

# **DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CICLOPÉPTIDOS $\beta$ -LACTÁMICOS DE TIPO RGD**

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

**Joseba Oyarbide Vicuña, 2010**



**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS  
PARA SU PRESENTACION**

Dr. JESÚS MARÍA AIZPURUA IPARRAGUIRRE con N.I.F. 15941826-C como Director/a de la Tesis Doctoral: DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CICLOPÉPTIDOS  $\beta$ -LACTÁMICOS DE TIPO RGD realizada en el Departamento QUIMICA ORGANICA I por el Doctorando Don JOSEBA OYARBIDE VICUÑA, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

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



**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS  
PARA SU PRESENTACION**

Dr. CLAUDIO PALOMO NICOLAU con N.I.F. 37655199-J como Director/a de la Tesis Doctoral:  
DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CICLOPÉPTIDOS  $\beta$ -LACTÁMICOS  
DE TIPO RGD realizada en el Departamento QUIMICA ORGANICA I por el Doctorando Don  
JOSEBA OYARBIDE VICUÑA, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que  
reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

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



**CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO**

El Consejo del Departamento de QUÍMICA ORGÁNICA I en reunión celebrada el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010 ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada: DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CICLOPÉPTIDOS  $\beta$ -LACTÁMICOS DE TIPO RGD dirigida por los Drs. JESÚS M<sup>a</sup> AIZPURUA y CLAUDIO PALOMO y presentada por Don JOSEBA OYARBIDE VICUÑA ante este Departamento.

En            a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010

Vº Bº DIRECTOR/A DEL  
DEPARTAMENTO

SECRETARIO/A DEL  
DEPARTAMENTO

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

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





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

DOCTORANDO DON JOSEBA OYARBIDE VICUÑA

TITULO DE LA TESIS: DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CICLOPÉPTIDOS  $\beta$ -LACTÁMICOS DE TIPO RGD

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

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

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

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

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

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

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: \_\_



## **Agradecimientos**

Primero quiero agradecer a mis directores de tesis Jesús María Aizpurua y Claudio Palomo por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el departamento de Química Orgánica I de la Universidad del País Vasco en Donostia. Y en especial quiero dar gracias al profesor Jesús María Aizpurua y al Dr. J. I. Miranda por la dedicación y constancia que han tenido conmigo en todo momento.

También agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la beca predoctoral que ha hecho posible este trabajo y a la UPV-EHU por las becas de colaboración que me ha brindado.

A parte, a lo largo de estos años de trabajo de laboratorio he tenido el placer de conocer a un gran grupo de personas (amigos y compañeros de fatigas) de los que he aprendido mucho y de los que guardaré un grato recuerdo. Muchas gracias a todos.

Para terminar agradecer la ayuda desinteresada de mis padres y de Guada, sin ellos esto no habría sido posible.

Joseba Oyarbide, 2010.



**Abreviaturas y acrónimos**

Aib	Ácido $\alpha$ -amino isobutírico
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asp (D)	Ácido Aspártico
aq	Disolución acuosa
$\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactama	(S) 3-amino-3-bencilazetidín-2-ona
$\beta$ -LSAD	$\beta$ -Lactam Scaffold-Assisted Design
CAN	Nitrato de Cerio(IV) y amonio
cat.	Catalizador
COSY	CORrelation SpectroscopY
CuAAC	Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
$\delta$	Desplazamiento químico en ppm
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2+2+2]octano
$\Delta\delta/\Delta T$	Variación del desplazamiento químico frente a la variación de la temperatura
DIPA	Diisopropilamina
DM	Dinámica Molecular
DPPA	Fosforazidato de difenilo
EDC	Clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida
EEDQ	2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonilo
Gly (G)	Glicina
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio
HMPA	Hexametilfosforotriamida
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxi-1H-benzotriazol
HOBt	1-Hidroxi-1H-benzotriazol
HPLC-MS	Cromatografía fase líquida a alta presión – Espectrometría de Masas
HUVEC	Células endotelicas de vena umbilical humana (Human umbilical vein endothelial cells)

IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria al 50%
J (Hz)	Constante de acoplamiento en hercios
K	Grados Kelvin
LHMDS	Bis(trimetil)sililamido de litio
MIDAS	Metal-ion-dependent adhesion site
NMM	N-metilmorfolina
NOE	Efecto Nuclear de Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
Ns-	Nitrobenzensulfonilo
Orn	Ornitina
Ox	4,5-(S,S)-Difenil-1,3-oxazolidin-2-ona
Pbf-	2,2,4,6,7-Pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
Pro (P)	Prolina
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (Angioplastia percutánea transluminal coronaria)
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía de capa fina
HUVEC	Células endotélicas de vena umbilical humana (Human umbilical vein endothelial cells)
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria al 50%
J (Hz)	Constante de acoplamiento en hercios
K	Grados Kelvin
LHMDS	Bis(trimetil)sililamido de litio
MIDAS	Metal-ion-dependent adhesion site

**Publicaciones:****1- "Synthesis of  $\beta$ -Lactam Scaffolds for Ditopic Peptidomimetics"**

Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua, Eva Balentová, Azucena Jiménez, Joseba Oyarbide, Raluca M. Fratila, and José Ignacio Miranda.

*Organic Letters*, **2007**, 9 (1), 101-104.





# ÍNDICE

<i>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</i>	i
<i>PUBLICACIONES</i>	iii
<i>ÍNDICE</i>	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Péptidos y peptidomiméticos	1
1.1.1. Giros $\beta$ y giros $\gamma$	2
1.1.2. Péptidos y peptidomiméticos cíclicos	6
1.2. Propiedades conformacionales de los péptidos y peptidomiméticos cíclicos	9
1.3. Peptidomiméticos cíclicos de tipo RGD	14
1.3.1. Antecedentes generales	14
1.3.2. Peptidomiméticos $\beta$ -lactámicos cíclicos	16
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
2.1. HIPÓTESIS	23
2.1.1. Las $\beta$ -lactamas como elementos de restricción conformacional en ciclopentapéptidos RGD	23
2.1.2. Control de enlaces de hidrógeno en peptidomiméticos cíclicos de tipo RGD	24
2.2. OBJETIVOS	27
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1. Síntesis y análisis conformacional de los ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos <b>1</b> , del tipo <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly <sub>4</sub> ] y <b>2</b> , del tipo <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala <sub>3</sub> ]	33
3.1.1. Plan de síntesis	33
3.1.2. Síntesis de moldes $\beta$ -lactámicos	36
3.1.2.1. Síntesis de $\alpha$ -amino- $\alpha$ -bencil-N-[(metoxicarbonil)metil]- $\beta$ -lactamas a partir de N-[bis(trimetilsilil)metil]- $\beta$ -lactamas	37

3.1.2.2. Síntesis de $\alpha$ -amino- $\alpha$ -bencil-N-[(metoxicarbonil)metil]- $\beta$ -lactamas a partir de N-nosil-aziridinas	38
3.1.3. Síntesis de pseudopéptidos lineales precursores de ciclopentapéptidos $\beta$ -lactámicos	39
3.1.3.1. Cbz-Gly- $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly <sub>3</sub> -OBn <b>8</b>	39
3.1.3.2. Cbz-Ala- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala <sub>2</sub> -OBn <b>9</b>	42
3.1.3.3. Desprotección de los pseudopéptido $\beta$ -lactámicos lineales y su ciclación	45
3.1.4. Análisis conformacional de los ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly <sub>4</sub> ] <b>1</b> y <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala <sub>3</sub> ] <b>2</b>	47
3.1.4.1. Análisis conformacional de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly <sub>4</sub> ] <b>1</b>	49
3.1.4.2. Análisis conformacional de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala <sub>3</sub> ] <b>2</b>	58
3.2. Síntesis de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD	66
3.2.1. Síntesis de los peptidomiméticos <b>3</b> , del tipo <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg-Gly-Asp]	67
3.2.2. Síntesis de peptidomiméticos <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg-Gly-Asp] <b>4a-c</b>	76
3.2.3. Síntesis del mimético tetrapeptídico <b>5</b> , del tipo <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Asp]	88
3.2.4. Modificación de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD mediante cicloadición alquino-azida	91
3.2.4.1. Síntesis del ciclopéptido propargílico <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg-Gly-Asp] <b>6</b>	95
3.2.4.2. Modificación “clic” del compuesto propargílico <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam-Aib-Arg-Gly-Asp] <b>6</b>	98
3.3. Análisis conformacional de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD	101
3.4. Estudios de inhibición de adhesión de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD	115
3.5. Conclusiones	119

<b>4.</b>	<b>PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES Y DATOS DE CARACTERIZACIÓN</b>	
4.1.	Nomenclatura	123
4.2.	Técnicas generales	123
4.3.	Síntesis de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos conteniendo residuos de glicina y alanina	124
4.3.1.	Síntesis del ciclopentapéptido <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-(Gly) <sub>4</sub> ] <b>1</b>	124
4.3.1.1.	Síntesis de Cbz-Gly-[ $\beta$ -Lactam(Bn)]-Gly-OMe <b>25</b>	125
4.3.1.2.	Síntesis de Cbz-Gly-[ $\beta$ -Lactam(Bn)]-(Gly) <sub>3</sub> -OBn <b>8</b>	125
4.3.1.3.	Desprotección y ciclación: <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-(Gly) <sub>4</sub> ] <b>1</b>	126
4.3.1.4.	Procedimiento de la síntesis del precursor H-Gly-Gly-OBn <b>14</b>	127
4.3.2.	Síntesis del ciclopentapéptido <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala) <sub>3</sub> ] <b>2</b>	132
4.3.2.1.	Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala) <sub>2</sub> -OBn <b>29</b>	132
4.3.2.2.	Síntesis de Cbz-Ala- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala) <sub>2</sub> -OBn <b>9</b>	133
4.3.2.3.	Síntesis de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala) <sub>3</sub> ] <b>2</b>	134
4.3.3.	Preparación del tosilato del precursor C-prottegido H-Ala-Ala-OBn <b>15</b>	134
4.3.4.	Síntesis del precursor H <sub>2</sub> N-Aib-OMe <b>19</b> a partir del ácido $\alpha$ -aminoisobutírico	136
4.4.	Síntesis de ciclopeptidomiméticos de tipo RGD a partir de $\beta$ -lactamas $\alpha$ -sustituídas	140
4.4.1.	Compuestos <i>ciclo</i> -[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam(R)-Gly] <b>3a-b</b>	140
4.4.1.1.	Procedimiento general para la síntesis de ácidos Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-OH <b>33a-b</b>	140
4.4.1.2.	Procedimiento general para la síntesis de Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn <b>42a-b</b>	144
4.4.1.3.	Procedimiento general para la síntesis de Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn <b>31a-b</b>	147
4.4.1.4.	Síntesis de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] <b>44a-b</b>	150
4.4.1.5.	Procedimiento general para la síntesis de los trifluoroacetatos de <i>ciclo</i> -[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam(R)-Gly] <b>3a-b</b>	153

4.5.	Síntesis de ciclopeptidomiméticos de tipo RGD a partir de $\beta$ -lactamas $\alpha$ , $\alpha'$ -polisustituidas	156
4.5.1.	Compuestos <i>ciclo</i> -[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa] <b>4a-c</b>	156
4.5.1.1.	Procedimiento general para la síntesis de Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn <b>49a-c</b>	157
4.5.1.2.	Procedimiento general para la preparación de <b>45a-c</b> por acoplamiento peptídico de H- $\beta$ -lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn <b>49a-c</b> con el ácido Cbz-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH	161
4.5.1.3.	Síntesis de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O <sup>t</sup> Bu)] <b>47a-c</b>	165
4.5.1.4.	Preparación de los ciclopéptidos <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg-Gly-Asp] <b>4a-c</b>	169
4.5.2.	Síntesis del tetrapéptido cíclico <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam (Bn)-Aib-Arg-Asp] <b>5</b>	173
4.5.2.1.	Procedimiento general	173
4.6.	Síntesis de ciclopeptidomiméticos RGD a partir de $\alpha$ -propargil- $\beta$ -lactamas	178
4.6.1.	Síntesis de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg-Gly-Asp] <b>6</b>	178
4.6.1.1.	$\alpha$ -Propargil $\beta$ -lactama <b>57</b> a partir de la $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama <b>60</b>	178
4.6.1.2.	Preparación de H-Arg(Pbf)-Gly-OFm <b>67</b>	181
4.6.1.3.	Procedimiento para el acoplamiento peptídico de Ns- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-OH <b>58</b> con H-Arg(Pbf)-Gly-OFm <b>67</b>	183
4.6.1.4.	Procedimiento para el acoplamiento peptídico de Fmoc-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH y la amina H- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm <b>66</b>	186
4.6.1.5.	Síntesis de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O <sup>t</sup> Bu)] <b>6</b>	188
4.6.1.6.	Procedimiento general para la preparación de 1,2,3-triazoles 1,4 disustituídos <b>71a-b</b>	190
4.6.1.7.	Procedimiento general de la síntesis de las sales trifluoroacéticas de <i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(1-alkil-1,2,3-triazol-4-il-metil)-Aib-Arg-Gly-Asp] <b>7a-b</b>	194
<b>5.</b>	<b>ANEXOS</b>	
5.1.	Espectros <sup>1</sup> H-RMN y <sup>13</sup> C-RMN	199

---

5.2.	Asignación ciclos <b>4a-c</b> y <b>5</b> y espectros bidimensionales: ROESY/NOESY	240
5.2.1.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-RGD] <b>4a</b>	240
5.2.2.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-( <i>D</i> )-Ala-RGD] <b>4b</b>	240
5.2.3.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-( <i>D</i> )-Aib-RGD] <b>4c</b>	242
5.2.4.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-RD] <b>5</b>	244
5.3.	Derivas térmicas ciclos <b>4a-c</b> y <b>5</b>	246
5.3.1.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-RGD] <b>4a</b>	246
5.3.2.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-( <i>D</i> )-Ala-RGD] <b>4b</b>	248
5.3.3.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-RGD] <b>4c</b>	250
5.3.4.	<i>ciclo</i> -[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-RD] <b>5</b>	251
6.	Publicaciones	255



# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.1. Péptidos y peptidomiméticos

Los péptidos son cadenas de hasta varias decenas de aminoácidos unidos por enlaces amídicos. Tienen múltiples funciones biológicas ya que pueden actuar como neuromoduladores, hormonas, etc<sup>1</sup>.... Además, muchas interacciones péptido-proteína están involucradas en el desencadenamiento de procesos patológicos<sup>2</sup>.

Las propiedades biológicas de los péptidos vienen determinadas por su estructura primaria, es decir, por la diferente secuencia de aminoácidos que los componen y cuyas cadenas laterales son las responsables del reconocimiento con receptores. Sin embargo, la eficiencia de la interacción péptido/receptor depende sobre todo de la disposición espacial que adopta el péptido en su conjunto o en parte de su cadena, que es lo que se denomina estructura secundaria o conformación. La conformación depende a su vez de diversos factores, tales como el entorno de la molécula, las diferentes interacciones estéricas y electrostáticas entre los sustituyentes de las cadenas laterales, la configuración absoluta de cada residuo y de la formación de enlaces de hidrógeno interresiduales.

La interacción de los péptidos con receptores relacionados con diferentes patologías y funciones vitales hace que sean muy interesantes en el campo de la investigación farmacéutica. Hoy en día, se conoce la secuencia y conformación bioactiva de cientos de péptidos naturales. Sin embargo, su utilización como agentes terapéuticos no es viable debido a su baja estabilidad metabólica y a su rápida eliminación por el hígado y los riñones. Además, habitualmente presentan una excesiva flexibilidad conformacional que disminuye su selectividad frente a un solo receptor, aumentando los efectos secundarios no deseados<sup>3</sup>. Una forma de superar estos problemas consiste en el empleo de peptidomiméticos<sup>4</sup>.

Los peptidomiméticos son sustancias que presentan sustituyentes de naturaleza y disposición espacial análogos al del péptido natural al que imitan, lo cual les permite desplazar a éste de receptores o enzimas. Como resultado de esta capacidad, los

<sup>1</sup> (a) Dicou, E. *FEBS J.* **2008**, 275, 1960-1975. (b) Müller, G.; Hessler, G.; Decornez, Y. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 894-896. (c) Serrano, L., *Adv. Protein Chem.* **2000**, 53, 4885. (d) Schneider, J. P.; Kelly, J. W. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2169-2187.

<sup>2</sup> (a) Gubernator, K.; Böhm, H. J. *Structure-Based Ligand Design*, Wiley-VCH, Weinheim 1998. (b) Veerapandian, P. *Structure-Based Design*, Dekker, New York 1997. (c) Babine, R. E.; Bender, S. L. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359-1472. (d) Beddell, C. R. *The Design of Drugs to Macromolecular Targets*, Wiley, Chichester 1992. (e) Veerapandian, P. *Structure-Based Design*, Dekker, New York 1997.

<sup>3</sup> Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1244-1267.

<sup>4</sup> Compuesto que puede imitar o bloquear el efecto biológico de un péptido frente a un receptor.

efectos del péptido original pueden ser reducidos (antagonista/inhibidor) o por el contrario multiplicados (agonista)<sup>5</sup>. Durante las dos últimas décadas, los peptidomiméticos han ido adquiriendo cada vez mayor protagonismo en el diseño de fármacos ya que permiten solucionar los problemas metabólicos y de selectividad que presentan los péptidos naturales. De hecho, los peptidomiméticos se preparan generalmente manteniendo la secuencia del péptido natural, alterando mínimamente su entorno a través de aminoácidos o enlaces amídicos modificados (pseudopéptidos) o introduciendo otro tipo de enlaces no amídicos, como por ejemplo, un enlace éster (depsipéptidos), o heterociclos como lactamas o espirolactamas de diversos tamaños. Incluso pueden llegar a carecer de cualquier estructura peptídica. Todo ello, les otorga una mayor resistencia metabólica, ya que los peptidomiméticos no son reconocidos por las proteasas. Además, la modificación introducida tiende a reducir la libertad conformacional respecto del péptido natural del que derivan, lo que puede aumentar su selectividad. Finalmente, estos compuestos son también interesantes porque proporcionan información acerca de la conformación bioactiva tanto del péptido natural (ligando) como de su receptor<sup>6</sup>.

### 1.1.1. Giros $\beta$ y giros $\gamma$

Muchos péptidos biológicamente activos presentan dos tipos de conformaciones denominadas giros  $\beta$  y giros  $\gamma$ <sup>7</sup>. Estas estructuras secundarias reciben el nombre de giros porque provocan un cambio de dirección en la cadena peptídica. También aparecen en las proteínas en puntos de cambio conformacional y durante el plegamiento. Constan de unos pocos aminoácidos y entre los dos giros, el  $\beta$  es el más abundante en las proteínas naturales.

El giro  $\beta$  fue definido por primera vez en 1968 por Venkatachalam<sup>8</sup>. Las estructuras de giro beta típicas están constituidas por cuatro aminoácidos que forman un pseudociclo de 10 átomos en el que el grupo amida del residuo (i+3) actúa como dador en un enlace de hidrógeno al carbonilo del residuo (i) (**Figura 1.1**). Otra característica de los

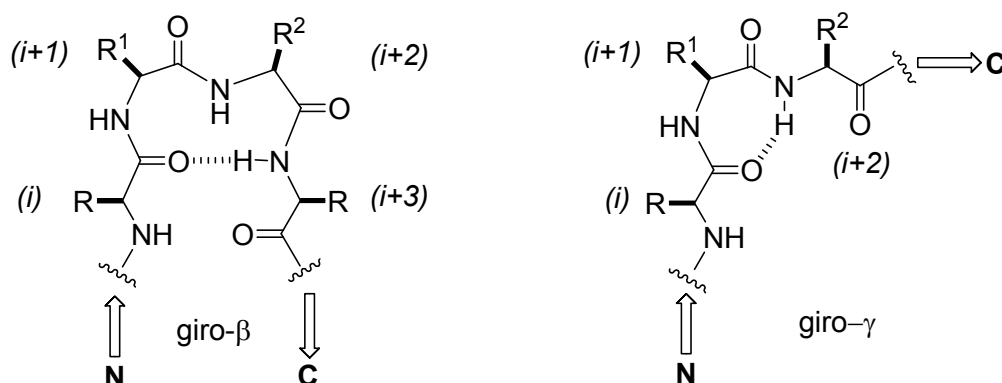
<sup>5</sup> (a) Nozawa, D.; Okubo, T.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Nakazato, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1232-1239. (b) Veber, D. F., in *Peptides-Chemistry and Biology, Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium*. Escrom. **1992**, *3*. (c) Morgan, B. A.; Gainor, J. A. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243-253.

<sup>6</sup> (a) Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R.; Achilefu, S. *Chemical Biology & Drug Design* **2007**, *69* (3), 163-169. (b) Marshall, G. R. *Biopolymers* **2001**, *60*, 246-277.

<sup>7</sup> Khan, M., Eguchi, M.. "Synthesis of Peptides Incorporating  $\beta$ -Turn Inducers and Mimetics" in Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Eds. Murray, G.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. **2003**, Vol.E 22c, 695-719.

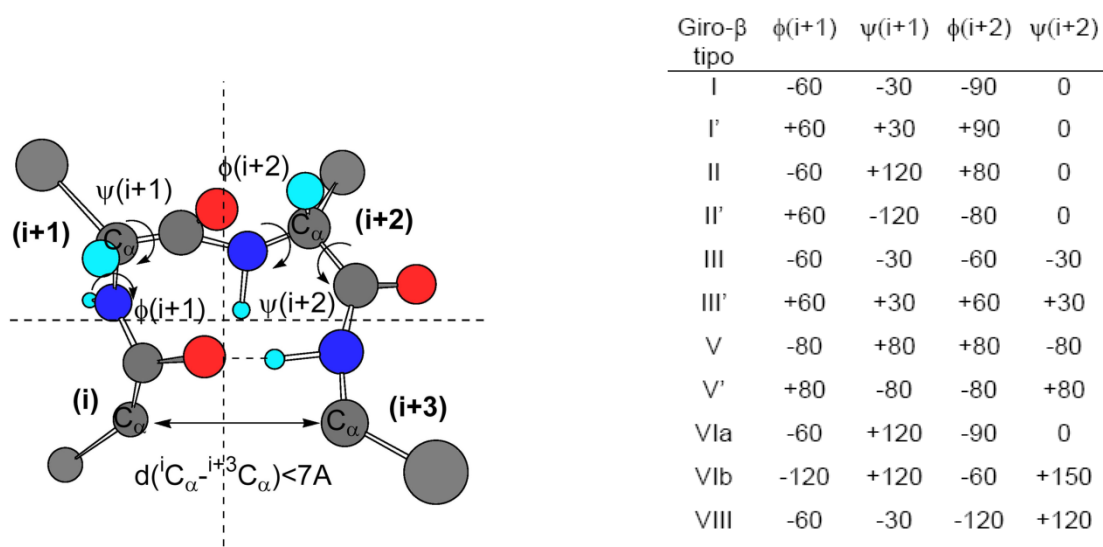
<sup>8</sup> Venkatachalam, C.M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.

giros  $\beta$ , es que la distancia entre los carbonos  $\alpha$  de los residuos (i) e (i+3) es menor de 7 Å<sup>9</sup>, y que los residuos (i+1) e (i+2), no describen una estructura helicoidal.



**Figura 1.1:** Representación general de un giro- $\beta$  y un giro- $\gamma$

Por su parte, los giros  $\gamma$  están formados por tres aminoácidos, generando un pseudociclo de 7 átomos. En este caso el enlace de hidrógeno también se forma entre el carbonilo del primer aminoácido (i) y el grupo amida del último (i+2), pero únicamente queda un residuo interno (i+1) (**Figura 1.1**)<sup>10, 11</sup>.



**Figura 1.2:** Representación de un giro- $\beta$  y su clasificación.

Son varias las conformaciones que puede adoptar un tetrapéptido lineal que se amolden a la definición de giro- $\beta$  y, de hecho, existen giros- $\beta$  diferentes. Los distintos tipos se clasifican en función de los valores de los ángulos diedros  $\phi$  (en torno al

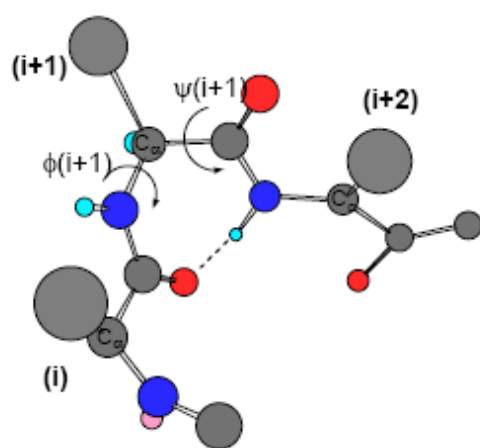
<sup>9</sup> Kabsch, W.; Sander, C. *Biopolymers* **1983**, 22, 2577-2637.

<sup>10</sup> Chon, K. C. *Anal. Biochem.* **2000**, 286, 1-16.

<sup>11</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.

enlace N-C $\alpha$ ) y  $\psi$  (en torno al enlace C $\alpha$ -C=O) de los residuos  $-(i+1)-$  e  $-(i+2)-$ <sup>12</sup> (**Figura 1.2**). Los ángulos diedros  $\omega$  de los enlaces peptídicos son generalmente planos y constantes, normalmente de 180° (*trans*), aunque en ocasiones pueden ser de 0° (*cis*). Otra característica de los giros- $\beta$  es que la longitud media del enlace (i) C=O...H-N (i+3) suele estar comprendida entre 1.8 y 2.5Å para la distancia O...H y entre 2.4 y 3.3Å para la distancia O...N. Los giros- $\beta$  que con más frecuencia se encuentran en la Naturaleza son los de tipo I, II, y III, en un 42%, 15% y 18% respectivamente. Los giros- $\beta$  tipo III describen una vuelta de hélice  $3_{10}$  (estructura secundaria parecida a la hélice- $\alpha$  de las proteínas). A pesar de que los giros- $\beta$  tipo I representan el 42% de los giros encontrados en estructuras cristalinas de proteínas, la mayoría de los miméticos de giros- $\beta$  descritos son de tipo II, y II' y, en menos ocasiones, de tipo I, III, ó VI<sup>13</sup>.

Por otra parte, los giros  $\gamma$  (**Figura 1.3**), solo presentan dos tipos, el normal ( $\gamma$ ) y el inverso ( $\gamma^i$ ), dependiendo de si el enlace de hidrógeno está por delante o por detrás del plano formado por el enlace peptídico del resto intermedio (i+1) cuando éste se representa con los grupos N- y C- terminales de izquierda a derecha. Aquellos giros,  $\beta$  ó  $\gamma$ , en los que no existen enlaces de hidrógeno intramoleculares y cuyos ángulos  $\phi$  y  $\psi$  no se desvían más de  $\pm 30^\circ$  de los valores ideales se conocen como giros abiertos.



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

**Figura 1.3:** Representación de un giro- $\gamma$  y su clasificación.

<sup>12</sup> Para clasificaciones detalladas de los tipos de giros- $\beta$ , ver: (a) Rose, G.D.; Gierasch, L.M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1-109. (b) Wilmot, C. M.; Thornton J. M. *Prot. Engineer.* **1990**, 3, 479-493. (c) Ball, J. B.; Hughes, R. A.; Alewood, P. F.; Andrews, P. R. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3467-3478. (d) Rotondi, K. S.; Gierash, L. M. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, 84, 13-22.

<sup>13</sup> Para miméticos de giros- $\beta$ , ver: (a) Oishi, S. *Tetrahedron* **2006**, 62, 1416-1424. (b) Cheng, Y. J.; Christianson, L. A.; Stanger, H. E.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10555-10556. (c) Cheng, Y. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3995-4004. (d) Diaz, H.; Espina, J. R.; Nelly, J. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8316-8318. (e) Diaz, H.; Tsang, K. Y.; Choo, D.; Espina, J. R.; Nelly, J. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3790-3791. (f) Gardner, R. R.; Liang, G. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1806-1816. (g) Nagai, U.; Sato, K., *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 647-650.

La formación de uno u otro tipo de giro depende de la naturaleza de los residuos que participan en él. Por ejemplo, la presencia de un residuo de prolina en la posición (i+1), favorece la formación de un giro- $\beta$ . Por otro lado, también es conocida la influencia de la configuración relativa de los residuos centrales -(i+1)-(i+2)- sobre el tipo de giro- $\beta$  que se forma<sup>12</sup>. En general, secuencias homoquirales en estos dos residuos, es decir (L-L) o (D-D), favorecen la formación de giros- $\beta$  de tipo I y I' respectivamente, y secuencias heteroquirales (L-D) o (D-L) favorecen la formación de giros de tipo II y II'.<sup>13</sup>

Este hecho se explica por las interacciones estéricas que tienen lugar entre los sustituyentes de los residuos (i+1) e (i+2) con el carbonilo (i+1) y el NH (i+2), favoreciendo aquellas conformaciones en las que dichos grupos se presenten mutuamente más alejados. Como los péptidos naturales se componen principalmente de L-aminoácidos, los giros- $\beta$  más abundantes que se dan en las proteínas y péptidos naturales son los de tipo I, que es el que corresponde a la configuración (L-L) de los residuos (i+1) e (i+2). No obstante algunos residuos atípicos, como la glicina (aquiral) o la prolina (cíclica) que suelen hacer el papel de D aminoácidos y, en general, todas las secuencias en las que los residuos (i+1)-(i+2) se corresponden con Aa-Gly o Aa-Pro pueden dar lugar a giros  $\beta$  de tipo II<sup>14</sup>. También pueden dar lugar a diversos tipos de giros- $\beta$ , la participación en posiciones centrales del giro de aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituídos como el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib), los  $\alpha$ -metil aminoácidos y aminoácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

Por último, otro factor que influye en el tipo de giro son las cadenas laterales de los aminoácidos contiguos. Dependiendo del ángulo pseudodiedro que formen entre ellos, el esqueleto peptídico se dispondrá de una manera determinada generando uno u otro tipo de confórmero. Este cambio de conformación, dependiendo de la orientación de las cadenas laterales de los residuos, es un factor crítico en la selectividad de los péptidos por sus receptores<sup>15</sup>.

<sup>12</sup> Pattarawarapan, Y. F. M.; Wang, Z.; Burgess, K. J. *Org. Chem.* **1999**, *64*, 9175-9177.

<sup>13</sup> Brenner, V.; Piuze, F.; Dimicoli, I.; Tardivel, B.; Mons, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2463-2466.

<sup>14</sup> Hruby, V. J.; A-Obeidi, F.; Kazmierski, W. *Biochem. J.* **1990**, *268*, 249-262.

<sup>15</sup> (a) Müller, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2767-2769. (b) Bach, A. C. II; Espina, J. R.; Jackson, S. A.; Stouten, P. F. W.; Duke, J.L.; Shaker, A. M.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293-294.

### 1.1.2. Péptidos y peptidomiméticos cíclicos

Una forma de fijar la conformación de determinados residuos en un péptido es a través de las estructuras cíclicas. El interés por los péptidos cíclicos comenzó en los años cuarenta cuando se descubrió que el antibiótico gramicidina S, *ciclo*-[Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro]<sub>2</sub> (**Figura 1.4**) es un decapeptido cíclico<sup>16</sup>. Además, la gramicidina S fue uno de los primeros fármacos peptídicos sintetizado artificialmente<sup>17</sup> y es comercial desde los años 50. Paralelamente, se descubrieron otros muchos antibióticos, agentes antitumorales e inmunosupresores y diferentes tipos de toxinas naturales con estructura peptídica cíclica.

Los péptidos cíclicos presentan frente a los lineales ventajas farmacológicas tales como su mayor estabilidad metabólica, potencia y selectividad. De hecho, los péptidos cíclicos, al no tener extremos libres, no son reconocidos por las enzimas exopeptidasas encargadas de la metabolización inicial de las proteínas. Además, muestran una mayor permeabilidad a las membranas celulares por su menor polaridad, lo cual aumenta su potencia farmacológica respecto a los péptidos lineales.

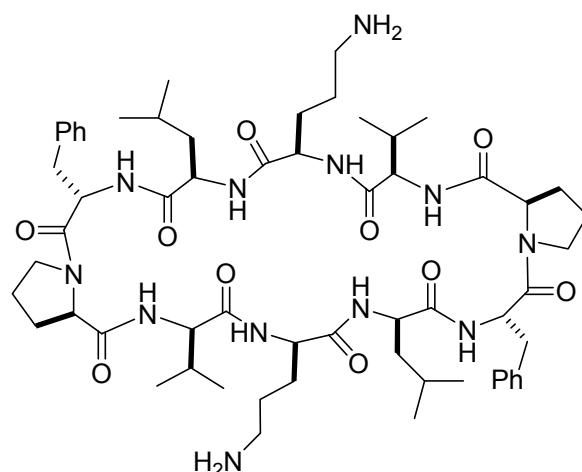
En cuanto a su selectividad, como se comentará más adelante, la estructura cíclica reduce considerablemente su flexibilidad conformacional aumentando con ello la selectividad frente a receptores<sup>18</sup>. Históricamente, el estudio estructural de péptidos cíclicos resultó ser un reto muy interesante debido a su ineficiente aislamiento de cultivos naturales y a la dificultad de conocer de forma precisa su constitución y conformación. Por otra parte, su síntesis es también interesante debido a las dificultades que conlleva la reacción de macrociclación de péptidos abiertos<sup>19</sup>.

<sup>16</sup> (a) Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. *Am. Rev. Sov. Med.* **1944**, 2, 134-138. (b) Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. *Nature (London)*, **1944**, 154, 703-703.

<sup>17</sup> (a) Schwyzer, R.; Sieber, P. *Helv. Chim. Acta* **1957**, 40, 624-626. (b) Schwyzer, R.; Sieber, P. *Helv. Chim. Acta* **1958**, 41, 2186-2190.

<sup>18</sup> (a) Linde Y.; Ovadia O.; Safrai, E.; Xiang, Z.; Portillo, F. P.; Shalev, D. E.; Haskell-Luevano, C.; Hoffman, A.; Gilon, C. *Biopolymers* **2008**, 90(5), 671-682. (b) Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *Tetrahedron* **1997**, 53, 12789. (c) Burgess, K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 826. (d) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M., Eds.; Academic: Orlando, FL **1985**; 37, 1-109. (e) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1244. (f) Hruby, V. J. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 847. (g) Suat Kee, K.; Jois, S. D. S. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 1209-1224.

<sup>19</sup> (a) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, 21, 512-523. (b) Kessler, H. *Trends in Drug Research*, Ed. Elsevier, Amsterdam **1990**, 73-84. (c) Schmidt, R.; Neubert, K. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 502-507. (d) Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 471-501. (e) Li, P.; Roller, P. P.; Xu, J. *Curr. Org. Chem.* **2002**, 6, 411-440.



**Figura 1.4:** Estructura del antibiótico gramicidina S, ciclopéptido simétrico formado por dos pentapéptidos idénticos.

