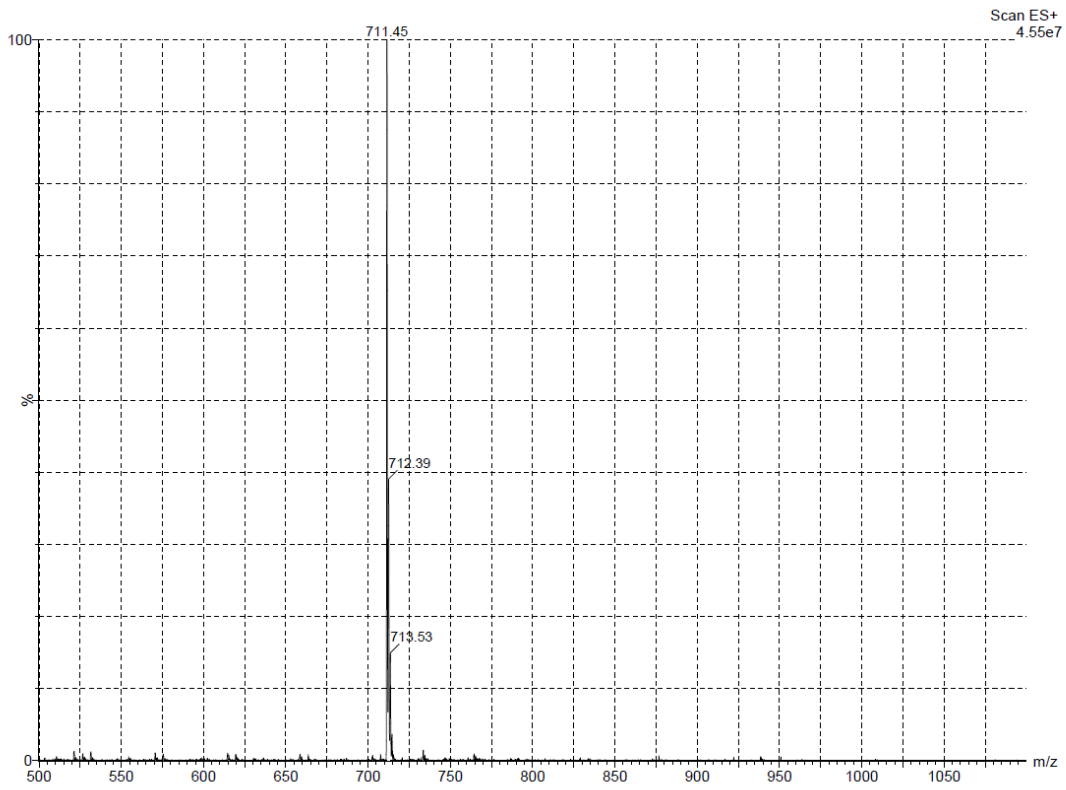
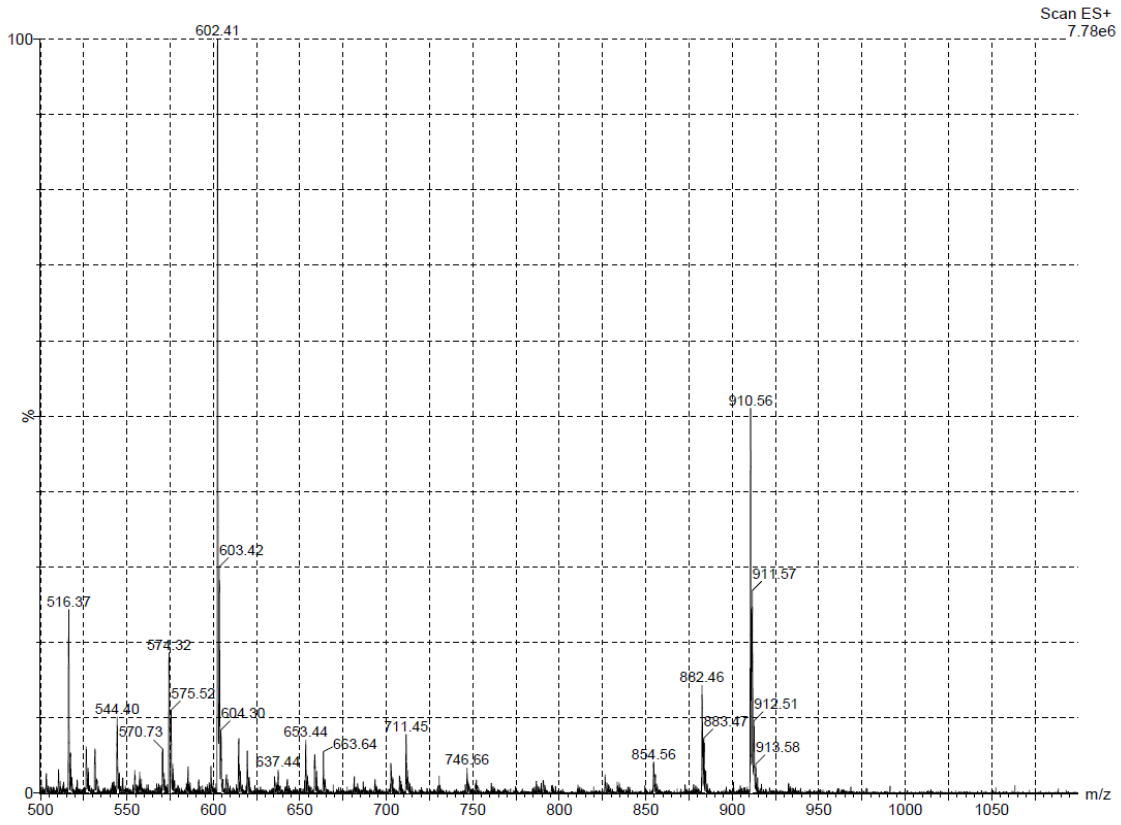
Cromatograma y espectro de masas del crudo de hidrogenación del compuesto 1.11 en MeOH:



Cromatograma y espectros de masas del crudo de hidrogenación del compuesto **1.11** en EtOH:

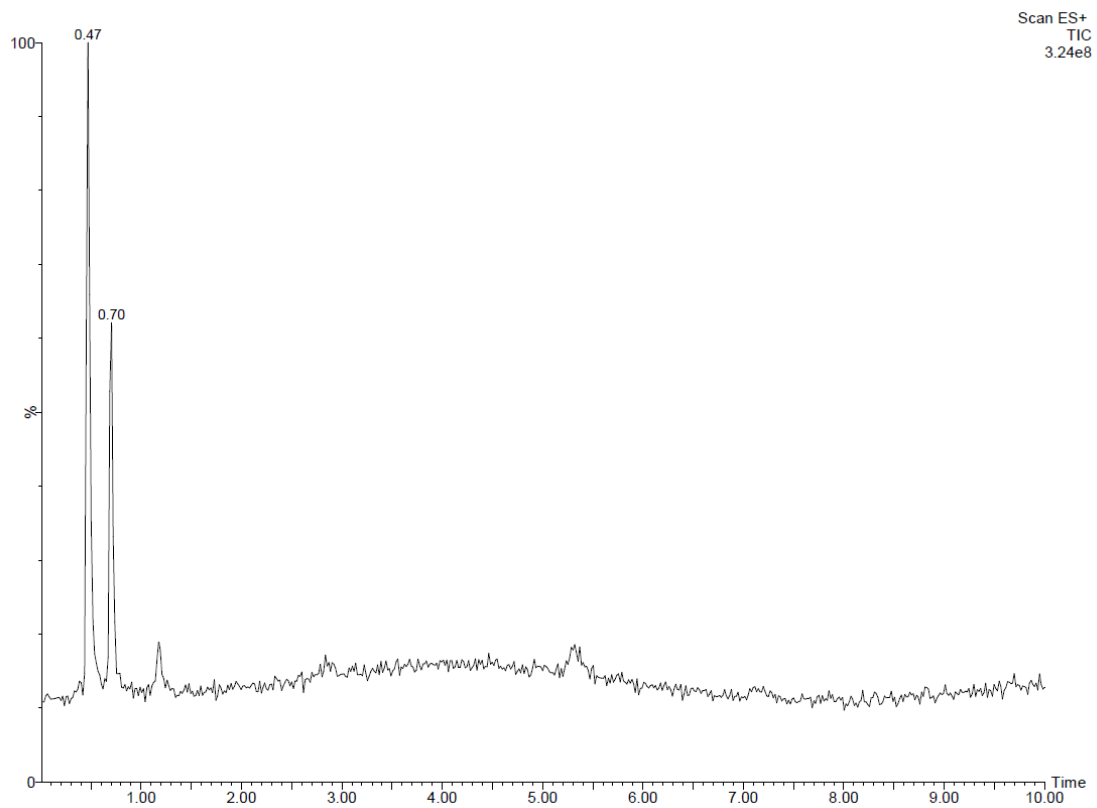


Anexo

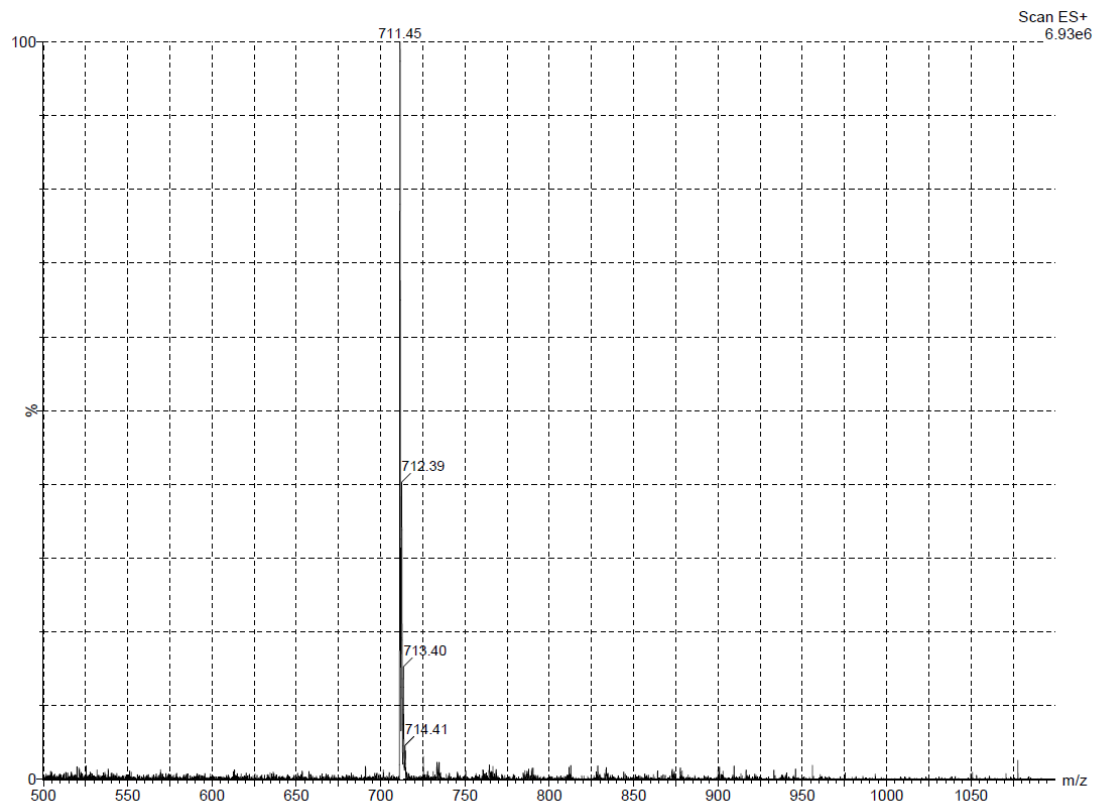
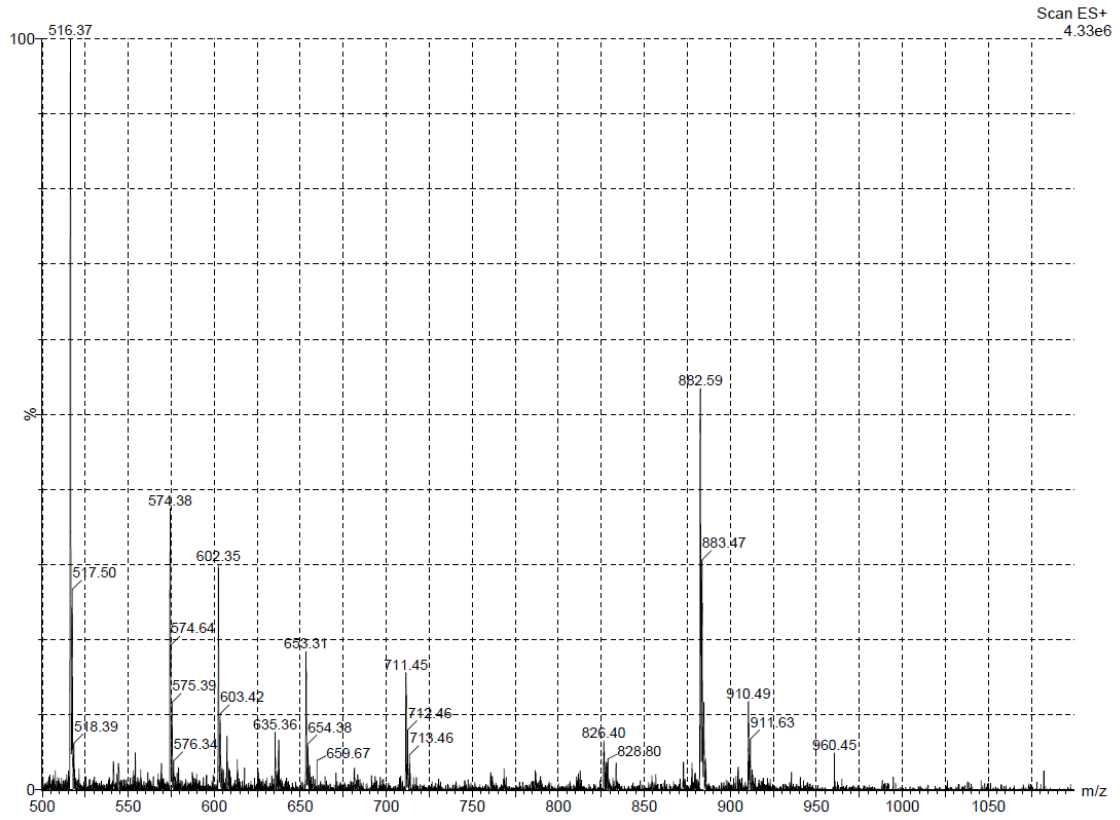