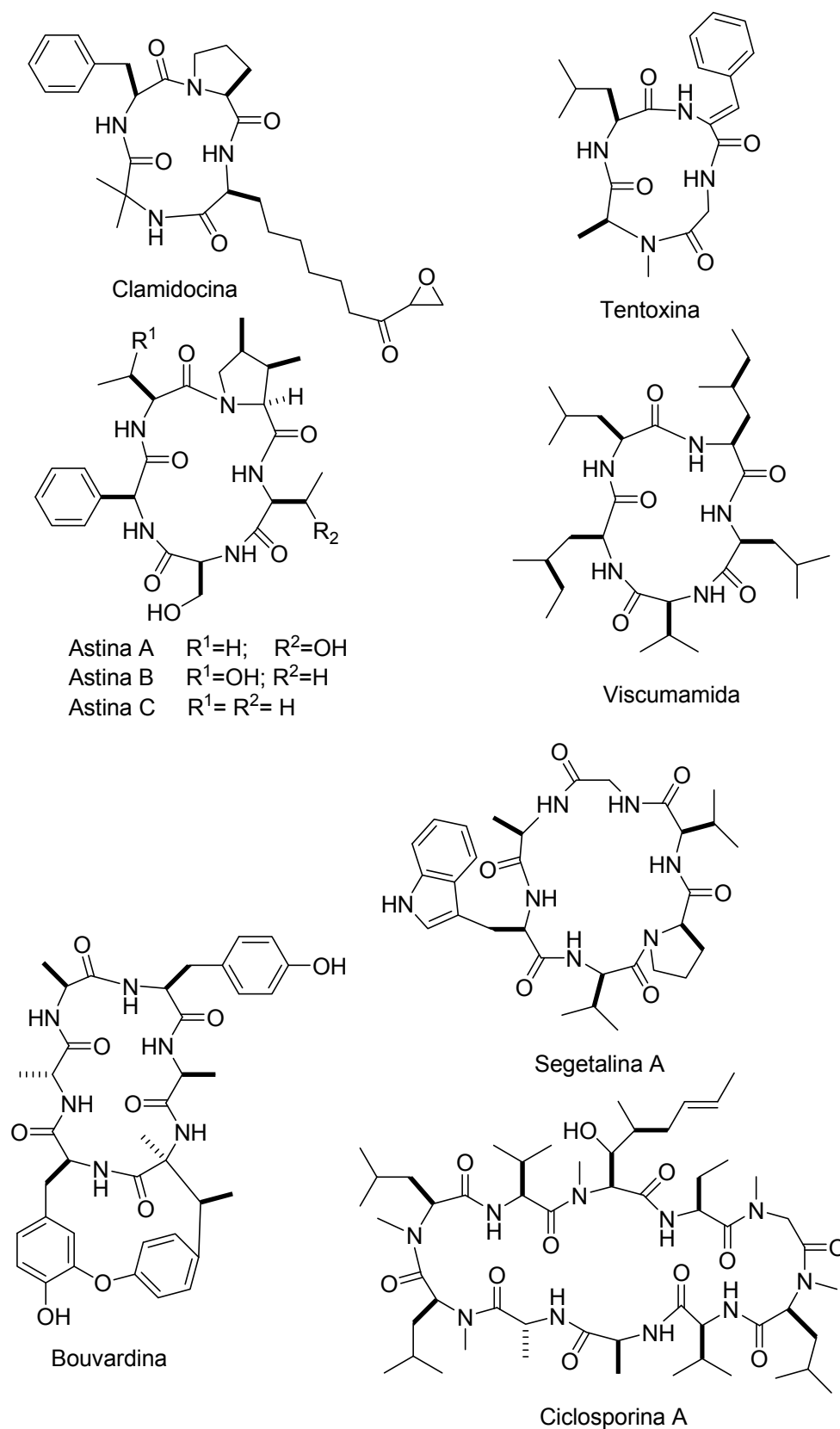
La variedad de los péptidos cíclicos naturales es muy amplia. Así, respecto a la naturaleza de los enlaces que unen los residuos del péptido cíclico, se pueden diferenciar los ciclopéptidos homodéticos y heterodéticos. En los homodéticos, los diferentes aminoácidos están conectados exclusivamente por enlaces peptídicos, mientras que en los heterodéticos existen otros tipos de conexiones tales como ésteres, éteres, tioéteres, puentes disulfuro o enlaces carbono-carbono. En la **Figura 1.5** se muestran algunos péptidos cíclicos naturales<sup>20</sup>. Como se observa en la **Figura 1.5**, los ciclopéptidos pueden contener diferente número de residuos, encontrándose en la naturaleza desde tripéptidos<sup>21</sup> y tetrapéptidos<sup>22</sup> hasta péptidos de más de siete residuos como la gramicidina S o la ciclosporina A (**Figura 1.5**). No obstante, los más frecuentes son los de cinco y seis residuos<sup>23</sup>.

<sup>20</sup> Gilon, C.; Mang, C.; Lohof, A.; Friedler, A.; Kessler, H. In *Houbel-Weyl Vol. E 22, Synthesis of Cyclic Peptides*, 461-542.

<sup>21</sup> (a) Kessler, H.; Krämer, P.; Krack, G. *Isr. J. Chem.* **1980**, *20*, 188-195. (b) ten Brink, H. T.; Rijkers D. T. S.; Liskamp R. M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*(5), 1817-1824.

<sup>22</sup> (a) Closse, A.; Huguenin, R. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 533-545. (b) Bernardi, E.; Fauchere, J.L.; Atassi, G.; Viallefont, P.; Lazaro, R. *Peptides* **1993**, *14*, 1091-1093. (c) Shen, J.; Woodward, R.; Kedenburg, J. P.; Liu, X.; Chen, M.; Fang, L.; Sun, D.; Wang, P. G.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7417-7427. (d) Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Coughlan, J.; Kaiser, S. M.; Jacobs, C. M.; Jones, A.; Ruehmann, A.; Turner, J. Y.; Smythe, M. L. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1386-1395.

<sup>23</sup> (a) Morita, H.; Kayashita, T.; Kobata, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6797-6804. (b) Morita, H.; Nagashima, S.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1121-1132. (c) Morita, H.; Kayashita, T.; Kobata, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Yamada K. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6003-6014; (d) Sonnet, P.; da Nascimento, S.; Marty, D.; Franceschini, N.; Guillon, J.; Brion, J. D.; Rochette, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3293-3296



**Figura 1.5:** Estructuras de algunos ciclopéptidos naturales de diferente tamaño.

Además, son los ciclos de cuatro, cinco y seis residuos los que presentan las propiedades farmacológicas más interesantes. Este hecho es debido a que tienen el



tamaño idóneo para contener los constituyentes imprescindibles para ser reconocidos por un receptor, y disponen de la restricción suficiente para tener una buena selectividad. Entre ellos destacan los ciclopentapéptidos que contienen en su estructura la secuencia peptídica arginina- glicina-ácido aspártico<sup>24</sup> RGD que, como se verá más adelante, actúa como ligando antagonista de integrinas.

## 1.2. Propiedades conformacionales de los péptidos y peptidomiméticos cíclicos

Como se ha comentado anteriormente, los péptidos cíclicos se caracterizan por poseer una flexibilidad conformacional restringida impuesta por el propio ciclo. Por ello, han sido objeto de numerosos estudios con el fin de conocer sus preferencias conformacionales y los diferentes enlaces de hidrógeno intramoleculares que pueden contener. En los péptidos cíclicos actúan dos tipos de restricciones conformacionales: a) las restricciones globales, que afectan al conjunto del ciclo, es decir, debidas al macrociclo, y b) las restricciones locales generadas por los diferentes restos que forman el ciclo; por ejemplo, la prolina, los D-aminoácidos, y los miméticos inductores de giros<sup>25</sup>.

Tal y como ocurre en los péptidos abiertos, la conformación preferente del esqueleto peptídico en los péptidos cíclicos también está determinada por su tendencia a minimizar el impedimento estérico entre las cadenas laterales de los residuos y los enlaces amida contiguos (**Figura 1.6**). Esto hace que presenten ciertas preferencias conformacionales en los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  que pueden resumirse en dos tendencias<sup>26</sup>:

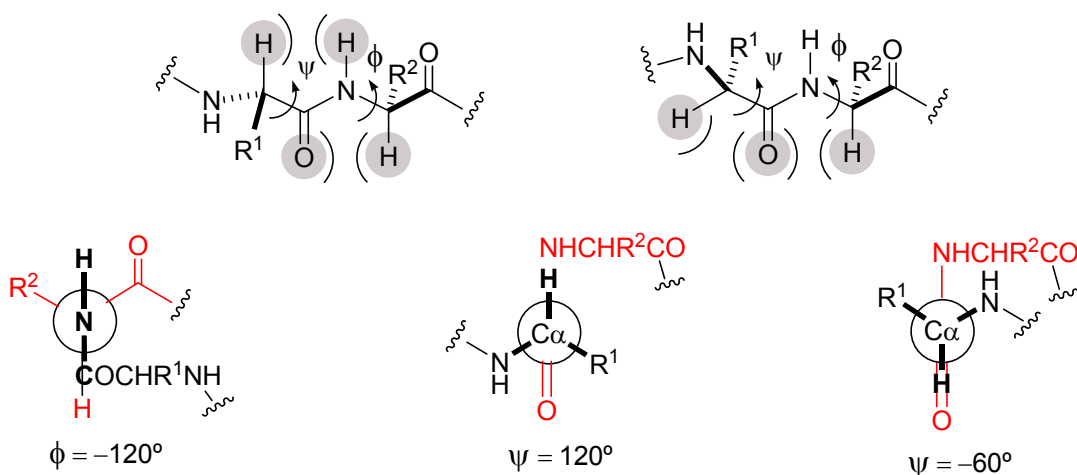
- 1) El ángulo diedro  $\phi$  más estable suele ser de  $-120^\circ$ , quedando antiparalelos el enlace amida y el enlace  $C\alpha-H$  de cada residuo. Este valor puede verse afectado en estado sólido por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares o por la presencia de disolvente ocluido.

<sup>24</sup> (a) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Nature* **1984**, 309, 30-33. (b) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Kurz, M.; Kessler, H. *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50-54. (c) Kim, J.; Hong, S. Y.; Park, H. S.; Kim D.S.; Lee W. *Mol. Cells.* **2005**, 19, 205-211.

<sup>25</sup> (a) Klose, J.; Ehrlich, A.; Bienert, M. *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5, 129-131. (b) El Haddadi, M.; Cavelier, F.; Vives, E.; Azmani, A.; Verducci, J.; Martinez, J. J. *Pept. Sci.* **2000**, 6, 560-570. (c) Besser, D.; Olender, R.; Rosenfeld, R.; Arad, O.; Reissmann, S. *J. Pept. Res.* **2000**, 56, 337-345.

<sup>26</sup> Heller, M.; Sukopp, M.; Tsomaia, N.; John, M.; Mierke, D. F.; Reif, B.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 13806-13814.

- 2) El ángulo  $\psi$  puede ser de  $120^\circ$  o de  $-60^\circ$ , siendo el más abundante el de  $-60^\circ$  en los péptidos cíclicos de pequeño tamaño.



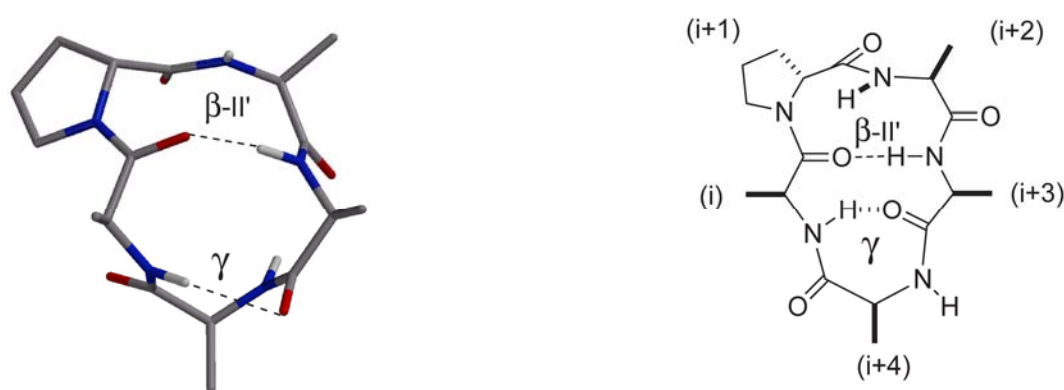
**Figura 1.6:** Interacciones estéricas en torno a los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de residuos contiguos (arriba) y sus proyecciones de Newman con los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de mínima interacción en los ciclopéptidos (abajo).

Otra característica importante que afecta a la conformación de los péptidos cíclicos es la presencia de enlaces de hidrógeno, que pueden ser inter- o intramoleculares. La influencia de uno y otro sobre la conformación del ciclo depende de la polaridad del medio y la naturaleza de los residuos del ciclo. Así, en medios no polares, tales como las membranas celulares, las restricciones conformacionales quedan impuestas por los enlaces de hidrógeno intramoleculares; mientras que en medios polares, la estabilidad conformacional del péptido puede venir determinada por los enlaces intermoleculares. Además, la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares genera habitualmente giros- $\beta$ , o giros- $\gamma$ , que estabilizan la conformación de la cadena peptídica.

Existen diferentes métodos para analizar la conformación de los péptidos. Los más importantes son la difracción de Rayos X y las técnicas de espectroscopía de RMN. En el caso de los péptidos cíclicos y sus peptidomiméticos la obtención de cristales es dificultosa por su tendencia a la autoagregación. Por ello, los experimentos de RMN mono- y dimensionales (NOESY, ROESY, etc...) combinados con cálculos de Dinámica Molecular (DM) son las técnicas más empleadas para establecer su estructura espacial.

En general, se conocen las conformaciones de los péptidos cíclicos de 3 a 7 residuos constituidos por aminoácidos naturales (-L)<sup>27</sup>. Sin embargo, en el caso de los ciclopeptidomiméticos con residuos de configuración modificada o con restricciones adicionales, resulta muy difícil predecir la conformación, ya que en muchos de ellos los enlaces de hidrógeno estabilizadores de giros  $\beta$  o  $\gamma$  no aparecen en la posición esperada o ni siquiera aparecen.

Hace quince años, Kessler realizó un estudio conformacional de ciclopentapéptidos de tipo *ciclo*-[D-Aa-L-Aa'<sub>4</sub>] que contenían un ciclo adicional y un estereocentro de configuración invertida<sup>28</sup>. Dicho autor, dedujo que este tipo de ciclopéptidos presentaban dos giros, tal y como se muestra en el ejemplo de la **Figura 1.7**. Por una parte, un giro- $\beta$  de tipo II' que incluye a un D-aminoácido en la posición (i+1) (en este caso D-Prolina) y por otra, un giro- $\gamma$  que involucra los L-aminoácidos de las posiciones (i+3) e (i), que en este caso son dos residuos de L-Ala.



**Figura 1.7:** Confórmero representativo del *ciclo*-[D-Pro-L-Ala<sub>4</sub>] calculado por Kessler<sup>28</sup> mediante Dinámica Molecular (DM).

Sin embargo, los resultados de Kessler fueron discutidos por otros autores<sup>29</sup>, alegando que sus estudios no demostraban la formación de dos giros con enlaces de hidrógeno estables. Recientemente, Kessler, intentó ratificar sus conclusiones realizando un nuevo estudio meticuloso del pentapéptido *ciclo*-[D-Pro-L-Ala<sub>4</sub>]<sup>30</sup>, afirmando que la conformación con giro  $\gamma$  estaba en rápido equilibrio conformacional con otra

<sup>27</sup> (a) Kessler, H.; Bermel, W.; Friedrich, A.; Krack, G.; Hull, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6297-6304. (b) Matter, H.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3347-3359. (c) Morita, H.; Kayashita, T.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Shiro, M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12539-12548. (d) Loiseau, N.; Gomis, J. M.; Santolini, J.; Delaforge, M.; Andre, F. *Biopolymers* **2003**, *69*, 363-385

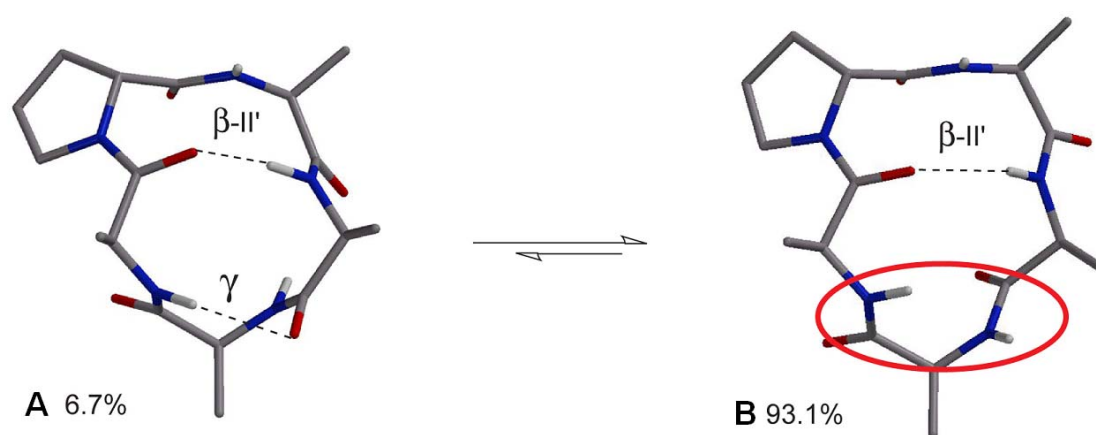
<sup>28</sup> Mierke, D. F.; Kurz, M.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1042-1049.

<sup>29</sup> Nikiforovich, G. V.; Köver, K. E.; Zhang, W. J.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3262-3273.

<sup>30</sup> Heller, M.; Sukopp, M.; Tsomaia, N.; John, M.; Mierke, D. F.; Reif, B.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13806-13814.

conformación “abierta” que no presentaba dicho giro. Sin embargo, mantenía que la conformación  $\beta_{II'}\gamma$ -girada, aunque minoritaria, se hallaba presente en el 15-30% de los conformeros.

A pesar de ello, la propuesta modificada tampoco ha acallado del todo a sus críticos<sup>31</sup>, que no aceptan la formación de un giro- $\gamma$  estable y proponen un modelo en el que la población del conformero con giro  $\gamma$  es todavía menor que la estimada por él (**Figura 1.8**). Así, Nikiforovich ha propuesto que la población con giro  $\gamma$  es del orden del 6.7% y que el conformero mayoritario posee una orientación diferente del enlace amida de la Ala4.



**Figura 1.8:** Equilibrio conformacional del ciclo-[D-Pro-L-Ala<sub>4</sub>] propuesto por Nikiforovich y su población estimada. Se observa que en la región (i+3)-(i+4)-(i) tiene lugar una rotación que rompe el giro  $\gamma$  (conformero B).

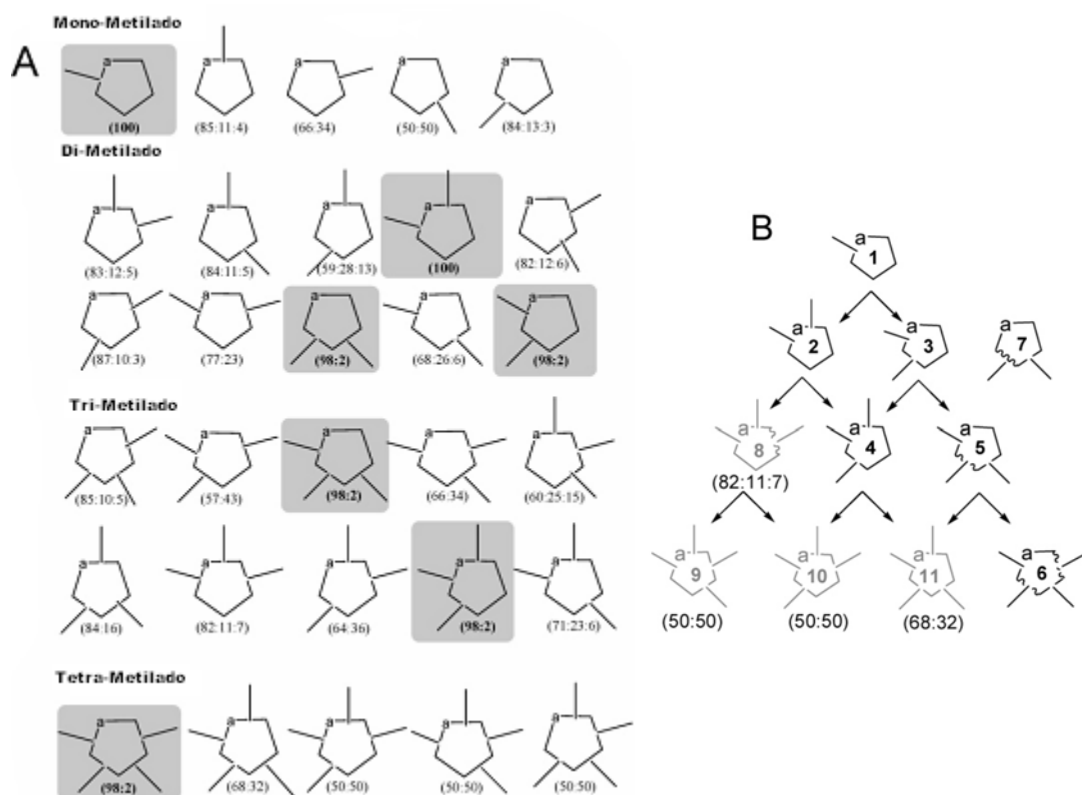
Como demuestran los estudios precedentes, la incorporación de aminoácidos cíclicos (Pro) y/o de configuración invertida incrementa la rigidez de los ciclopentapéptidos. Sin embargo, no está claro en qué medida afecta la incorporación de residuos proteinogénicos o sus miméticos a la red de enlaces de hidrógeno intramoleculares de los ciclopéptidos.

Otra forma de modular la conformación en péptidos cíclicos de tamaño medio consiste en la N-metilación<sup>32</sup>. Así, por ejemplo, tras preparar una librería de 30 N-metilciclopéptidos, Kessler comparó la conformación del ciclo-[D-Ala-L-Ala<sub>4</sub>] con la de sus análogos mono-, di-, tri- y tetra- N-metilados, observando que de los 30 ciclopéptidos posibles sólo 7 presentaban una única conformación preferida (**Figura**

<sup>31</sup> Nikiforovich, G. V.; Zhang, X.; Marshall, G. R. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2921-2925.

<sup>32</sup> (a) Chatterjee, J.; Mierke, D.; Kessler, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 1508-1517. (b) Chatterjee, J.; Mierke, D.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15164-15172.

1.9) dándose un equilibrio entre una conformación  $\beta$ - y  $\gamma$ -girada sobre el enlace Ala3-Ala4, al igual que ocurría en el *ciclo*-[D-Pro-L-Ala<sub>4</sub>].

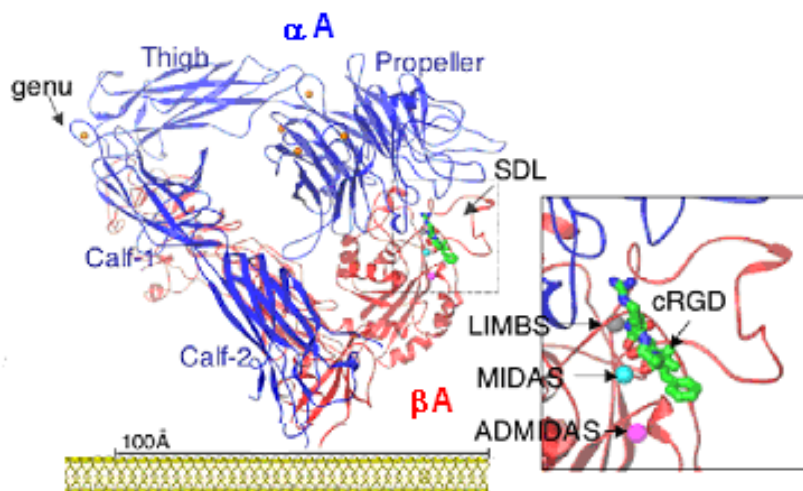


**Figura 1.9:** (A) Quimioteca de los 30 ciclopentapéptidos N-metilados de *ciclo*-[D-Ala-L-Ala<sub>4</sub>] y sus respectivas abundancias conformacionales determinada por NMR (entre paréntesis). (B) Diagrama esquemático del número de compuestos que presentan preferentemente una sola conformación.

### 1.3. Peptidomiméticos cíclicos de tipo RGD

#### 1.3.1. Antecedentes generales

Tras las contribuciones pioneras de Barton<sup>33(a)</sup>, ha sido Kessler<sup>33(b)</sup> uno de los autores que más esfuerzo ha dedicado a la búsqueda de una relación sistemática entre la conformación de los ciclopeptidos y su actividad biológica. Uno de los campos en los que dichos estudios conformacionales han conducido a resultados más relevantes ha sido el de los ciclopeptidos de tipo RGD. Los péptidos RGD son aquellos que contienen en su secuencia la triada arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D) y son abundantes en las proteínas de la matriz exterior de la membrana celular (ECM)<sup>34</sup>. Tienen la propiedad de interactuar con varios tipos de integrinas, proteínas de membrana (**Figura 1.10**) que participan principalmente en fenómenos de adhesión celular.



**Figura 1.10:** Estructura cristalina del dominio extracelular de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  donde se detalla la región de interacción ligando de RGD-integrina con el extremo del dominio  $\beta A$  (rojo) próximo al dominio  $\alpha A$  (azul)<sup>35</sup>.

<sup>33</sup> (a) Barton, R. J. *Angew. Chem.* **1980**, 92, 827-833; (b) *Nobel Lectures Chemistry 1963-1970*, Elsevier, Amsterdam **1972**, 298-311. (b) Müller, M.; Gurrath, H.; Kessler, Timpl, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1992**, 31, 326-328.

<sup>34</sup> (a) Gentilucci, L.; Cardillo, G.; Tolomelli, A.; De Marco, R.; Garelli, A.; Spampinato, S.; Sparta, A.; Juaristi, E. *ChemMedChem* **2009**, 4, 517-523. (b) Gentilucci, L.; Cardillo, G.; Tolomelli, A.; Spampinato, S.; Sparta, A.; Squassabia, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4, 729-735. (c) Benfatti, F.; Cardillo, G.; Fabbroni, S.; Galzerano, P.; Gentilucci, L.; Juris, R.; Tolomelli, A.; Baiula, M.; Sparta, A.; Spampinato, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7380-7390. (d) Gentilucci, L.; Cardillo, G.; Squassabia, F.; Tolomelli, A.; Spampinato, S.; Sparta, A.; Baiula, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2329-2333. (e) Benfatti, F.; Cardillo, G.; Fabbroni, S.; Gentilucci, L.; Perciaccante, R.; Tolomelli, A.; Baiula, M.; Spampinato, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 167-170.

<sup>35</sup> Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. *Curr. Opin Cell Biol.* **2007**, 19, 495-507.

Estos fenómenos son procesos clave que controlan la formación de órganos y tejidos en los organismos pluricelulares así como su muerte programada o apoptosis. La selectividad y potencia de los péptidos RGD frente a cada tipo de integrina se puede modular bloqueando la conformación del segmento RGD mediante su incorporación a diferentes ciclopéptidos que contengan D-aminoácidos tales como la D-fenilalanina (F). Para comprender cómo afectan estos cambios a la capacidad de reconocimiento RGD-integrina es necesario disponer de información acerca de la estructura general de estas últimas.

Las integrinas están compuestas por varios dominios extracelulares extensos, una hélice transmembrana y unos dominios intracelulares reducidos. Se conocen 25 integrinas presentes en las células de los mamíferos que se pueden clasificar de acuerdo con la estructura de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, es conocido que sólo los dominios  $\alpha A$  y  $\beta A$ , correspondientes a los extremos más externos de dichas subunidades, participan en la interacción con ligandos y, por tanto, desencadenan la transducción de señal. En el caso de péptidos de tipo RGD los residuos interactúan en estas regiones externas con residuos complementarios; en concreto, la arginina (R) con un residuo de ácido aspártico de la rama  $\alpha$ , el ácido aspártico (D) con un ion metálico en la región denominada MIDAS y la glicina actuaría de separador sin interactuar con la integrina<sup>35, 36</sup>. Por otro lado, 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. Así, por ejemplo, la primera está implicada en la agregación plaquetaria<sup>37</sup>, la segunda regula la angiogénesis<sup>38</sup> o la migración celular en músculo blando vascular<sup>39</sup> y las dos últimas están implicadas en la adhesión de osteoclastos en la matriz ósea<sup>40</sup>. Por ello, no es de extrañar que diferentes ligandos capaces de interferir

<sup>36</sup> Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frach, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2002**, 296, 151-155, PDB file: 1L5G.

<sup>37</sup> Wityak, J.; Sielecki, T. M. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1996**, 6, 1175-1194.

<sup>38</sup> (a) Marugán, J. J.; Manthey, C.; Anaclerio, B.; Lafrance, L.; Lu, T.; Markotan, T.; Leonard, K. A.; Crysler, C.; Eisennagel, S.; Dasgupta, M.; Tomczuk, B. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 926-934. (b) Cardo-Vila, M.; Arap, W.; Pasqualini, R. *Mol. Cell* **2003**, 11, 1151-1162. (c) Eskens, F. A. L. M.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Bottcher, S.; Wynendaele, W.; Dreys, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T. *Eur. J. Cancer* **2003**, 39, 917-926. (d) Strömblad, S.; Cheresh, D. A. *Cell Survival. Chem. Biol.* **1996**, 3, 881-885. (e) Chen, X.; Plasencia, C.; Hou, Y.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1098-1106 (corrigendum, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5874). (f) Eliceiri, B. P.; Cheresh, D. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 1227-1230. (g) Tucker, G. C. *Curr. Oncol. Rep.* **2006**, 2, 96-103.

<sup>39</sup> (a) Matsuno, H.; Stassen, J. M.; Vermynen, J.; Deckmyn, H. *Circulation*, **1994**, 90, 2203-2206. (b) Choi, E. T.; Engel, L.; Callow, A. D.; Sun, S.; Trachtenberg, J.; Santoro, S.; Ryan, U. S. *J. Vasc. Surgery*, **1994**, 19, 125-134. (c) Liaw, L.; Almeida, M.; Hart, C. E.; Schwartz, S. M.; Giachelli, C. M. *Circ. Res.*, **1994**, 74, 214-224.

<sup>40</sup> (a) Duong, L. T.; Rodan, G. A. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2001**, 2, 95-104. (b) Robey, P. G. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, 28, 227-236. (c) Engleman, V. W.; Nickols, G. A.; Ross, F. P.; Horton, M. A.; Griggs, D. W.; Settle, S. L.; Ruminiski, P. G.; Teitelbaum, S. L. *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 2284-2292. (d) Van der Pluijm, G.; Mouhaan, H.; Baas, C.; de Groot, H.; Papapoulos, S.; Löwik, C. *J. Bone Miner. Res*

selectivamente estos procesos de adhesión sean considerados como candidatos a fármacos para el tratamiento de patologías tales como la trombosis, la metástasis de tumores sólidos cancerosos, la restenosis posterior a la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) o la osteoporosis. Consecuentemente, durante los últimos años se han sintetizado decenas de pseudopéptidos de bajo peso molecular miméticos de RGD. Estas moléculas, además de actuar como ligandos potentes y selectivos de las correspondientes integrinas, deben tener las buenas propiedades farmacodinámicas y la estabilidad proteolítica de las que carecen los péptidos naturales.

Sin embargo, el problema es más complejo de lo que a primera vista puede parecer. En efecto, un ligando muy potente con respecto, por ejemplo, a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  pierde inmediatamente todo su posible potencial farmacológico como agente antitumoral si también es muy potente frente a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , puesto que podría generar reacciones adversas tales como hemorragias, etc... Así pues, la cuestión clave que hay que resolver para disponer de ligandos eficaces es la de cómo conseguir la máxima potencia<sup>41</sup> y selectividad frente a las diferentes integrinas mimetizando la misma secuencia RGD. Y como ya se ha anticipado en este apartado, la clave para resolver el problema de la selectividad reside en la identificación y fijación de las diferentes conformaciones bioactivas de la triada RGD mediante la estabilización de determinados tipos de giros peptídicos y enlaces de hidrógeno amídicos con la imposición de restricciones a dicha secuencia o a sus miméticos equivalentes<sup>34</sup>.

### 1.3.2. Peptidomiméticos $\beta$ -lactámicos cíclicos

Como se ha mencionado anteriormente, para reducir el número de conformaciones posibles en ciclopentapéptidos de tipo RGD, Kessler<sup>42</sup> ha aplicado modificaciones tales como la N-metilación o la introducción de ciclos adicionales. Por ejemplo, la N-metilación del residuo de la valina en el *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] I (**Figura 1.11**)

---

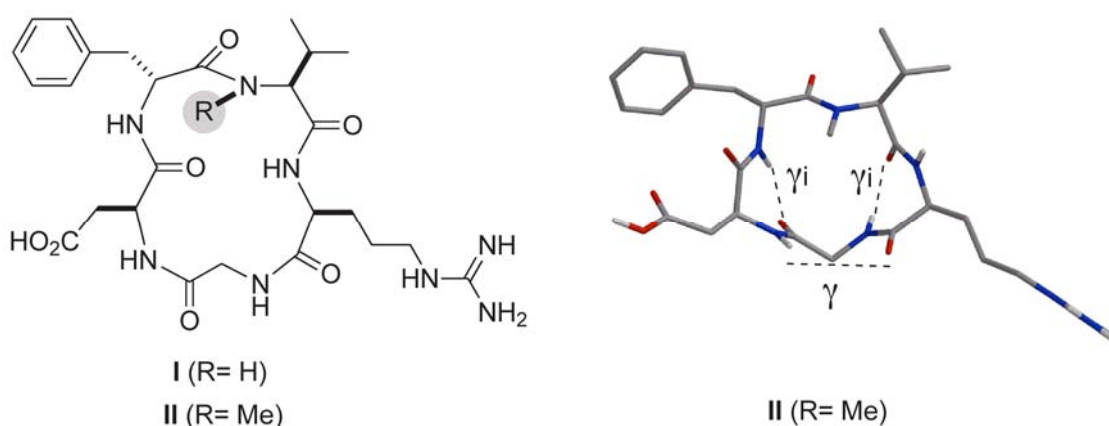
1994, 9, 1021-1028. (e) Helfrich, M. H.; Nesbitt, S. A.; Horton, M. A. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, 7, 345-351.

<sup>41</sup> La potencia de un ligando de integrinas se expresa en valores  $IC_{50}$ , correspondientes a la concentración de ligando necesaria para desplazar el 50% de alguna de las proteínas naturales antes mencionadas adheridas la integrina estudiada. Por ejemplo, cuando se quiere medir la actividad inhibitoria de un ligando frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , se suele utilizar la vitronectina que es la proteína natural selectiva de esta integrina; análogamente cuando la actividad a medir es la de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , la proteína a desplazar suele ser el fibrinógeno.

<sup>42</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.



condujo al descubrimiento de la cilengitida **II**<sup>43</sup>, un ciclopentapéptido de tipo RGD que es una de las sustancias inhibitoras de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  más potentes y selectivas que se conocen y que en el año 2007 ha sido aceptado como medicamento huérfano para el tratamiento del glioblastoma en humanos<sup>44</sup>. Además, en base a experimentos de RMN, se ha establecido que la conformación más estable de la cilengitida en disolución acuosa es aquella en la que el resto central de glicina se dispone adoptando un giro  $\gamma$ , formándose otros dos giros  $\gamma$  e inversos adicionales en torno a los residuos de ácido aspártico y arginina (**Figura 1.11**).

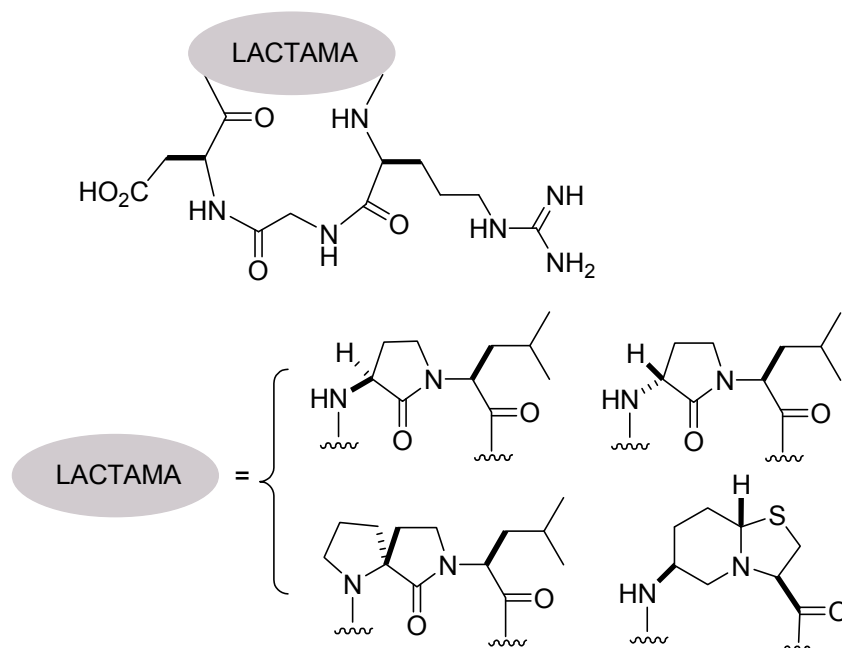


**Figura 1.11:** Representación de la estructura y la conformación más probable de la cilengitida **II**, obtenida mediante N-metilación formal de **I**.

La introducción de ciclos lactámicos y espirolactámicos también ha sido empleada para restringir la flexibilidad de los ciclopentapéptidos de tipo RGD. Así, se han descrito diferentes miméticos que se recogen en la **Figura 1.12**. Aunque el efecto de dichas lactamas sobre los enlaces de hidrógeno intramoleculares de los ciclopentapéptidos RGD que los contienen es muy diferente (ver sección 2.1.2), ninguna de ellas ha demostrado provocar en los correspondientes ciclopéptidos RGD una actividad inhibitora de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  superior a la cilengitida.

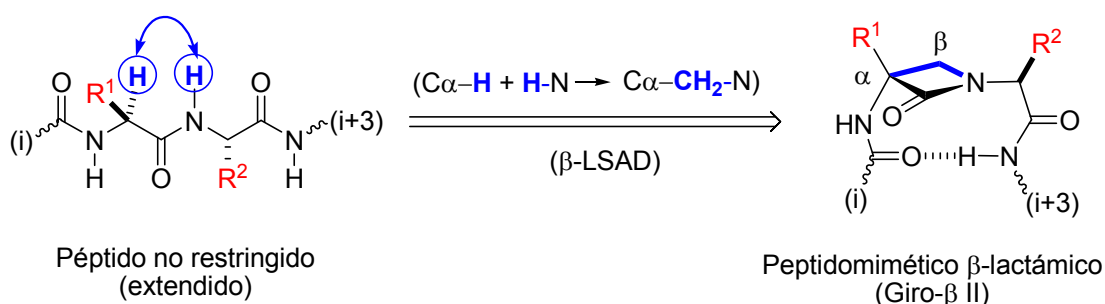
<sup>43</sup> Haubner, R.; Schmit, W.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881-7891.

<sup>44</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. of Clin. Oncol.* **2008**, *26*(34), 5610-5617. (b) Friess, H.; Langrehr, J. M.; Oettle, H.; Raedle, J.; Niedergethmann, M.; Dittrich, C.; Hossfeld, D. K.; Stoeger, H.; Neyns, B.; Herzog, P.; Piedbois, P.; Dobrowolski, F.; Scheithauer, W.; Hawkins, R.; Katz, F.; Balcke, P.; Vermorken, J.; van Belle, S.; Davidson, N.; Esteve, A. A.; Castellano, D.; Kleeff, J.; Tempia-Caliera, A. A.; Kovar, A.; Nippgen, J. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 285.



**Figura 1.12:** Algunos miméticos lactámicos (“lactamas de Freidinger”) empleados para la restricción conformacional de ciclopentapéptidos de tipo RGD.

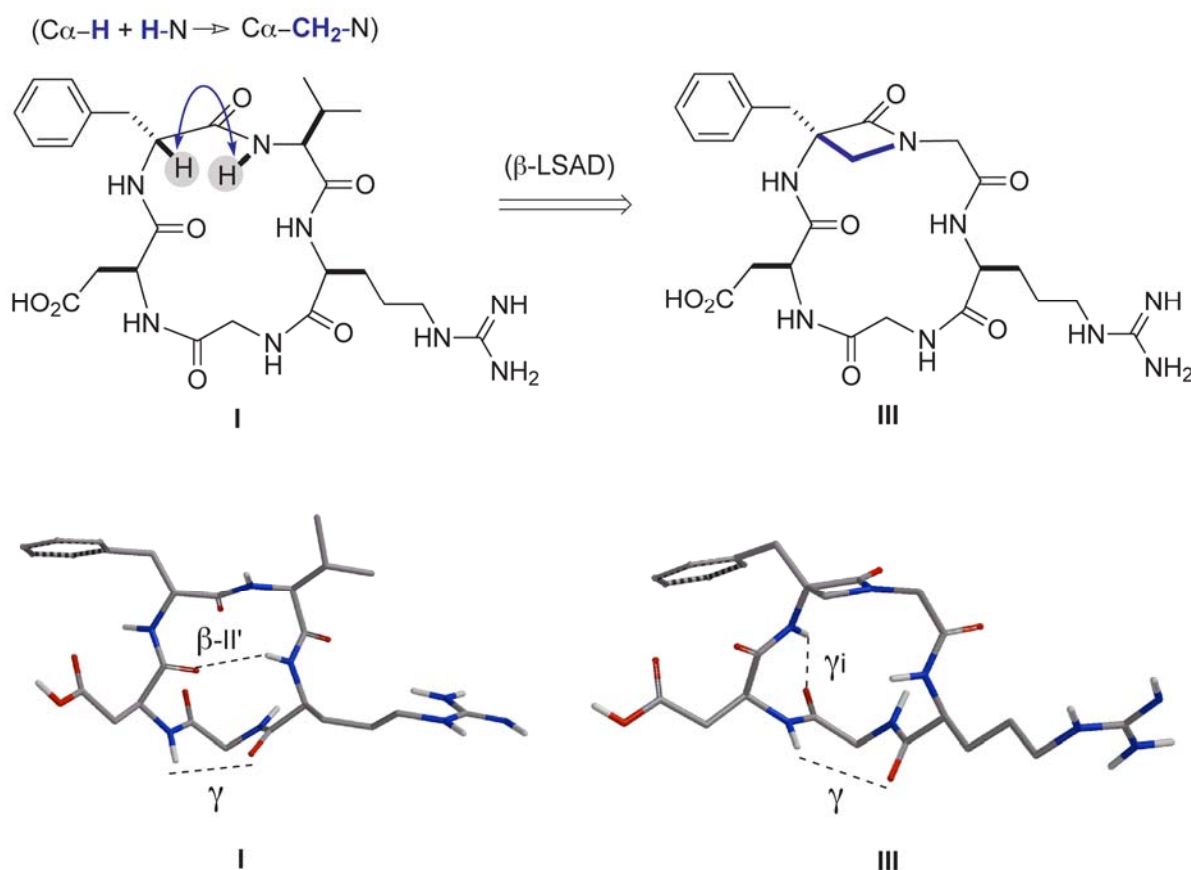
En este sentido, en nuestro laboratorio ya se conocía que la inserción de un puente metileno entre las posiciones  $C\alpha(i+1)$  y  $N(i+2)$  de una cadena peptídica lineal provoca en el peptidomimético  $\beta$ -lactámico resultante una fuerte estabilización de la conformación  $\beta$ -girada de tipo  $\beta$ -II o  $\beta$ -II', según la configuración del estereocentro  $\alpha$ <sup>45</sup> (**Figura 1.13**). Esta aproximación, que hemos denominado “ $\beta$ -Lactam Scaffold-Assisted Design” ( $\beta$ -LSAD), proporciona pseudopéptidos  $\beta$ -lactámicos que difieren en un único átomo de carbono de los péptidos nativos.



**Figura 1.13:** ( $\beta$ -LSAD) “ $\beta$ -Lactam Scaffold-Assisted Design”: Peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos beta girados a partir de péptidos lineales extendidos. La mimetización simultánea de los protones  $C\alpha$ -H y NH de dos aminoácidos contiguos por un grupo  $CH_2$  provoca la estabilización de un giro  $\beta$ -II.

<sup>45</sup> (a) Benito, A. Tesis Doctoral, UPV-EHU. “Nuevos peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos: diseño, síntesis y análisis estructural” **2003**. (b) 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.

La aplicación del concepto  $\beta$ -LSAD a péptidos cíclicos la estudió primeramente I. Loinaz quien sintetizó en nuestro laboratorio el ciclopentapéptido  $\beta$ -lactámico de tipo RGD **III**, análogo del precursor *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] **I**<sup>46</sup> (**Figura 1.14**). A partir del estudio conformacional del mimético **III** en disolución acuosa por RMN y Dinámica Molecular, se llegó a la conclusión de que la  $\beta$ -lactama, sorprendentemente, estabilizaba giros- $\gamma$  en ciclopentapéptidos y no giros- $\beta$ , como ocurría en péptidos lineales o en el ciclopentapéptido **I**. Por último, ensayos de inhibición de adhesión de células HUVEC sobreexpresadas en integrina  $\alpha_v\beta_3$  y cultivadas sobre vitronectina, mostraron que el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **III** presenta una potencia inhibitoria muy superior a la del ciclopéptido **I** (**Figura 1.14**) y del mismo orden que la cilengitida **II**.

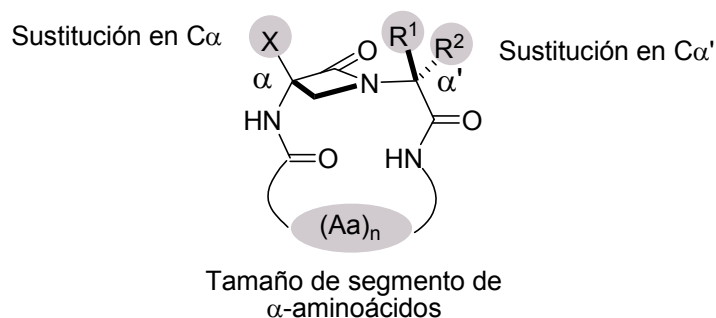


**Figura 1.14:** Estructura y conformación mayoritaria en disolución de los ciclopéptidos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] **I** y *ciclo*-[Asp-D-Phe-( $\beta$ -Lactama)-Arg-Gly] **III**.

A la vista de estos prometedores precedentes, nosotros pensamos explorar en mayor profundidad varios aspectos relacionados con el diseño, síntesis, comportamiento

<sup>46</sup> Loinaz, I. Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Estudio de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", 2004.

conformacional y actividad biológica de esta nueva familia de pentapéptidos cíclicos en los que el movimiento del macrociclo se halla restringido por una  $\alpha$ -alquil- $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactama (**Figura 1.15**). En concreto, pensamos que dicho estudio permitiría conocer en detalle las variaciones conformacionales provocadas en el macrociclo  $\beta$ -lactámico por variables estructurales tales como: la naturaleza del grupo X situado en la posición  $C\alpha$  de la  $\beta$ -lactama, la sustitución y configuración en  $C\alpha'$  y la alteración del número de residuos del ciclopéptido.



**Figura 1.15:** Variables estructurales con posible efecto sobre la conformación de ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos.

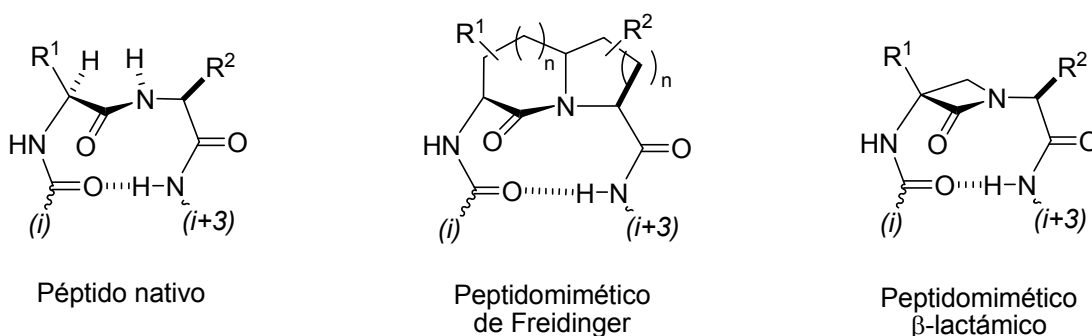
## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 HIPÓTESIS

### 2.1.1. Las $\beta$ -lactamas como elementos de restricción conformacional en ciclopentapéptidos RGD

La principal diferencia entre los peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos y otros miméticos lactámicos betágenos convencionales como las lactamas de Freidinger (**Figura 2.1**) es la posibilidad de incluir diferentes grupos de reconocimiento molecular diferenciando los elementos de restricción y de reconocimiento.

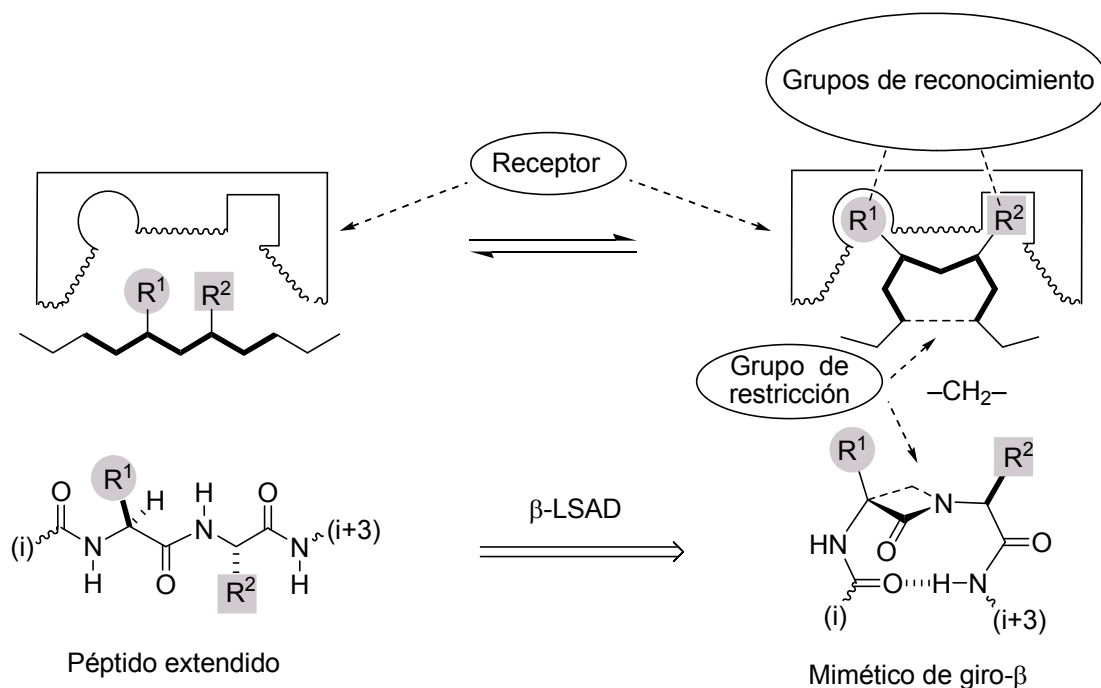


**Figura 2.1:** Comparación de un péptido (*giro- $\beta$  II*) con peptidomiméticos convencionales (*miméticos de Freidinger*) y con peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos.

Como se ha mencionado anteriormente, el reducido volumen estérico del grupo metileno presente en la posición  $\beta$  de los peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos permite una mimetización simultánea de los protones  $C\alpha-H$  ( $i+1$ ) y  $NH$  ( $i+2$ ), por lo que dicho grupo puede actuar, exclusivamente, como elemento de restricción conformacional sin perturbar las interacciones de reconocimiento del receptor con los grupos  $R^1$  y  $R^2$ . A diferencia de lo que ocurre en los peptidomiméticos betágenos de Freidinger, el hecho de poder retener o modificar de manera sencilla el grupo  $R^1$  y/o  $R^2$ , puede facilitar considerablemente el diseño de familias de compuestos estructuralmente homogéneas y simplificar la interpretación de las relaciones estructura/actividad, especialmente en el caso de los miméticos ditópicos. (**Figura 2.2**).

A la vista de las ventajas potenciales de los peptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos de tipo  $\beta$ -LSAD nos propusimos extender este diseño a diversos pentapéptidos cíclicos, tanto triviales como de tipo RGD. Partiendo de la hipótesis de que el carácter gammágeno de las  $\alpha$ -alquil- $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactamas se mantendría en dichos ciclopéptidos, supusimos

que podrían constituir una familia interesante de miméticos RGD para la inhibición selectiva de integrinas.



**Figura 2.2:** Principio de diseño " $\beta$ -LSAD" aplicado a receptores ditópicos: El grupo metileno genera una fuerte restricción en la flexibilidad de la cadena peptídica pero, debido a su reducido tamaño, no provoca interacciones indeseadas con el receptor.

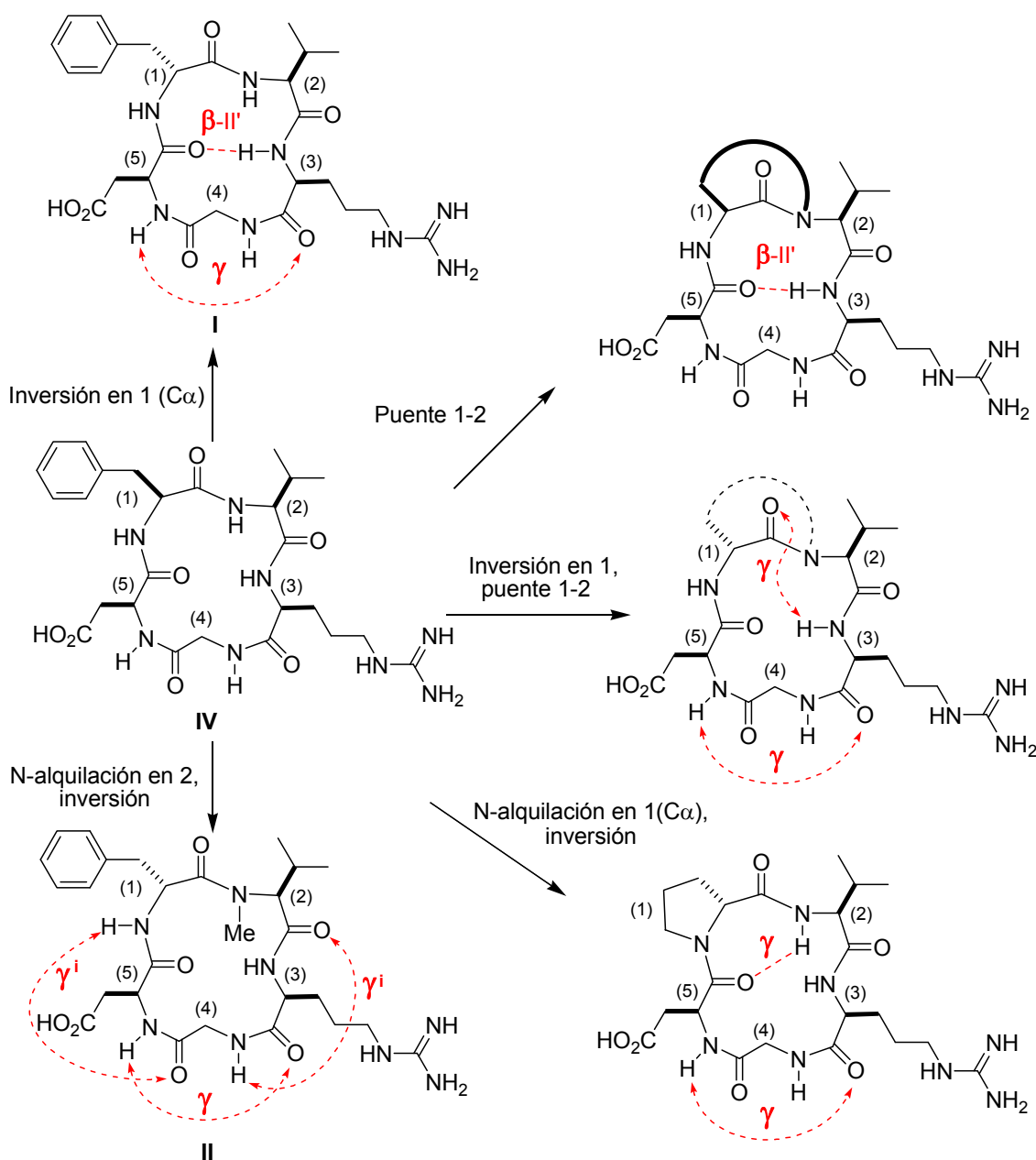
### 2.1.2. Control de enlaces de hidrógeno en peptidomiméticos cíclicos de tipo RGD

Como se ha anticipado en el apartado 1.3.2, Kessler ha descrito una serie de modificaciones estructurales en los aminoácidos de las posiciones (1) y (2) de un ciclopentapéptido RGD "todo-L" del tipo *ciclo*-[Arg-Gly-Asp-Aa(1)-Aa(2)] **IV** (**Esquema 2.1**). De este modo descubrió que, dependiendo del tipo de modificación, se formaban diferentes enlaces de hidrógeno intramoleculares que afectan a la conformación final del macrociclo.

A partir de este estudio, Kessler estableció que eran más activos frente a integrinas  $\alpha_v\beta_3$  los ciclopentapéptidos RGD con grupos hidrofóbicos en la posición  $\text{C}\alpha$  del residuo Aa (1) y que, sin embargo, el sustituyente del residuo Aa (2) no era importante para dicha actividad. Además, aunque los ciclopentapéptidos con un aminoácido de configuración invertida (D) en la posición (1) fueran más activos que la cilengitida **II**, en



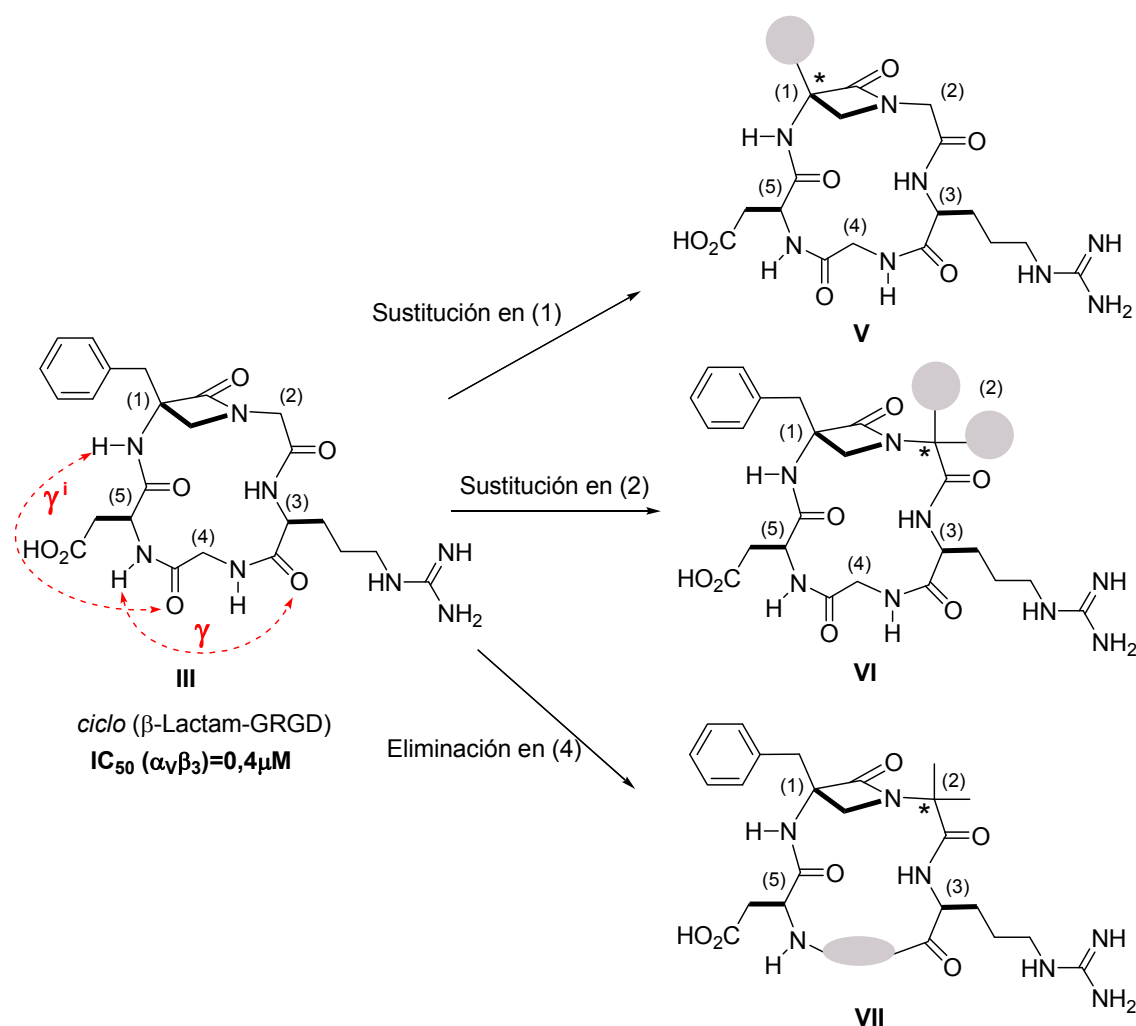
general eran poco selectivos para discriminar entre sí las integrinas  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , probablemente debido a la flexibilidad residual de sus estructuras.



**Esquema 2.1:** Variación del sistema de enlaces de hidrógeno intramoleculares en el ciclopentapéptido RGD "todo L" (IV) en función de las modificaciones estructurales efectuadas en los residuos Aa (1) y Aa (2).

Por otra parte, es conocido que secuencias peptídicas en las que se intercala un aminoácido de configuración invertida tipo (D)-Aa-(L)-Aa, así como las secuencias (D)-Aa-Gly y (D)-Aa-Aib, estabilizan giros de tipo  $\beta-II'$  en péptidos abiertos<sup>13</sup>. Sin embargo, en peptidomiméticos cíclicos, esta tendencia no se cumple en todos los casos, alternándose giros de tipo  $\beta-II'$  y  $\gamma$  (**Esquema 2.1**).

Además, se observó en nuestro laboratorio que la introducción de diferentes sustituyentes en el resto Aa (i+2) de péptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos abiertos provoca alteraciones en el carácter betágено o gammágено de los péptidos  $\beta$ -lactámicos abiertos<sup>47</sup>. Por ello, nosotros pensamos que una modificación similar en el residuo Aa (2) de los equivalentes cíclicos podría tener una influencia considerable en su comportamiento conformacional.



**Equema 2.2:** Algunas variaciones estructurales proyectadas a partir del ciclopentapéptido  $\beta$ -lactámico III para generar alteraciones de su sistema de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Para aclarar las cuestiones arriba mencionadas, supusimos que la incorporación de restos Aa (1) y Aa (2) de diferente configuración en ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos también

<sup>47</sup> Balentová, E. Tesis Doctoral, "Stereocontrolled Synthesis of  $\beta$ -Lactam Peptides", Ph.D. Thesis, P.J. Safarik University (Slovakia)/EHU-UPV. 2006.

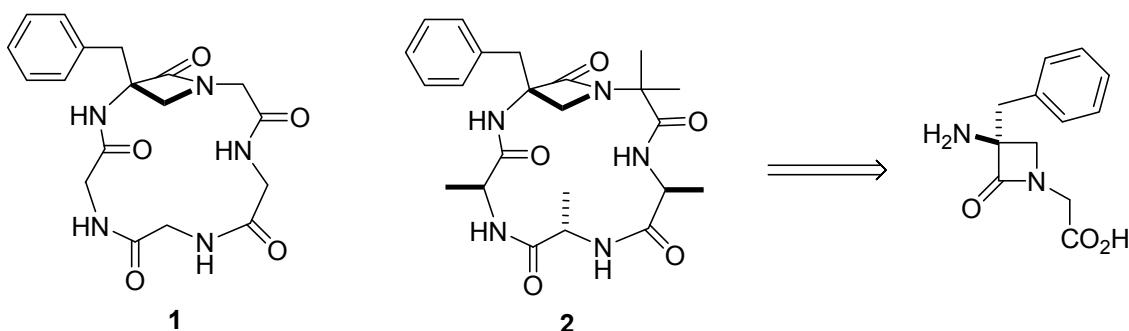
podría alterar su red de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Entre las diferentes variaciones estructurales que se pueden efectuar para poner de manifiesto dichos efectos, nosotros seleccionamos los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos de RGD **V**, **VI** y **VII** tomando como variables: a) el número de residuos del ciclopéptido, b) la naturaleza del sustituyente del residuo Aa (1), y c) la configuración y naturaleza de los sustituyentes del residuo Aa (2) (**Esquema 2.2**).

## 2.2. OBJETIVOS:

En base a las hipótesis y consideraciones anteriores, y con los propósitos generales de: a) comprender en profundidad el efecto de restricción conformacional ejercido por el anillo  $\beta$ -lactámico en péptidos cíclicos de cinco residuos, y b) aplicar dicho conocimiento a la optimización de miméticos RGD, se establecieron los siguientes objetivos:

### 1. Síntesis y estudio conformacional de modelos de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de glicina y alanina

En primer lugar, nos propusimos sintetizar los modelos de ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[Gly<sub>3</sub>- $\beta$ -Lactam-Gly]<sup>48</sup> **1** y *ciclo*-[Ala<sub>3</sub>- $\beta$ -Lactam-Aib] **2** a partir de la (*S*)- $\alpha$ -amino- $\alpha$ -bencil-N-carboximetil- $\beta$ -lactama enantiopura que se muestra en el siguiente esquema retrosintético.



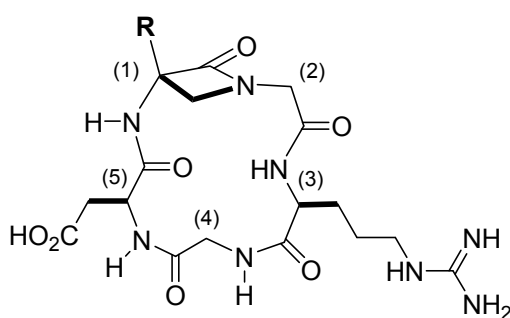
<sup>48</sup> El residuo ( $\beta$ -Lactam) se utilizará en adelante para indicar la (*S*)-3-amino-3-bencilazetidín-2-ona. La nomenclatura empleada corresponde a la denominación abreviada de péptidos con la cadena orientada de los grupos N-terminales a los C-terminales.

Dichos modelos fueron seleccionados por contener residuos aquirales de glicina (en **1**) como cadenas de configuración natural “todo L” (en **2**) parecidos a los modelos *ciclo*-[D-Pro-L-Ala<sub>4</sub>] de Kessler.

A partir de su análisis conformacional en disolución se podría determinar la capacidad intrínseca que ejerce el anillo de β-lactama como agente de restricción conformacional en ciclopeptidos sencillos con residuos (Gly, Ala) carentes de grupos funcionales adicionales.

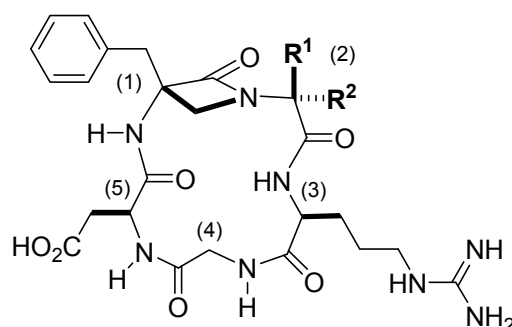
## 2. Síntesis de ciclopeptidos β-lactámicos RGD con diferentes sustituyentes en la β-lactama (R) y en el residuo Aa (2).

Seguidamente, se propuso sintetizar los peptidomiméticos β-lactámicos cíclicos de tipo RGD **3** y **4** que incorporan las siguientes variables estructurales:



**3a** R= Me

**3b** R= 3-F<sub>3</sub>C-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>



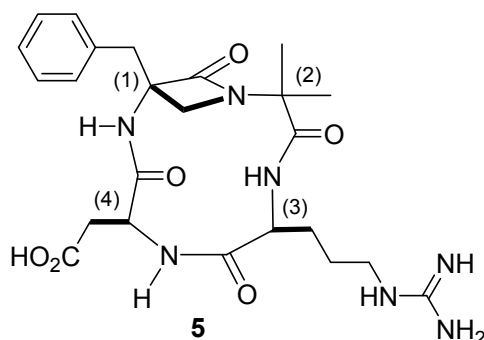
**4a** R<sup>1</sup>= Me; R<sup>2</sup>= H

**4b** R<sup>1</sup>= H; R<sup>2</sup>= Me

**4c** R<sup>1</sup>= R<sup>2</sup>= Me

- 1) Poseer diferentes grupos en la posición C $\alpha$  (1) de la β-lactama obtenidos por alquilación de la misma con diferentes grupos electrófilos. Concretamente se seleccionó un grupo de pequeño volumen estérico (**3a**, R=Me) y otro voluminoso y polarizado (**3b**, R=3-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>)
- 2) Poseer diferentes residuos Aa (2) contiguos a la β-lactama, con diferente grado de sustitución y configuración.

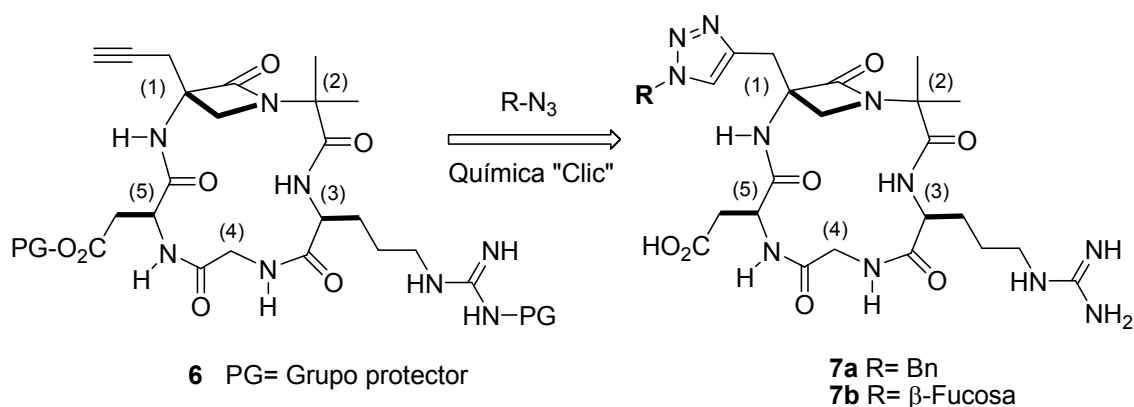
### 3. Síntesis de un ciclopéptido $\beta$ -lactámico de tipo RGD carente del resto Gly



Se planteó la síntesis del ciclotetrapéptido  $\beta$ -lactámico **5**, de menor tamaño que **3** y **4**, para comparar su sistema de enlaces de hidrógeno intramoleculares y su actividad inhibitoria de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  con la de los correspondientes pentapéptidos cíclicos RGD **3** y **4**.

### 4. Estudio de la modificación química de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos RGD mediante reacciones de cicloadición alquino-azida.

Tras preparar los nuevos miméticos propargílicos **6**, se planteó estudiar su modificación con diferentes azidas a través de cicloadiciones "clic" 1,3-dipolares catalizadas por Cu(I) para formar los 1,2,3-triazoles  $\beta$ -lactámicos.



### 5. Exámen del sistema de enlaces de hidrógeno intramoleculares de los ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam] **4a**, **4b**, **4c** y **5**.

Se seleccionaron los ciclopéptidos RGD **4a-c** y **5** para llevar a cabo su análisis conformacional en disolución acuosa empleando técnicas de RMN (deriva térmica,

NOESY-ROESY) y Dinámica Molecular. Con ello se pretendió conocer la distribución de sus principales conformeros

**6. Evaluación biológica de los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam-Gly] **3a**, **3b**, **7a** y **7b** frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .**

Para evaluar la actividad biológica de los ciclopeptidos RGD preparados se planteó realizar ensayos de inhibición de adhesión celular de células endotélicas de vena umbilical humana (HUVEC) en presencia de los miméticos  $\beta$ -lactámicos RGD **3a-b**, **4a-c**, **5** y **7a-b**. De este modo, se esperaba conocer la relación existente entre su potencia, su conformación y la estructura de los sustituyentes.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

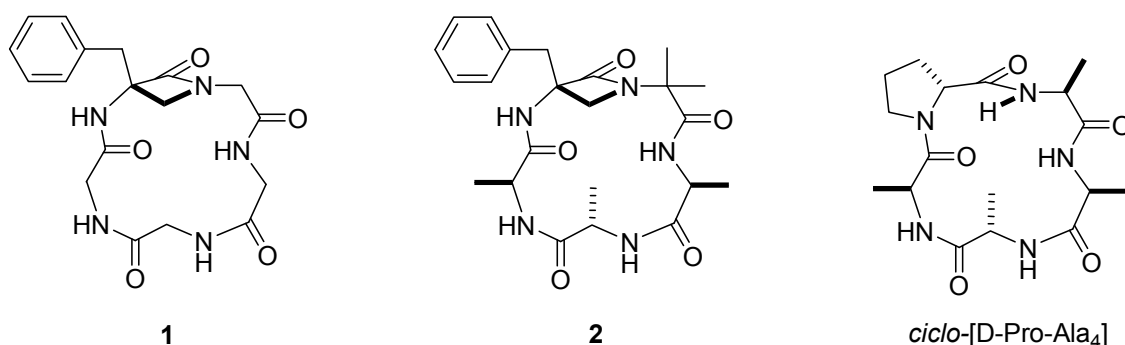




### 3.1. Síntesis y análisis conformacional de los ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos **1**, del tipo *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly<sub>4</sub>] y **2**, del tipo *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala<sub>3</sub>]

De acuerdo con nuestro plan de trabajo, en primer lugar pasamos a estudiar el comportamiento conformacional de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2**, cuyas estructuras fueron seleccionadas como modelos para representar secuencias de residuos no sustituidos (Gly) y monosustituidos (Ala).

Tras determinar la estructura de sus redes de enlaces de hidrógeno intramoleculares, se llevará a cabo un estudio comparativo con el *ciclo*-[D-Pro-(Ala)<sub>4</sub>] propuesto por Kessler para establecer la contribución intrínseca del anillo  $\beta$ -lactámico en la conformación de los correspondientes peptidomiméticos.



**Figura 3.1.** Estructura de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[Gly<sub>3</sub>- $\beta$ -Lactam-Gly] **1**, *ciclo*-[Ala<sub>3</sub>- $\beta$ -Lactam-Aib] **2** y el *ciclo*-[D-Pro-Ala<sub>4</sub>] propuesto por Kessler.

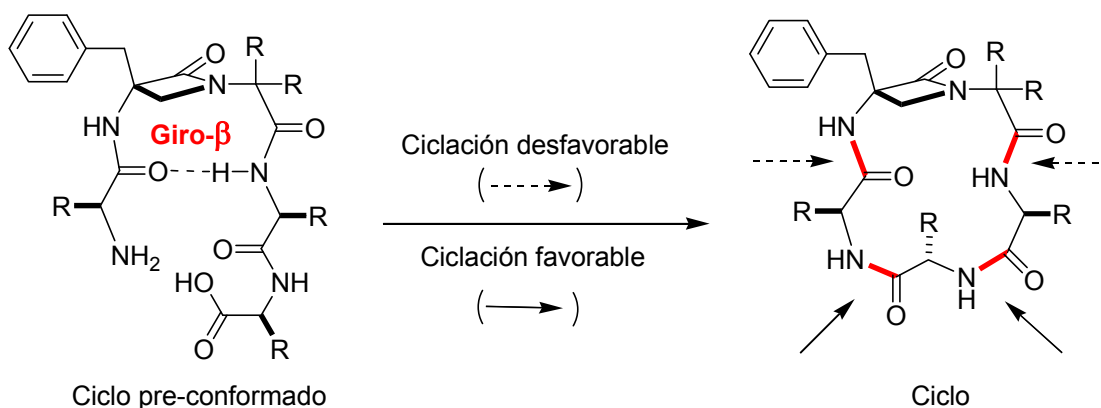
En los siguientes apartados se describe la síntesis de los ciclos **1** y **2** y finalmente su análisis conformacional en disolución mediante técnicas de RMN.