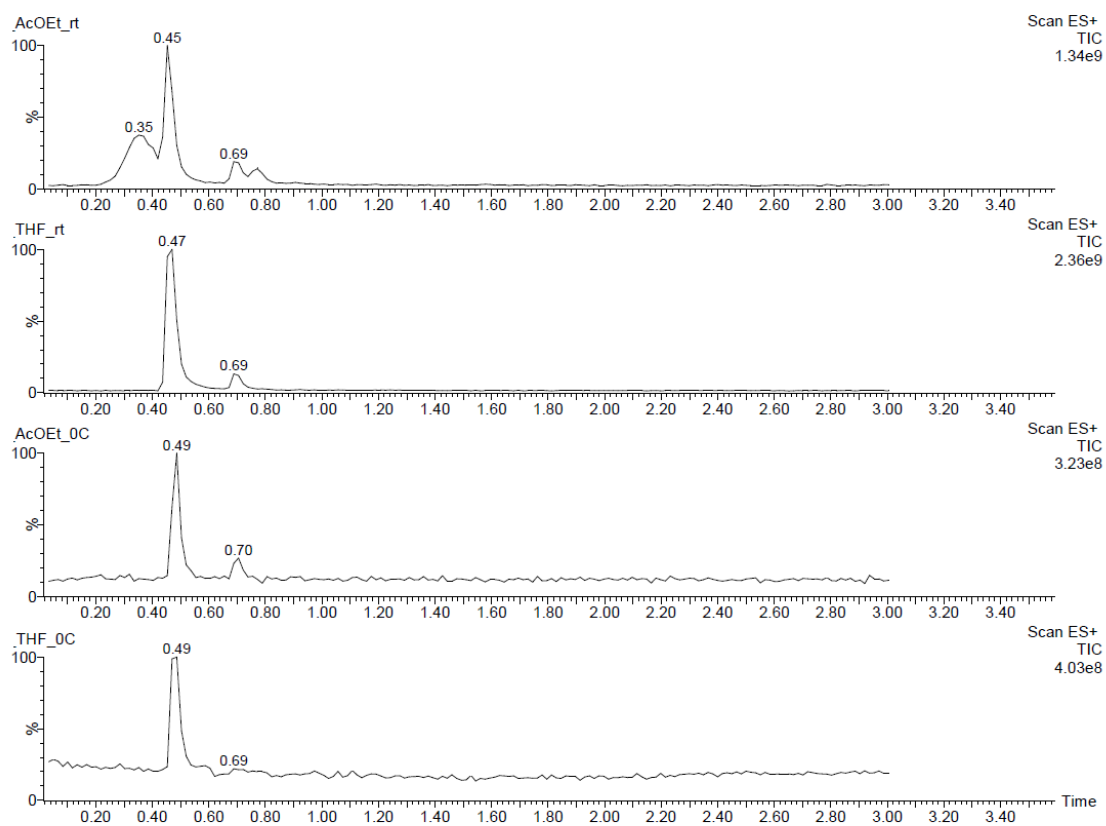
Cromatograma y espectros de masas del crudo de hidrogenación del compuesto **1.11** en AcOEt:



Anexo



Cromatogramas de los crudos de hidrogenación del compuesto **1.11** en AcOEt y THF a diferentes temperaturas:



### 8.3.3. Pureza de los productos finales

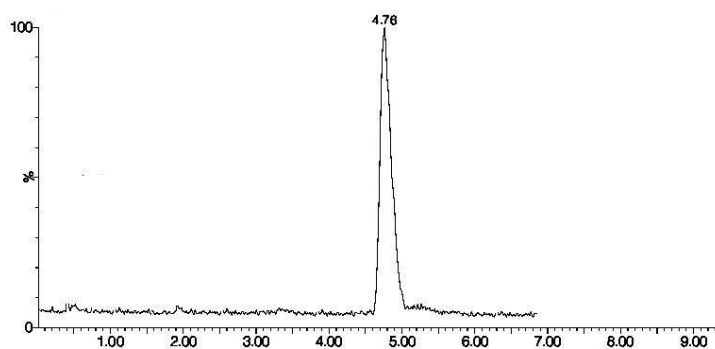


Figura 187. UPLC del compuesto 1.

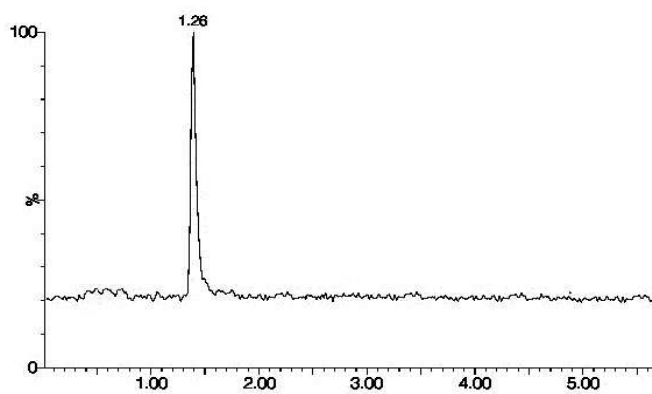


Figura 188. UPLC del compuesto 7.

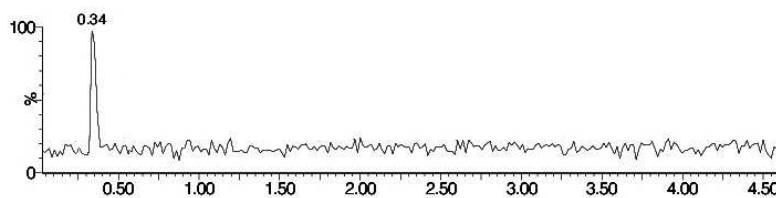


Figura 189. UPLC del compuesto 9.

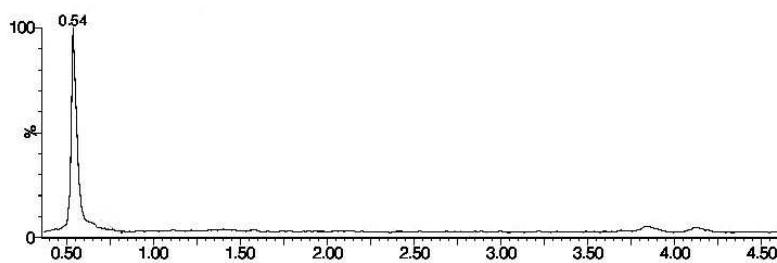


Figura 190. UPLC del compuesto 17.

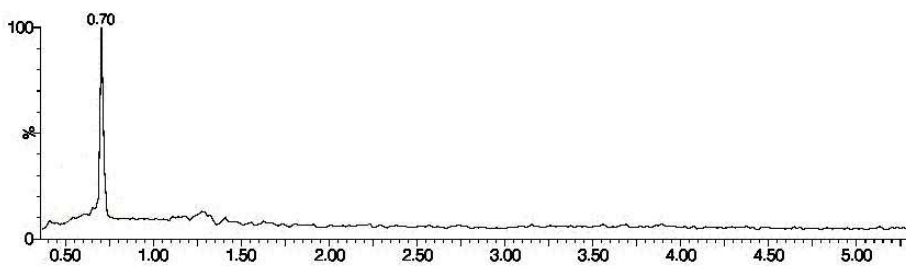


Figura 191. UPLC del compuesto 18.

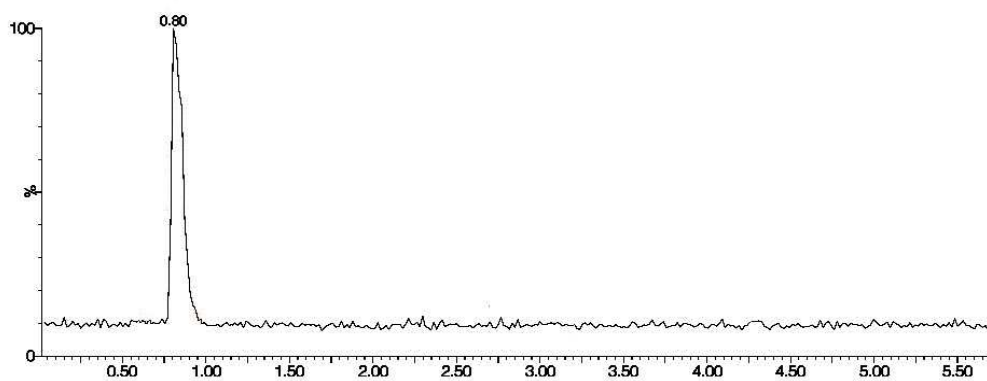


Figura 192. UPLC del compuesto 19.

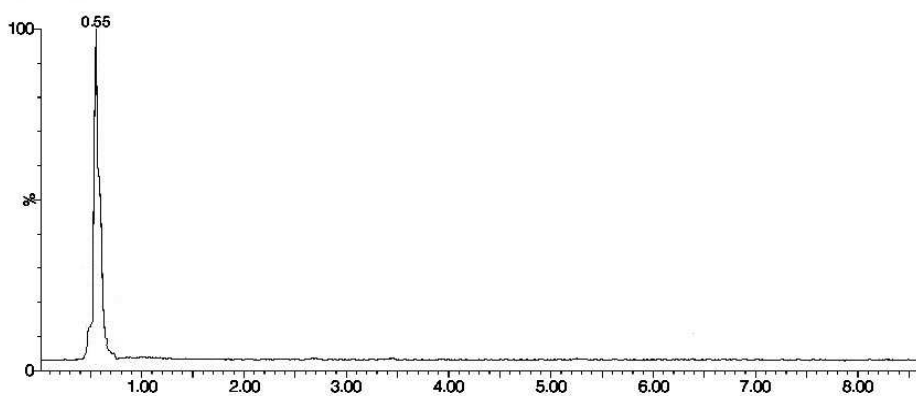


Figura 193. UPLC del compuesto 20.

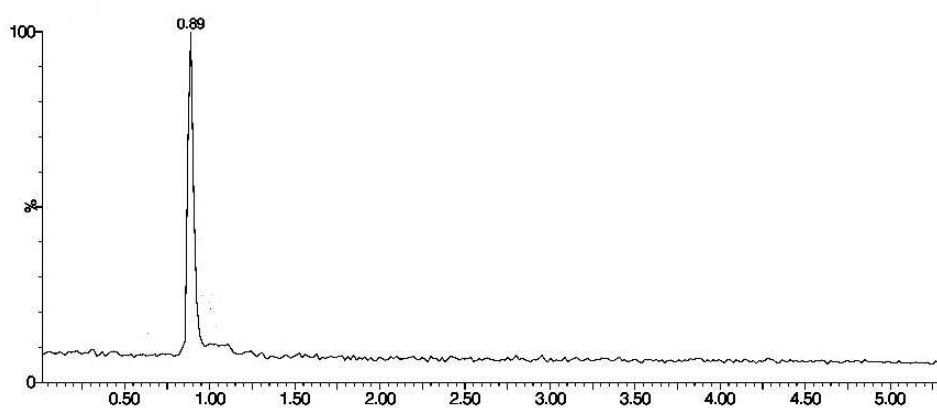


Figura 194. UPLC del compuesto 21.

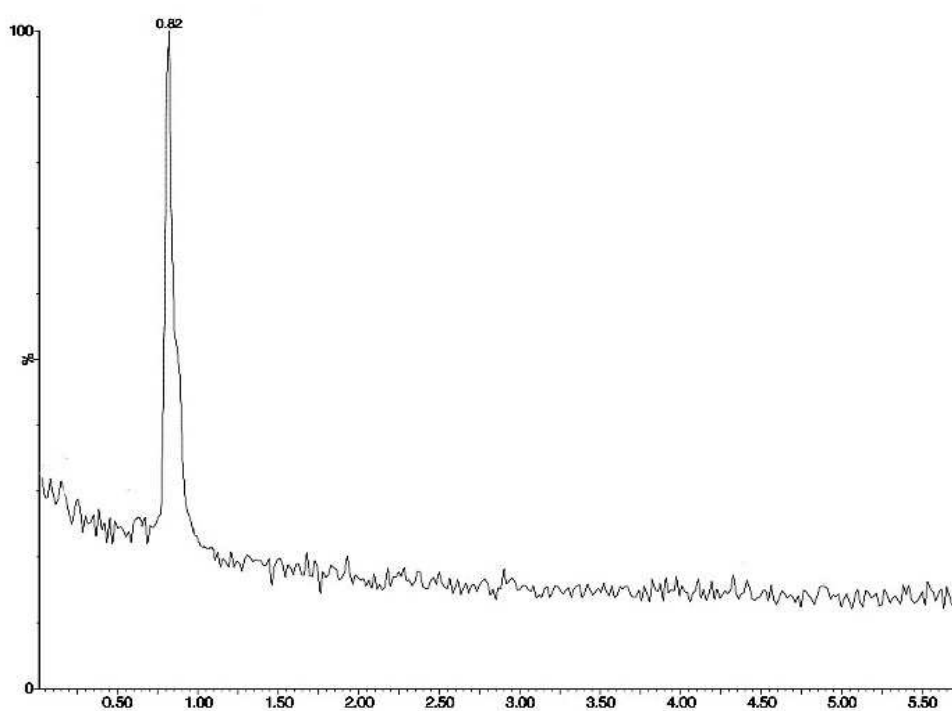


Figura 195. UPLC del compuesto 22.

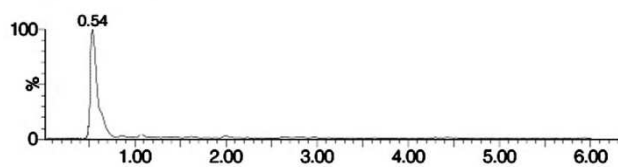


Figura 196. UPLC del compuesto 23.