#### 3.1.1. Plan de síntesis

Los aspectos críticos a considerar en el plan de síntesis de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2** fueron los siguientes: a) decidir el enlace peptídico idóneo para la ciclación del pentapéptido abierto, b) seleccionar el sistema de grupos protectores compatible con las reacciones de acoplamiento peptídico y de macrolactamización, c) elegir el método para la preparación del segmento central de N-carboximetil- $\beta$ -lactama

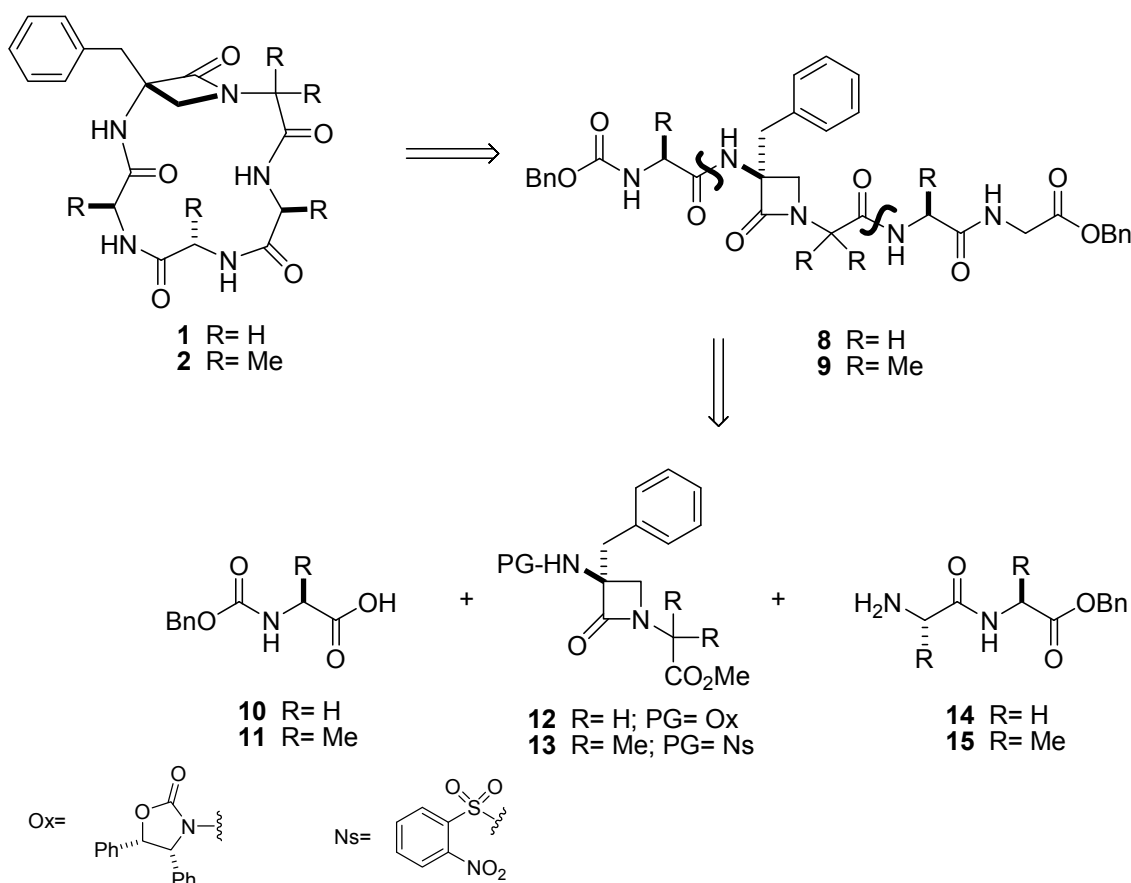
y, d) seleccionar los reactivos y condiciones idóneos para llevar a cabo los sucesivos acoplamientos peptídicos y, sobre todo, para la etapa de ciclación.

En cuanto al primer punto, la introducción de una  $\beta$ -lactama en una cadena peptídica abierta favorecer una preorganización  $\beta$ -girada de acuerdo con el principio  $\beta$ -LSAD mencionado anteriormente (ver **Figura 1.13**, pag.18), por lo que supusimos que el mejor enlace amídico para llevar a cabo la ciclación sería aquél que fuese inmediatamente anterior o posterior al enlace de hidrógeno<sup>19</sup> generado en torno a la  $\beta$ -lactama. En esta disposición los extremos  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{CO}_2\text{H}$  de la cadena peptídica se situarían próximos entre sí facilitando la condensación intramolecular y, por tanto, la ciclación del péptido. De acuerdo con este criterio, únicamente las dos posiciones mostradas en el **Esquema 3.1** serían potencialmente favorables:



**Esquema 3.1.** Los péptidos abiertos  $\beta$ -lactámicos adoptan conformaciones giradas que favorecen su ciclación. Las flechas continuas señalan los enlaces peptídicos idóneos para la formación del macrociclo.

Como grupos protectores de los extremos N- y C-terminales de los péptidos lineales se eligieron respectivamente los grupos Cbz y bencilo (**Esquema 3.2**), ya que su desprotección por hidrogenación catalítica puede llevarse acabo en condiciones muy suaves en la etapa previa a la ciclación. Consecuentemente, en los fragmentos peptídicos intermedios, los grupos amino y carboxilo se protegieron como  $\text{NH}^t\text{Boc}$  y  $\text{CO}_2^t\text{Bu}$ , empleando grupos protectores ortogonales a los anteriores.



### Esquema 3.2: Retrosíntesis de los ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos 1 y 2

Como fragmentos  $\beta$ -lactámicos centrales se seleccionaron los intermedios **12** y **13**. Para el caso del *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-Gly<sub>4</sub>] **1** se pensó emplear el intermedio **12** cuya preparación se llevó a cabo a través de una cicloadición [2+2] tipo Staudinger que ya había sido descrita anteriormente en nuestro laboratorio<sup>49</sup>. Análogamente, la preparación del *ciclo*-[Ala<sub>3</sub>- $\beta$ -Lactam-Aib] **2** se planteó a través del intermedio **13**, asequible mediante un método desarrollado recientemente por nosotros y que se basa en la condensación intramolecular de  $\beta$ -aminoésteres obtenidos mediante la apertura regioselectiva de *N*-nosil-aziridinas  $\alpha$  sustituidas con aminas o  $\alpha$ -aminoésteres<sup>50</sup>.

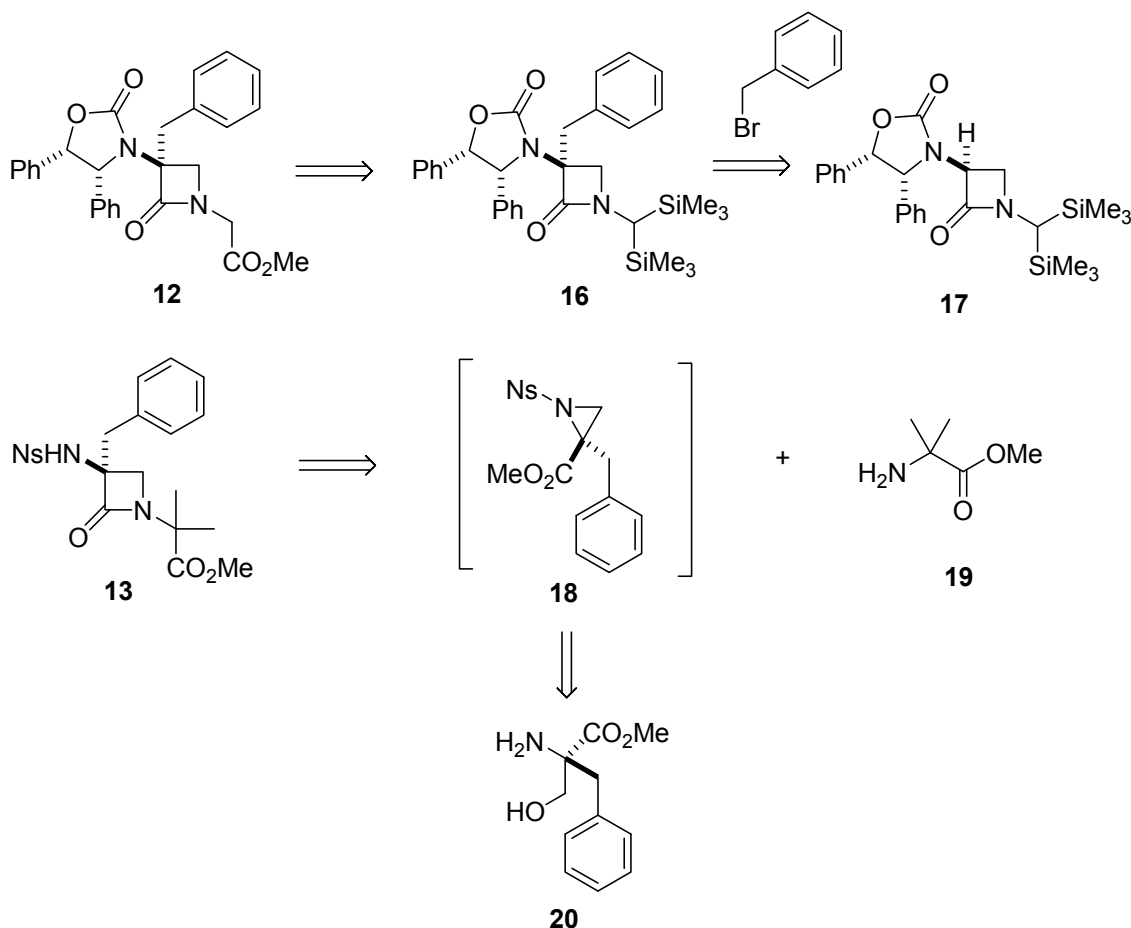
Por último, para los sucesivos acoplamiento peptídicos nos planteamos emplear inicialmente la carbodiimida hidrosoluble EDC·HCl aunque, como se detallará en los apartados posteriores, también se emplearon otros reactivos a fin de optimizar los diferentes acoplamiento inter- e intramoleculares.

<sup>49</sup> (a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Legido, M.; Galarza, R.; Deya, P. M.; Dunogues, J.; Picard, J. P.; Ricci, A.; Seconi, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1239-1241. (b) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Legido, M.; Mielgo, A.; Galarza, R. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1432-1441.

<sup>50</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentova, E.; Jimenez, A.; Oyarbide, J.; Fratila, R. M.; Miranda, J. I. *Org. Lett.* **2007**, 9, 101-104.

### 3.1.2. Síntesis de moldes $\beta$ -lactámicos

Como se ha indicado en el apartado anterior, en nuestro laboratorio se han puesto a punto dos métodos para preparar las formas enantiopuras de las  $\alpha$ -alquil- $\alpha$ -amino-(N-carboximetil)- $\beta$ -lactamas no sustituidas en la posición  $\beta$ . El primero de ellos se basa en la  $\alpha$ -alquilación de la N-[bis(trimetilsilil)metil]- $\beta$ -lactama **17**<sup>51</sup> y el segundo en la apertura estereoselectiva de anillos de N-nosil-aziridina del tipo **18** con  $\alpha$ -aminoésteres<sup>50,52</sup>



**Esquema 3.3:** Retrosíntesis de los fragmentos  $\beta$ -lactámicos **12** y **13**.

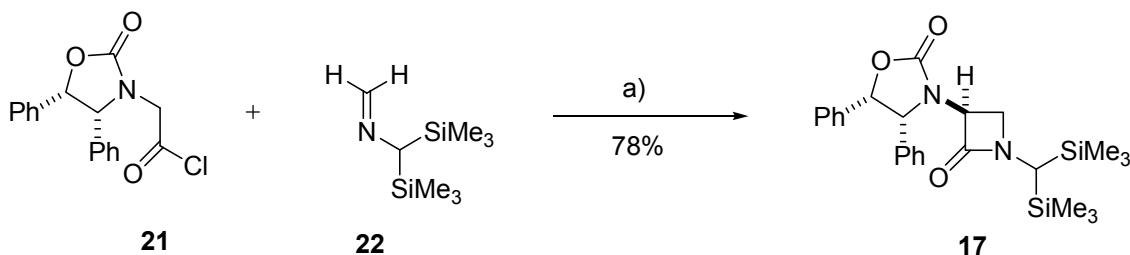
En el **Esquema 3.3** se muestran los análisis retrosintéticos de ambas vías aplicados, respectivamente, a los moldes  $\beta$ -lactámicos **12** y **13**. En los siguientes apartados de este capítulo se describirán los detalles de su síntesis.

<sup>51</sup> (a) Ref. 49(b). (b) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Galarza, R.; Benito, A.; Khamrai, U.K.; Eikeseth, U.; Linden, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5563-5570. (c) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Galarza, R.; Khamrai, U.K.; Vazquez, J.; DePascual-Teresa, B.; Nieto, P. M.; Linden, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3056-3058. (d) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Legido, M.; Galarza, R. *Chem. Commun.* **1997**, 233-234.

<sup>52</sup> (a) Maligres, P. E. See, M. M.; Askin, D.; Reider, P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5253-5256. (b) Kan, T.; Fukuyama, T. *Chem. Commun.* **2004**, 353-359. (c) Kim, B. M.; So, S. M.; Choi, H. J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 949-952.

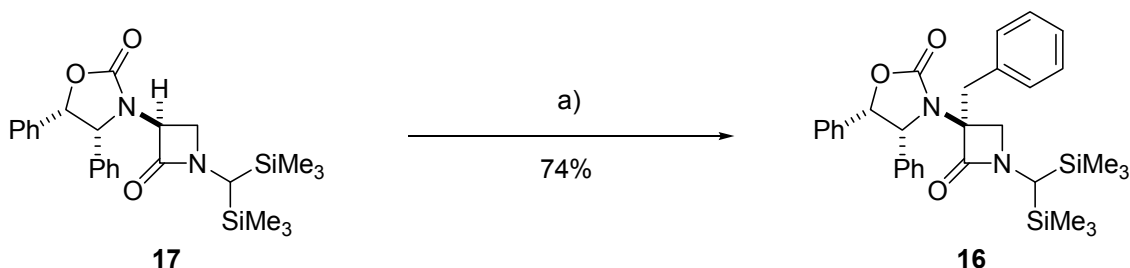
### 3.1.2.1. Síntesis de $\alpha$ -amino- $\alpha$ -bencil-N-[(metoxycarbonil)metil]- $\beta$ -lactamas a partir de N-[bis(trimetilsilil)metil]- $\beta$ -lactamas

La cicloadición [2+2] de Staudinger entre la cetena derivada del cloruro de ácido **21** y la imina **22**<sup>49</sup> se llevó a cabo en cloroformo a reflujo y en presencia de trietilamina y tamiz molecular. La reacción fue completamente diastereoselectiva, obteniéndose un único isómero.



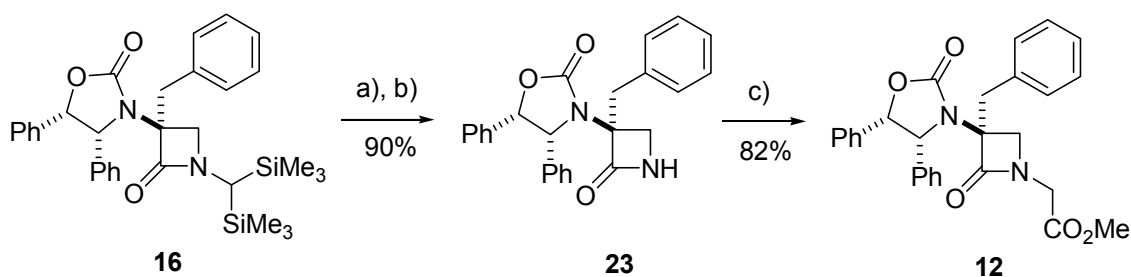
**Esquema 3.4:** a)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , tamiz molecular 4Å reflujo, 16h.

Tras preparar la  $\beta$ -lactama **17** se procedió a su alquilación utilizando LDA y bromuro de bencilo. Ello condujo a la correspondiente  $\alpha$ -bencil- $\beta$ -lactama **16** de manera totalmente estereoselectiva.



**Esquema 3.5:** a) LDA, THF,  $-78^\circ\text{C}$ , 10min; luego  $\text{BnBr}$ , THF,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow t.a.$ , 16h.

La transformación de la  $\beta$ -lactama **16** en su correspondiente derivado N-carboximetilado **12** se llevó a cabo en dos pasos según un método descrito en nuestro laboratorio<sup>49,50</sup> (**Esquema 3.6**). Primeramente se degradó el grupo bis(trimetilsilil)metilo mediante oxidación con nitrato de Cerio (IV) y amonio para dar una N-formil- $\beta$ -lactama intermedia (no mostrada en el esquema) que fue inmediatamente desformilada en medio básico a la NH- $\beta$ -lactama **23**. Dicha  $\beta$ -lactama fue seguidamente N-alquilada con bromoacetato de metilo en presencia de carbonato de cesio en acetonitrilo a reflujo obteniéndose la N-metoxycarbonilmetil  $\beta$ -lactama deseada **12**.



**Esquema 3.6:** a) CAN, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, t.a., 1h; b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> aq., MeOH, t.a., 2h; c) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me, CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 1.5h.

### 3.1.2.2. Síntesis de $\alpha$ -amino- $\alpha$ -bencil-N-[(metoxicarbonil)metil]- $\beta$ -lactamas a partir de N-nosil-aziridinas

Las aziridinas<sup>53</sup> son intermedios versátiles para la síntesis de aminoácidos, pirrolidonas, polímeros, y otros compuestos nitrogenados, así como electrófilos elaborados capaces de participar en reacciones aldólicas, sustituciones alílicas catalizadas por paladio, etc... También es conocido que las aziridinas pueden emplearse como precursoras en la síntesis de  $\beta$ -lactamas<sup>54</sup>.

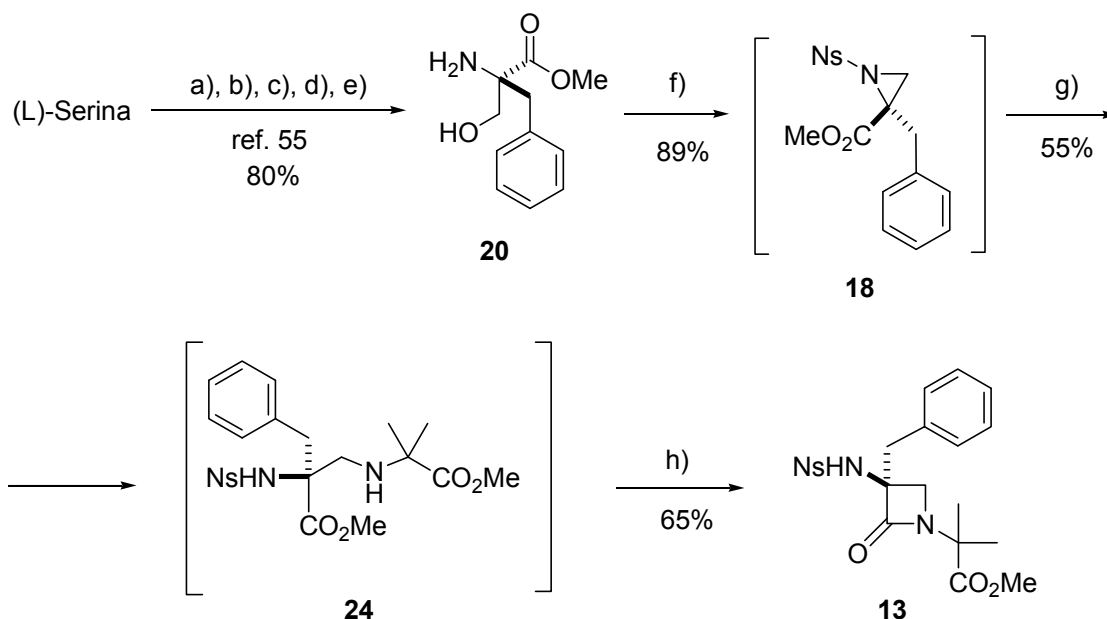
En nuestro laboratorio, se ha desarrollado recientemente un método para la síntesis de  $\beta$ -lactamas  $\alpha,\alpha'$ -polialquiladas basado en la apertura nucleófila de N-nosilaziridinas con aminas, seguida de ciclación de los  $\beta$ -aminoésteres resultantes en medio básico<sup>50</sup>. Aplicando este procedimiento (**Esquema 3.7**), la síntesis de la  $\beta$ -lactama **13** se llevó a cabo partiendo de la L-serina que se transformó en (S)-2-bencilserinato de metilo **20**, siguiendo el método descrito por Seebach<sup>55</sup>. Tras calentar el serinato **20** con dos equivalentes de cloruro de *o*-nosilo y KHCO<sub>3</sub> en acetonitrilo a reflujo se obtuvo la aziridina N-activada **18**, cuya apertura se llevó a cabo *in situ* con  $\alpha$ -amino-isobutirato de metilo **19**, formándose el correspondiente  $\beta$ -aminoéster **24**. Finalmente, dicho  $\beta$ -

<sup>53</sup> Revisiones: (a) Hu, X. E. *tetrahedron* 2004, 60, 2701-2743. (b) Pineschi, M. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 4979-4988. Para otros ejemplos: (c) Deyrup, J. A.; Clough, S. C. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 902-907. (d) Tanner, D.; Somfai, P.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1211-1214. (e) Tanner, D.; Somfai, P. *Tetrahedron* **1988**, 44, 619-624. (f) Van der Steen, E. H.; van Koten, G. *Tetrahedron* **1991**, 47, 7503-7525. (g) Cainelli, G.; Panunzio, M.; Giacomini, D. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 121-124. (h) Kang, S. H.; Kim, M.; Ryu, D. H. *Synlett* **2003**, 1149-1150. (i) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

<sup>54</sup> Turner, J. J.; Sikkema, F. D.; Filippov, D. V.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Synlett* **2001**, 1727-1730.

<sup>55</sup> (a) Seebach, D.; Aebi, J. D. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2545-2548. (b) Seebach, D.; Aebi, J. D.; Gander-Coquoz, M.; Naef, R. *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1194-1216. (c) Krimen, L. I. *Org. Synth.* **1970**, 50, 1.

aminoéster fue ciclado con bis(trimetilsilil)amiduro de litio<sup>56</sup> en THF para dar la  $\beta$ -lactama deseada **13**.



**Esquema 3.7:** a) MeCOCl/MeOH, 0°C  $\rightarrow$  reflujo, 2h; b) <sup>t</sup>BuCHO, Et<sub>3</sub>N, pentano, reflujo, 16h; c) Anhídrido acético-fórmico, Et<sub>2</sub>O, 0°C, 6h; d) LDA, HMPA, BnBr, THF, -78°C  $\rightarrow$  t.a., 16h; e) 12M HCl, MeOH, reflujo, 12h, luego NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOAc; f) NsCl, KHCO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 16h; g) H<sub>2</sub>NcMe<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me (**19**), MeCN; h) LHMDs, THF, 0°C.

### 3.1.3. Síntesis de pseudopéptidos lineales precursores de ciclopentapéptidos $\beta$ -lactámicos

#### 3.1.3.1. Cbz-Gly- $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly<sub>3</sub>-OBn **8**

Una vez sintetizada la  $\beta$ -lactama **12**, se procedió a su acoplamiento con los restos de glicina necesarios y convenientemente protegidos siguiendo la secuencia sintética que se muestra en el **Esquema 3.8**. Primero se desprotegió el grupo 4,5-difeniloxazolidinilo del compuesto **12** mediante hidrogenación catalítica a media presión. La  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactama intermedia resultante no se purificó y se acopló con la glicina N-prottegida Cbz-Gly-OH. La reacción se llevó a cabo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco empleando reactivos

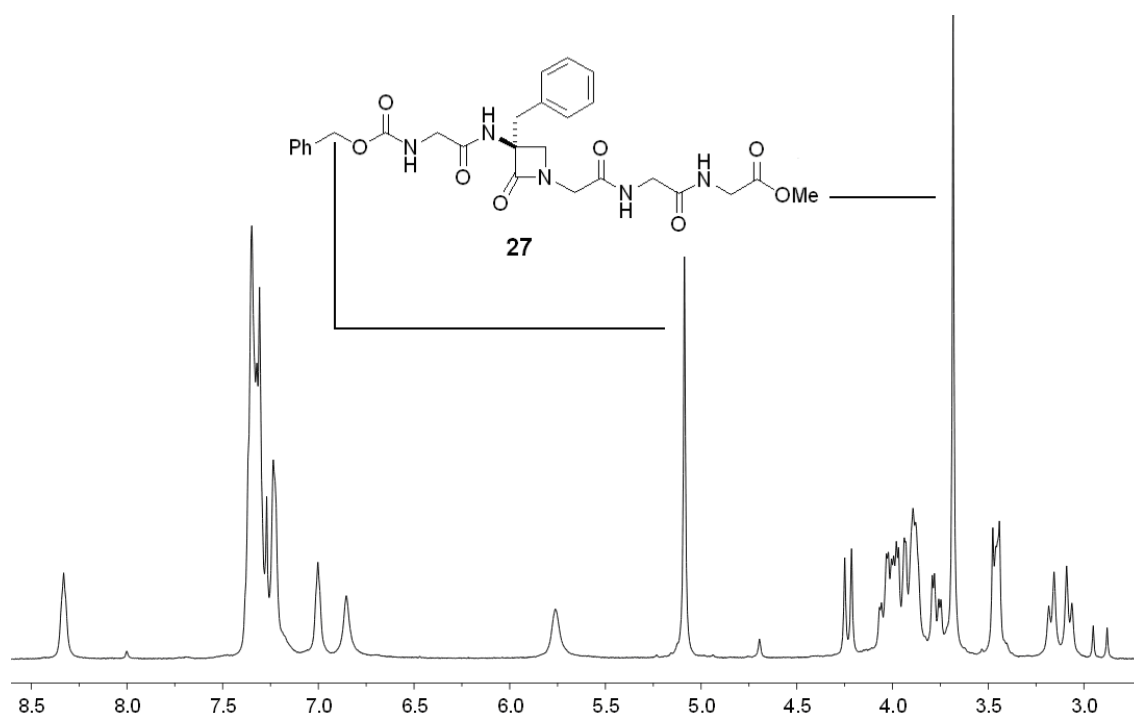
<sup>56</sup> Vicario, J. L.; Badía, D.; Carrillo, L. J. *Org. Chem.* **2001**, 66, 9030-9032.

The reaction scheme illustrates the synthesis of compound **8** from compound **12** through a four-step process:

- Compound **12** (a bicyclic amide with a phenyl group, a benzyl group, and a methyl ester) is converted to compound **25** (a bicyclic amide with a phenyl group, a benzyl group, and a methyl ester) via steps a) and b) in 65% yield.
- Compound **25** is converted to compound **26** (a bicyclic amide with a phenyl group, a benzyl group, and a carboxylic acid) via step c) in 97% yield.
- Compound **26** is converted to compound **8** (a bicyclic amide with a phenyl group, a benzyl group, and a carboxylic acid) via step d) in 65% yield.

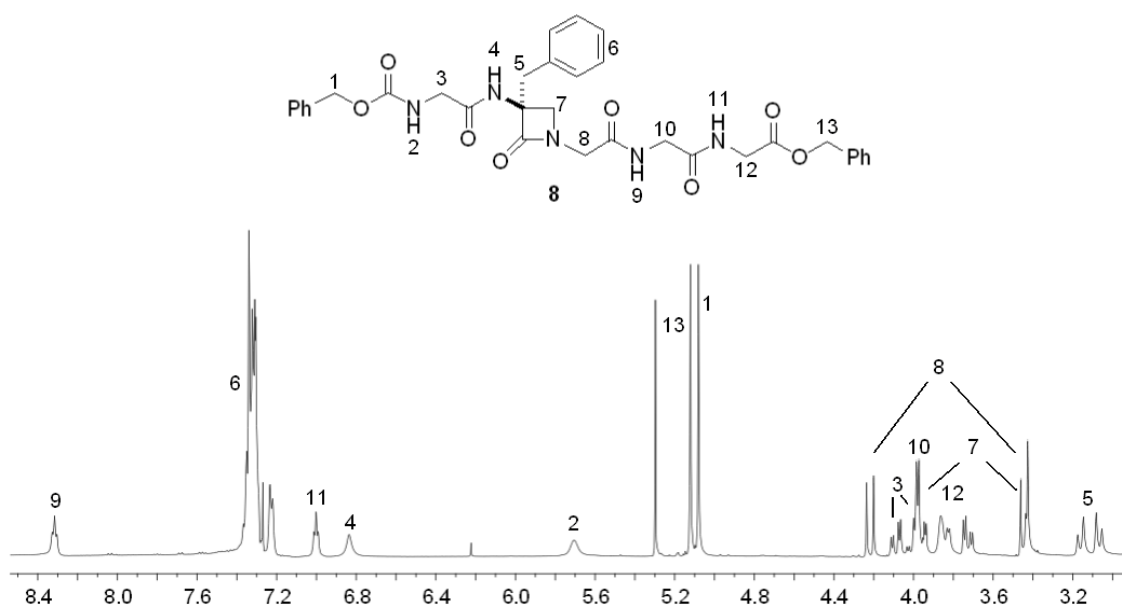
Tras saponificar el éster metílico del compuesto **25** con hidróxido de litio en una mezcla de THF y agua, se obtuvo la N-carboximetil-β-lactama **26**. Finalmente, ésta se acopló con el dipéptido C-protégido H-Gly-Gly-OBn **14** en condiciones similares a las empleadas anteriormente. El pseudopéptido β-lactámico **8** así obtenido, resultó ser sorprendentemente inestable en medio ácido. De hecho, se observó que al purificarlo en gel de sílice con una mezcla MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente se producía su transesterificación espontánea del éster bencílico C-terminal al éster metílico, por reacción con el metanol empleado como eluyente. En la **Figura 3.2** se muestra el espectro RMN del pseudopéptido **27** formado tras la transesterificación y se indica la señal correspondiente al nuevo éster metílico.





**Figura 3.2:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del pseudopéptido  $\beta$ -lactámico **27** formado por transesterificación espontánea de **8**.

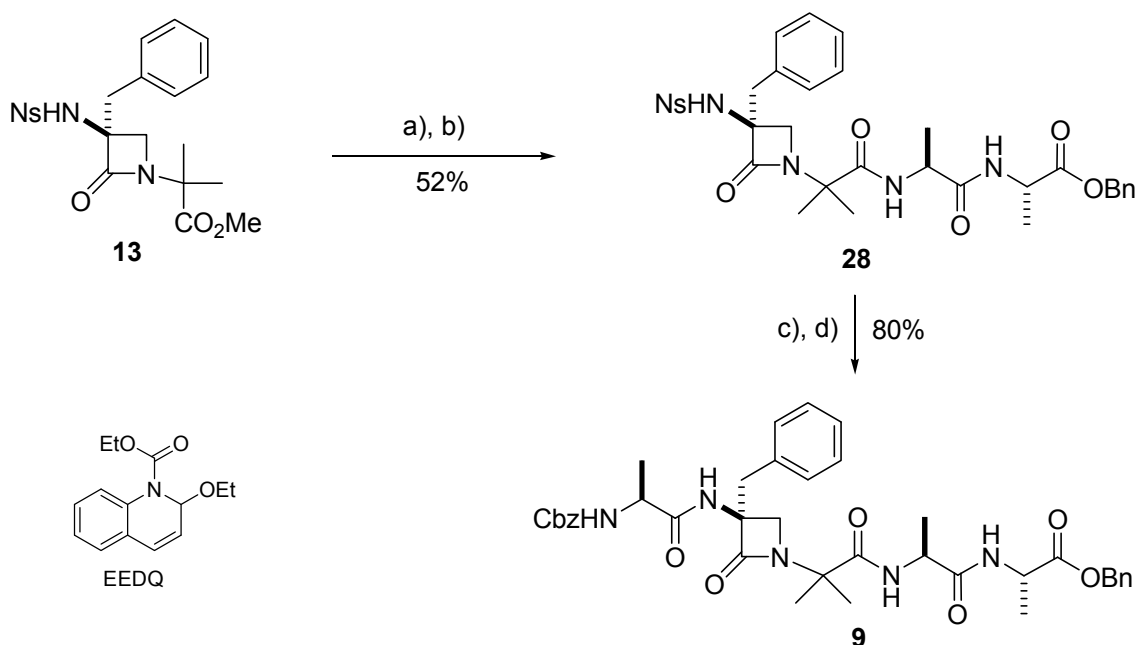
Para evitar esta transformación imprevista se decidió realizar su desprotección mediante hidrogenólisis (ver apartado 3.1.3.3) empleando directamente el crudo de reacción del compuesto **8**, que presentaba una alta pureza de acuerdo con el espectro  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del pseudopéptido  $\beta$ -lactámico **8** en  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.1.3.2. Cbz-Ala-β-Lactam(Bn)-Aib-Ala<sub>2</sub>-OBn **9**

Para la preparación del análogo portador de residuos de alanina se partió de la α-nosilamino-β-lactama **13** (**Esquema 3.9**). Tras desproteger el éster metílico por saponificación, el acoplamiento peptídico del ácido β-lactámico resultante con el dipéptido de alanina H-Ala-Ala-OBn **15** se llevó a cabo con la 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Este reactivo es conocido por ser particularmente eficiente en acoplamientos peptídicos entre aminoácidos impedidos<sup>57</sup>. De hecho, observamos que la transformación **13** → **28** no tenía lugar con los reactivos habituales, EDC y HOBT, recuperándose el ácido carboxílico intermedio. Sin embargo, empleando EEDQ se obtuvo el producto deseado con un rendimiento global del 52% tras purificación por cromatografía de columna.



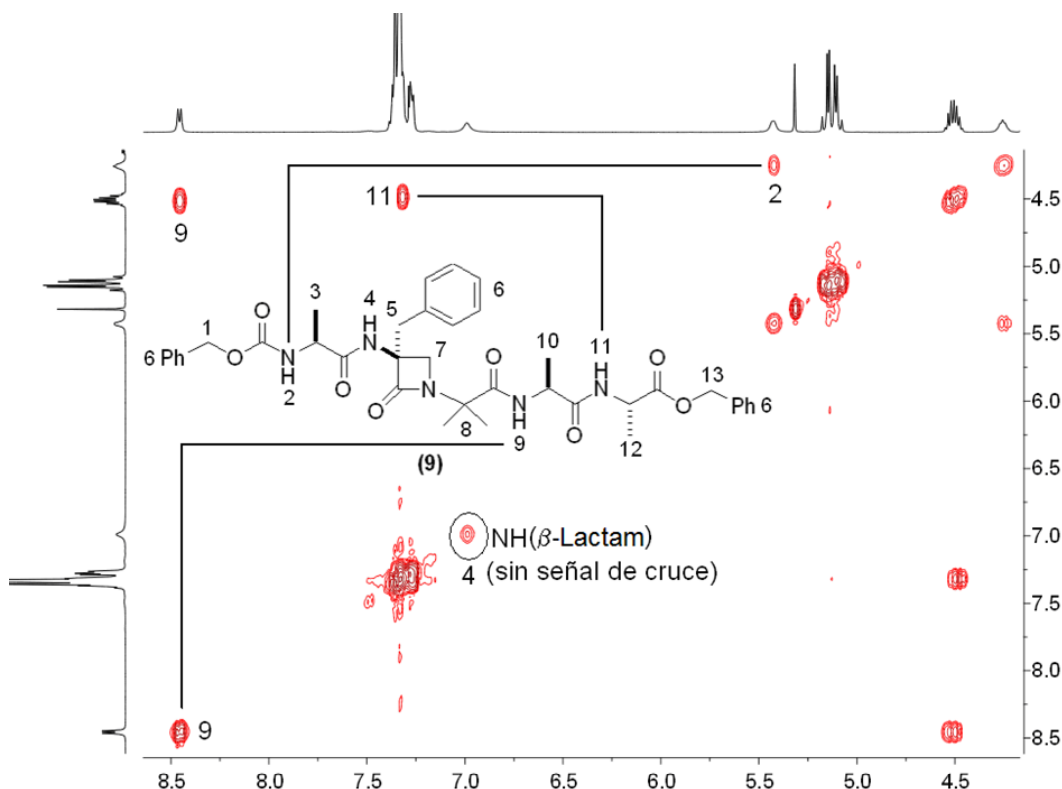
**Esquema 3.9:** a) LiOH·H<sub>2</sub>O (10eq), THF/H<sub>2</sub>O, 0°C → t.a., 1h; b) H-Ala-Ala-OBn (**15**) (1.2eq), EEDQ (2.0eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a., 16h; c) PhSH (2eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1eq), MeCN, t.a., 1.5 h; d) Cbz-Ala-OH (1.1eq), HOBT (1.2eq), Et<sub>3</sub>N (5eq), EDC·HCl (2.0eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a., 16h.

El péptido **28** se desprotegió del grupo N-nosilo por reacción con tiofenol y carbonato potásico, siguiendo el método de Maligres<sup>52(a)</sup> (**Esquema 3.9**). El crudo obtenido no se purificó y se acopló “in situ” con Cbz-Ala-OH empleando el método de la carbodiimida (EDC, HOBT). Es preciso señalar que el 2-tiofenilnitrobenzoceno formado como

<sup>57</sup> (a) Sipos, F.; Gaston, D. W. *Synthesis*, **1971**, 321-322; (b) Chan, T. Y.; Chen, A.; Allanson, N.; Chen, R.; Liu, D.; Sofia, M. J. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 8097-8100.

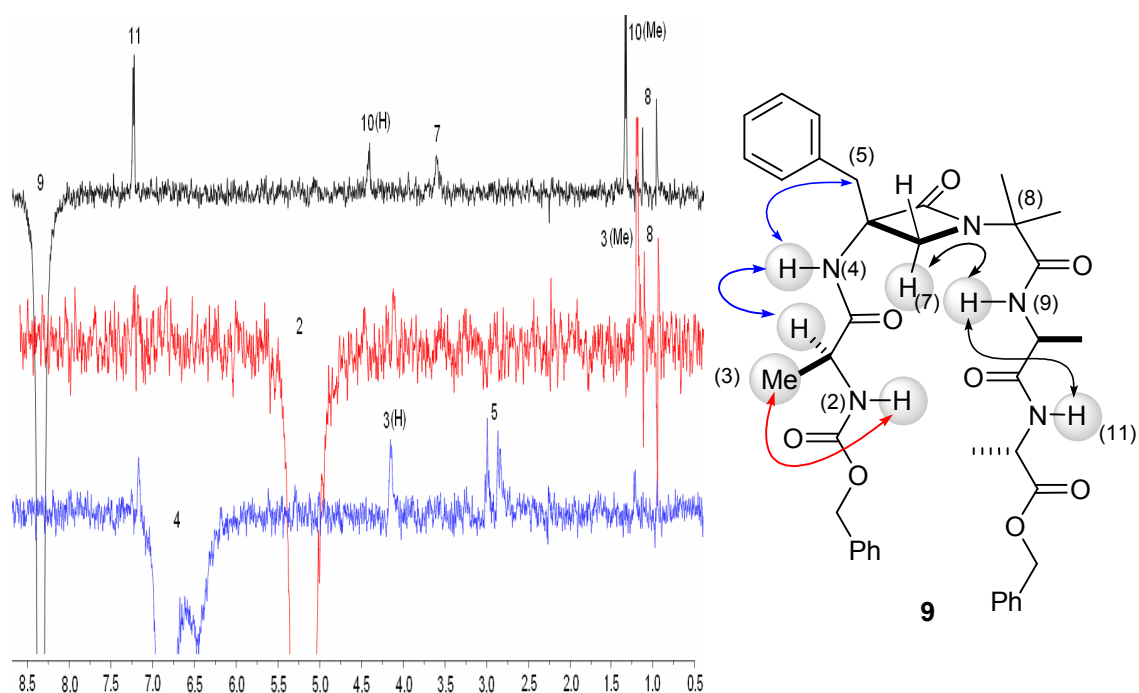
subproducto de la desprotección no interfirió a la posterior reacción de acoplamiento, pudiendo ser separado fácilmente por cromatografía de columna durante la purificación del pseudopéptido  $\beta$ -lactámico **9**.

A diferencia del péptido lineal **8** derivado de la glicina, el compuesto **9** derivado de la alanina resultó ser completamente estable bajo las condiciones de purificación cromatográfica. En la **Figura 3.6** se muestra su espectro  $^1\text{H}$ -RMN con la asignación de las señales más significativas. Dicha asignación se pudo llevar a cabo a partir de los espectros COSY y NOE selectivo irradiando sobre las señales NH amida (9, 4 y 2) del compuesto **9** que se muestran en las **Figuras 3.4** y **3.5**.

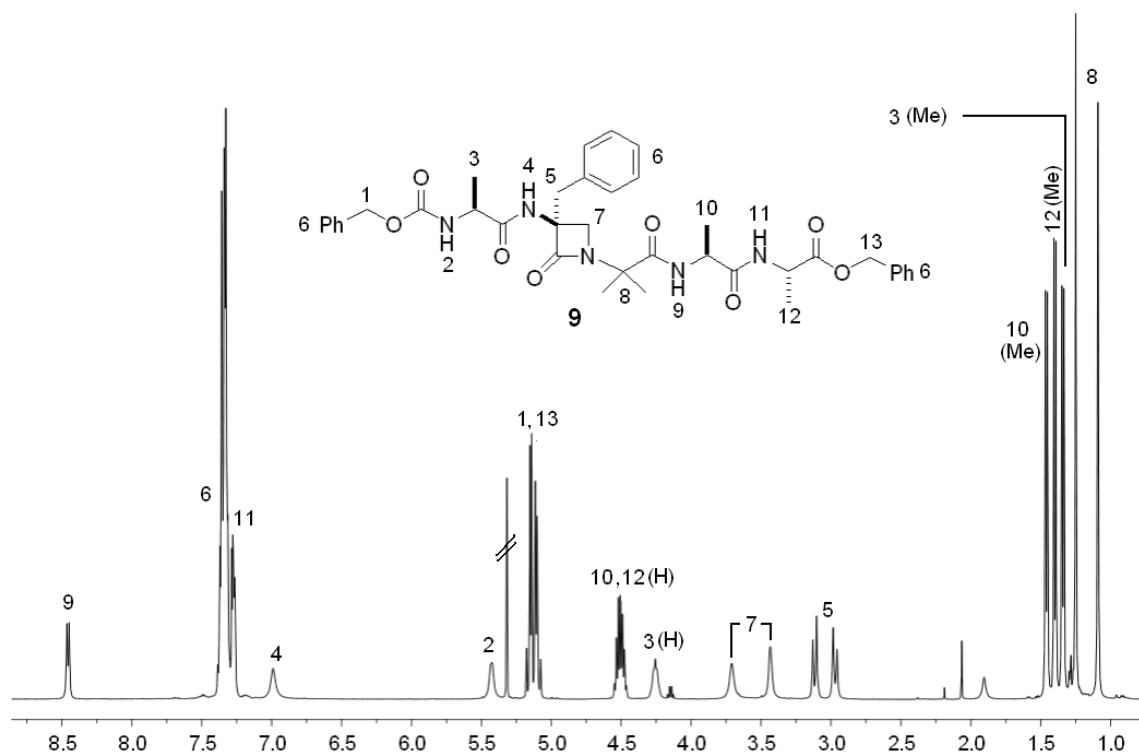


**Figura 3.4:** a) Ampliación del espectro COSY, mostrando las señales de cruce de los protones amídicos del compuesto **9**.

En el espectro COSY (**Figura 3.4**) se pudo identificar fácilmente el NH amídico de la  $\beta$ -lactama (4) por no tener señal de cruce con ningún protón CH. Al irradiar selectivamente esta señal sólo aparecerían en el espectro NOE selectivo los protones CH próximos a él, es decir, los protones 3(H) y 5(H) (ver **Figura 3.5**). Con este dato se pudo identificar la señal 3(H) en el espectro COSY y, por tanto, conocer el protón amídico NH(2) acoplado a él. De esta forma, alternando el espectro COSY con el de NOE selectivo, se fueron identificando las correspondientes señales del espectro de protón que se muestra en la **Figura 3.6**.



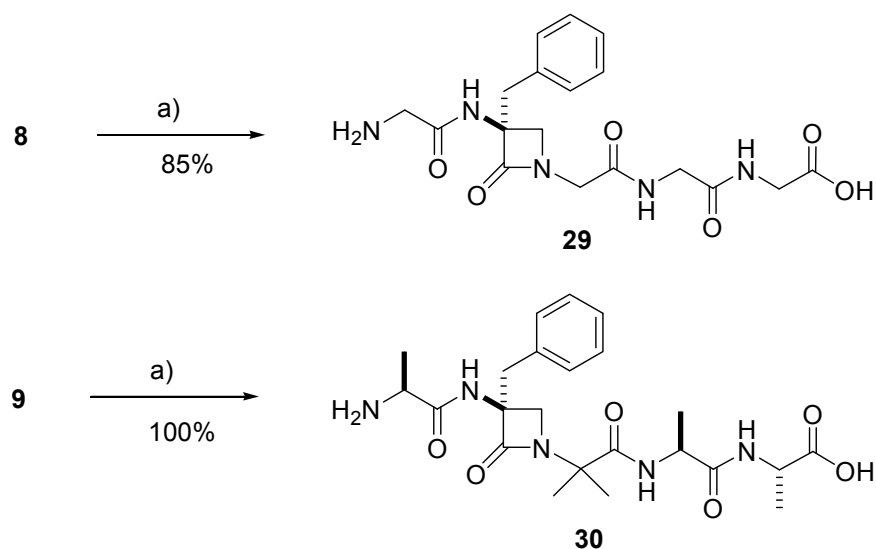
**Figura 3.5:** Superposición de espectros de NOE selectivo obtenido por irradiación de los NH amídicos 2, 4 y 9. Las interacciones observadas se representan sobre el compuesto **9**.



**Figura 3.6:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del pseudopéptido  $\beta$ -lactámico **9**.

### 3.1.3.3. Desprotección de los pseudopéptidos $\beta$ -lactámicos lineales y su ciclación

Una vez preparados los pseudopéptidos  $\beta$ -lactámicos lineales **8** y **9** se desprotegieron simultáneamente en sus posiciones N- y C- terminales mediante hidrogenólisis catalizada por paladio/carbono. La reacción se llevó a cabo en metanol a temperatura ambiente y presión atmosférica, obteniéndose en ambos casos el precursor lineal del ciclo buscado (**Esquema 3.10**). No obstante, se observó que la hidrogenólisis era lenta y que si se prolongaba durante más de 24 horas el producto podía llegar a descomponerse en proporciones significativas. Finalmente, llevando a cabo la reacción en corriente suave de hidrógeno, los péptidos  $\alpha,\omega$ -desprotegidos **29** y **30** se obtuvieron en unas 6 horas con excelentes rendimientos.



**Esquema 3.10:** a) Pd/C (10%), 1atm.  $H_2$ , MeOH, t.a., 6h.

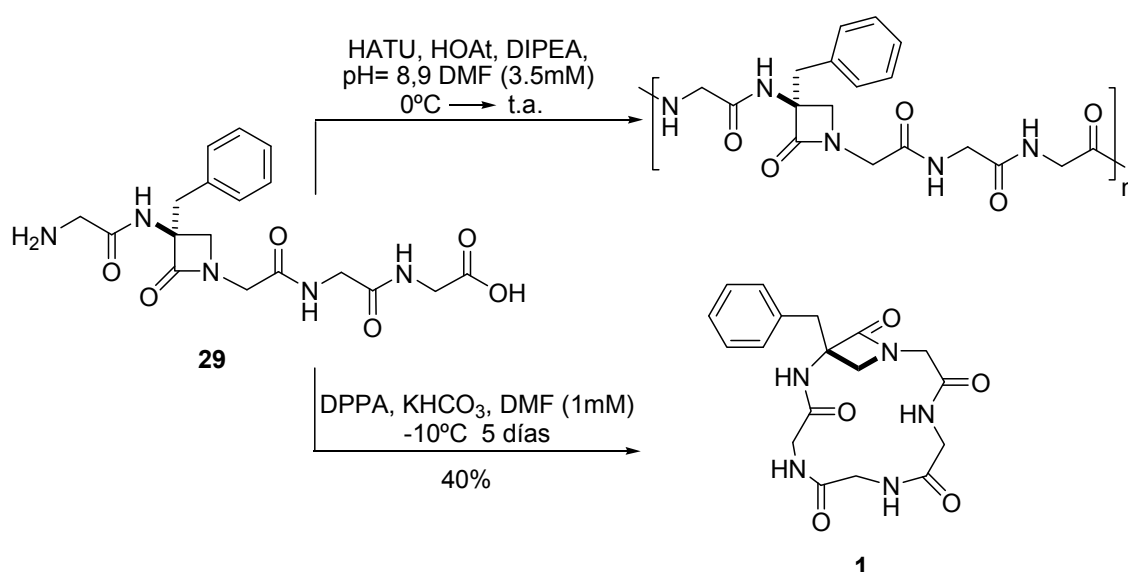
Con el objeto de obtener los ciclopentapéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2**, se sometieron los pseudopéptidos **29** y **30** a macrociclación sin purificación previa. Se sabe que la formación de ciclopéptidos es un proceso difícil que sólo proporciona rendimientos aceptables empleando condiciones de alta dilución y baja temperatura<sup>58</sup> que minimizan los acoplamiento intermoleculares. Se estudiaron dos métodos. Primero se emplearon 1.6 equivalentes de HATU<sup>59</sup> y 1.4 equivalentes de HOAt como reactivos de acoplamiento, 7 equivalentes de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como base, y N,N-dimetilformamida anhidra como disolvente. La reacción se llevó a cabo a  $-10^\circ\text{C}$  a una

<sup>58</sup> (a) Han, S. Y.; Kim, Y. A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467. (b) Davies J. S. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 471-501. (c) Jeremic, T.; Linden, A.; Moehle, K.; Heimgartner, H. *Tetrahedron* **2005**, *61*(7), 1871-1883.

<sup>59</sup> (a) Belvisi, L.; Bernardi, A.; Checchia, A.; Manzini, L.; Potenza, D.; Scolastico, C.; Castorina, M.; Cupelli, A.; Gianini, G.; Carminati, P.; Pisano, C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001-1005. (b) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.

concentración 3.5 mMolar. Además, el pH del medio de reacción fue controlándose periódicamente, manteniéndolo entre 8 y 9 por adición de base. En el caso del pseudopentapéptido **29**, a pesar de la alta dilución utilizada, sólo se obtuvieron productos polimerizados procedentes de acoplamiento intermoleculares, quizás debido a la elevada reactividad del HATU.

Ante este resultado adverso, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica que permitió hallar un método basado en el difosforazidato de difenilo (DPPA)<sup>60</sup>, menos reactivo que las sales de uronio HATU y TBTU. Con este segundo método se obtuvo el ciclopéptido buscado **1**, aunque sólo con un rendimiento moderado.



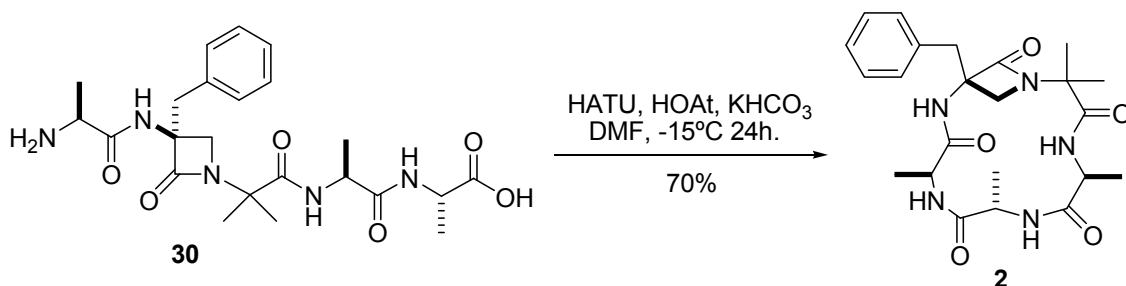
**Esquema 3.11:** Ciclación del  $\alpha,\omega$ -aminoácido **29** al ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1**.

La purificación del ciclopéptido **1** por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8/1)) tampoco fue sencilla, ya que el producto muestra una gran tendencia a la autoagregación que provoca la aparición de bandas muy anchas en los cromatogramas.

En cuanto al *ciclo*-[Aib-β-Lactam-Ala<sub>3</sub>] **2** se probó con éxito la ciclación del  $\alpha,\omega$ -aminoácido **30** con HATU y HOAt como reactivos, pero sustituyendo la N,N-diisopropiletilamina por la base inorgánica KHCO<sub>3</sub>. Tras varios ensayos de ciclación a diferentes temperaturas, se observó que los resultados fueron óptimos a -15°C. El

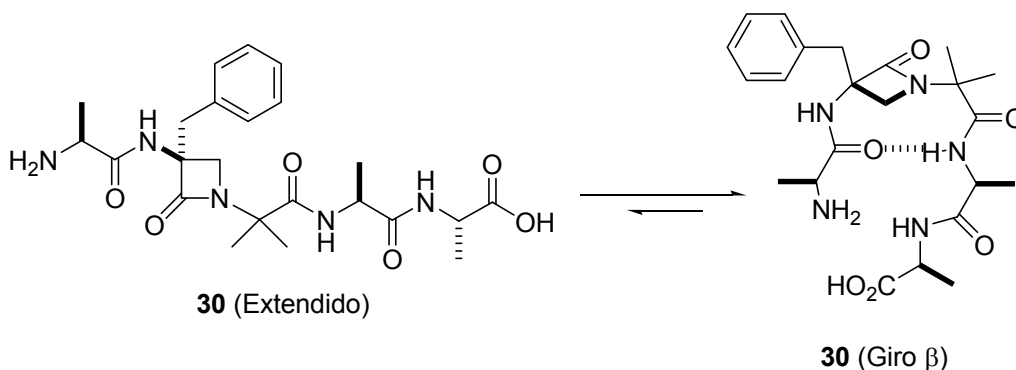
<sup>60</sup> (a) Brady, S. F.; Freidinger, R. M.; Palaveda, W. J.; Colton, C. D.; Homnick, C. F.; Whitter, W. L.; Curley, P.; Nutt, R. F.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 764-769. (b) Han, S. Y.; Kim, Y. A. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.

crudo también se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de MeCN/H<sub>2</sub>O (TFA 0.1%) (90/10). De este modo se obtuvo el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2** con un rendimiento aislado del 70%.



**Esquema 3.12:** Síntesis del ciclo-[Aib- $\beta$ -Lactam-Ala<sub>3</sub>] **2**.

El mayor rendimiento obtenido en el caso del ciclo **2** con respecto del ciclo **1** se atribuyó en parte a la presencia del grupo Aib que podría aumentar la preorganización  $\beta$ -girada del péptido lineal **30**, favoreciendo su ciclación. Otro factor que explicaría el aumento del rendimiento podría ser la presencia de los grupos metilo de las alaninas que disminuirían la flexibilidad del precursor lineal y facilitaría también su preorganización, a pesar de incrementar ligeramente el impedimento estérico de los residuos directamente implicados en la ciclación.



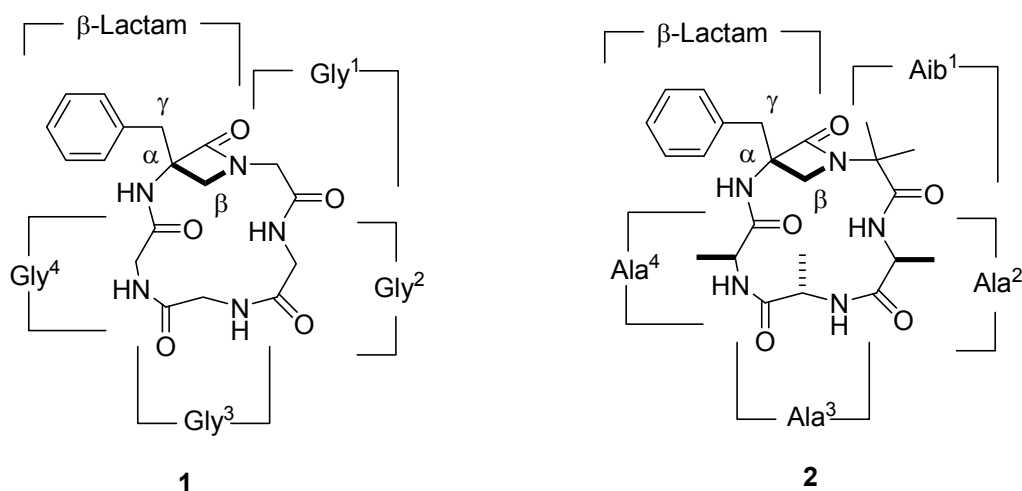
**Esquema 3.13:** Equilibrio conformacional del pseudopéptido  $\beta$ -lactámico **30** donde un giro- $\beta$  estabiliza una conformación que aproxima entre sí los grupos amino y carboxilo de los Ala residuos terminales, favoreciendo la reacción de macrociclación.

### 3.1.4. Análisis conformacional de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly<sub>4</sub>] **1** y *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala<sub>3</sub>] **2**

Una vez sintetizados los ciclos **1** y **2** se pasó a analizar sus confórmeros mediante RMN. Esta técnica es particularmente eficaz para el estudio conformacional de

péptidos, ya que permite determinar la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, las distancias interprotónicas y los ángulos diedros  $^3J(\text{HC}\alpha\text{-NH})$ . Además, la combinación de estos datos con cálculos de modelización molecular permite conocer la estructura de las diferentes especies que participan en el equilibrio conformacional en disolución. En nuestro caso, el estudio se realizó en un medio coordinante como el  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ , ya que los enlaces de hidrógeno que son estables en dicho medio son fuertes y su detección es más significativa que en medios no coordinantes como el  $\text{CDCl}_3$ . Una forma de medir la estabilidad de los enlaces de hidrógeno intramoleculares es a través del coeficiente térmico de los diferentes protones amida ( $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ ).

El análisis comenzó asignando las señales de RMN a los diferentes protones de los ciclos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2** utilizando una combinación de experimentos  $^1\text{H}$ , COSY y NOESY. Después, se midió la variación de los desplazamientos químicos de los diferentes protones amida ( $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ ) de los ciclos aplicando un rango de temperaturas de 300-325 K a intervalos de 5 K. Seguidamente, se determinaron las distancias interprotónicas mediante integración de las señales de cruce significativas de los espectros 2D NOESY siguiendo el método ISPA<sup>61</sup> (*Isolated Spin-Pair Approximation*). Para completar el análisis, las estructuras se modelizaron introduciendo los valores anteriores como restricciones en cálculos de dinámica molecular (*Simulated Annealing*).



**Figura 3.7:** Nomenclatura posicional empleada en la asignación de las señales de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2**.

<sup>61</sup> (a) Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*; VCH Publishers: New York, **1989**. (b) Thomas, P. D.; Basus, V. J.; James, T. L. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1237-1241.

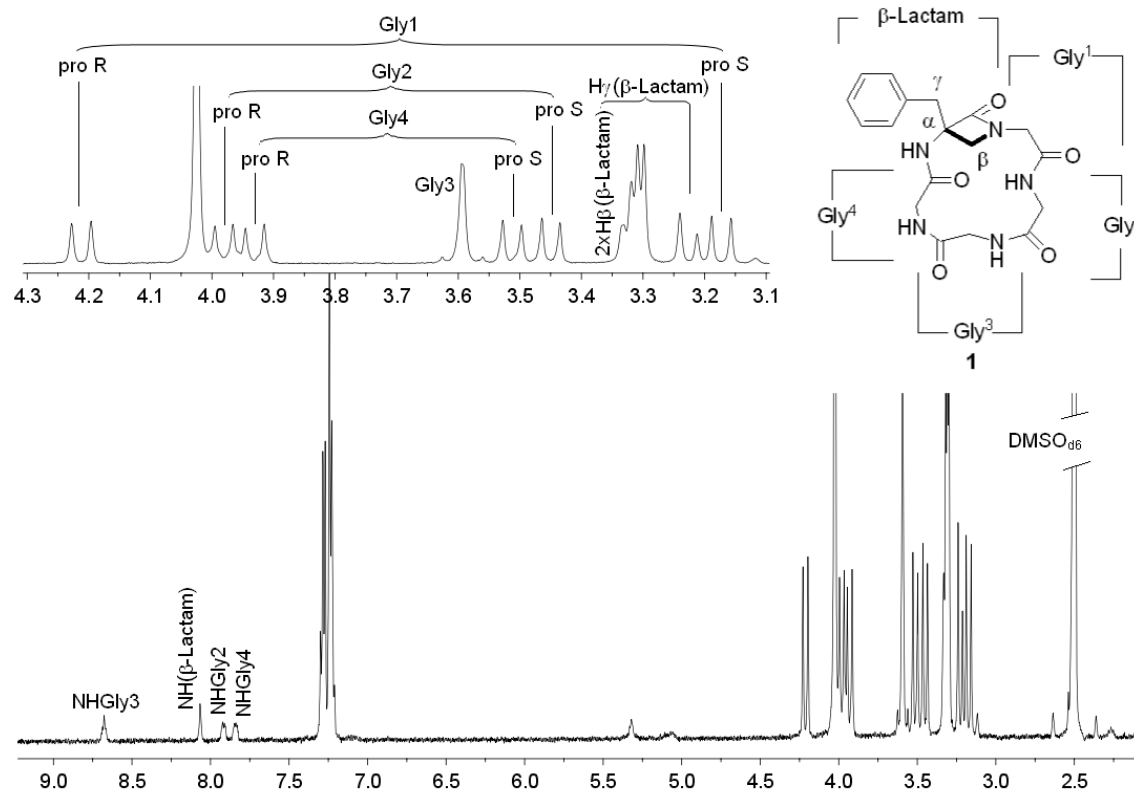


En ambos casos se utilizó la misma nomenclatura posicional para la asignación de los protones, numerando cada resto a partir de la  $\beta$ -lactama e indicándose ésta como “ $\beta$ -Lactam” (**Figura 3.7**). Los estudios se realizaron con disoluciones de concentraciones aproximadas de 5mM a 300 K en  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ .

### 3.1.4.1. Análisis conformacional de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly<sub>4</sub>] 1

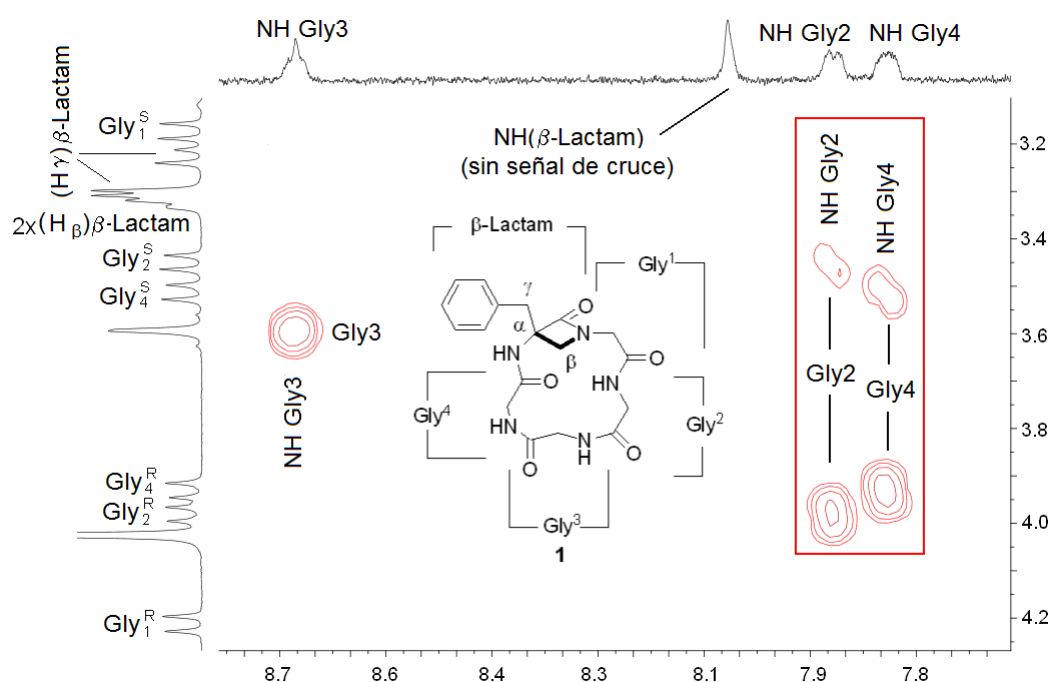
La identificación de las señales del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1** se muestra en la **Figura 3.8**.

A pesar de que las señales correspondientes a los NH amídicos en el espectro  $^1\text{H}$  mostraron muy baja intensidad debido probablemente al rápido intercambio con los protones del agua residual proveniente de la  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ , el NH- $\beta$ -lactámico se identificó fácilmente por aparecer como singlete al carecer de protones adyacentes. En el espectro COSY de la **Figura 3.9** también se pudieron identificar los protones de Gly1, ya que tampoco presentan señales de cruce con ningún NH amídico.



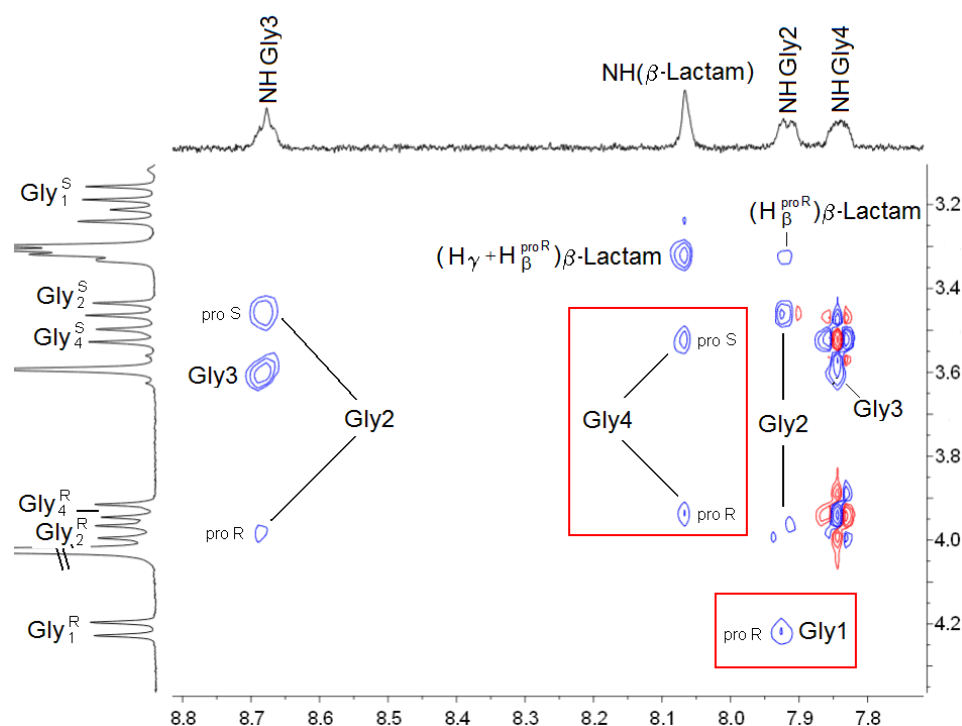
**Figura 3.8:** Asignación de las señales de  $^1\text{H}$ -RMN del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1** en  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ .

Para la identificación del resto de protones del ciclo **1** se tuvieron en cuenta las señales de cruce del espectro NOESY (ver **Figura 3.10**) entre los NH amídicos y los protones de los grupos metileno del ciclo. Así, las señales de cruce interresiduales del NH- $\beta$ -lactámico sólo podían corresponder a los protones de Gly4, debido a la estructura cíclica de la molécula. Del mismo modo, las señales de NOE de los protones metilénicos de Gly1 debían proceder de su proximidad con el protón amídico de Gly2 (cuadro **Figura 3.10**). Una vez identificado el protón amídico de Gly4 por el espectro COSY (cuadro **Figura 3.9**), dedujimos que sus señales de NOE debían provenir de la interacción con los protones espacialmente próximos de Gly3. Así, fueron asignándose sucesivamente las señales del espectro a los protones de la molécula **1**.

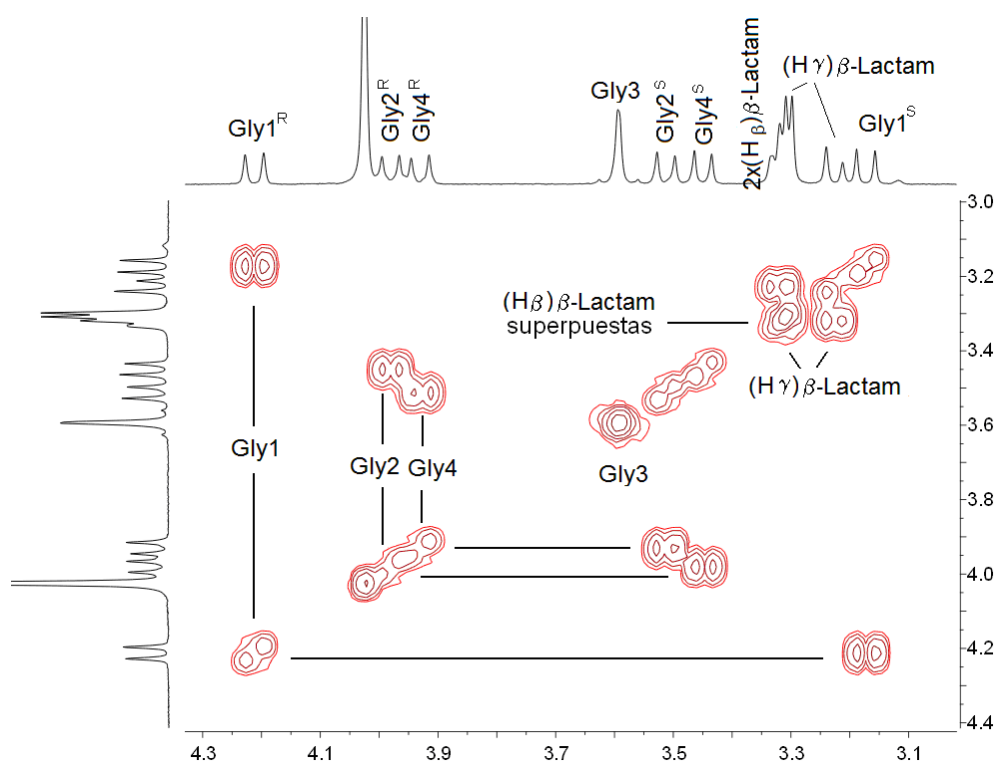


**Figura 3.9:** Ampliación del espectro COSY del ciclopéptido **1** en la región de los NH amídicos en la que se observa la ausencia de señales de cruce intrarresiduales de NH( $\beta$ -Lactam) y Gly1.

Algunos de los protones diastereotópicos se distinguieron por la diferente intensidad de las señales de cruce del espectro de NOESY con los protones amídicos. Y como se puede observar en el espectro  $^1\text{H}$  RMN **Figura 3.8** y en el COSY **Figura 3.11**, los protones  $\text{C}_\alpha$  exceptuando los de Gly3 más alejado del centro estereogénico, mostraron sistemas de tipo AB con constantes de acoplamiento geminales de 15.8 Hz, 14.6 Hz y 15.2 Hz para los protones de Gly1, Gly2 y Gly4 respectivamente.



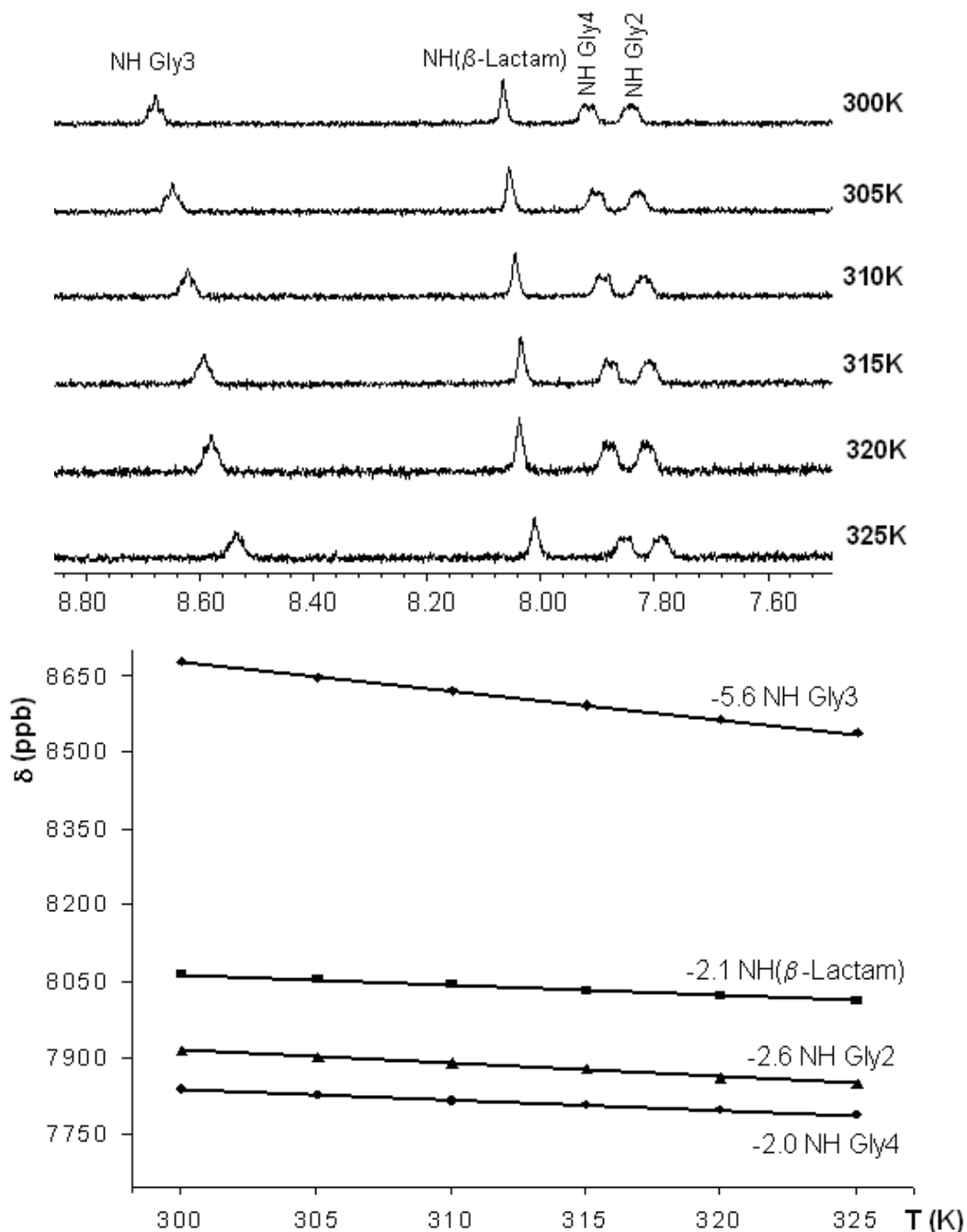
**Figura 3.10:** Ampliación del espectro NOESY y las señales de cruce interresiduales más significativas del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico 1.