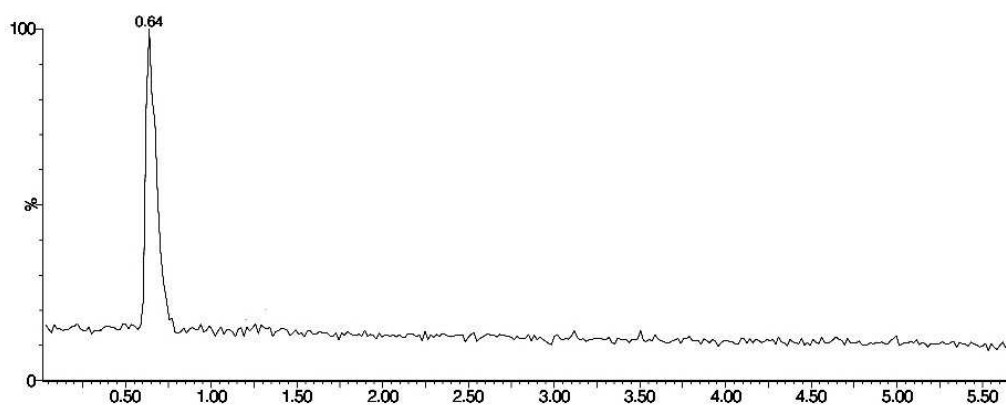
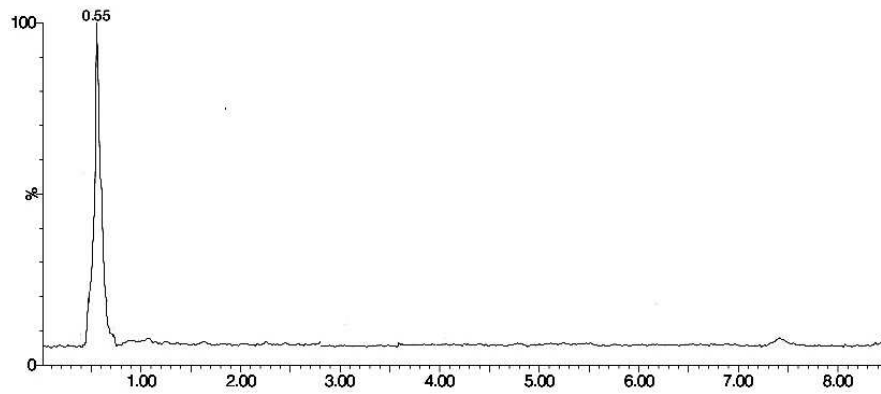
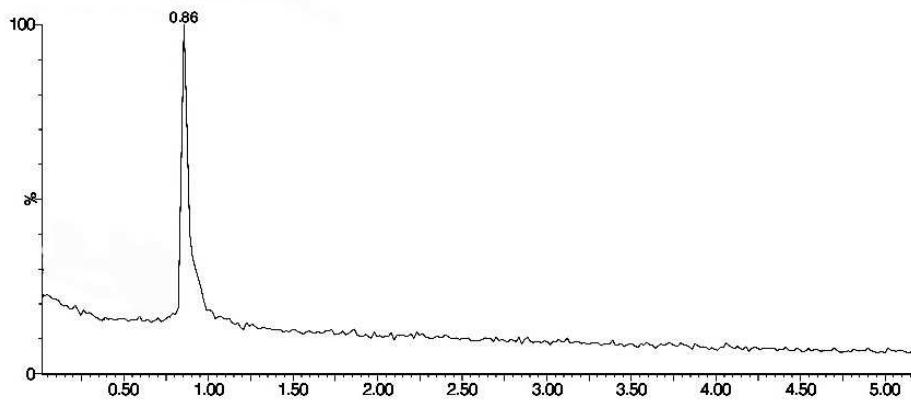


Figura 197. UPLC del compuesto 24.



**Figura 198.** UPLC del compuesto 25.



**Figura 199.** UPLC del compuesto 26.

### 8.4. Datos de los resultados génicos

	C	Va	Vb	1	7	9
CDKN2B	0,210	0,769	1,169	0,187	0,773	0,122
TGFBR2	0,601	0,572	0,631	1,210	0,589	0,648
VEZF1	0,537	0,498	0,515	0,446	0,569	0,511
ITGA6	0,656	0,361	0,612	0,767	0,603	0,799
TRIP12	0,783	0,308	0,405	0,920	0,393	0,659
ITGA2	0,514	0,486	0,481	0,398	0,362	0,657
PERP	0,690	0,561	0,506	0,754	0,695	0,780
MMP1	0,674	0,389	0,494	0,767	0,271	0,582
ITGB1	0,662	0,527	0,473	0,655	0,445	0,654
MAP3K7	0,862	0,082	0,090	0,843	0,487	0,655
GCKR	-0,369	-0,671	-0,940	-0,435	-0,854	-0,566
CDC7	-1,630	-0,662	0,804	-1,885	-0,039	-1,775
ADAM6	-1,698	-1,525	0,419	-1,767	0,317	-1,754
FOXC1	-0,504	-0,317	-0,279	-0,688	-0,571	-0,810
FAIM3	-0,348	-0,359	-0,367	-0,366	-0,259	-0,287
CAMK2N2	-0,482	-0,392	-0,410	-0,344	-0,301	-0,495
ITGA9	-0,101	-1,000	-1,114	-0,167	-0,058	-0,124

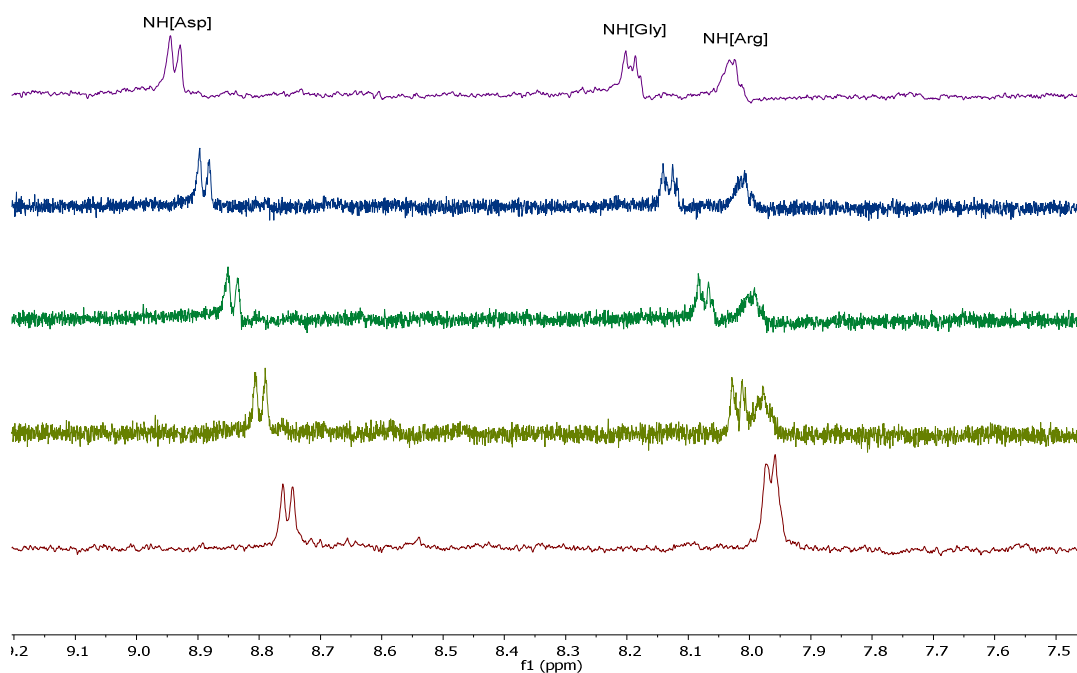
	17	18	19	20	21
CDKN2B	-0,111	0,186	0,101	0,431	0,412
TGFBR2	0,031	0,156	0,212	0,348	0,821
VEZF1	0,187	0,242	0,610	0,171	0,517
ITGA6	0,115	0,243	0,128	0,137	0,421
TRIP12	0,123	0,144	0,761	0,101	0,507
ITGA2	0,226	0,178	0,312	0,064	0,314
PERP	0,288	0,478	0,714	0,179	0,720
MMP1	0,448	0,429	0,531	-0,020	0,512
ITGB1	0,137	0,168	0,417	0,221	0,812
MAP3K7	0,090	0,108	0,316	0,090	0,734
GCKR	-0,540	-0,644	-0,612	-0,312	-0,211
CDC7	0,188	0,659	-1,010	-0,116	-1,620
ADAM6	0,231	0,166	-0,873	-0,010	-1,513
FOXC1	-0,119	-0,344	-0,079	-0,217	-0,314
FAIM3	0,125	0,144	-0,211	-0,213	-0,757
CAMK2N2	-0,078	-0,122	-0,311	-0,072	-0,134
ITGA9	-0,017	-0,098	-0,092	-0,137	-0,217

	22	23	24	25	26
CDKN2B	0,091	0,037	-0,012	0,459	0,081
TGFBR2	0,021	0,227	0,707	0,231	0,084
VEZF1	0,211	0,091	0,011	0,389	0,101
ITGA6	0,512	0,141	0,017	0,674	-0,213
TRIP12	0,211	0,075	0,012	0,364	0,237
ITGA2	0,121	0,021	0,041	0,098	0,052
PERP	0,604	0,579	0,712	0,531	0,097
MMP1	0,191	0,117	0,473	0,091	0,521
ITGB1	0,011	0,073	0,124	-0,312	0,114
MAP3K7	0,070	0,341	0,107	0,021	0,135
GCKR	-0,211	-0,196	-0,174	-0,613	-0,192
CDC7	-1,743	-1,117	-1,121	-0,106	0,761
ADAM6	-0,913	-1,616	-1,223	0,224	-0,871
FOXC1	-0,452	-0,222	-0,317	-0,362	-0,312
FAIM3	-0,187	-0,016	-0,218	-0,112	-0,081
CAMK2N2	-0,021	-0,017	-0,071	-0,102	-0,721
ITGA9	-0,101	-0,103	-0,092	-0,621	0,017



## 8.5. Datos de los resultados conformacionales

### 8.5.1. Derivas térmicas de los compuestos cíclicos



Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Asp]	8.938	8.889	8.845	8.799	8.754	d 7.9	-9.16
NH[Gly]	8.195	8.131	8.076	8.018	7.966	m	-11.42
NH[Arg]	8.027	8.012	7.998	7.981	7.966	m	-3.06

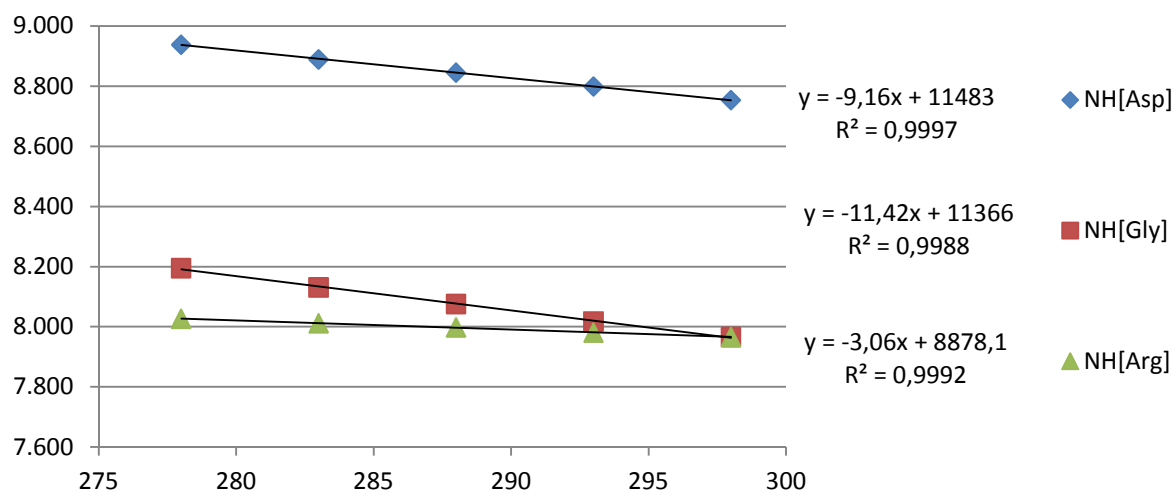
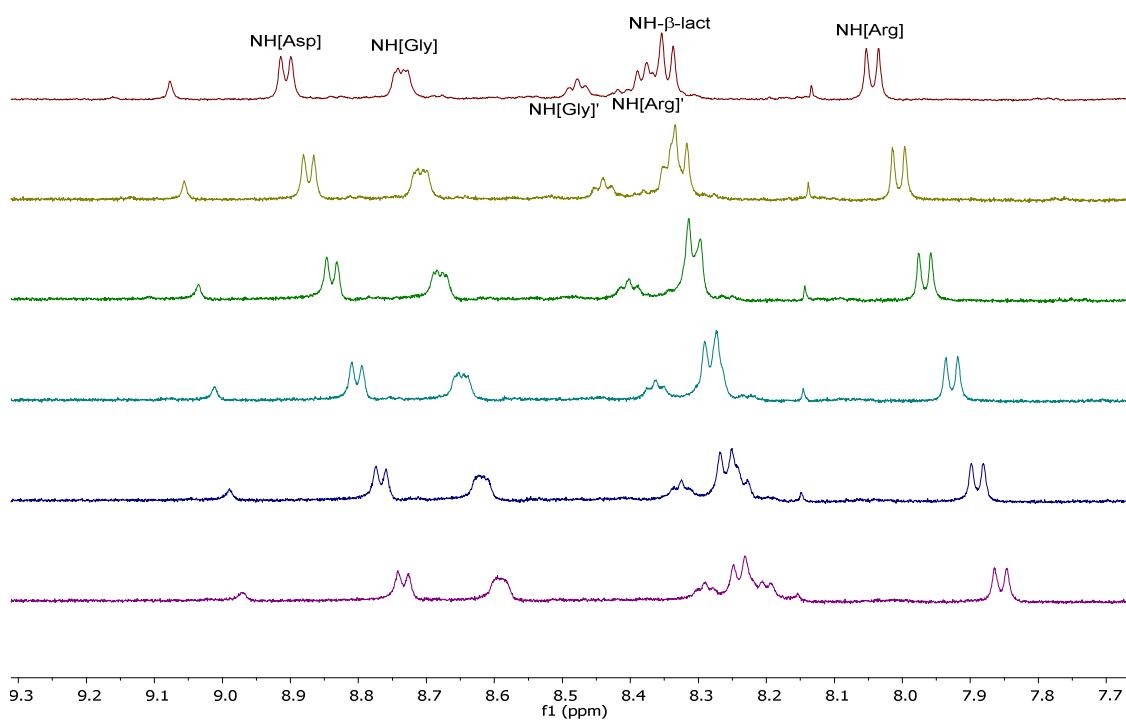
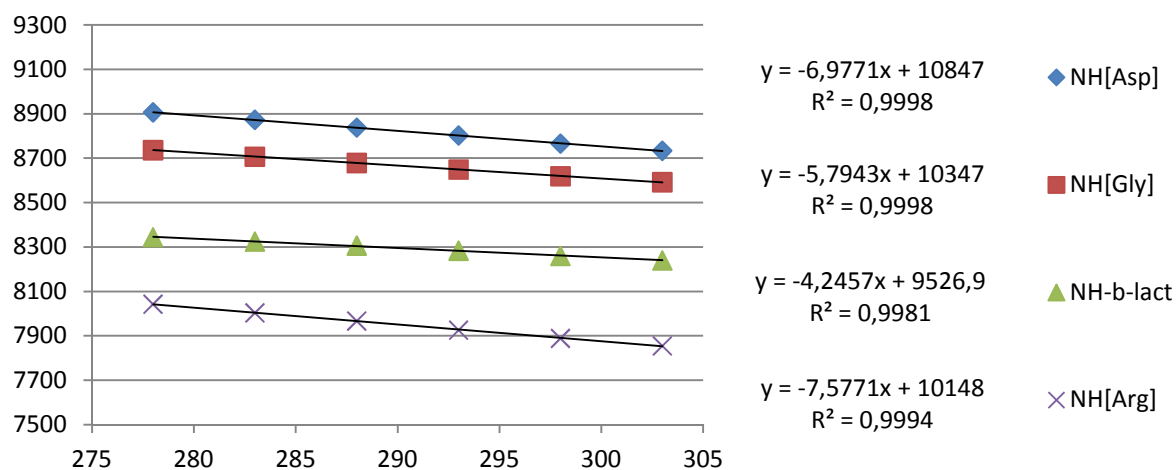


Figura 200. Deriva térmica del compuesto 1.

## Anexo

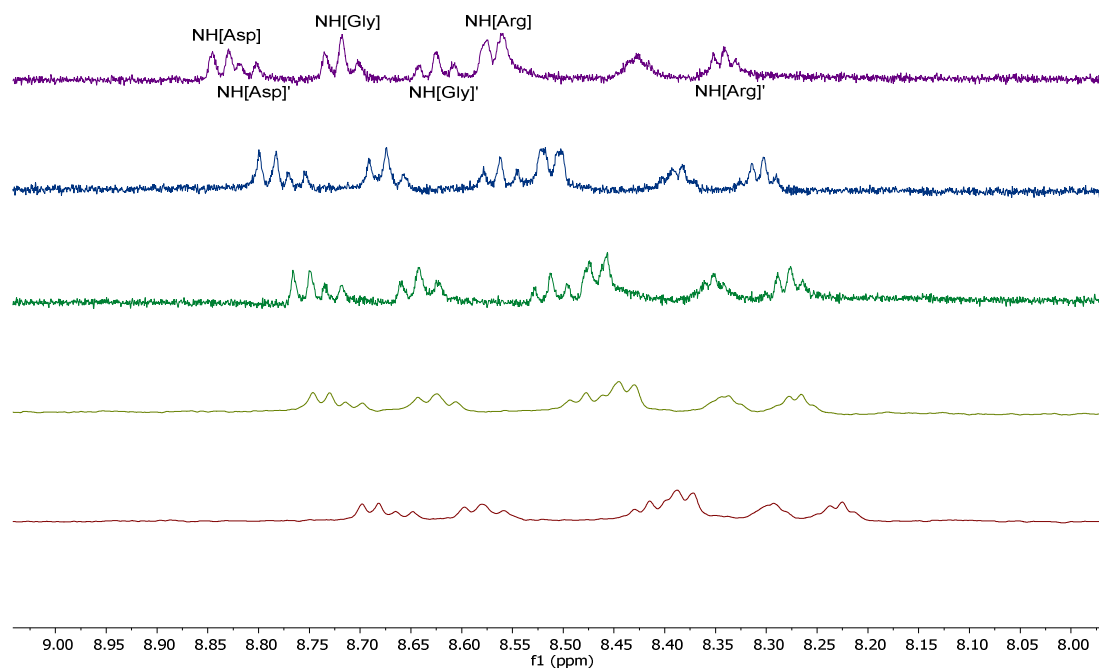


Amida	Desplazamiento químico (ppm)						Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K	303K		
NH[Asp]	8.907	8.873	8.838	8.803	8.766	8.734	d 7.4	-6.98
NH[Gly]	8.736	8.707	8.679	8.649	8.619	8.592	m	-5.79
NH-β-lact	8.345	8.325	8.307	8.284	8.260	8.240	d 8.7	-4.24
NH[Arg]	8.043	8.004	7.967	7.926	7.889	7.855	d 8.9	-7.58

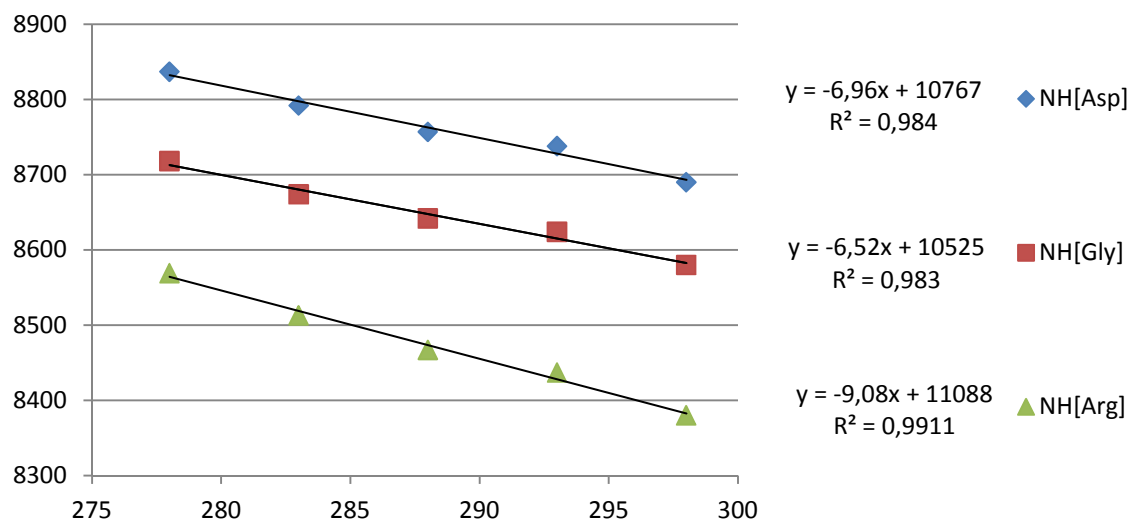


**Figura 201.** Deriva térmica del compuesto 7.

## Anexos

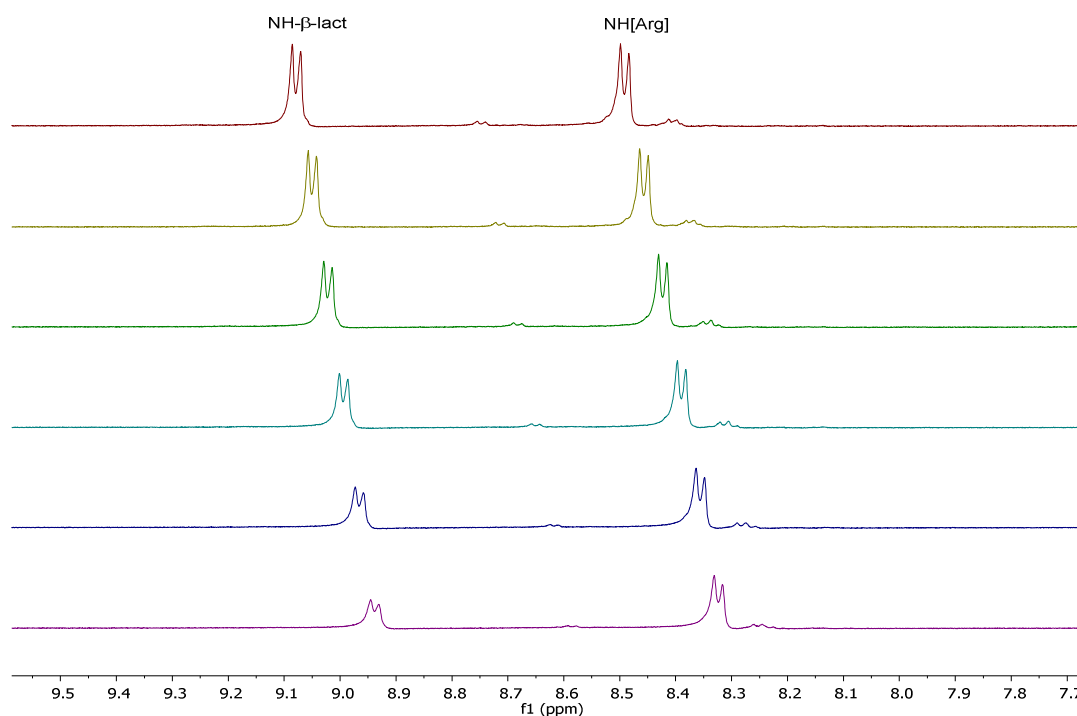


Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Asp]	8.837	8.792	8.757	8.738	8.690	d 8.1	-6.96
NH[Gly]	8.718	8.674	8.642	8.624	8.580	t 8.3	-6.52
NH[Arg]	8.569	8.513	8.467	8.437	8.380	d 8.6	-9.08



**Figura 202.** Deriva térmica del compuesto 9.

### 8.5.2. Derivas térmicas de los compuestos de cadena abierta más activos



Amida	Desplazamiento químico (ppm)						Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K	303K		
NH-β-lact	9.079	9.050	9.023	8.995	8.967	8.939	d 7.3	-5.58
NH[Arg]	8.492	8.457	8.424	8.391	8.356	8.324	d 7.5	-6.72

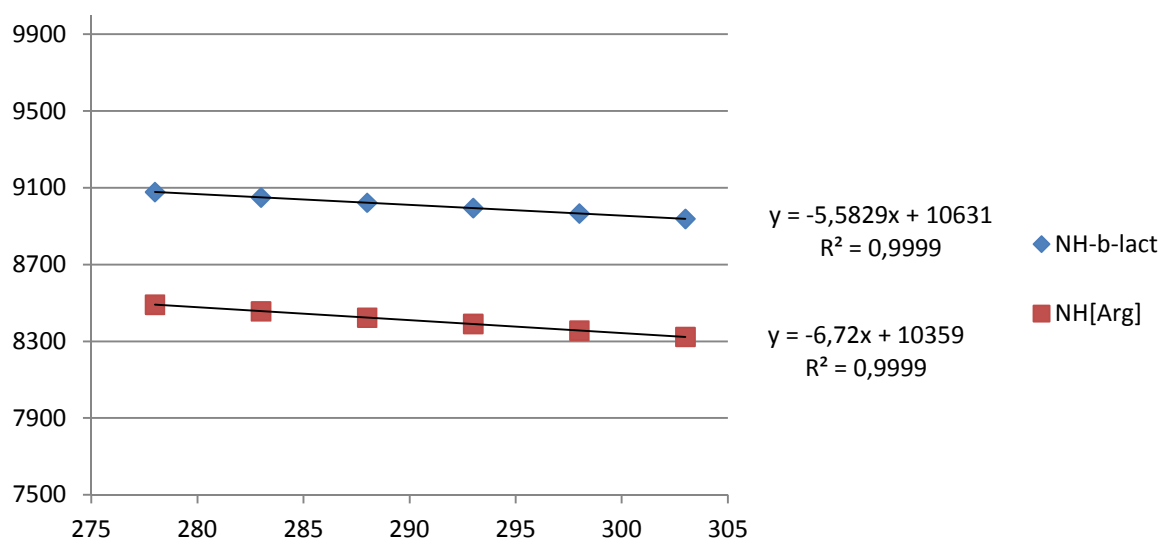
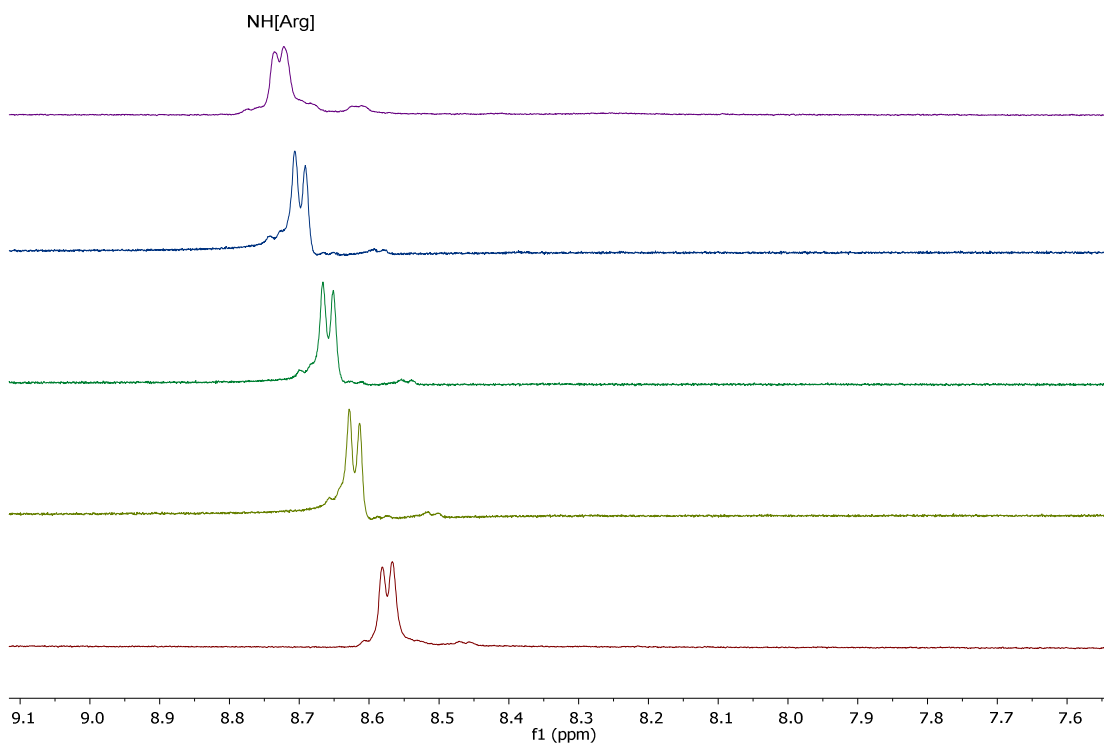


Figura 203. Deriva térmica del compuesto 18.



Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Arg]	8.728	8.699	8.659	8.621	8.574	d 6.6	-7.72