**Figura 3.11:** Ampliación del espectro COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) del ciclopéptido 1 en la región de los protones metilénicos de los residuos de glicina.

Las separaciones de desplazamiento químico de los protones diastereotópicos siguieron el orden Gly3<Gly4<Gly2<Gly1, coherente con su creciente proximidad con el centro estereogénico (C $\alpha$ ) de la  $\beta$ -lactama. Cabe destacar que los dos protones diastereotópicos H $\beta^{\text{proR}}$  y H $\beta^{\text{proS}}$  de la  $\beta$ -lactama aparecen juntos a 3.30 ppm y quedan enmascarados por la señal de uno de los protones bencílicos H $\gamma$ .

Seguidamente, se midió la deriva de los protones amida con la temperatura (**Figura 3.12**), calculándose los coeficientes térmicos correspondientes.



**Figura 3.12:** Derivas y coeficientes térmicos (ppb/K) de las señales correspondientes a los NH amídicos del ciclo 1 en DMSO $_{d6}$ .

La siguiente Tabla recoge los desplazamientos químicos de los protones más significativos del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1** y los coeficientes térmicos de sus protones amida. Lamentablemente, debido a la mala resolución de las señales amida (**Figura 3.12**) no se pudieron medir las constantes de acoplamiento  $\text{NH-H}\alpha$  y por lo tanto no se pudieron calcular sus correspondientes ángulos diedros a partir de la ecuación de Karplus<sup>62</sup>.

Los valores de los coeficientes indican que existen por lo menos tres enlaces de hidrógeno intramoleculares fuertes en  $\text{DMSO}_{d6}$  en los que participan como dadores los protones amídicos  $\text{NH}(\beta\text{-Lactam})$ ,  $\text{NHGly2}$  y  $\text{NHGly4}$ , ya que los valores absolutos de los coeficientes son inferiores a -3 ppb/K, que es el valor considerado como límite<sup>19 (a)</sup> para la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en  $\text{DMSO}_{d6}$ . Según este criterio, el protón amídico  $\text{NHGly3}$  sería el único que no participa en un enlace de hidrógeno intramolecular estable.

**Tabla 3.1:** Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de los protones más significativos del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1** y coeficientes térmicos de sus protones amida  $\Delta\delta/\Delta T(\text{H}^N)$  medidos en  $\text{DMSO}_{d6}$ .

Residuo	$\delta\text{H}\alpha$	$\delta\text{H}\beta$	$\delta\text{H}\gamma$	$\delta\text{H}^N$	$\Delta\delta/\Delta T(\text{H}^N)^a$ (ppb/K)
$\beta\text{-Lactam}$	----	3.33	3.33/3.23	8.07	-2.1
Gly1	4.21/3.17	----	----	----	----
Gly2	3.98/3.44	----	----	7.91	-2.6
Gly3	3.59	----	----	8.68	-5.6
Gly4	3.93/3.51	----	----	7.84	-2.0

a) En gris se resaltan los NH que participant en enlaces de hidrógeno.

Para poder detectar los aceptores de dichos enlaces se calcularon las distancias interprotónicas mediante la integración de las señales más significativas del espectro NOESY<sup>64</sup> a un tiempo de mezcla de 400 ms. En la **Tabla 3.2** y en la **Figura 3.13** se muestran las principales distancias promedio tomando como referencia la distancia de 2.4 Å entre los protones  $\text{NH}(\beta\text{-Lactam})/\text{H}\beta^R(\beta\text{-Lactam})$ .

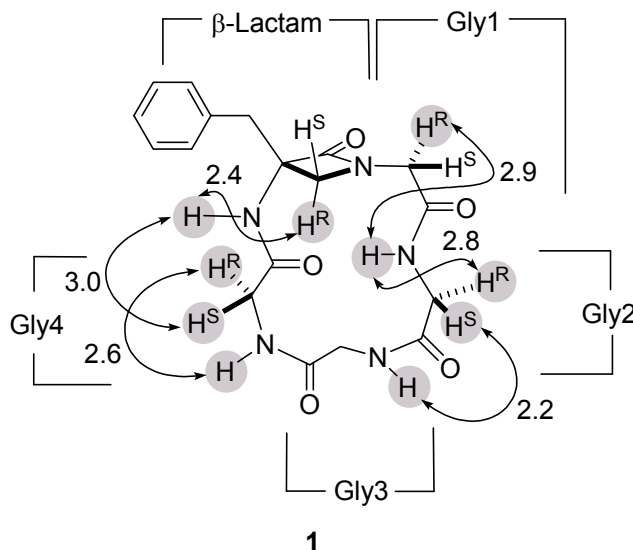
<sup>62</sup> Günter, P.; Braun, W.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3997-4004.  
 $J^3\text{HN}\alpha = 6.4 * \cos^2(\varphi - 60) - 1.4 * \cos(\varphi - 60) + 1.9$ .

**Tabla 3.2:** Distancias interprotónicas promedio (en Å) obtenidas mediante integración de las señales de cruce del espectro NOESY.

H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	Distancias interprotónicas <sup>a), b)</sup>
NHGly2	CH <sup>S</sup> -Gly2	2.7
NHGly2	CH <sup>R</sup> -Gly2	2.8
NHGly2	CH <sup>R</sup> -Gly1	2.9
NHGly3	CH <sub>2</sub> -Gly3	2.0
NHGly3	CH <sup>R</sup> -Gly2	3.1
NHGly3	CH <sup>S</sup> -Gly2	2.2
NHGly4	CH <sub>2</sub> -Gly3	2.6
NH(β-Lactam)	Hβ <sup>R</sup> (β-Lactam)	2.4
NH(β-Lactam)	CH <sup>R</sup> -Gly4	3.4
NH(β-Lactam)	CH <sup>S</sup> -Gly4	3.0

a) Distancia de referencia: [NH(β-Lactam)/Hβ<sup>R</sup>(β-Lactam)]= 2.4 Å.

b) Tiempo de mezcla 400 ms.

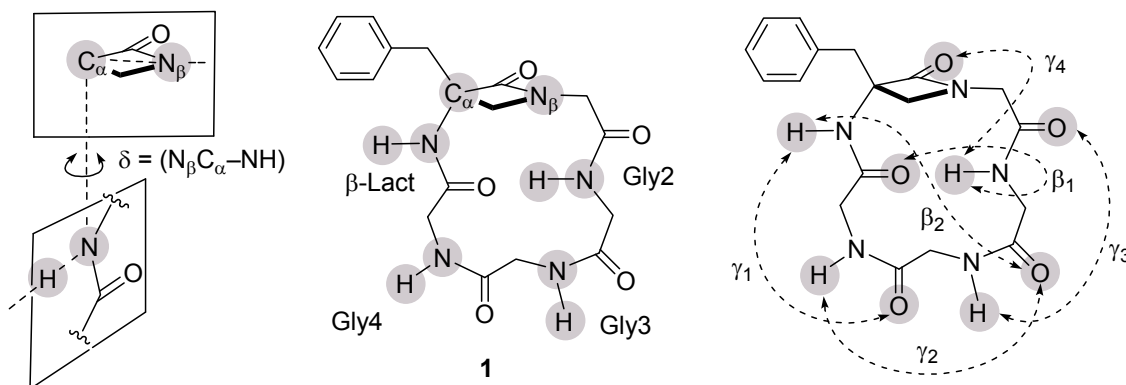


**Figura 3.13:** Interacciones NOE significativas y distancias interprotónicas (en Å) del ciclopeptido β-lactámico **1** determinadas a partir de la integración de las señales NOE en disolución de DMSO<sub>d6</sub> a un tiempo de mezcla de 400 ms.

Seguidamente, se emplearon las distancias interprotónicas de la **Tabla 3.2** como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o clusters más relevantes

para el pseudopéptido cíclico **1**. Para ello, se siguió el método *Simulated Annealing*<sup>63</sup> modelizando el enfriamiento desde 1000K hasta 300K de 100 estructuras del pseudopéptido cíclico **1** generadas al azar. El margen aplicado a cada restricción de distancia interprotónica fue de  $\pm 0.3$  Å y las simulaciones se efectuaron empleando el programa X-PLOR-NIH 2.16<sup>64</sup>.

**Tabla 3.3:** Clusters conformacionales del ciclopéptido **1** definidos por el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta$ , indicador de la orientación de los grupos amida en relación al plano medio macrocíclico <sup>a)</sup> y de las distancias  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  de los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares.



Cluster (n) <sup>b)</sup>	$\delta = (\text{N}\beta\text{C}\alpha\text{-NH})$				Distancia $\text{CO}\cdots\text{HN}$ (Å) <sup>c)</sup>					
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-Lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly4}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly3}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly2}}$	$\langle\gamma_1\rangle$	$\langle\gamma_2\rangle$	$\langle\gamma_3\rangle$	$\langle\gamma_4\rangle$	$\langle\beta_1\rangle$	$\langle\beta_2\rangle$
<b>1-A</b> (34)	+62.1	-55.3	+70.0	-120	<u>2.0</u>	2.9	4.6	2.8	4.7	4.3
<b>1-B</b> (11)	-33.5	-84.1	+50.4	-112.7	3.0	3.0	3.9	<u>2.4</u>	6.3	<u>2.5</u>
<b>1-C</b> (5)	+50.0	-64.4	+59.0	+106.0	<u>2.0</u>	2.9	5.2	4.3	5.9	3.4
<b>1-D</b> (4)	-31.8	+44.8	+48.6	-109.3	3.0	3.0	4.7	<u>2.3</u>	6.3	<u>1.7</u>
<b>1-E</b> (3)	-3.8	+70.4	-18.0	-109.4	3.0	3.0	4.7	<u>2.3</u>	6.2	<u>1.7</u>
<b>1-F</b> (3)	-28.2	+52.0	+53.2	+106.0	2.9	3.0	5.2	4.1	5.7	<u>1.7</u>

a) Una orientación anterior al plano medio macrocíclico del enlace  $\text{CON-H}$  corresponde a un valor positivo  $\delta$  (+); mientras que la orientación posterior de dicho enlace corresponde a un valor negativo  $\delta$  (-).

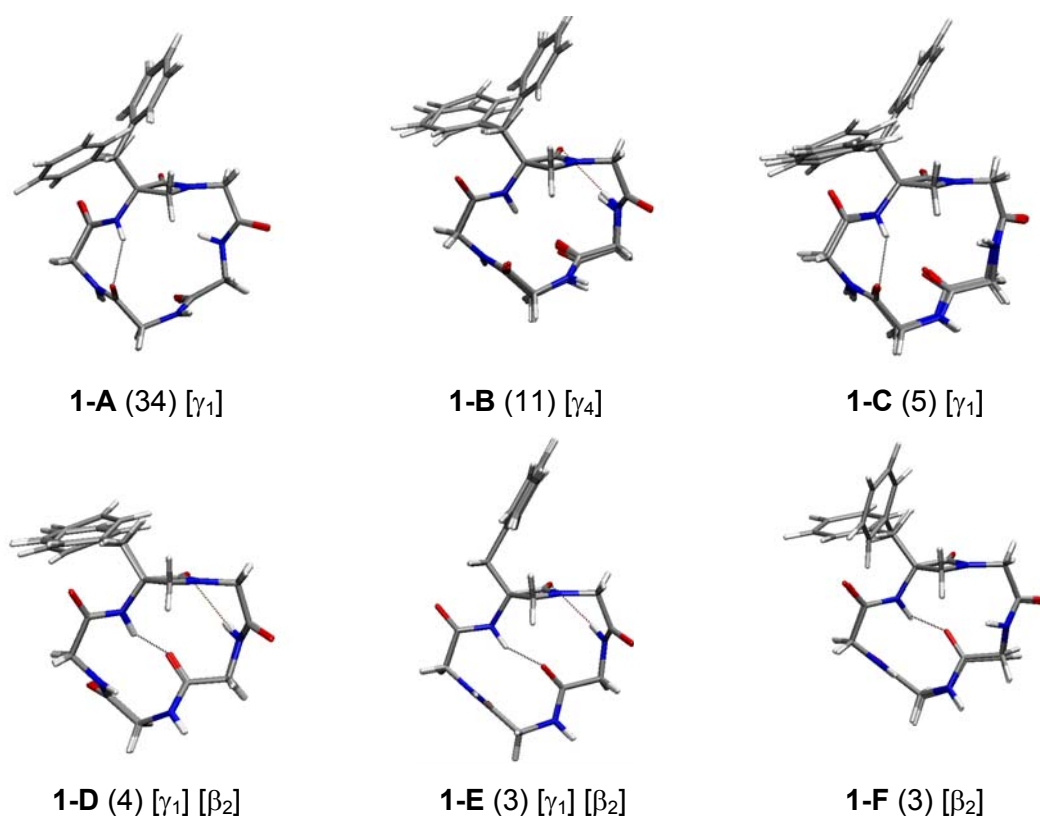
b) Entre paréntesis se indica el número de estructuras de las 60 encontradas que no violan ninguna de las restricciones de distancia interprotónica.

c) Valores promedio (en Å) de la distancia  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  en posibles giros ( $\gamma_1$ - $\beta$ ). En gris se resaltan los enlaces de hidrógeno formados.

<sup>63</sup> Daures, X.; Gademan, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2393-2404.

<sup>64</sup> Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Clore, G. M. *Prog. Nucl. Magn. Spectrosc.* **2006**, 48, 47-62.

De las 100 estructuras resultantes se seleccionaron aquellas (60) que cumplían todas las restricciones o que únicamente violaban una de ellas. Los grupos conformacionales o clusters se definieron agrupándolos según los valores de los ángulos pseudodiedros ( $\delta_{\beta\text{-Lactam}}$ ,  $\delta_{\text{Gly2}}$ ,  $\delta_{\text{Gly3}}$  y  $\delta_{\text{Gly4}}$ ) definidos en la **Tabla 3.3**. Éstos indican la orientación de los diferentes grupos amida con respecto a un plano imaginario perpendicular al anillo  $\beta$ -lactámico que coincide aproximadamente con el plano medio del macrociclo peptídico. Valores positivos del ángulo  $\delta$  indican que el enlace N-H de dichas amidas está orientado hacia la parte delantera del macrociclo, mientras que un valor negativo de  $\delta$  indica que el enlace N-H está orientado hacia la parte posterior del macrociclo. Además, se determinaron las distancias promedio  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  de los enlaces de hidrógeno intramoleculares correspondientes a todos los posibles giros ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ). Tras el análisis de los parámetros mencionados, se obtuvieron seis clusters **1-A** a **1-F** que se recogen en la **Tabla 3.3**.



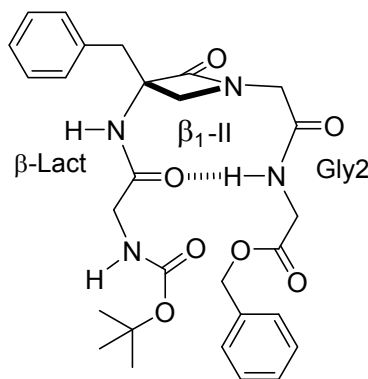
**Figura 3.14:** Superposiciones de conformeros representativos de clusters para el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **1**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones y entre corchetes los tipos de giros formados.



Las superposiciones de las 5 estructuras de menor energía de cada uno de los seis *clusters* obtenidos se representan en la **Figura 3.14**. De los seis, la conformación **1-A** es la más poblada (34 estructuras) y contiene un giro  $\gamma_1$  con un enlace de hidrógeno  $\beta$ -Lactam(NH $\cdots$ O=C)Gly3 que también está presente en el cluster **1-C** poblado por 5 estructuras. Por su parte, los clusters minoritarios **1-B**, **1-D** y **1-E** contienen sendos giros inversos  $\gamma_4$  y  $\beta_2$  con enlaces de hidrógeno Gly2(NH $\cdots$ O=C) $\beta$ -Lactam y  $\beta$ -Lactam(NH $\cdots$ O=C)Gly2. Finalmente, el cluster **1-E**, poblado sólo por 3 estructuras, contiene únicamente el giro inverso  $\beta_2$ .

Estos clusters están en concordancia con los bajos coeficientes térmicos medidos para los protones amídicos de los residuos Gly2 y  $\beta$ -Lactam en dos enlaces de hidrógeno estables. Sin embargo, aunque ninguno de los clusters justifica el bajo coeficiente térmico observado para los protones amídicos de Gly4, las distancias Gly4(NH $\cdots$ O=C)Gly2 correspondientes al giro  $\gamma_2$ , no son largas encontrándose en el rango 2.9-3.0 Å. Por otro lado, también se observa la ausencia total de enlaces de hidrógeno que estabilicen giros de tipo  $\gamma_3$  y  $\beta_1$ , lo cual concuerda con el elevado coeficiente térmico (-5.6 ppb/K) observado para el protón amídico del residuo Gly3.

En conclusión, el anillo  $\beta$ -lactámico provoca una restricción conformacional que tiende a estabilizar principalmente giros de tipo  $\gamma_1$ ,  $\gamma_4$  y  $\beta_2$  en un ciclopéptido de tipo *ciclo*-[Gly]<sub>5</sub> desprovisto de sustituyentes. Además, la interconversión entre las conformaciones más pobladas (**1-A**, **1-B** y **1-C**) tiene lugar por rotación de los enlaces amídicos  $\beta$ -Lactam y Gly2, que flanquean el anillo  $\beta$ -lactámico. Estos resultados contrastan fuertemente con lo observado anteriormente en nuestro laboratorio para los péptidos  $\beta$ -lactámicos abiertos,<sup>45</sup> que únicamente forman giros  $\beta_1$  de tipo II' entre los residuos (i) e (i+3), (**Figura 3.15**).



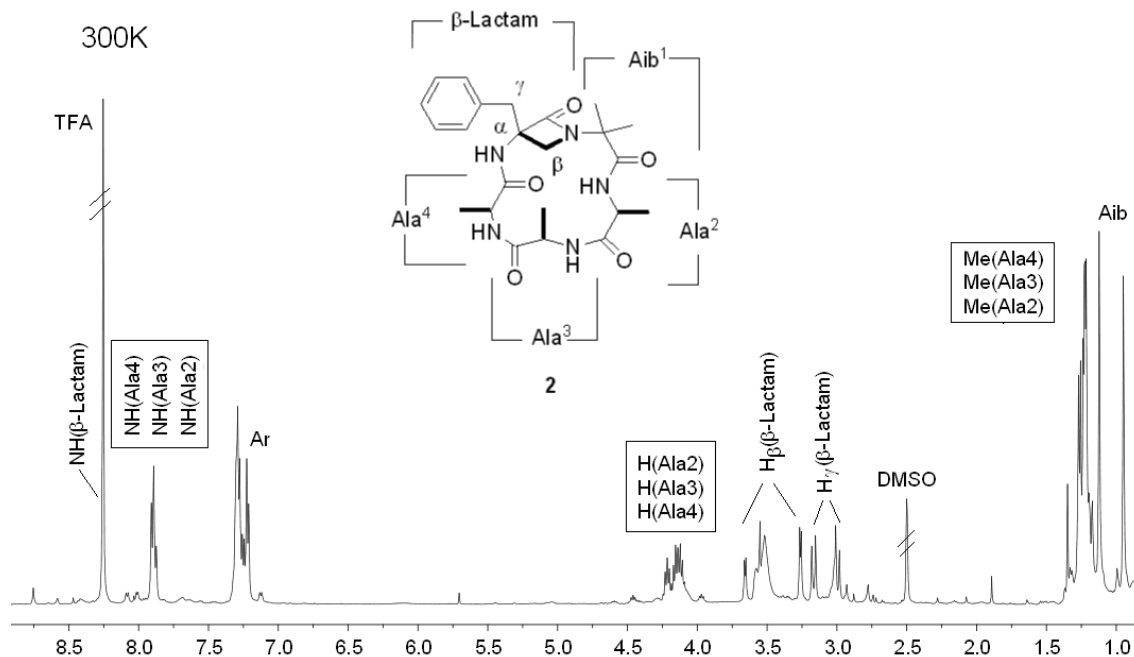
**Figura 3.15:** Efecto de restricción conformacional del anillo  $\beta$ -lactámico en péptidos flexibles abiertos.

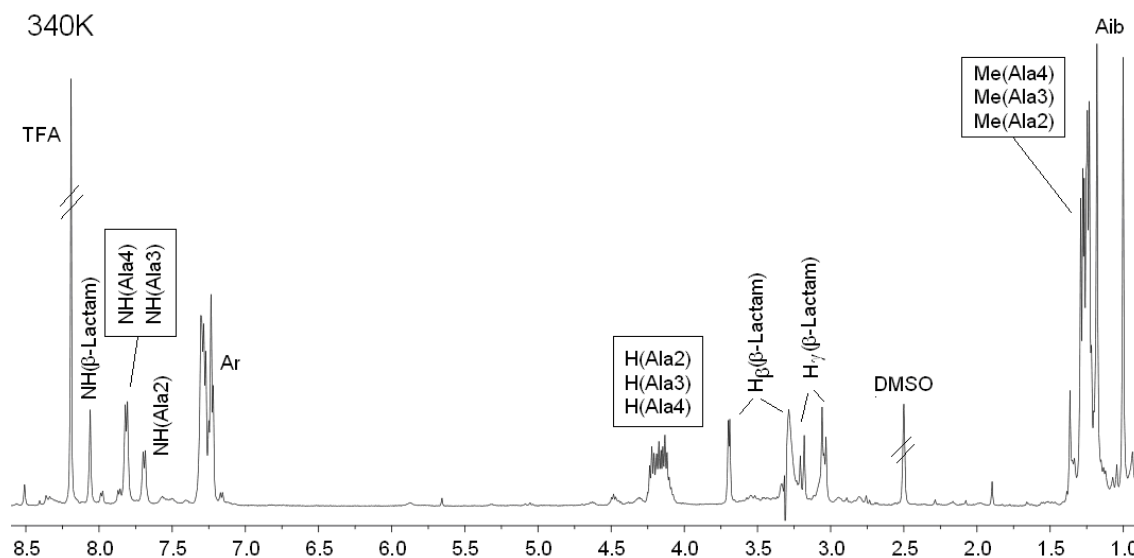
Una vez establecido el efecto de restricción conformacional del anillo  $\beta$ -lactámico en el ciclopentapéptido de glicina **1**, pasamos a investigar la influencia que ejerce dicho anillo en el comportamiento conformacional de ciclopentapéptidos conteniendo residuos sustituidos (Ala).

### 3.1.4.2. Análisis conformacional de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Ala<sub>3</sub>] **2**

La asignación de las señales en DMSO<sub>d6</sub> del ciclo **2** se realizó de manera análoga al caso anterior, es decir, a partir de los espectros <sup>1</sup>H, COSY, y ROESY. Sin embargo, a temperatura ambiente (300K), no pudieron asignarse los protones NH amídicos de los diferentes residuos de alanina, ya que aparecieron superpuestos (**Figura 3.16**). Afortunadamente, tras registrar el espectro de protón a 340K, se consiguió una separación parcial de dichos protones, aunque hubo dos que siguieron superpuestos. Aún así, se decidió realizar el estudio conformacional del ciclo **2** a 340K, que se consideró óptima para lograr la máxima dispersión de señales (**Figura 3.16**).

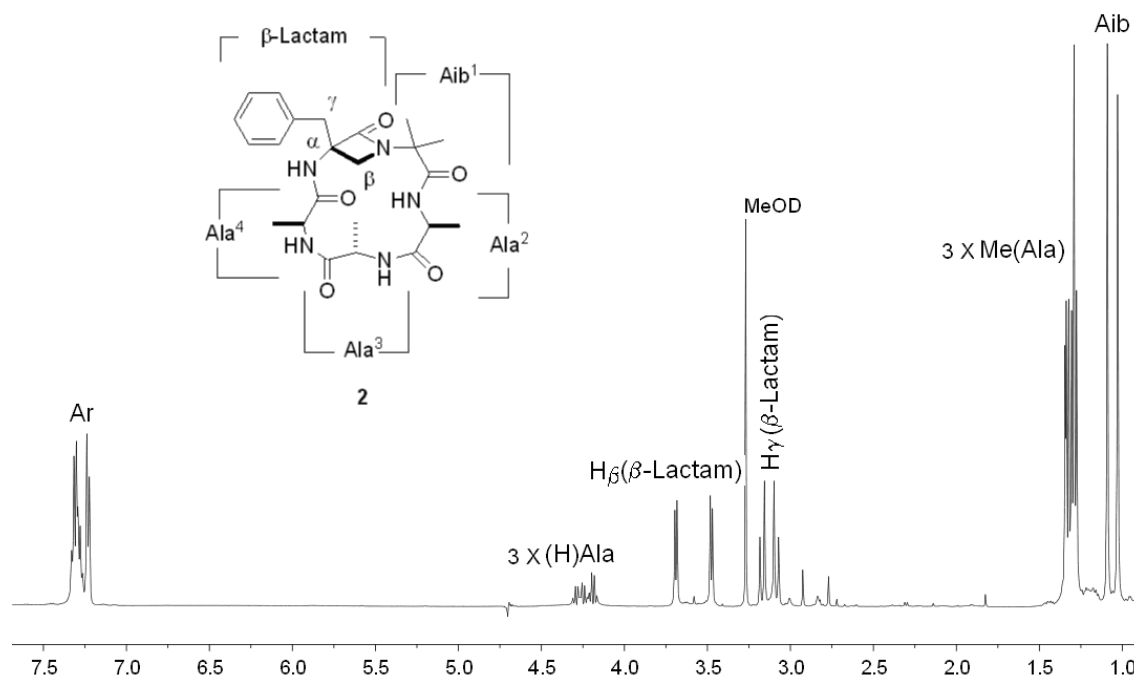
De los espectros <sup>1</sup>H y COSY se pudo deducir la presencia de varios confórmeros minoritarios a temperatura ambiente cuyas estructuras no pudieron identificarse debido a la complejidad de los espectros y a la superposición y baja intensidad de las señales.





**Figura 3.16:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2** en  $\text{DMSO}_{d6}$  a 300K (página anterior) y a 340K (arriba). Las señales (H)Ala corresponden a los protones  $\text{C}\alpha\text{H}$  de las alaninas.

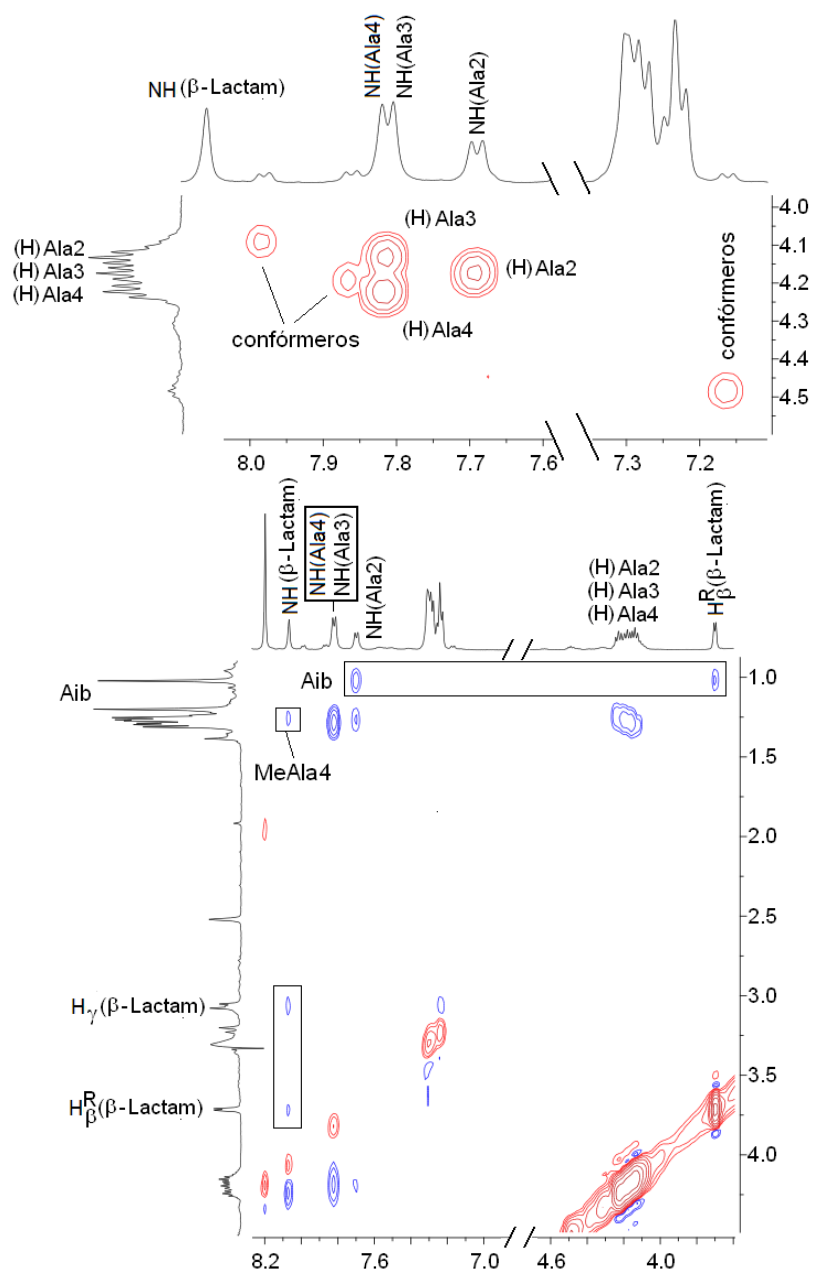
A pesar de ello, la asignación de los protones del conformero mayoritario se pudo llevar a cabo a partir de las señales de cruce del espectro NOESY entre los protones amídicos y los protones metílicos.



**Figura 3.17:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2** en  $\text{MeOH}_{d4}$ .

También se realizó un  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{MeOH}_{d4}$  del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2** (Figura 3.17), presentando un espectro mucho más simplificado que en  $\text{DMSO}_{d6}$ , lo cual fue

interpretado como una consecuencia de la existencia de confórmers relativamente estables en este último disolvente y no a la presencia de impurezas o mezclas de compuestos. Desafortunadamente, los protones amídicos desaparecieron debido a su rápido intercambio con el deuterio del  $\text{MeOH}_{d4}$ . Por ello, nos marcamos como objetivo la caracterización estructural completa del confórmer mayoritario en  $\text{DMSO}_{d6}$  a 340K.



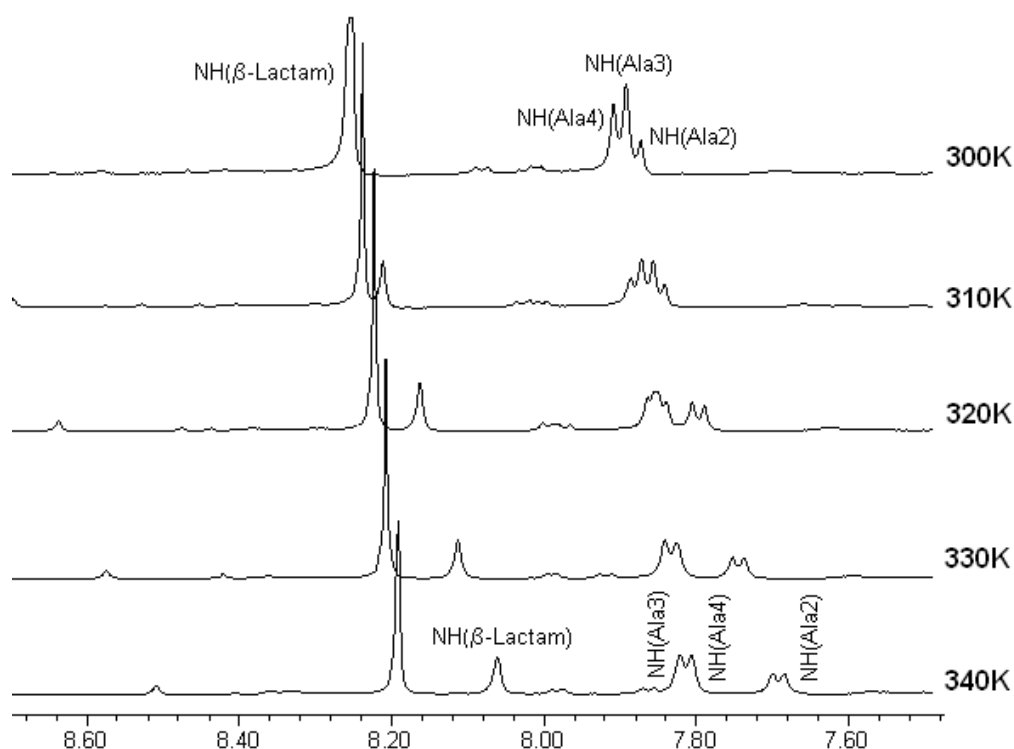
**Figura 3.18:** Ampliaciones del espectro COSY (arriba) y del espectro ROESY (abajo) para el ciclo 2.

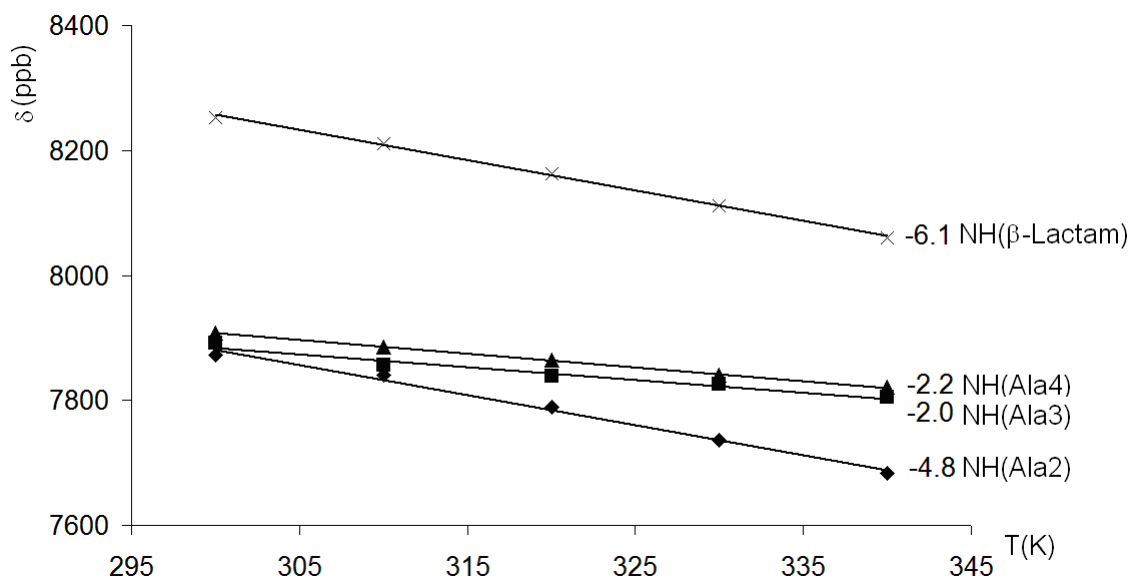
La asignación del confórmer mayoritario del ciclo 2 se realizó primero a partir del espectro COSY (**Figura 3.18**, arriba) donde se identificó el NH-β-lactámico por no presentar ninguna señal de cruce con otros protones. Posteriormente, a partir del

espectro ROESY (**Figura 3.18**, abajo) se asignó NH(Ala2), ya que presentaba señal de cruce con uno de los metilos del grupo Aib. De manera análoga, por las señales de cruce de NH( $\beta$ -Lactam) se asignó Me(Ala4). Y a través de las señales de cruce de MeAla4 en el espectro COSY se pudieron identificar H(Ala4) y NH(Ala4). Finalmente, descartando el resto de las señales, se asignó NH(Ala3) que presentaba señal de cruce COSY con el multiplete H(Ala) y que apareció acoplado a la señal NH(Ala4).

Por otro lado, los protones diastereotópicos del anillo de  $\beta$ -lactama se asignaron por las diferentes señales de cruce que presentaban en el espectro ROESY entre  $H^R\beta(\beta$ -Lactam) y el protón amida de la  $\beta$ -lactama NH( $\beta$ -lactama). Desafortunadamente, no se encontró señal de cruce entre  $H^S\beta(\beta$ -Lactam) y los protones aromáticos debido a que la señal del  $H^S\beta(\beta$ -Lactam) quedó superpuesta por la señal de agua residual del DMSO.

Seguidamente se realizó la deriva térmica de los protones amídicos del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2** en un rango de temperatura de 300 a 340 K, calculándose los coeficientes térmicos a intervalos de 10 K. (**Figura 3.19**).