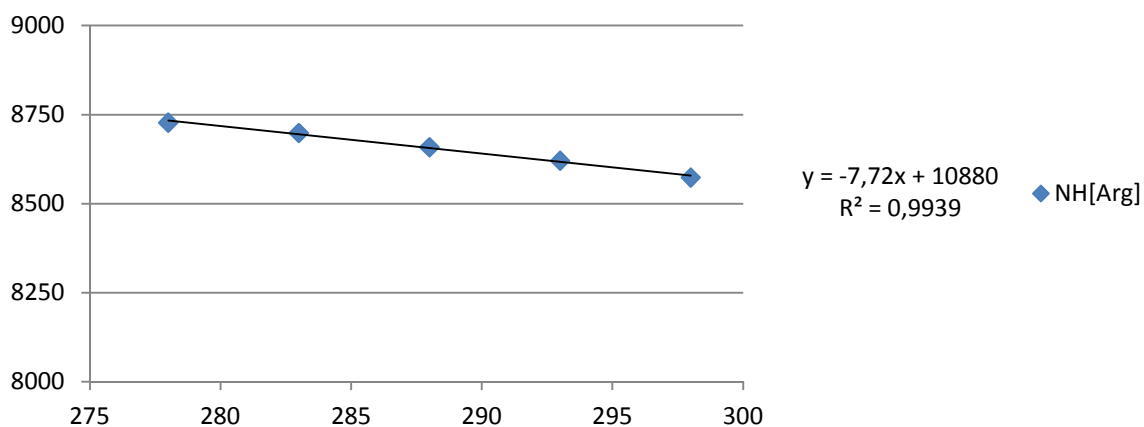
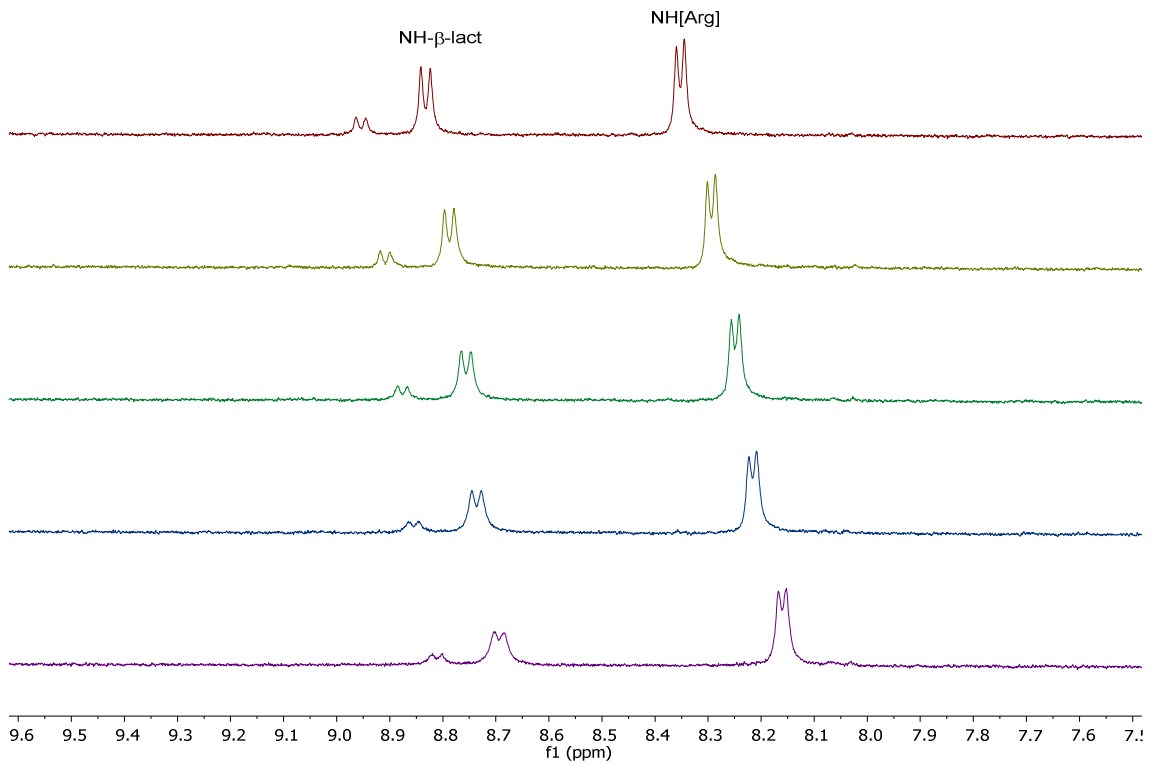


Figura 204. Deriva térmica del compuesto 19.

Anexo



Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH-β-lact	8.832	8.787	8.755	8.735	8.694	d 9.0	-6.56
NH[Arg]	8.352	8.295	8.248	8.216	8.161	t 7.6	-9.22

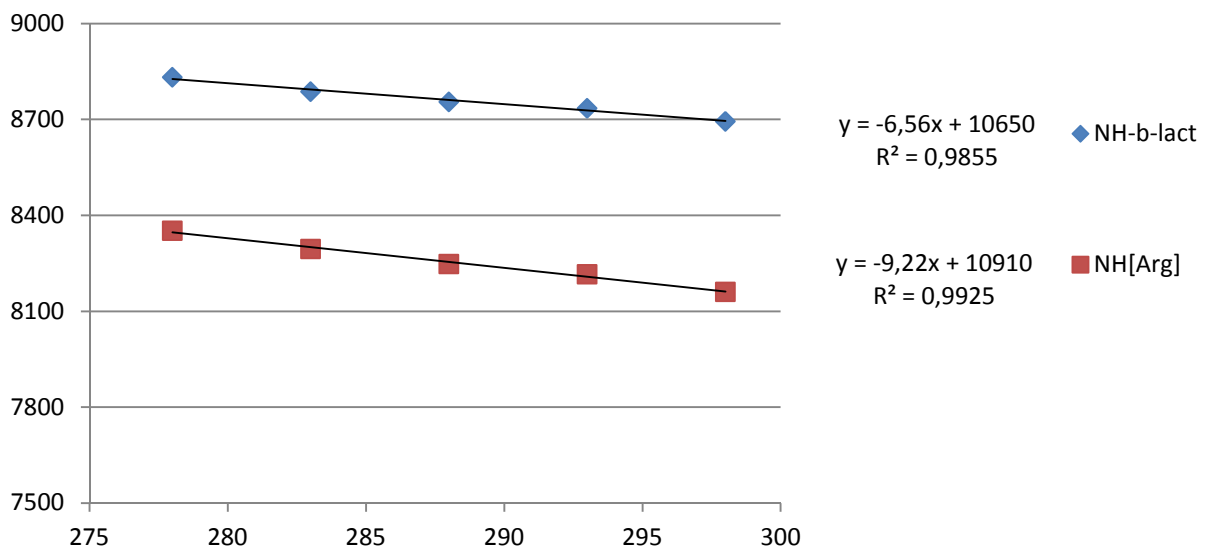
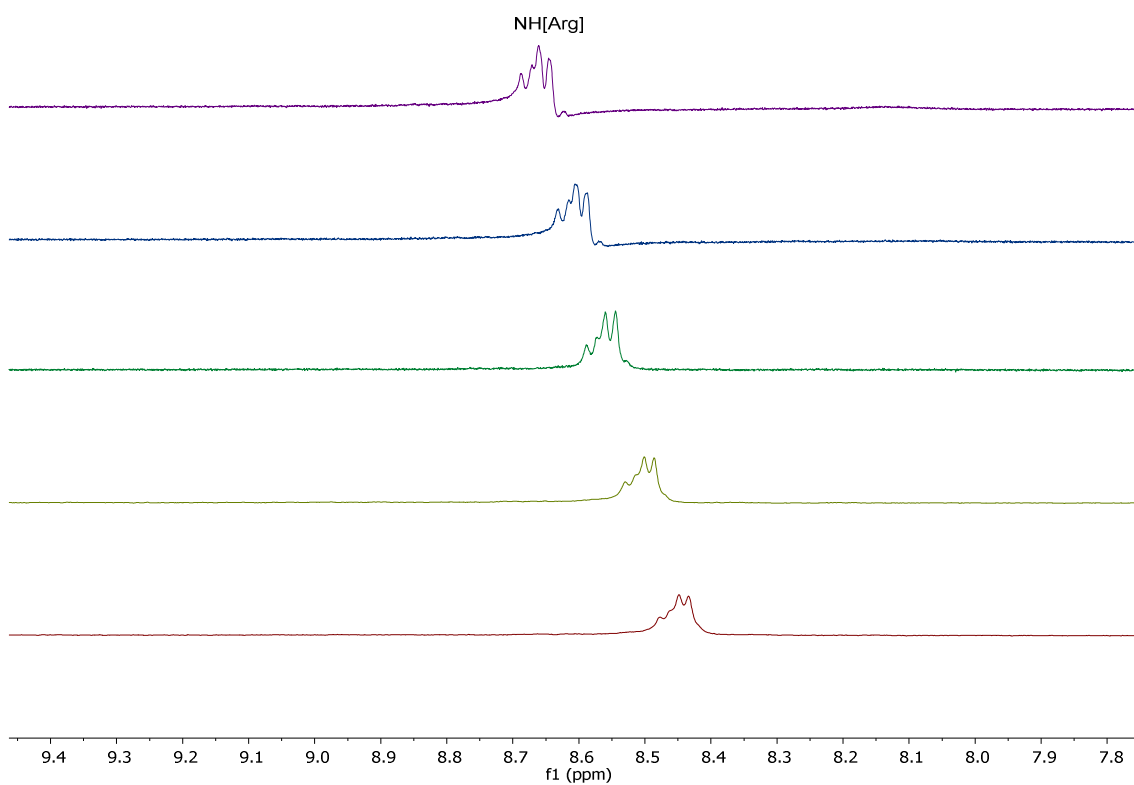
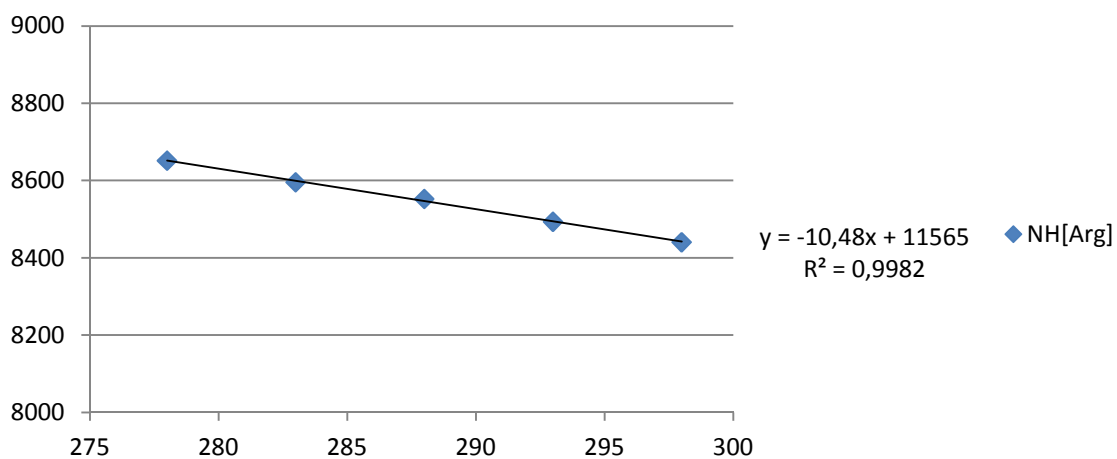


Figura 205. Deriva térmica del compuesto 20.

## Anexos

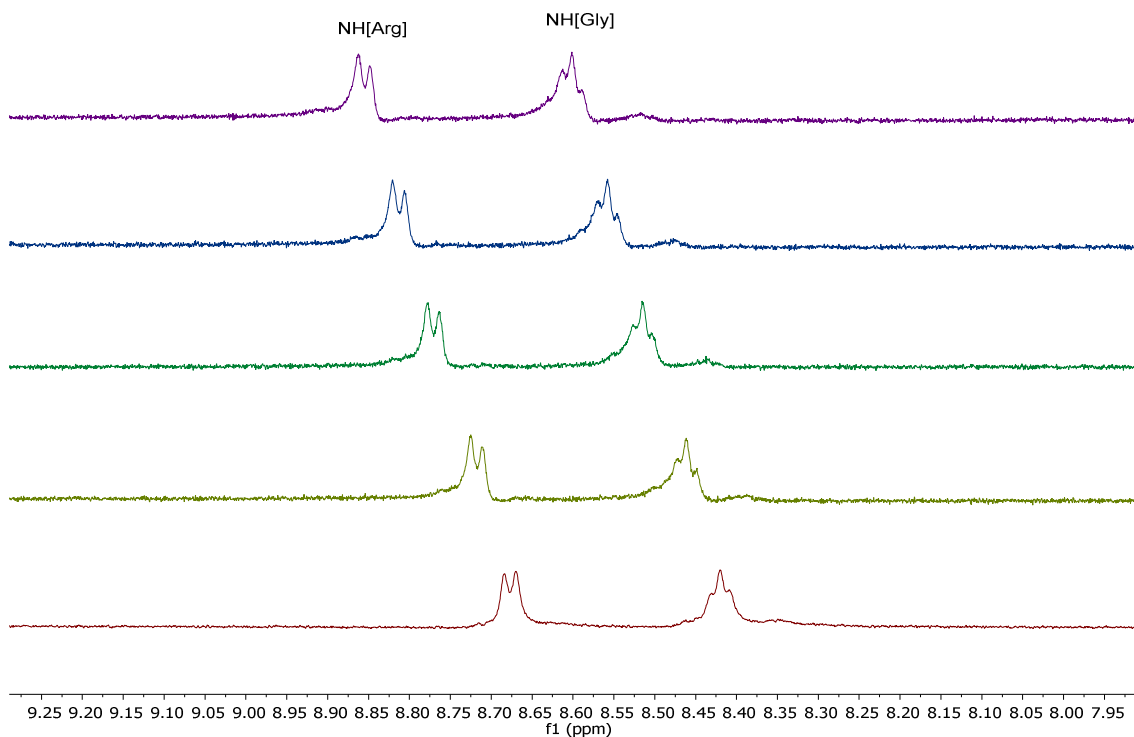


Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Arg]	8.652	8.596	8.553	8.494	8.441	d 8.4	-10.48

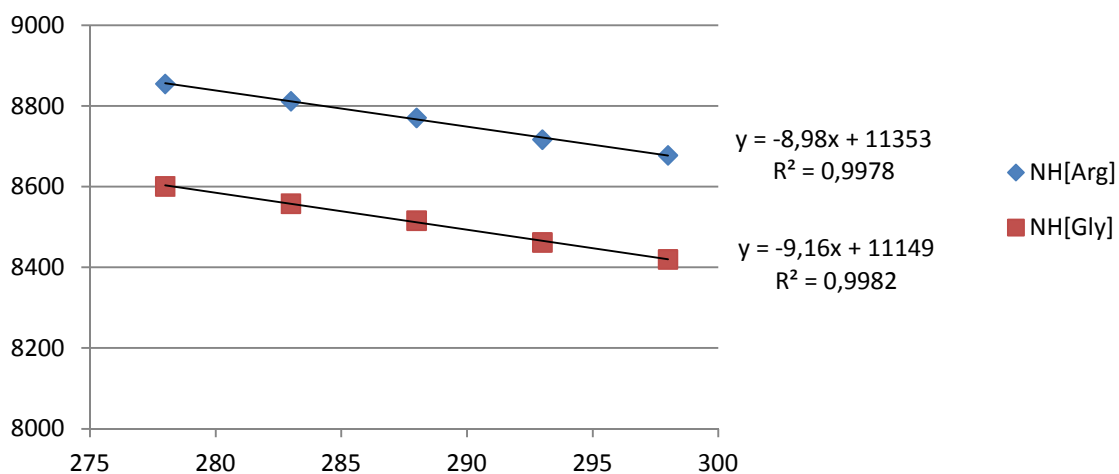


**Figura 206.** Deriva térmica del compuesto **21**.

## Anexo



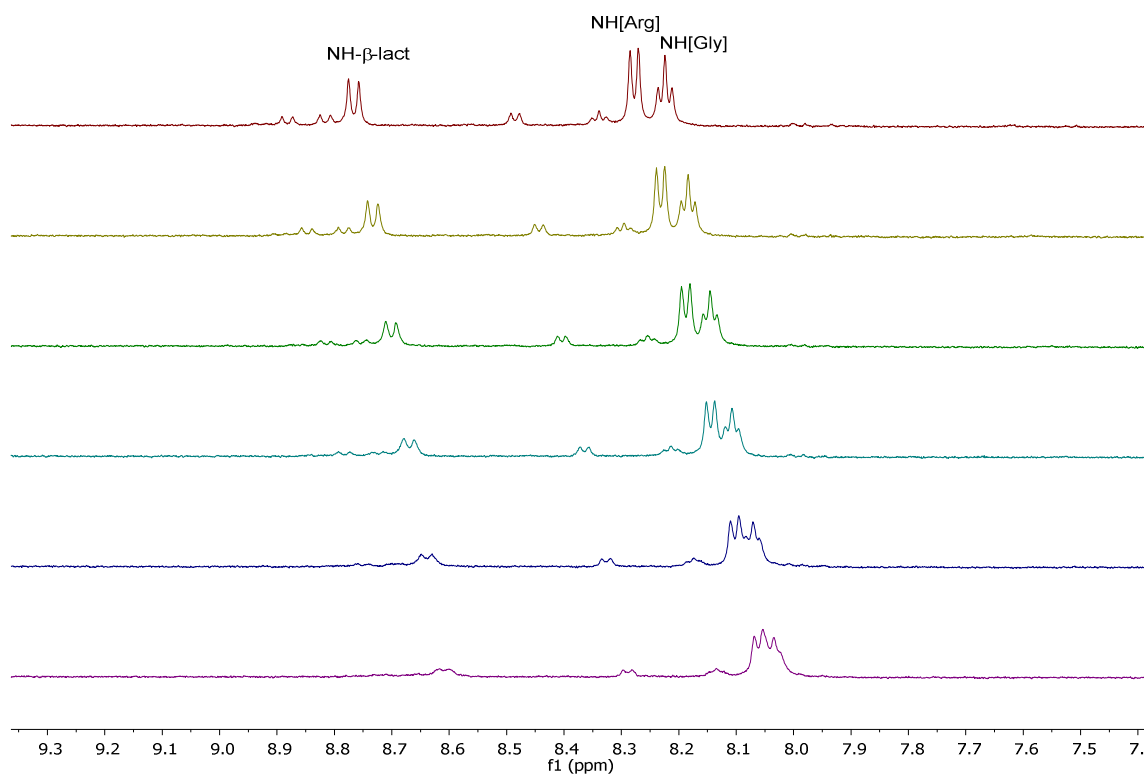
Amida	Desplazamiento químico (ppm)					Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K		
NH[Arg]	8.855	8.812	8.771	8.717	8.678	d 7.6	-8.98
NH[Gly]	8.601	8.558	8.516	8.462	8.420	t 6.3	-9.16



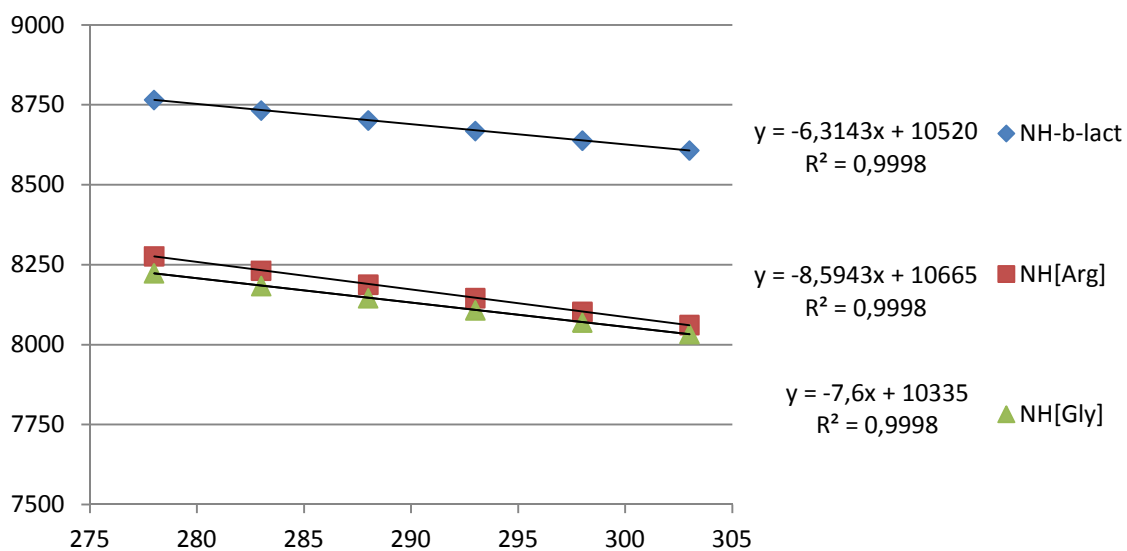
**Figura 207.** Deriva térmica del compuesto **24**.



## Anexos



Amida	Desplazamiento químico (ppm)						Cnt acoplamiento (Hz)	Coeficiente térmico (ppb/K)
	278K	283K	288K	293K	298K	303K		
NH-β-lact	8.766	8.733	8.702	8.669	8.639	8.608	d 8.9	-6.31
NH[Arg]	8.277	8.232	8.288	8.146	8.103	8.062	d 7.2	-8.59
NH[Gly]	8.224	8.284	8.146	8.108	8.070	8.034	t 6.2	-7.60



**Figura 208.** Deriva térmica del compuesto 25.

### 8.5.3. Distribución de *clusters* del *docking* en compuestos de cadena abierta

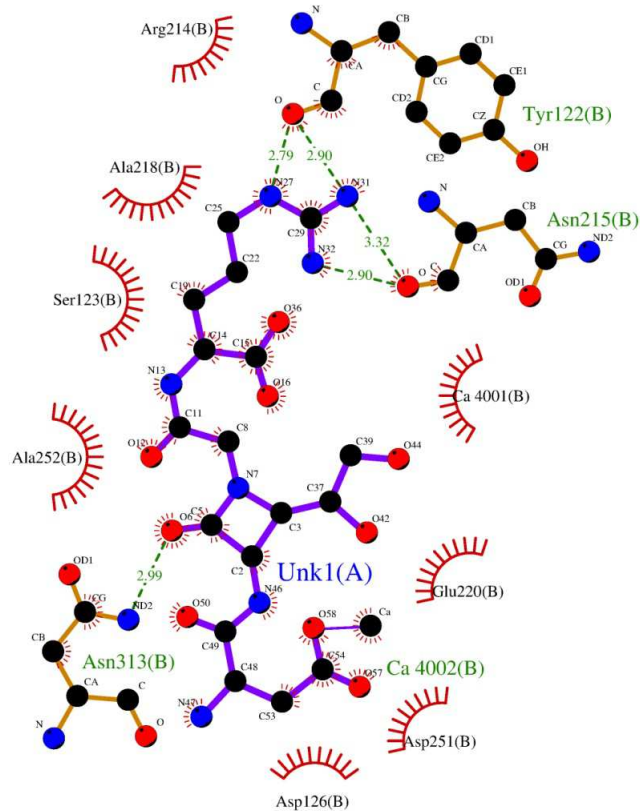
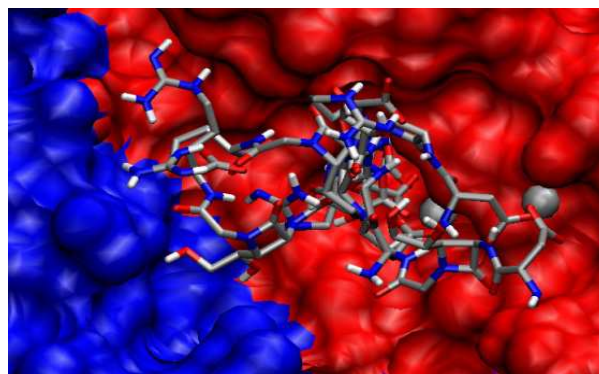
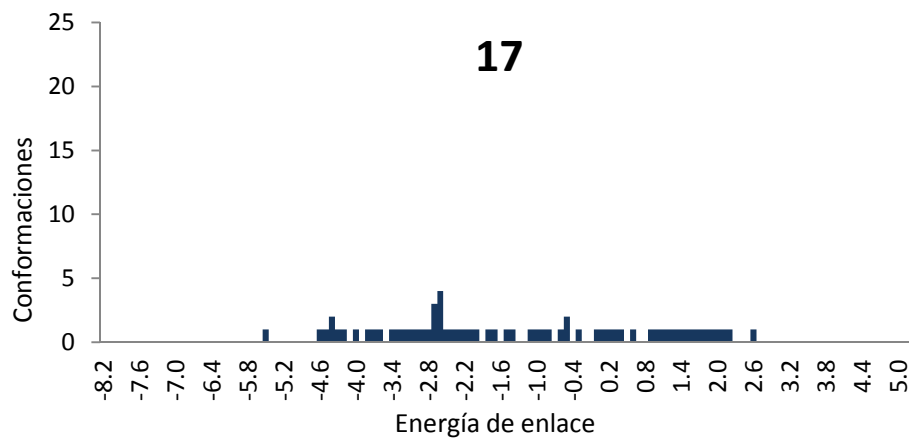


Figura 209. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 17.  
518

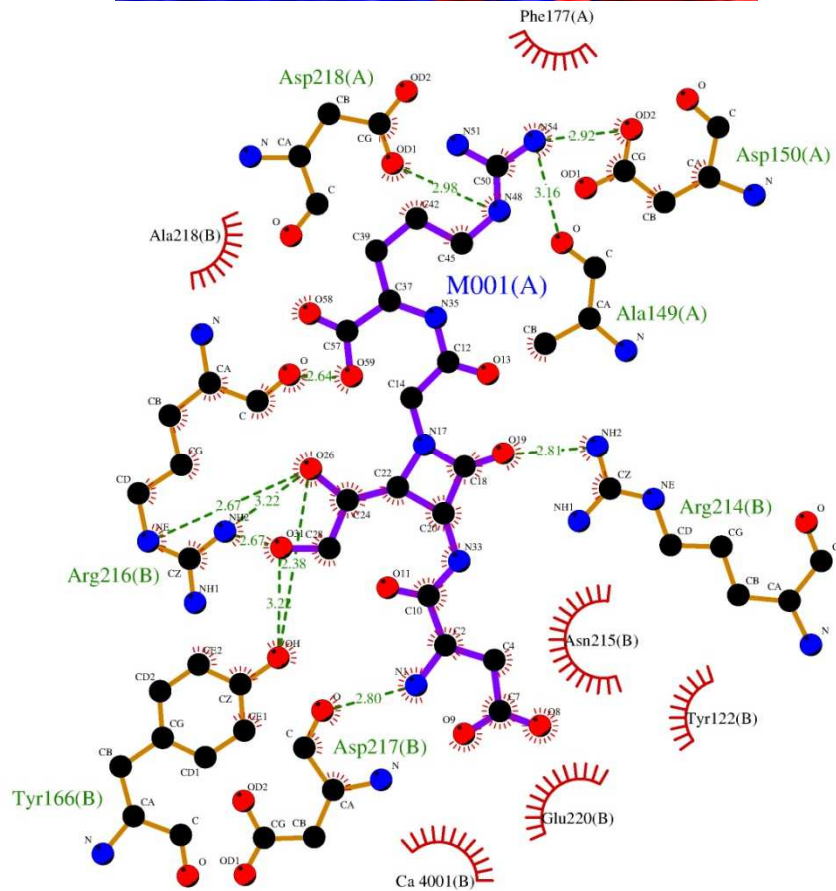
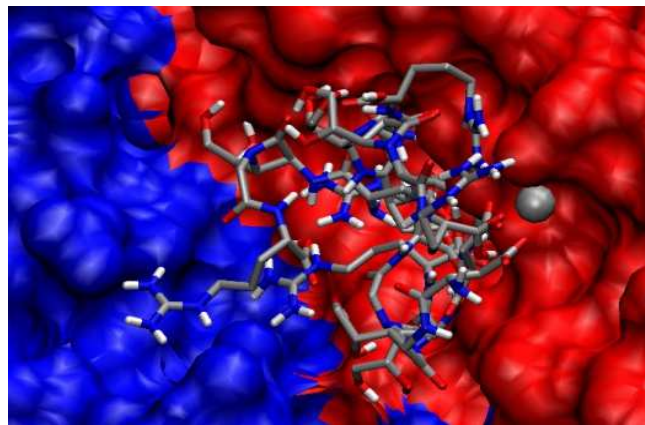
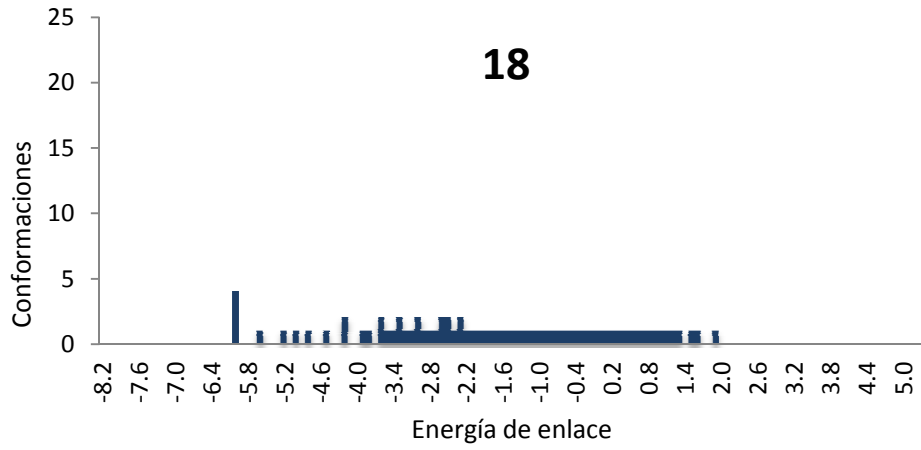


Figura 210. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 18.