**Figura 3.19:** Derivas y coeficientes térmicos (ppb/K) de las señales correspondientes a los NH amídicos del ciclo 2 en DMSO<sub>d6</sub>.

La siguiente tabla recoge los desplazamientos químicos de los protones más significativos del ciclopéptido β-lactámico **2** junto con los coeficientes térmicos de sus protones amida, las constantes de acoplamiento y el ángulo diedro correspondiente calculado a partir de la ecuación de Karplus<sup>62</sup>.

**Tabla 3.4:** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm), constantes de acoplamiento ( $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ ), ángulos diedros y coeficientes térmicos  $\Delta\delta/\Delta T(H^N)$  de los protones más significativos del ciclopéptido β-lactámico **2** medido a 340 K en DMSO<sub>d6</sub>.

Residuo	$\delta H_\alpha$	$\delta H^R_\beta/H^S_\beta$	$\delta H_\gamma$	$\delta H^N$	$^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ (Hz)	$\phi(\text{HN-C}\alpha\text{H})$	$\Delta\delta/\Delta T(H^N)$ (ppb/K)
β-Lactam	----	3.70/3.29	3.20/3.04	8.06	----	----	-4.8
Aib1	----	1.18/1.00	----	----	----	----	----
Ala2	4.18	1.27	----	7.71	7.6	±147	-4.8
Ala3	4.14	1.28	----	7.81	----	----	<u>-2.0</u>
Ala4	4.23	1.24	----	7.82	----	----	<u>-2.2</u>

A la vista de los datos obtenidos en la deriva térmica, el ciclopéptido β-lactámico **2** presenta dos enlaces de hidrógeno intramoleculares estables en el que intervienen los NH de los residuos Ala4 y Ala3. Del mismo modo que en el caso del ciclopéptido **1**, se calcularon las distancias interprotónicas mediante la integración de las señales más

significativas del espectro ROESY<sup>61</sup> a un tiempo de mezcla de 400 ms. En la **Tabla 3.5** y en la **Figura 3.20** se muestran las principales distancias promedio tomando como referencia la distancia de 2.4 Å entre los protones NH(Ala2)/Me(Ala2).

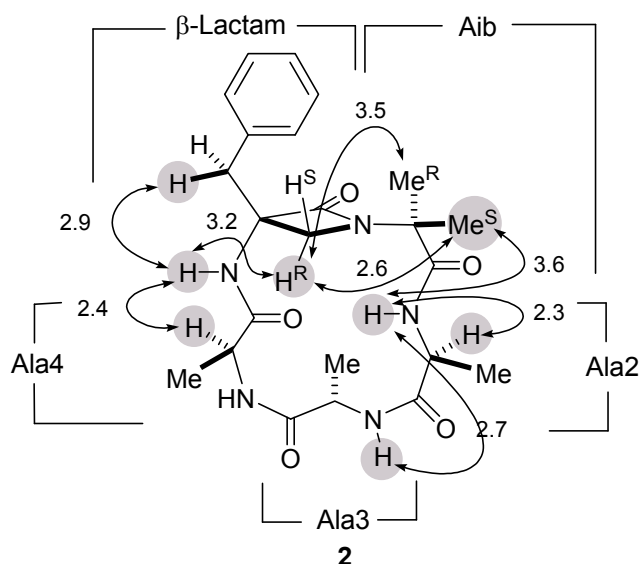
Seguidamente, se aplicaron las distancias interprotónicas de la **Tabla 3.5** como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o clusters más relevantes del ciclo **2** empleando la técnica de *Simulated Annealing* (**Tabla 3.6**). A diferencia de lo observado previamente con el ciclopéptido de poliglicina **1**, en el caso del ciclopéptido de polialanina **2** se obtuvo un único cluster (**2-A**) integrado por 69 estructuras que cumplían todas las restricciones impuestas o incumplían únicamente una de ellas. Además, se constató la presencia de dos giros contiguos de tipo  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$  formando enlaces de hidrógeno intramoleculares a partir de los protones amídicos NH(Ala3) y NH(Ala4).

**Tabla 3.5:** Distancias interprotónicas promedio (en Å) del ciclopéptido **2** obtenidas a partir del espectro ROESY<sup>a), b)</sup>.

H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	Distancias medias interprotónicas H <sub>A</sub> -H <sub>B</sub>
NH(Ala2)	Me <sup>R</sup> (Aib)	2.4
NH(Ala2)	Me <sup>S</sup> (Aib)	3.6
NH(Ala2)	CH $\alpha$ (Ala2)	2.3
NH(Ala2)	CH $\alpha$ (Ala3)	3.0
NH(Ala2)	NH(Ala3)	2.7
NH( $\beta$ -Lactam)	H <sup>R</sup> $\beta$ ( $\beta$ -Lactam)	3.2
NH( $\beta$ -Lactam)	CH $\alpha$ (Ala4)	2.4
NH( $\beta$ -Lactam)	CH $\gamma$ ( $\beta$ -Lactam) <sup>1</sup>	2.9
H <sup>R</sup> $\beta$ ( $\beta$ -Lactam)	Me <sup>R</sup> (Aib)	2.6
H <sup>R</sup> $\beta$ ( $\beta$ -Lactam)	Me <sup>S</sup> (Aib)	3.5
NH(Ala4)	CH $\alpha$ (Ala4)	2.4

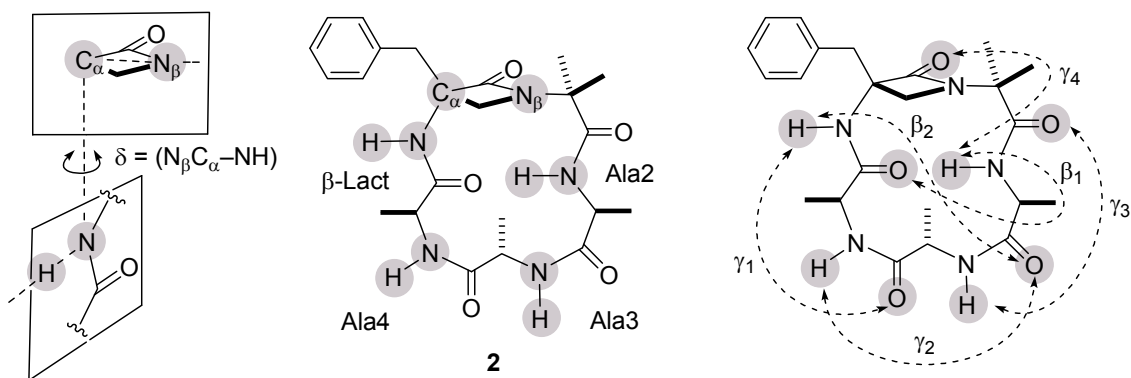
a) Distancia de referencia empleada en la restricción [NH(Ala2)-Me(Ala2)]= 2.4 Å

b) Tiempo de mezcla 400 ms.



**Figura 3.20:** Interacciones NOE significativas y distancias interprotónicas (en Å) del ciclopeptido  $\beta$ -lactámico **2** calculadas por integración de las señales NOE en disolución de  $\text{DMSO}_{d6}$ .

**Tabla 3.6:** Clusters conformacionales del ciclopeptido **2** definidos por el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta$ , indicador de la orientación de los grupos amida en relación al plano medio macrocíclico <sup>a)</sup> y de las distancias  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  de los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares.

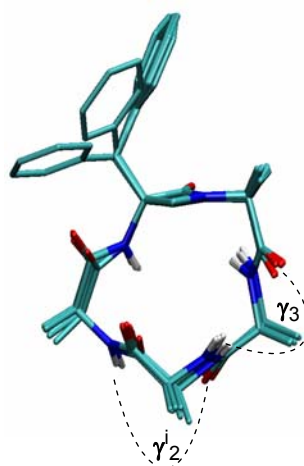


Cluster (n) <sup>b)</sup>	$\delta = (\text{N}\beta\text{C}\alpha\text{-NH})$				Distancia $\text{CO}\cdots\text{HN}$ (Å)					
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-Lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Ala4}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Ala3}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Ala2}}$	$\langle\gamma_1\rangle$	$\langle\gamma_2\rangle$	$\langle\gamma_3\rangle$	$\langle\gamma_4\rangle$	$\langle\beta_1\rangle$	$\langle\beta_2\rangle$
<b>2-A</b> (69)	-47.3	-81.1	+43.6	-123.6	3.5	<b>2.6</b>	<b>2.5</b>	3.0	5.9	5.2

- a) Una orientación anterior al plano medio macrocíclico del enlace  $\text{CON-H}$  corresponde a un valor positivo  $\delta$  (+); mientras que la orientación posterior de dicho enlace corresponde a un valor negativo  $\delta$  (-).
- b) Entre paréntesis se indica el número de estructuras que incumplen una o ninguna de las restricciones de distancia interprotónica.
- c) Valores promedio (en Å) de la distancia  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  en posibles giros ( $\gamma_1$ - $\beta$ ). En negrita se muestran los enlaces de hidrógeno formados.



En la **Figura 3.21** se muestra la superposición de cinco estructuras del cluster **2-A** obtenidas a partir de los cálculos de *Simulated Annealing* restringidos con distancias interprotónicas. Una vez más, los dos enlaces de hidrógeno observados para los protones amídicos Ala3 y Ala4 coinciden con los residuos que presentan los coeficientes térmicos más bajos (**Tabla 3.4**). Además, la estabilización de dos giros contiguos de tipo  $\gamma_2^i$  y  $\gamma_3$  en frente del fragmento de restricción conformacional es un motivo que concuerda con lo observado por otros autores en ciclopentapéptidos del tipo *ciclo*-[D-Ala-Ala<sub>4</sub>] con diferente grados de metilación<sup>32</sup>.



**2-A** (69) [ $\gamma_2^i$ ] [ $\gamma_3$ ]

**Figura 3.21:** Superposición de conformeros representativos de clusters para el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **2**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones y entre corchetes los tipos de giros formados

En resumen, el comportamiento conformacional del ciclopéptido **2** vuelve a confirmar la gran capacidad gammágena de la  $\beta$ -lactama y su nula tendencia a inducir giros  $\beta$  nucleados en torno al anillo  $\beta$ -lactámico. Además, a diferencia del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico poliglicínico **1** que presentó una considerable flexibilidad de la cadena peptídica (reflejada en la formación de 6 clusters conformacionales), el ciclopéptido  $\beta$ -lactámico de polialaninas **2** muestra una estructura mucho más rígida donde la rotación de los grupos amido no es posible y la única movilidad permitida es la torsión parcial de las amidas Ala2-Ala3 para reforzar alternativamente el giro inverso  $\gamma_2^i$  o el giro  $\gamma_3$ . Todo ello concuerda con la observación de conformeros minoritarios no interconvertibles a temperatura ambiente durante el estudio inicial de RMN al analizar el espectro de protón en diferentes disolventes y a varias temperaturas (**Figura 3.16**).

Por último un aspecto a considerar en el comportamiento conformacional del ciclopéptido **2** es el posible efecto restrictor que pueda causar el residuo Aib. Como es bien conocido, la conformación en ciclopéptidos de pequeño tamaño está condicionada principalmente por las interacciones estéricas de los sustituyentes<sup>65</sup> afectando a los ángulos diedros del esqueleto peptídico. En concreto, es conocido que el grupo Aib, reduce la libertad conformacional de los ángulos diedros próximos a él, es decir,  $\phi_2$  N-C(Aib)-CO y  $\psi_2$  CH<sub>3</sub>-C(Aib)-CO<sup>66</sup>. Esta limitación podría enmascarar parcialmente la interpretación de las restricciones ejercidas por los grupos metilos de las alaninas, pero en cualquier caso, no parece ser determinante a la hora de causar una drástica disminución de la libertad conformacional observada para el ciclopéptido **2**.

En los siguientes apartados de esta memoria se extenderán estos estudios a ciclopéptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD con sustituyentes funcionalizados en los residuos (3) y (5) del ciclopéptido y se intentará establecer una relación entre su conformación y su bioactividad.

### 3.2. Síntesis de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD

Una vez establecido el comportamiento conformacional de los ciclopentapéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2**, pasamos a estudiar los análogos funcionalizados de tipo RGD. En los siguientes apartados de este capítulo se describirá la síntesis y análisis conformacional de una serie de ciclopéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos **3-4** derivados formalmente del compuesto **III**, único de estas características sintetizado previamente en nuestro laboratorio<sup>46</sup>.

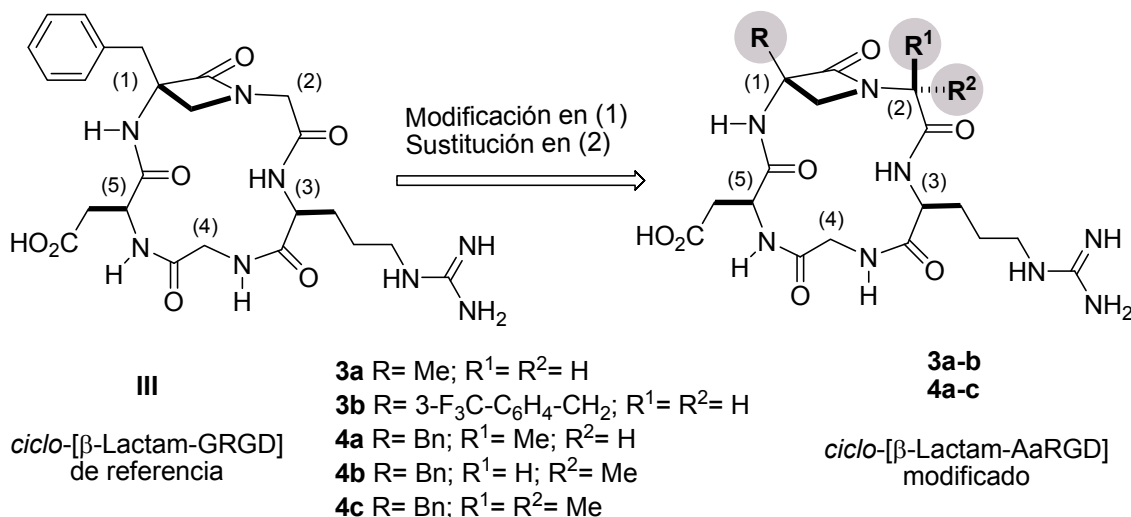
Tal y como se recoge en el **Esquema 3.14**, se realizaron dos tipos de modificaciones en el ciclopeptidomimético RGD (**III**) de partida: a) la sustitución del grupo R en C $\alpha$  del anillo de la  $\beta$ -lactama, y b) la sustitución en C $\alpha'$  (R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>), que puede conllevar la creación de un estereocentro adicional.

Concretamente, modificando el grupo R de los ciclos del tipo **3**, proyectamos preparar dos ciclopéptidos; el *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Me)-GRGD] **3a** y el *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(3-CF<sub>3</sub>-

<sup>65</sup> Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2393-2400.

<sup>66</sup> (a) Raghothama, S.; Chaddha, M.; Balaram, P. *Proc. Nat. Acad. Sci. India*, **1996**, *66*, 33-44. (b) Schweitzer-Stenner, R.; Gonzales, W.; Bourne, G. T.; Feng, J. A.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13095-13109.

$\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$ )-GRGD] **3b**. También emprendimos la síntesis de tres ciclos del tipo **4** modificando los grupos de reconocimiento  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  en la posición  $\text{C}\alpha'$  del ciclo RGD  $\beta$ -lactámico. Dos de ellos monosustituídos en el residuo (2) con grupos metilo y configuración opuesta en  $\text{C}\alpha'$  [**4a** (*S*) y **4b** (*R*)] y, finalmente, el ciclo dimetilado **4c**.



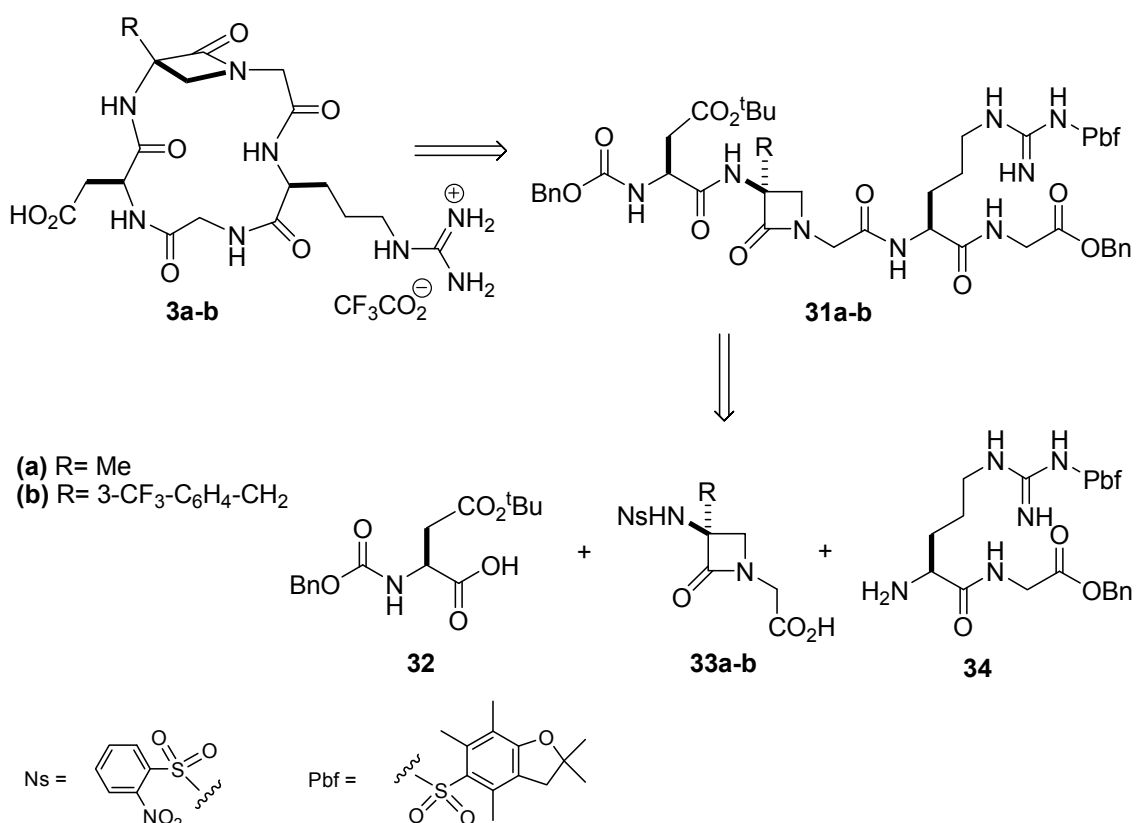
**Esquema 3.14:** Modificaciones estructurales realizadas sobre el ciclopeptidomimético *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly-Arg-Gly-Asp] **III**.

### 3.2.1. Síntesis de los peptidomiméticos **3**, del tipo *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg-Gly-Asp]

La estrategia sintética aplicada para sintetizar los compuestos **3** fue la misma que para el caso del ciclo **2**, preparando los intermedios  $\beta$ -lactámicos **33a-b** a partir de N-nosil aziridinas (**Esquema 3.15**) y protegiendo los extremos de los péptidos **31a-b** con los grupos Cbz y éster bencílico que se desprotegerían simultáneamente en la etapa previa a la ciclación. Los grupos (R) seleccionados para modificar el fragmento  $\beta$ -lactámico de los ciclos RGD fueron el grupo metilo (Me) y el 3-trifluorobencilo ( $3\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2$ ). Su elección se realizó buscando interacciones lo más diferentes posibles entre sí con integrinas  $\alpha_v\beta_3$ .

Para llevar a cabo la síntesis de los ciclos **3** fue necesario disponer de dos pares ortogonales de grupos protectores en los precursores lineales **31**. Uno (Bn) para proteger los grupos N- y C- terminales durante los correspondientes acoplamientos y

otro para proteger los grupos funcionales reactivos como el ácido carboxílico del resto aspártico y el grupo guanidinio del resto arginina. Para la arginina se optó por el grupo 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf)<sup>67</sup>, ya utilizado anteriormente en nuestro laboratorio, y para el ácido aspártico se empleó el éster de terc-butilo. Ambos grupos se eliminan con ácido trifluoroacético y soportan la hidrogenación catalítica previa a la ciclación. Además, el grupo Boc se puede eliminar con ácido fórmico sin afectar al grupo Pdf, lo cual permite la preparación del dipéptido **34** (H-Arg(Pbf)-Gly-OBn).

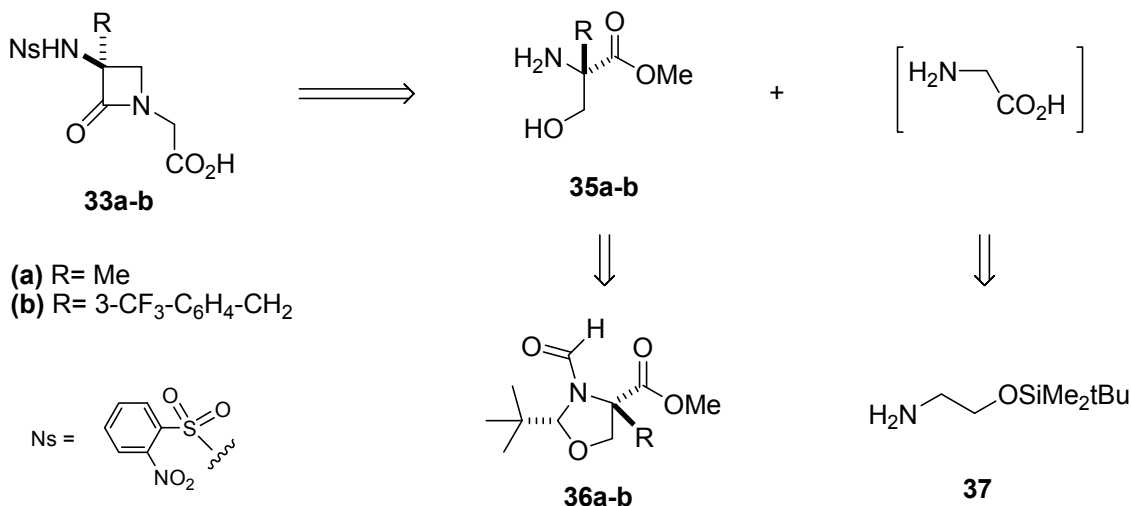


**Esquema 3.15:** Retrosíntesis de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **3**.

De modo similar a la síntesis de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2** descrita en el apartado 3.1, la preparación de los intermedios clave  $\beta$ -lactámicos **33a-b** se planteó a partir de los serinatos  $\alpha$ -sustituídos **35a-b** y de la glicina. No obstante, debido a la incompatibilidad de ésta con las condiciones fuertemente básicas requeridas para la formación de la  $\beta$ -lactama (ver **Esquema 3.16**), se optó por sustituirla por el equivalente sintético *O*-terc-butildimetilsililetanolamina **37**.

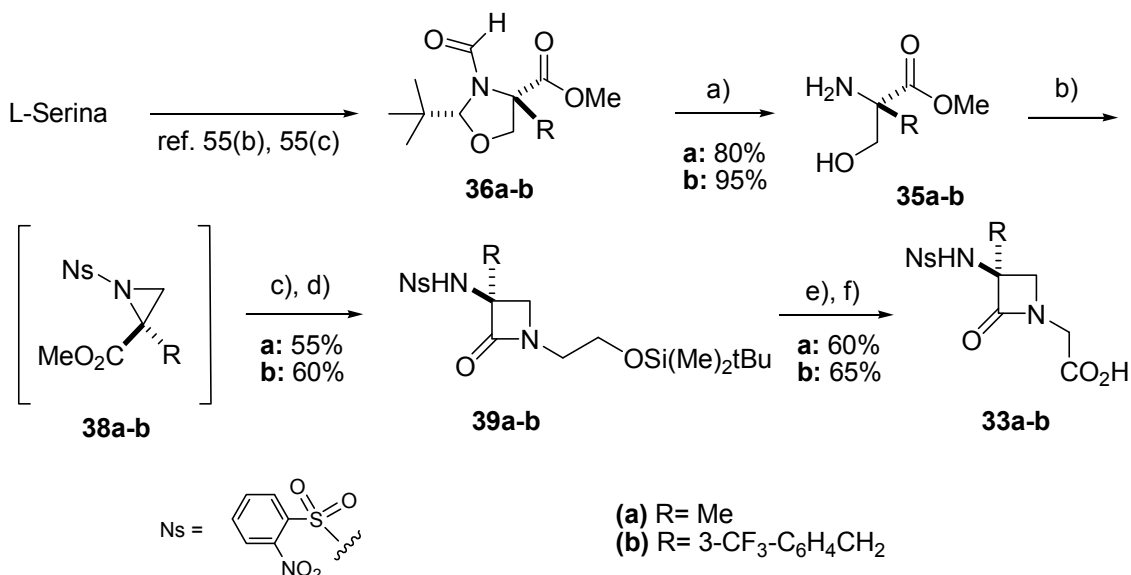
<sup>67</sup> Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829-7832.

Por otra parte, la introducción de diferentes grupos en  $\alpha$  de los serinatos **35a-b**, se llevó a cabo por alquilación de la correspondiente oxazolidina **36** (R=H) con yoduro de metilo (MeI) y con bromuro de 3-trifluorometilbencilo (3-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>Br) siguiendo el método de Seebach<sup>55</sup>.



**Esquema 3.16:** Retrosíntesis de las  $\beta$ -lactamas **33a-b**.

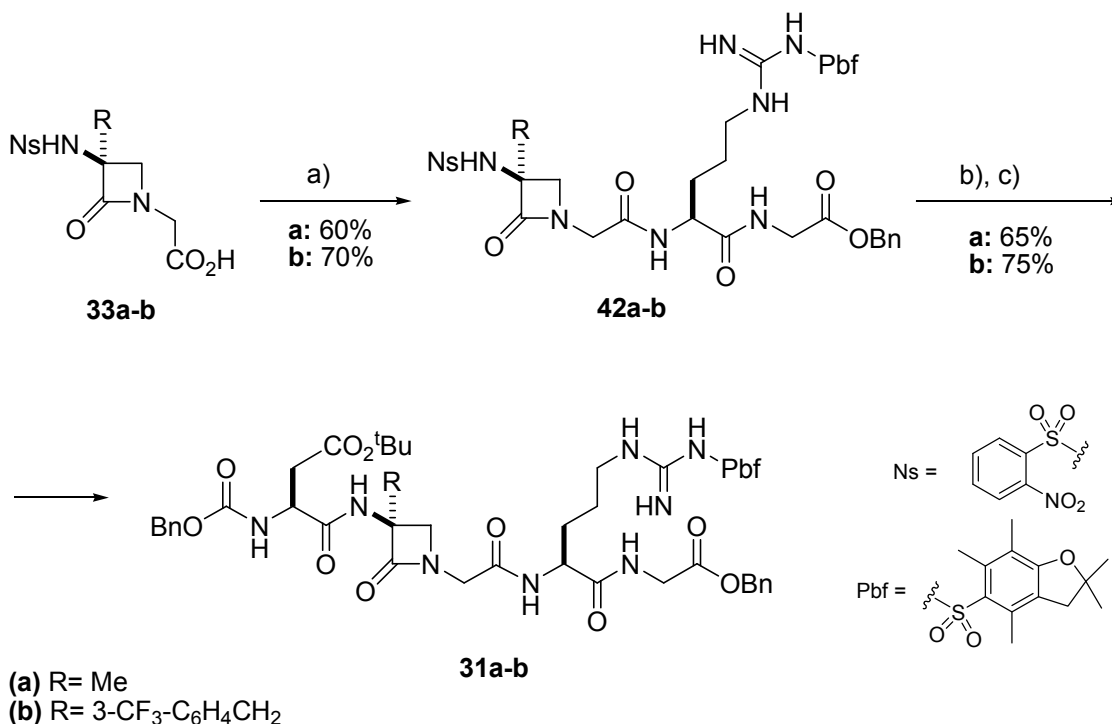
En el siguiente esquema se detalla la secuencia sintética seguida para preparar las N-carboximetil- $\beta$ -lactamas **33a-b** a partir de la L-serina. De esta forma, tras ciclar los  $\alpha$ -alquilserinatos **35a-b** a las correspondientes aziridinas **38**, éstas se abrieron con la etanolamina O-sililada **37**.



**Esquema 3.17:** a) 12M HCl, MeOH, reflujo, 12h; b) NsCl, KHCO<sub>3</sub>, MeCN, reflujo, 16h; c) <sup>t</sup>BuMe<sub>2</sub>SiO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (**37**), MeCN, t.a., 16h; d) LHMDs, THF, 0°C, 30min; e) HF, MeCN, 0°C  $\rightarrow$  t.a., 2h; f) CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Acetona/PrOH/H<sub>2</sub>O, 0°C  $\rightarrow$  t.a., 1h.

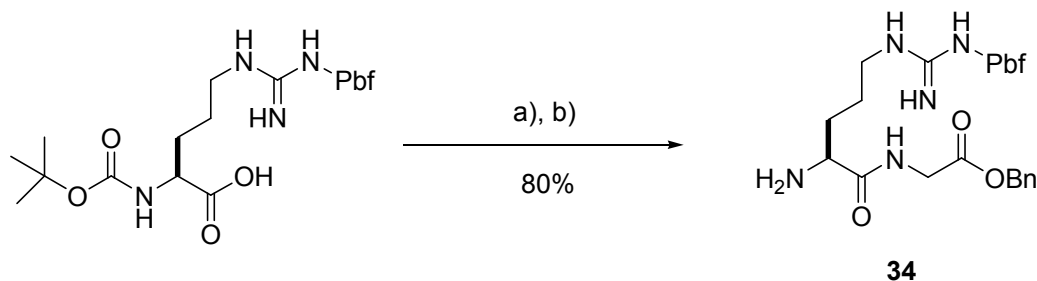
Los  $\beta$ -aminoésteres intermedios así formados se ciclaron con bis(trimetilsilil)amiduro de litio proporcionando las correspondientes  $\beta$ -lactamas sililadas **39** que se purificaron mediante cromatografía de columna. A partir de las  $\beta$ -lactamas **33a** y **33b** se fueron preparando los respectivos pseudopentapéptidos  $\beta$ -lactámicos lineales **31a-b** por sucesivos acoplamientos peptídicos. En primer lugar se acoplaron las  $\beta$ -lactamas **33a-b** al dipéptido Arg(Pbf)GlyOBn **34**, preparado previamente por reacción entre la Boc-Arg(Pbf)-OH comercialmente asequible y el éster bencílico de la glicina (ver **Esquema 3.18**).

Por otro lado, la preparación del dipéptido **34** se llevó a cabo por acoplamiento entre la Boc-arginina y el glicinato de bencilo con HOBt y EDC·HCl (**Esquema 3.19**). El péptido intermedio Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn **41** se purificó por cromatografía en columna y se aisló con un rendimiento del 90%. Seguidamente, se desprotegió quimiosselectivamente el grupo Boc de la arginina en dicho intermedio con ácido fórmico a temperatura ambiente, proporcionando la amina **34** deseada con un rendimiento global del 80%.



**Esquema 3.18:** a) H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (**34**) (1.1eq), HOBt (1.1eq), Et<sub>3</sub>N (5eq), EDC·HCl (1.5eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a. 16h; b) PhSH (2eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1eq), MeCN, t.a., 1.5h; d) Cbz-Asp(OtBu)-F (**40**) (1.5eq), NMM (3eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a. 16h.

Tras aislar la amina libre del dipéptido Arg(Pbf)GlyOBn **34** mediante extracción ácido-básica, ésta se acopló a las  $\beta$ -lactamas **33a** y **33b** mediante tratamiento con HOBt, EDC·HCl y trietilamina (**Esquema 3.18**).

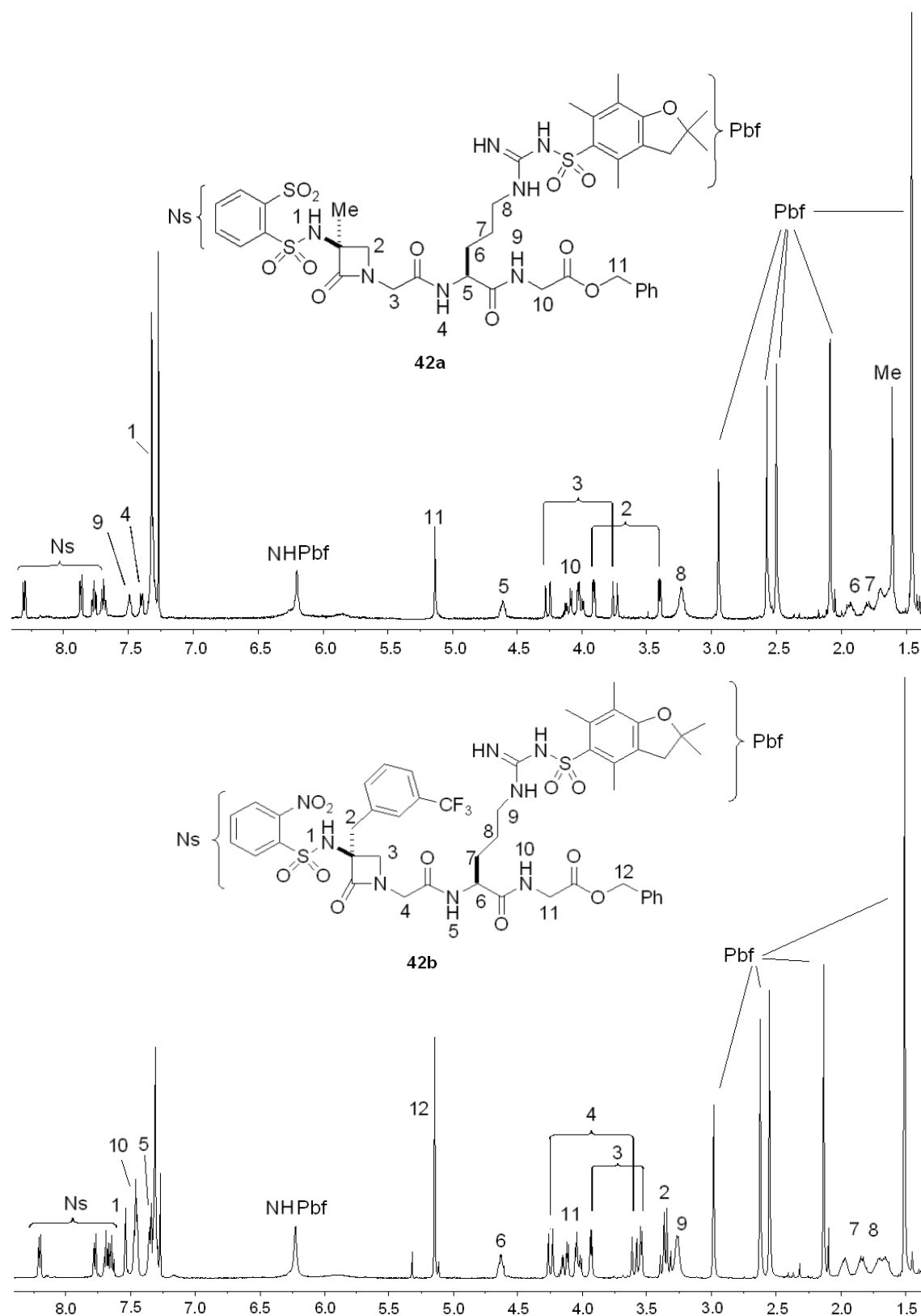


**Esquema 3.19:** a) *H-Gly-OBn* (1 eq), *HOBt* (1.1eq), *EDC·HCl* (1.5eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a. 16h; b)  $\text{HCO}_2\text{H}$ , t.a. 1.5h.

Los productos purificados por cromatografía en columna se obtuvieron con un rendimiento del 60% para el compuesto con el grupo metilo **42a** y de un 70% para el análogo portador del grupo 3-trifluorometilbencilo **42b**. Los productos obtenidos se caracterizaron mediante  $^1\text{H}$ -RMN. En la **Figura 3.22** se muestran los espectros de los compuestos **42a** y **42b**, donde se observan las señales del grupo nosilo entre 8.22 y 7.60 ppm. Por otro lado, las señales de los protones de la posición  $\beta$  del anillo de  $\beta$ -lactama aparecen a 3.40 y 3.90 para el compuesto **42a** (señal 2) y a 3.50 y 3.90 ppm para el **42b** (señal 3) con unas constantes de acoplamiento de 5.4 y 5.9 Hz respectivamente. Además, se pueden observar las diferentes señales de los sustituyentes en  $\alpha'$  de la  $\beta$ -lactama (señal 3). Así, en el compuesto **42a**, la señal del metilo aparece como un singlete a 1.61 ppm, mientras que en el compuesto **42b**, las señales del grupo trifluorometilbencilo, aparecen en la zona de los aromáticos y a 3.32 ppm como multiplete (señal 2).

Una vez obtenidos los compuestos **42a-b**, éstos se desnosilaron según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3.2., obteniéndose las aminas libres **43a-b** que se acilaron con el dipéptido comercial Cbz-Asp(OtBu)-OH. Para ello, primeramente se formó el fluoruro de ácido Cbz-Asp(OtBu)-F **40** siguiendo el procedimiento de Carpino<sup>68</sup> (ver **Esquema 3.18**). Este método resulta eficaz para activar los grupos carboxilo peptídicos de cara a llevar a cabo acoplamientos estéricamente impedidos, aunque tiene la desventaja de emplear el reactivo tóxico fluoruro de cianurilo.