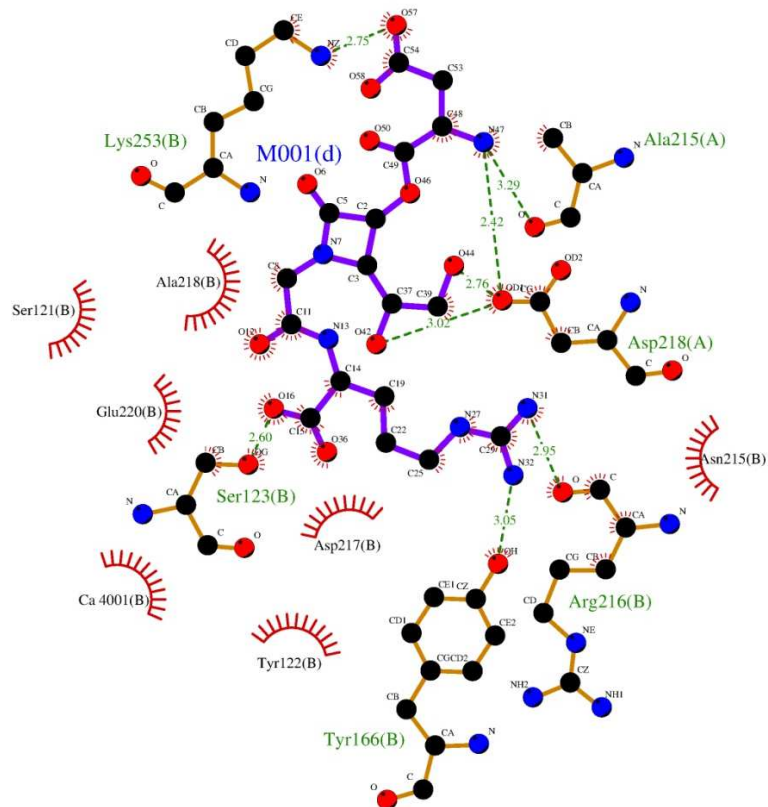
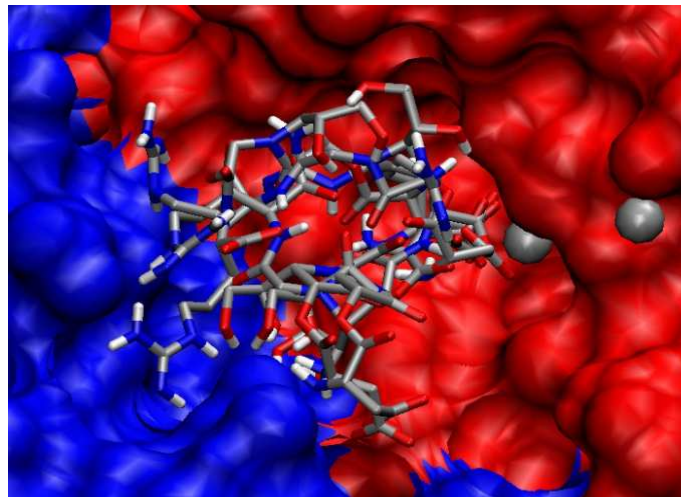
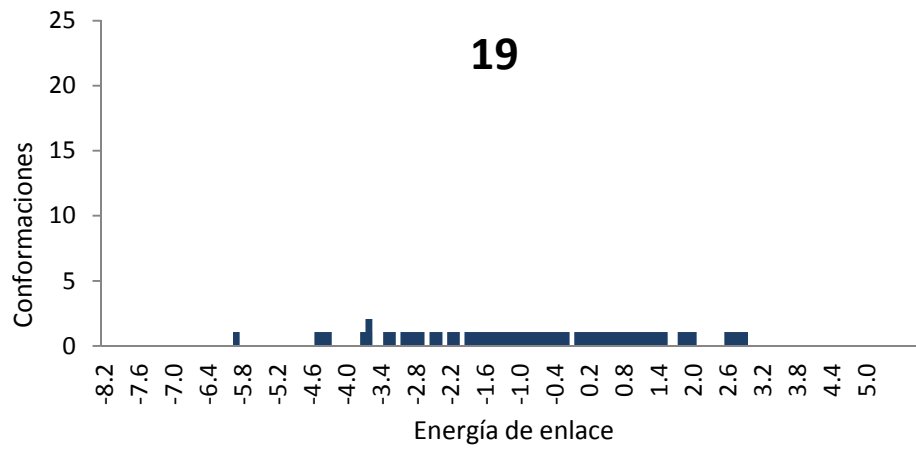


Figura 211. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 19.

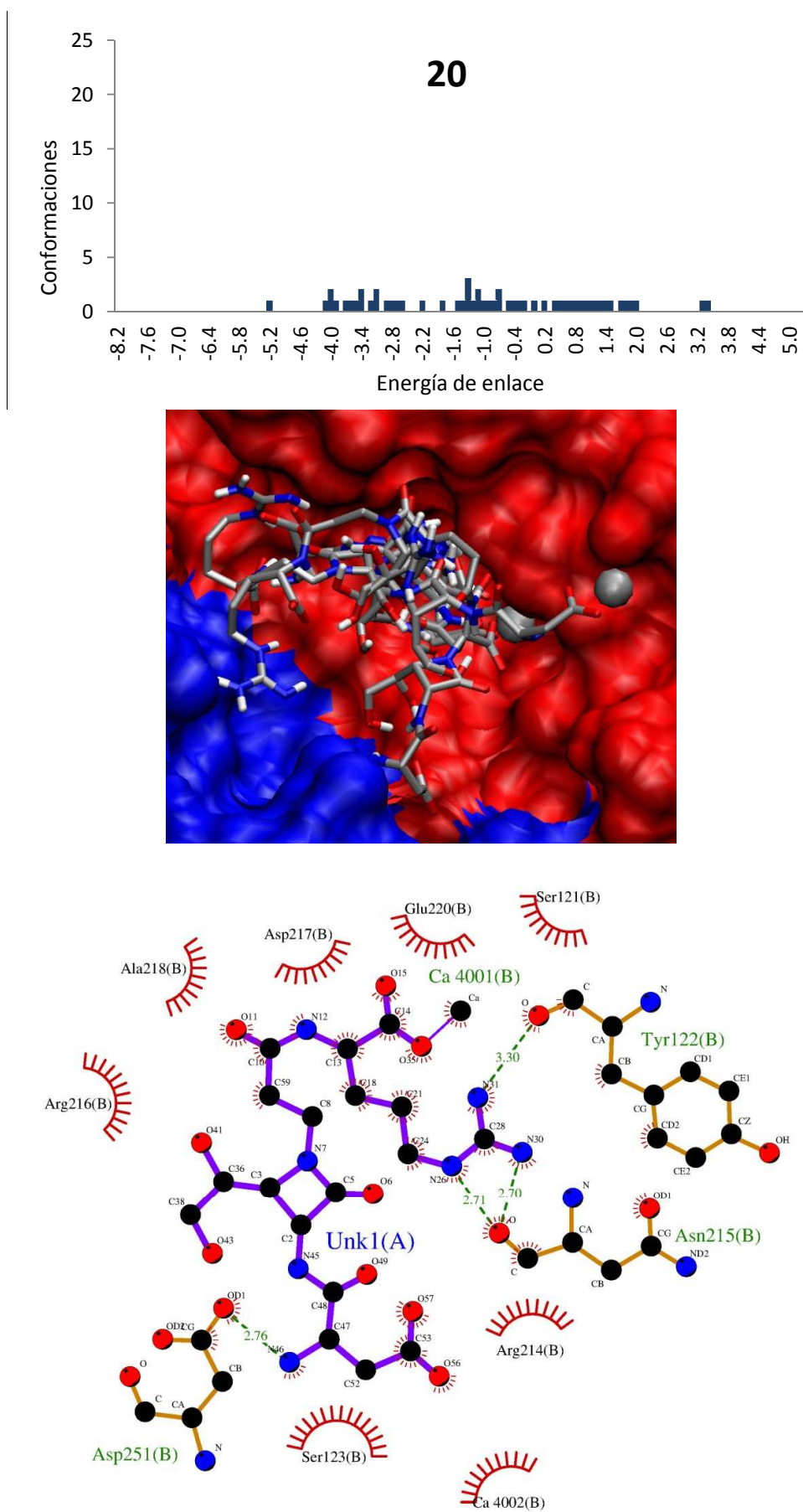


Figura 212. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 20.

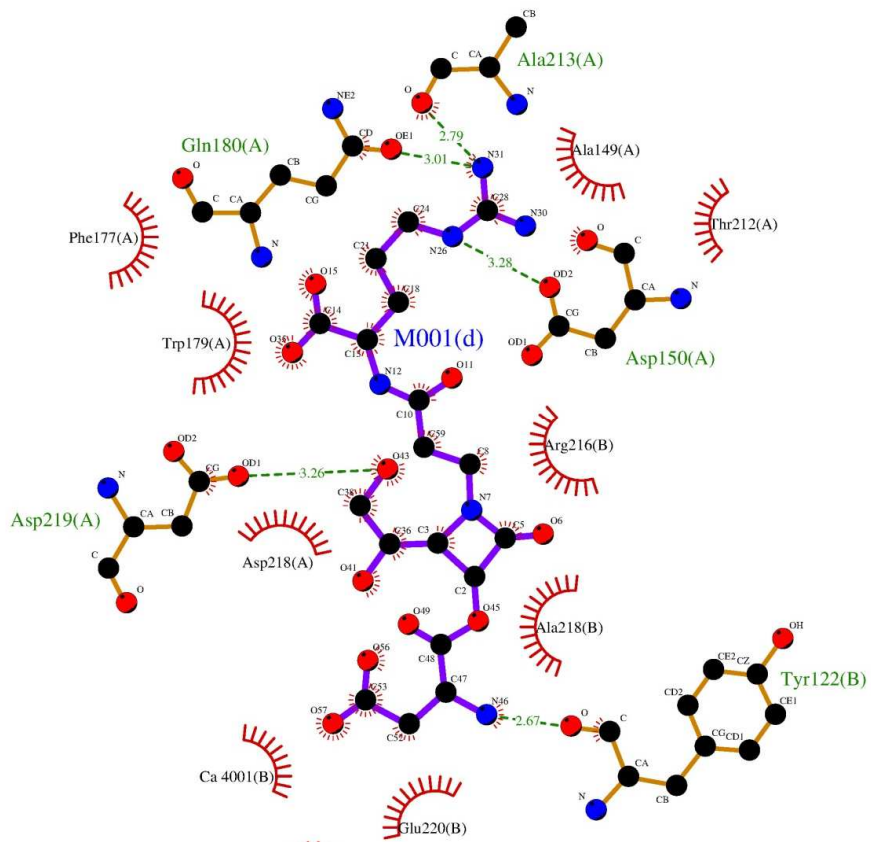
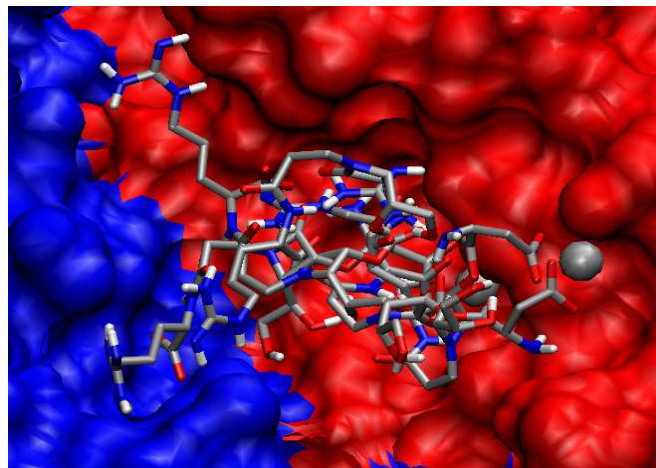
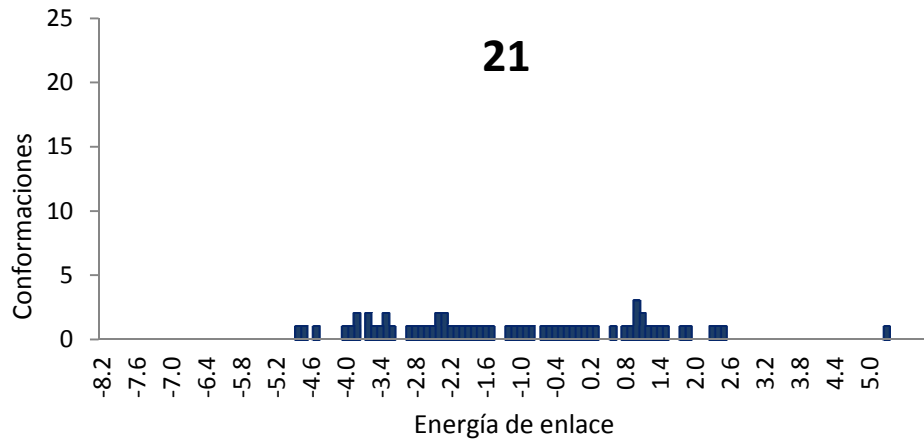


Figura 213. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 21.



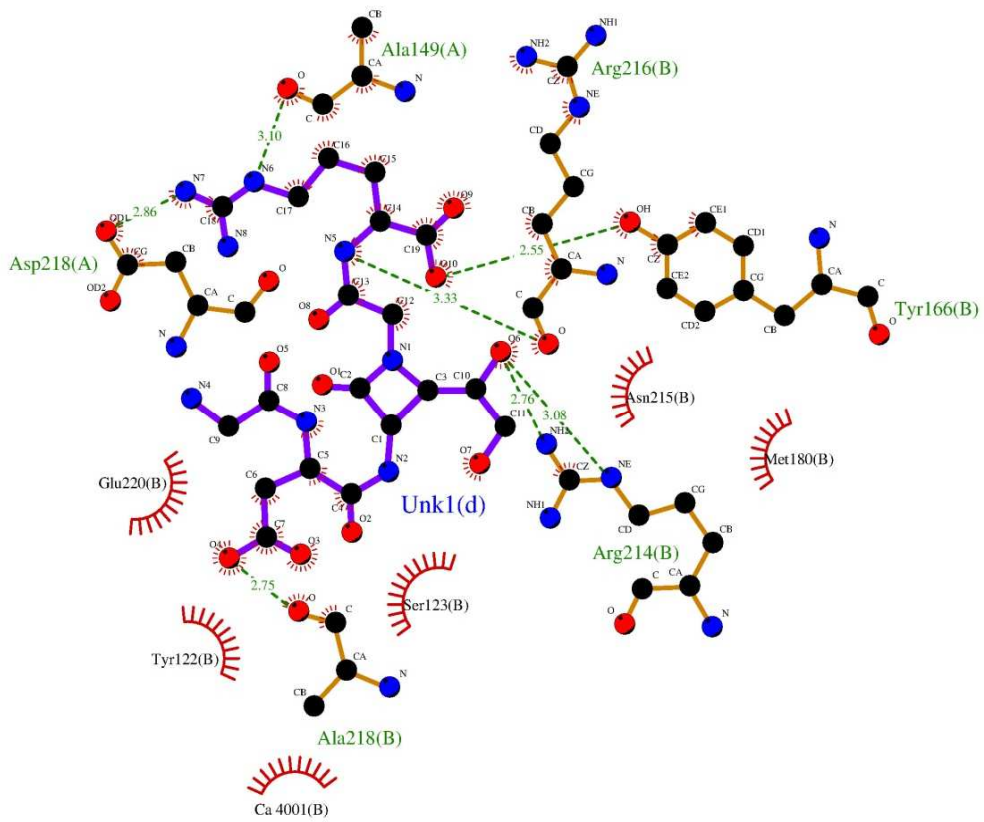
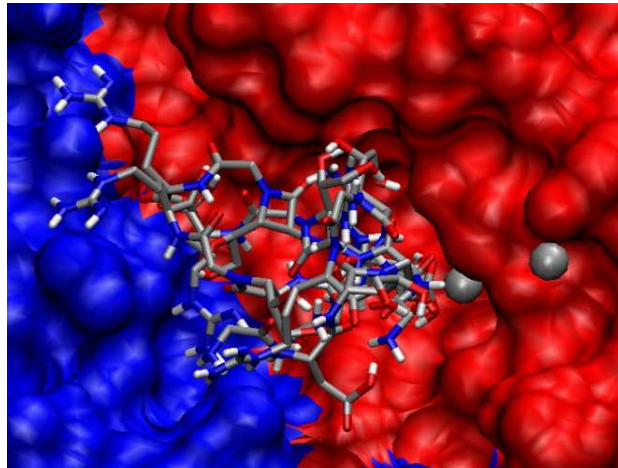
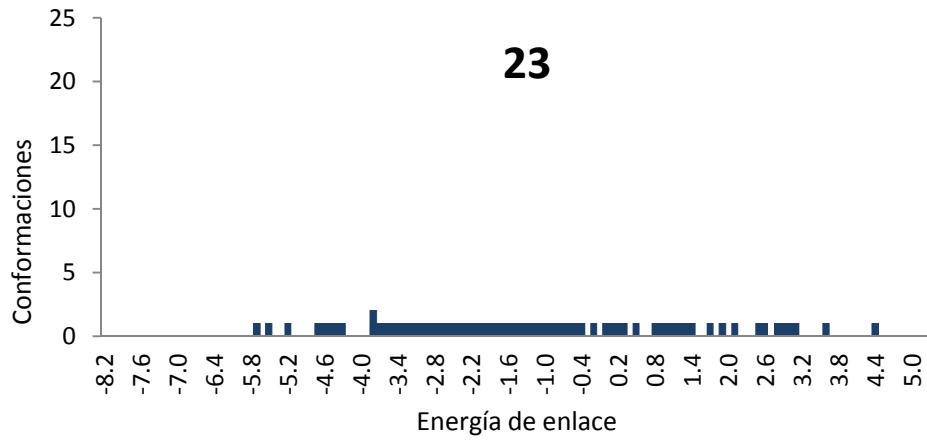


Figura 215. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 23.



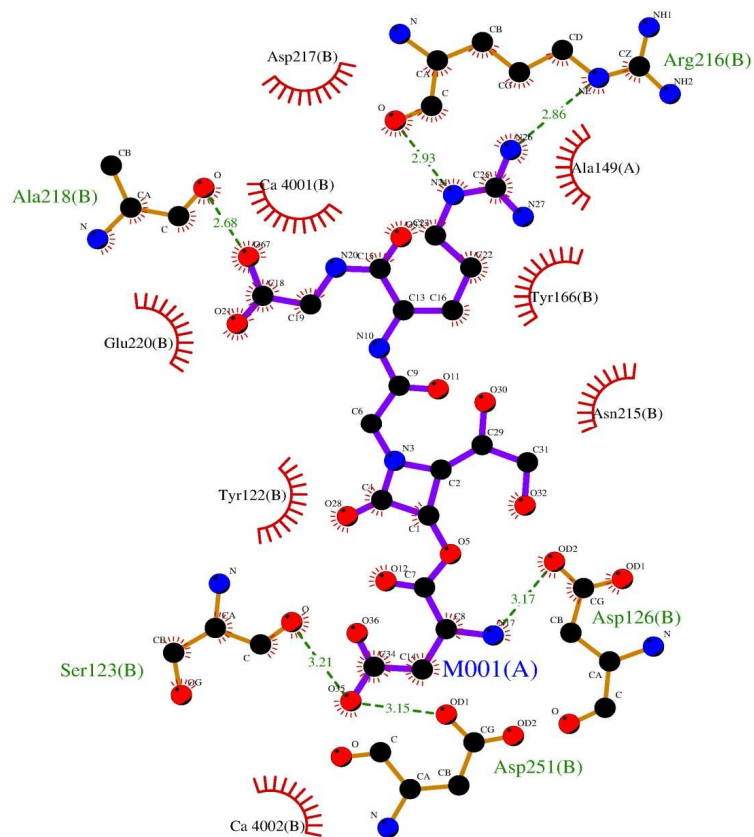
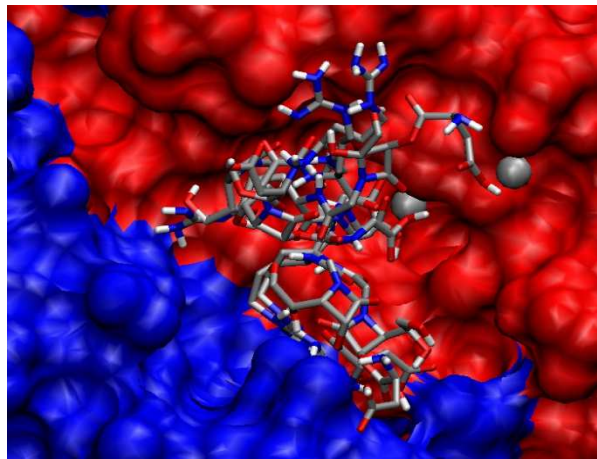
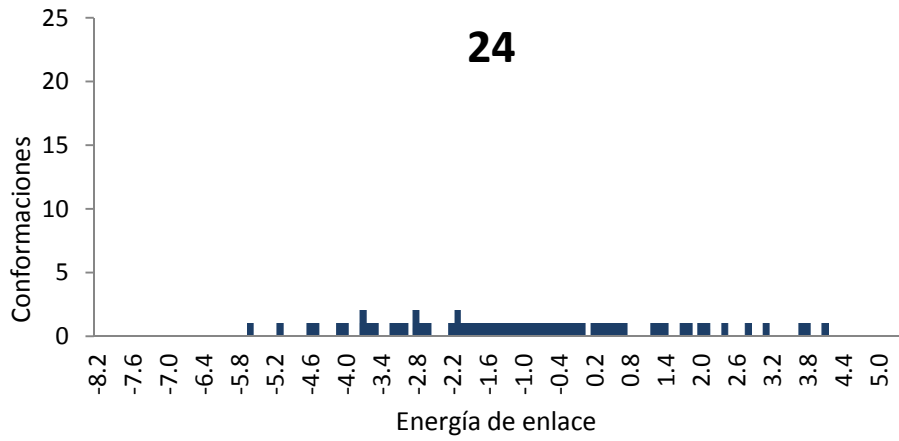


Figura 216. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 24.

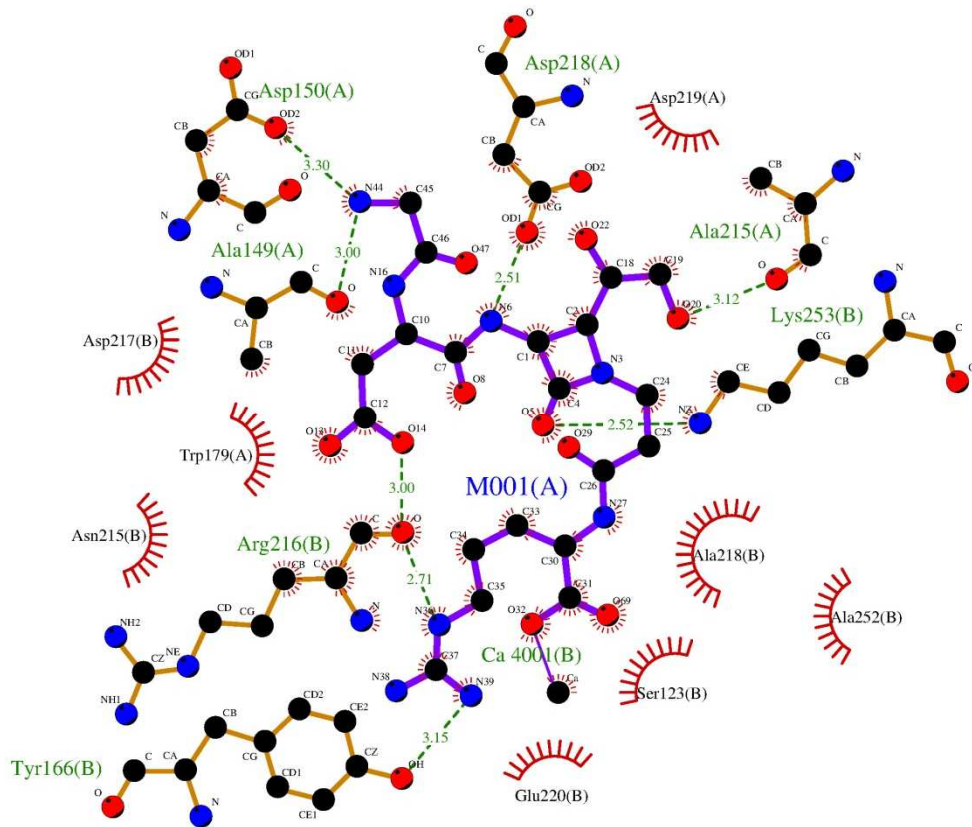
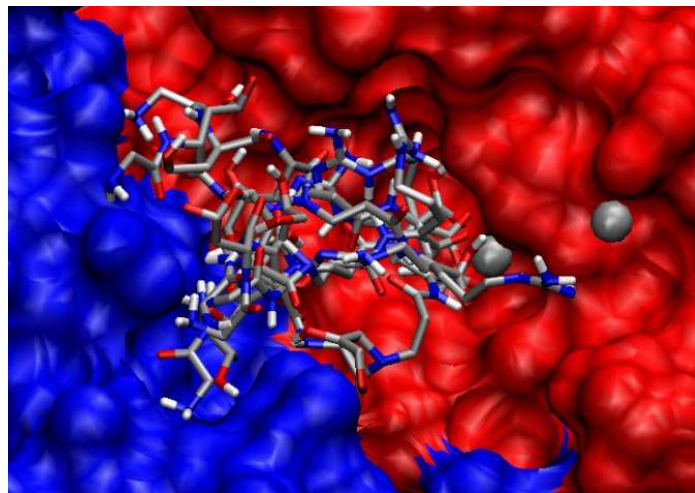
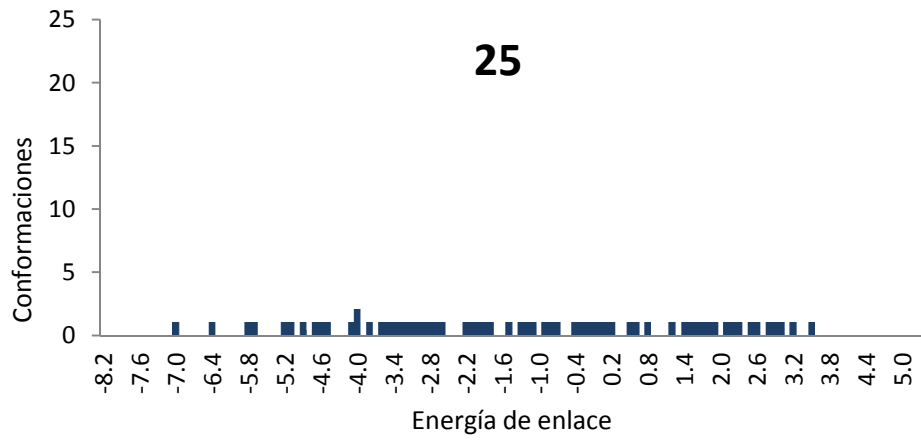
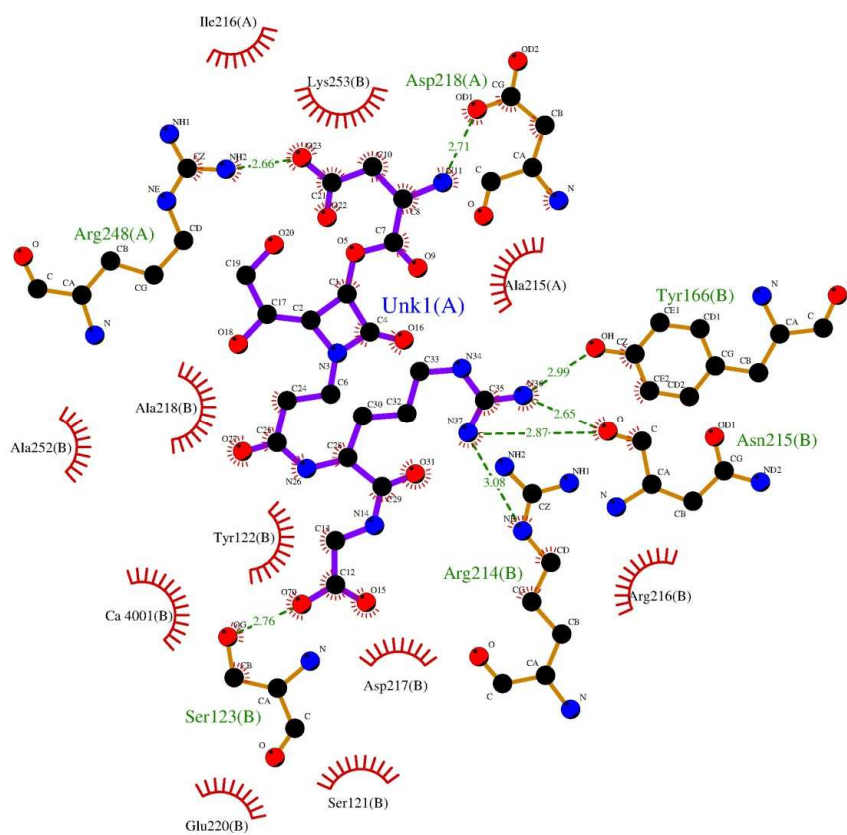
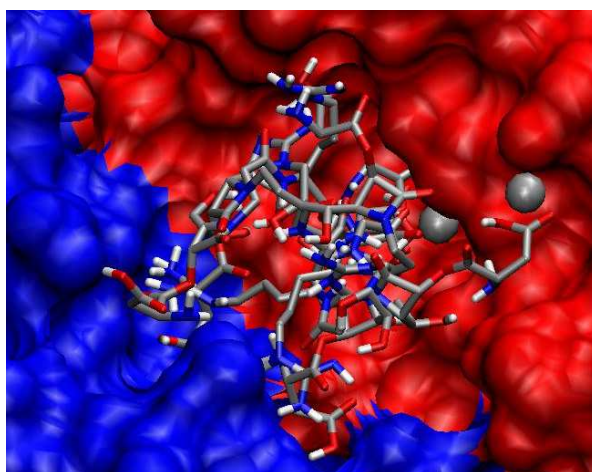
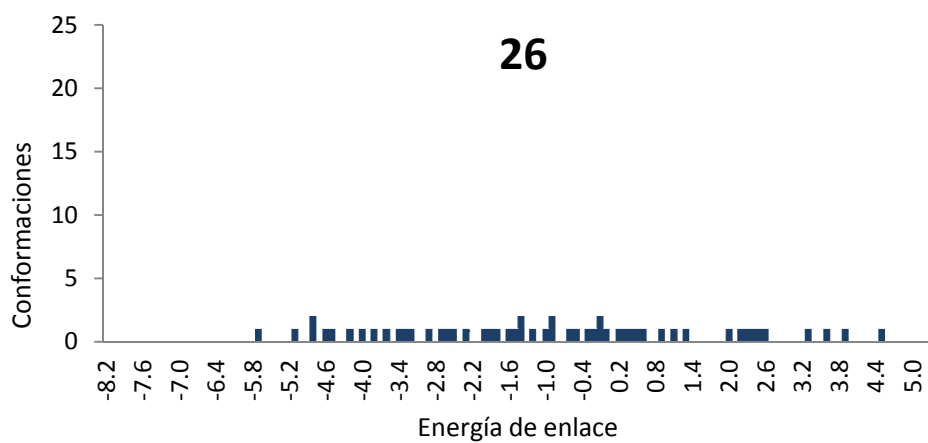


Figura 217. Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 25.



**Figura 218.** Distribución de *clusters*, *docking* e interacción ligando-receptor del compuesto 26.