<sup>68</sup> Carpino, A.; Mansour, M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2611-2614.

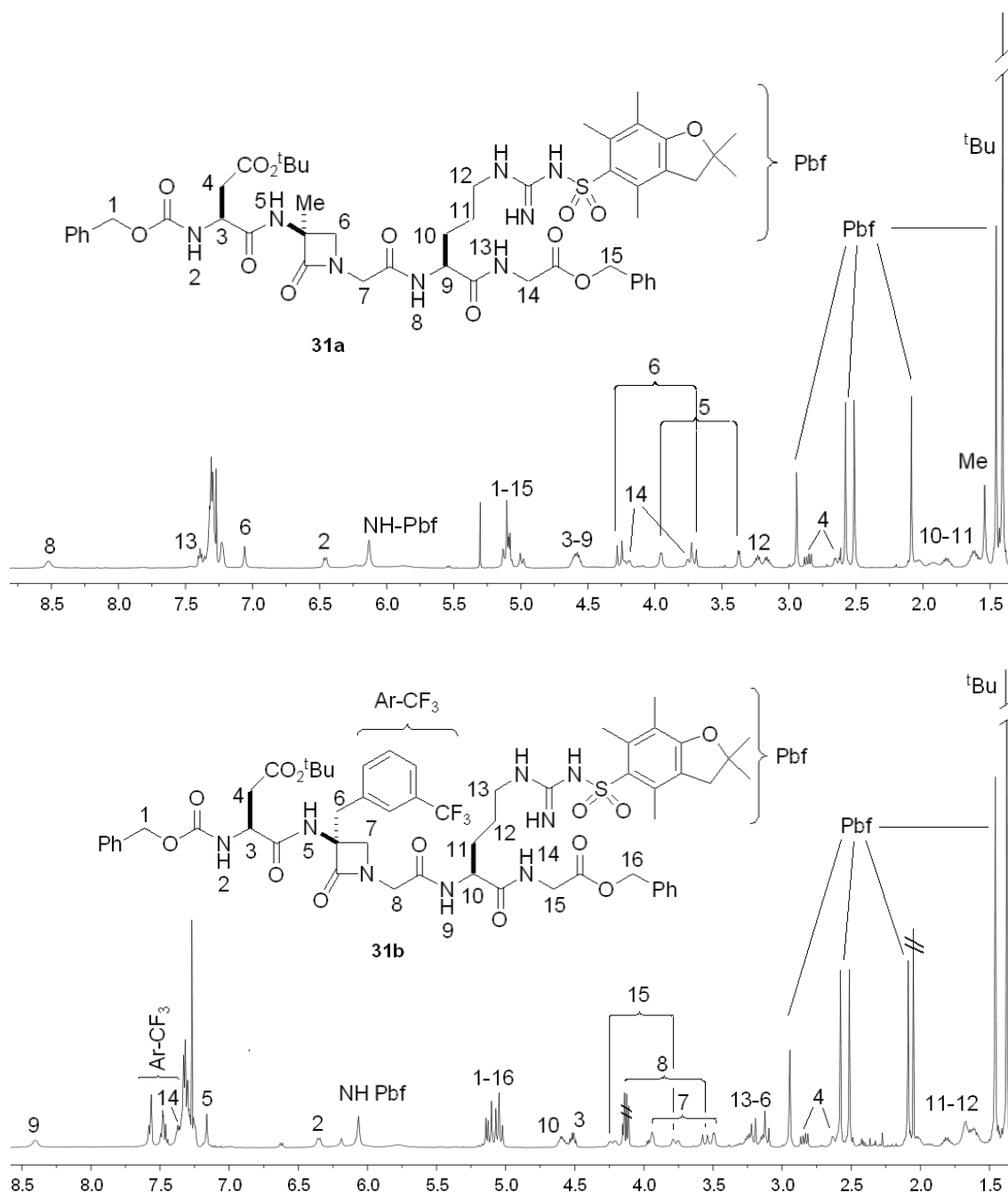


**Figura 3.22:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **42a** y **42b** en  $\text{CDCl}_3$ .

Los pseudopéptidos  $\beta$ -lactámicos **31a** y **31b** se obtuvieron tras purificar los crudos correspondientes por cromatografía en columna con rendimientos del 65 y 75%

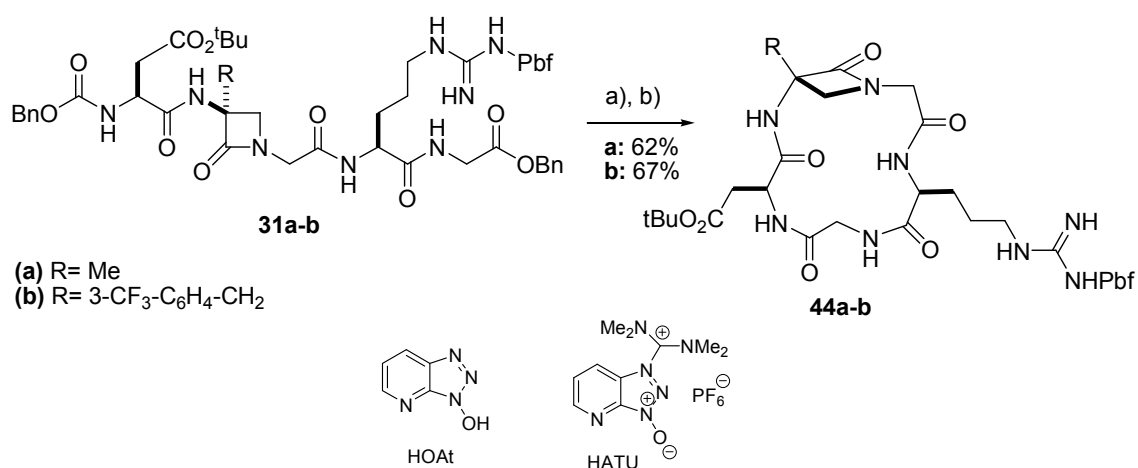


respectivamente. En la **Figura 3.23** se muestran los espectros de dichos compuestos donde se aprecian las nuevas señales provenientes del grupo Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu), el multiplete a 4.65 ppm perteneciente al C $\alpha$  del aspártico (señal 3) y el singlete a 1.44 ppm de los protones metílicos del grupo *terc*-butilo (<sup>t</sup>Bu), así como el doble doblete entre 2.97-2.89 ppm de los protones en  $\beta$  del residuo de ácido aspártico (señal 4). Además, puede observarse que en la región de 5.16-5.01 ppm (protones 1-15) la complejidad de las señales aumenta respecto a los compuestos nosilados **42a-b** (señal 11 y 12 respectivamente), ya que en este caso además del éster bencílico está presente el grupo Cbz.



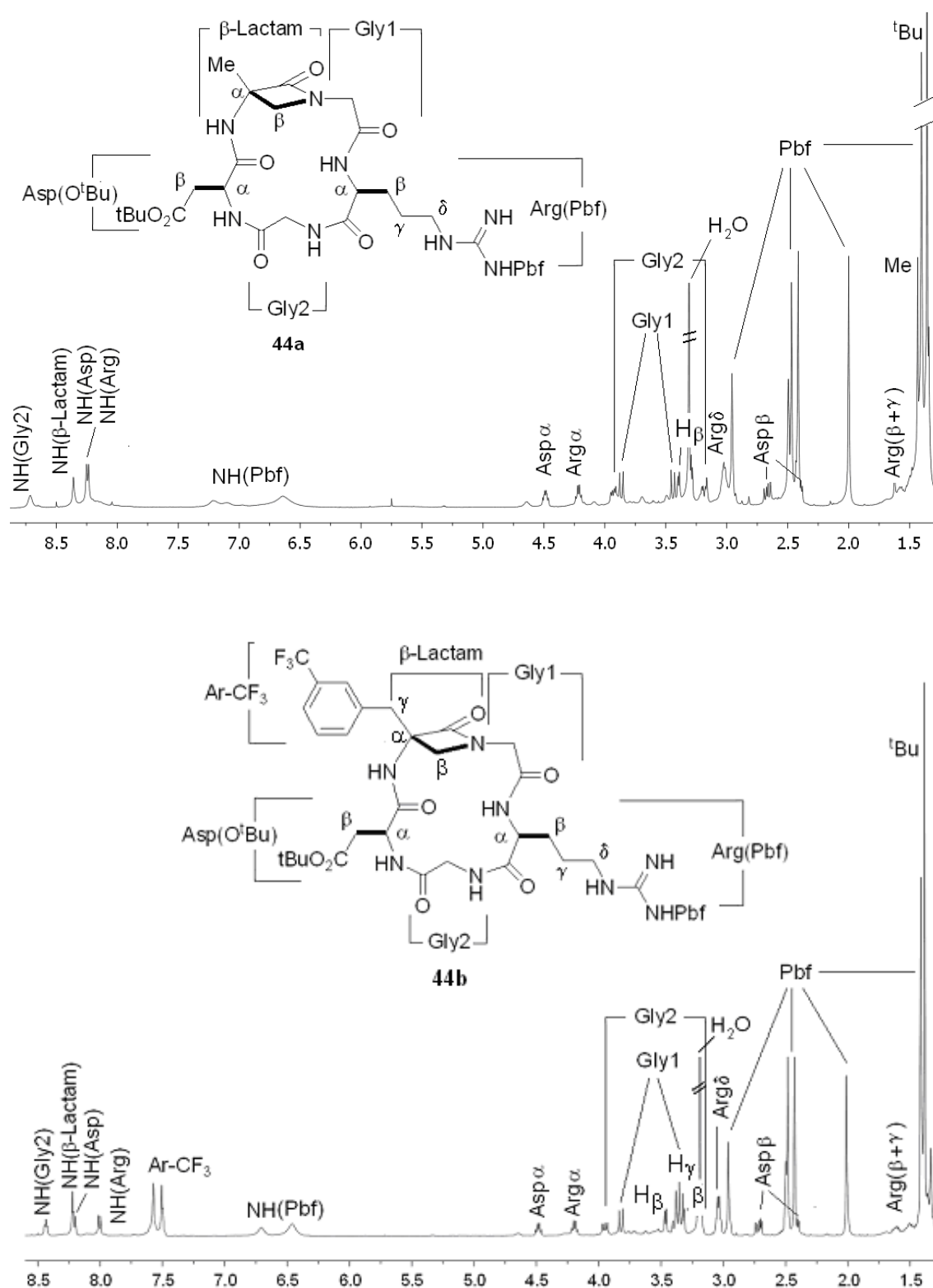
**Figura 3.23:** Espectros <sup>1</sup>H-RMN (500MHz) de los compuestos **31a-b** en CDCl<sub>3</sub>.

Finalmente, aparecen nuevas señales de amida a 8.60 y 8.50 ppm respectivamente y desaparecen las señales del grupo nosilo entre 7.60-8.22 ppm de los precursores **42a-b** (ver **Figura 3.22**). Una vez obtenidos los precursores lineales **31a-b**, se desprotegeron sus extremos N- y C- terminales por hidrogenólisis catalizada por paladio/carbono en metanol a temperatura ambiente y presión atmosférica. Los crudos de reacción obtenidos fueron empleados inmediatamente en la siguiente etapa de ciclación sin ser sometidos a una purificación adicional.



**Esquema 3.20:** a) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 6h; b) HATU (1.2eq), HOAt (1.4eq), KHCO<sub>3</sub> (10eq), DMF, -10°C, 24h.

Las ciclaciones se llevaron a cabo a -10°C y a alta dilución (4mM) durante 24h, utilizando HATU y HOAt como reactivos de acoplamiento, bicarbonato potásico anhidro como base y DMF como disolvente.

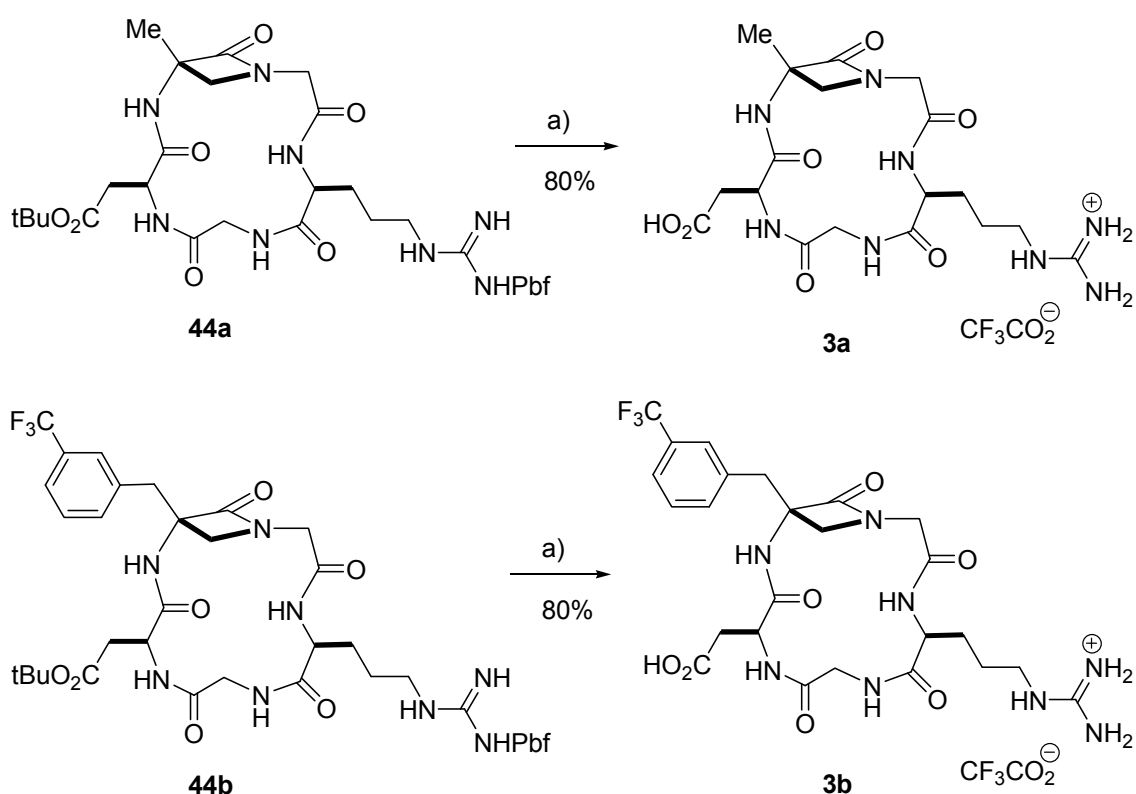


**Figura 3.24:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **44a** y **44b** en  $\text{DMSO-}d_6$ .

De esta forma se obtuvieron crudos bastante limpios que se terminaron de purificar por cromatografía de capa fina preparativa. Los rendimientos globales de la transformación desde los péptidos lineales protegidos **31a-b** fueron de un 62% y de un

67% respectivamente. En la **Figura 3.24** se pueden ver los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de ambos ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos.

Finalmente, se procedió a desproteger los grupos Pbf y Boc de los restos de arginina y ácido aspártico con ácido trifluoroacético bajo atmósfera inerte y a una temperatura de entre 30-35°C. Se obtuvieron así las sales trifluoroacéticas de los pseudopéptidos *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Me)-GRGD] **3a** y *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(3- $\text{CF}_3$ - $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$ )-GRGD] **3b**. Tras su purificación por precipitación con éter diisopropílico, se obtuvieron los compuestos cíclicos deseados con un 80% de rendimiento en ambos casos.

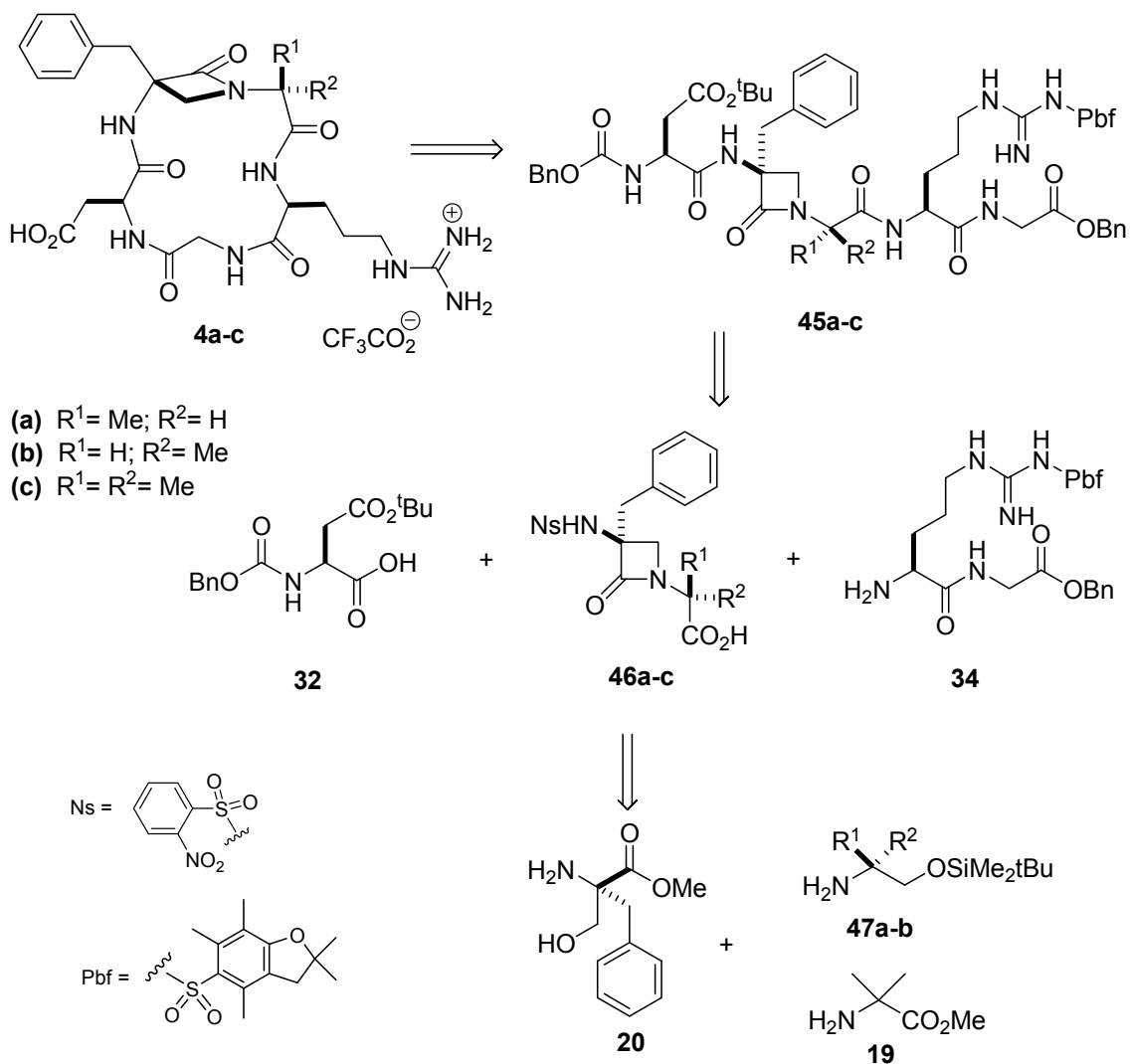


**Esquema 3.21:** a)  $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ , 35°C, 1h; recristalización en  $i\text{Pr}_2\text{O}$ .

### 3.2.2. Síntesis de peptidomiméticos *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg-Gly-Asp] **4a-c**

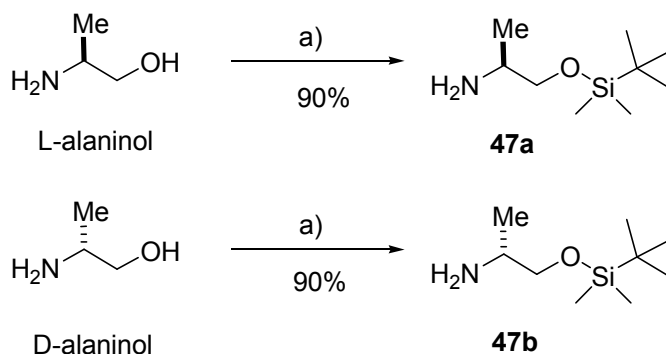
En este apartado se describirá la síntesis de tres ciclopéptidos de tipo RGD con diferentes tipos de sustitución ( $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$ ) en el residuo (2) del anillo peptídico. La estrategia sintética adoptada fue similar a la de los casos anteriores. Según se muestra en el esquema retrosintético del **Esquema 3.22**, las diferentes  $\beta$ -lactamas sustituidas en el residuo (2) **46a-b** se sintetizaron a partir del bencilserinato de metilo

**20** y las correspondientes aminas **47a-b** o el  $\alpha$ -aminoisobutirato de metilo **19**. Como modelo de  $\beta$ -lactama  $\alpha',\alpha'$ -disustituída se empleó el ácido **46c** cuya preparación a partir del aminoéster **19** ya ha sido comentada en el apartado 3.1.2.2. (**Esquema 3.7**).



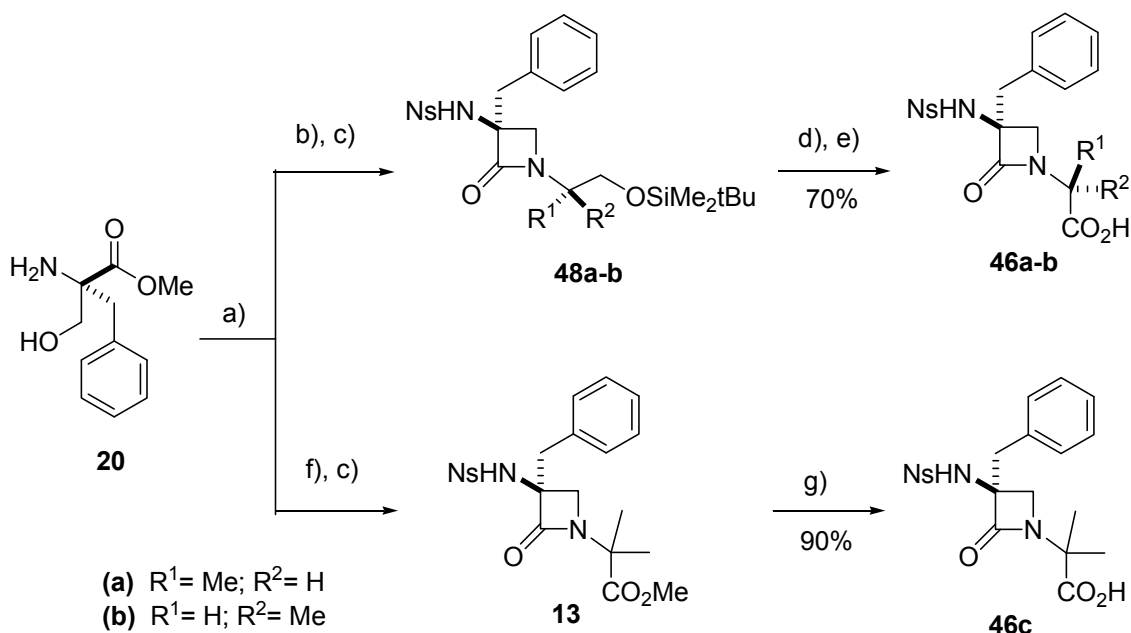
**Esquema 3.22:** Esquema retrosintético para la preparación de los ciclopentapéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos **4a-c** sustituidos en el residuo (2).

Los aminoalcoholes O-sililados **47a** y **47b** se prepararon a su vez a partir de (L) y (D) alaninol respectivamente, por sililación con *tert*-butildimetilclorosilano en presencia de trietilamina (**Esquema 3.23**).



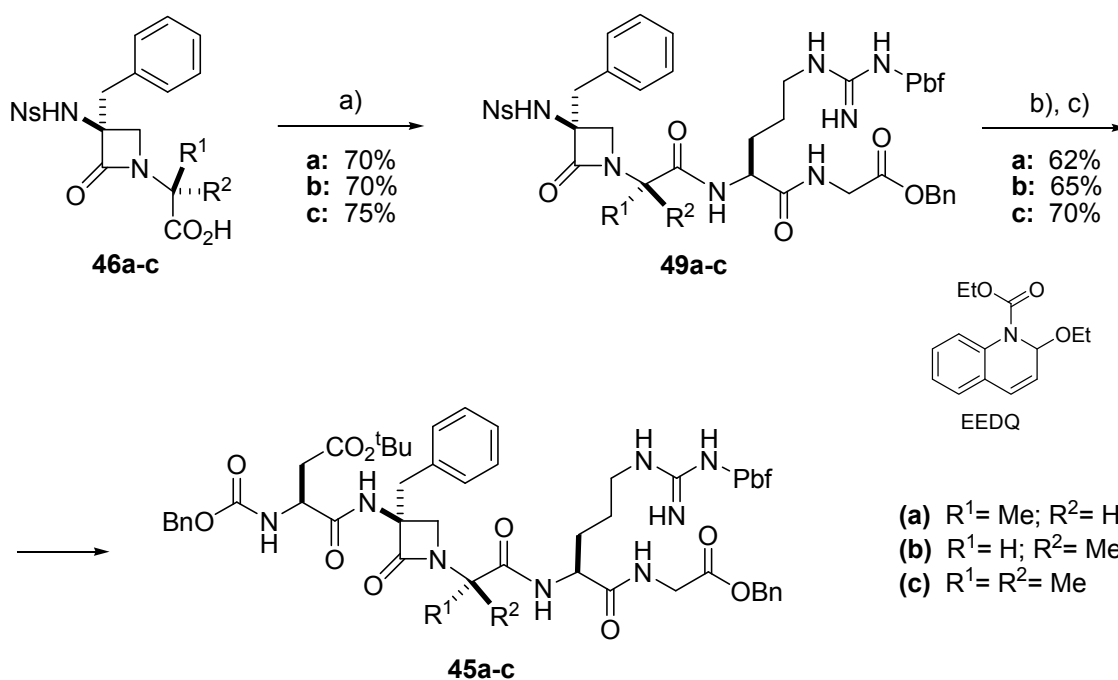
**Esquema 3.23:** a)  $t\text{BuMe}_2\text{SiCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 16h.

En el **Esquema 3.24**, se recogen las rutas seguidas para la obtención de las  $\beta$ -lactamas carboxílicas **46** a partir del bencilserinato de metilo **20** siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (ver **Esquema 3.17**). Para ello, se abrió la aziridina intermedia resultante de la ciclación de **20** con las *O*-*tert*-butildimetilsililetanoalminas **47a** y **47b**. Después, los  $\beta$ -aminoésteres intermedios resultantes se volvieron a ciclar por tratamiento con LHMDS dando las correspondientes  $\beta$ -lactamas **48a**, **48b** y **13**, que se transformaron en los compuestos carboxílicos bien por oxidación ( $\beta$ -lactamas **48a** y **48b**) o por saponificación ( $\beta$ -lactama **13**).



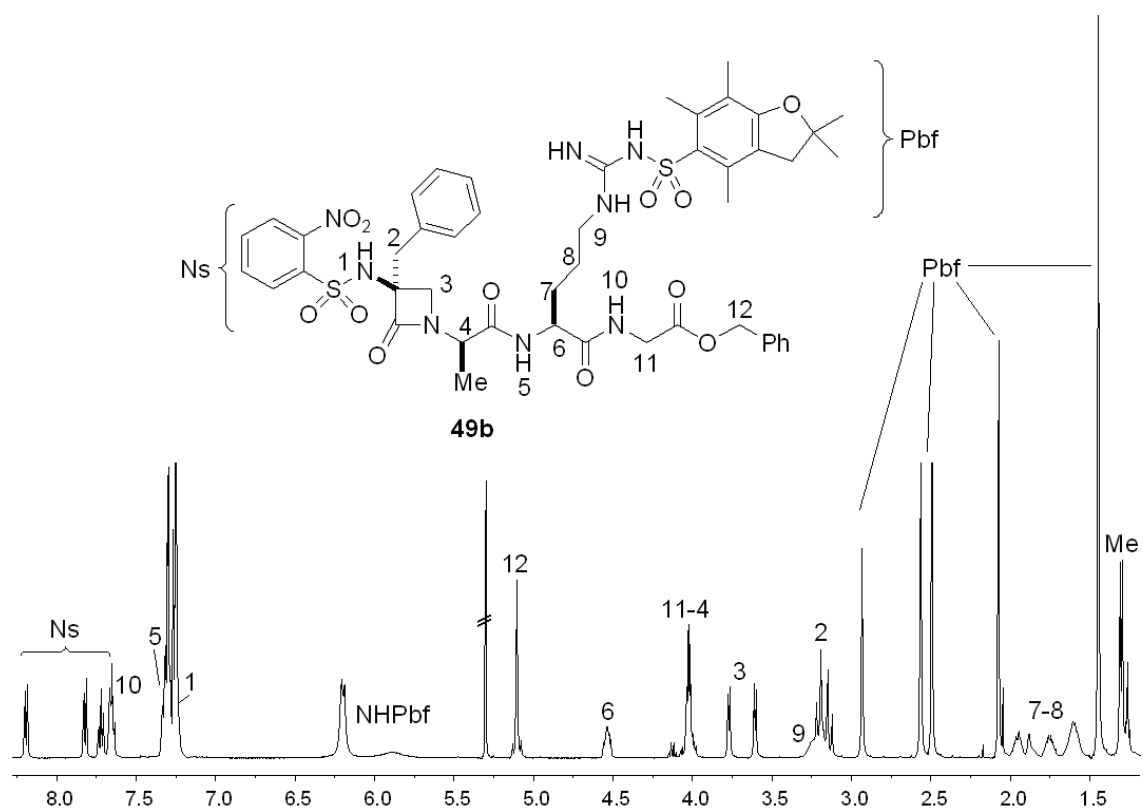
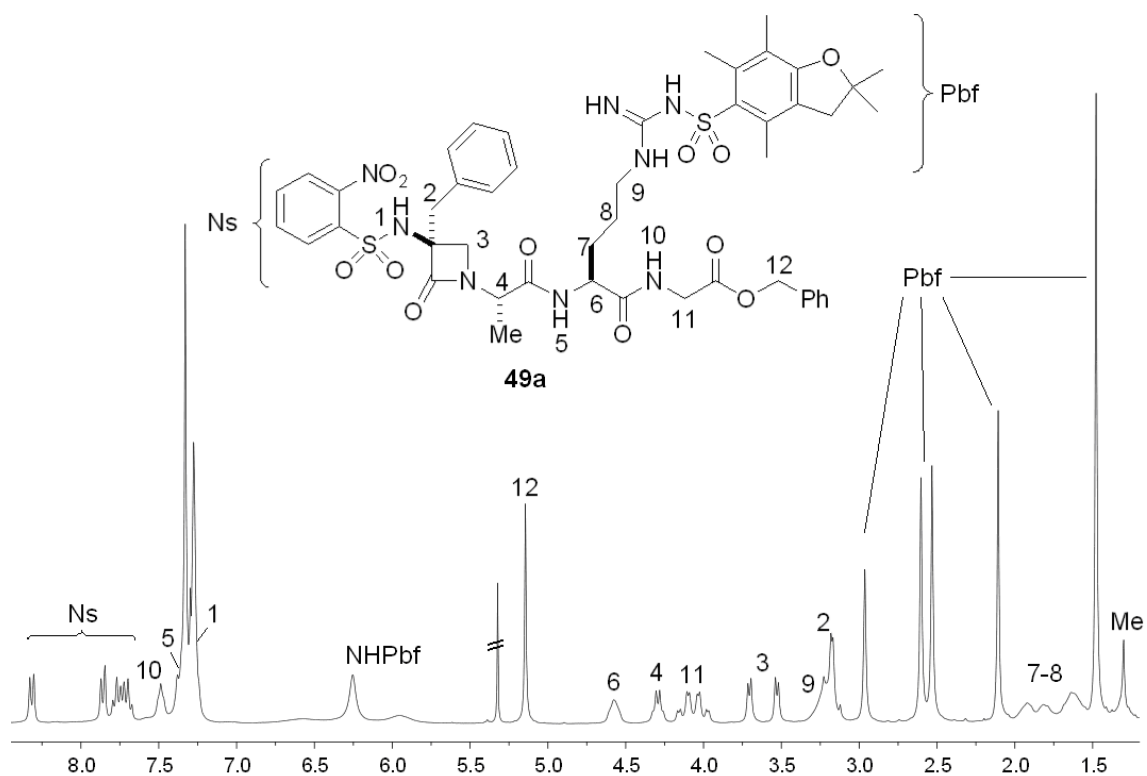
**Esquema 3.24:** a)  $\text{NsCl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{MeCN}$ , reflujo, 16h; b) **47a-b**, t.a., 16h; c) LHMDS,  $\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min.; d)  $\text{HF}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 2h; e)  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Me}_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 1h; f)  $\text{H}_2\text{NCMe}_2\text{CO}_2\text{Me}$  (**19**),  $\text{MeCN}$ , t.a., 16h; g)  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 2h.

Una vez preparadas las N-carboximetil- $\beta$ -lactamas **46a-c**, se procedió al acoplamiento de la cadena peptídica siguiendo la misma secuencia utilizada anteriormente para los peptidomiméticos cíclicos del tipo **3** (ver **Esquema 3.18**), salvo para el acoplamiento entre el ácido  $\beta$ -lactámico **46c** con el dipéptido H-Arg(Pbf)-Gly-OBn **34**, que se realizó con EEDQ.

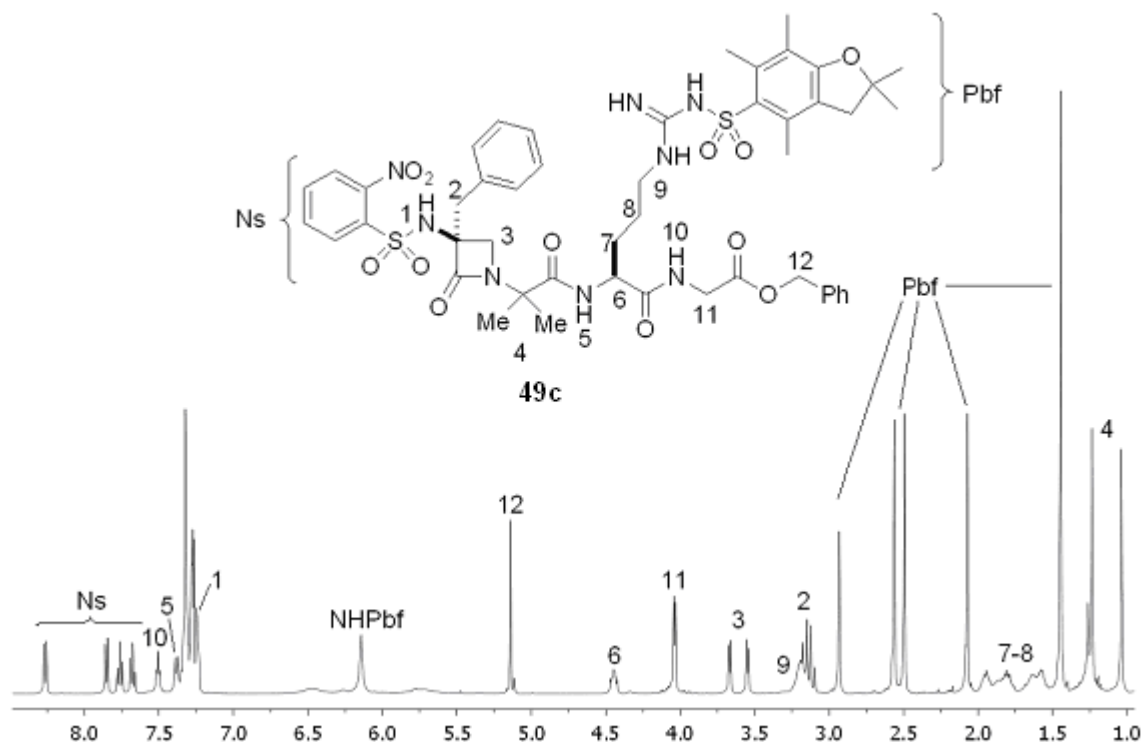


**Esquema 3.25:** a) Para los compuestos (a) y (b): H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (**34**) (1.1eq), HOBT (1.1eq), TEA (5eq), EDC-HCl (1.5eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 16h. Para el compuesto (c): H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (**34**) (1.1eq), EEDQ (2eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ ; b) PhSH (2eq),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1eq), MeCN, t.a., 1.5h; c) CbzHN-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (**32**) (1eq), HATU (1.3eq),  $\text{KHCO}_3$  (5eq), DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h.

En la **Figura 3.25** se muestran los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los intermedios **49a-c** con la asignación de sus protones. Entre los más significativos, aparecen los protones aromáticos del grupo protector nosilo (Ns) entre 8.5-7.8 ppm, los protones amida próximos a las señales de los grupos aromáticos (señales 1, 5 y 10), los protones del anillo de  $\beta$ -lactama (señal 3) o el protón de la alanina adyacente a la  $\beta$ -lactama (señal 4). Para el compuesto **49c** desaparece esta señal apareciendo una nueva señal de metilo próxima a 1.0 ppm (señal 4 para el compuesto **49c**).

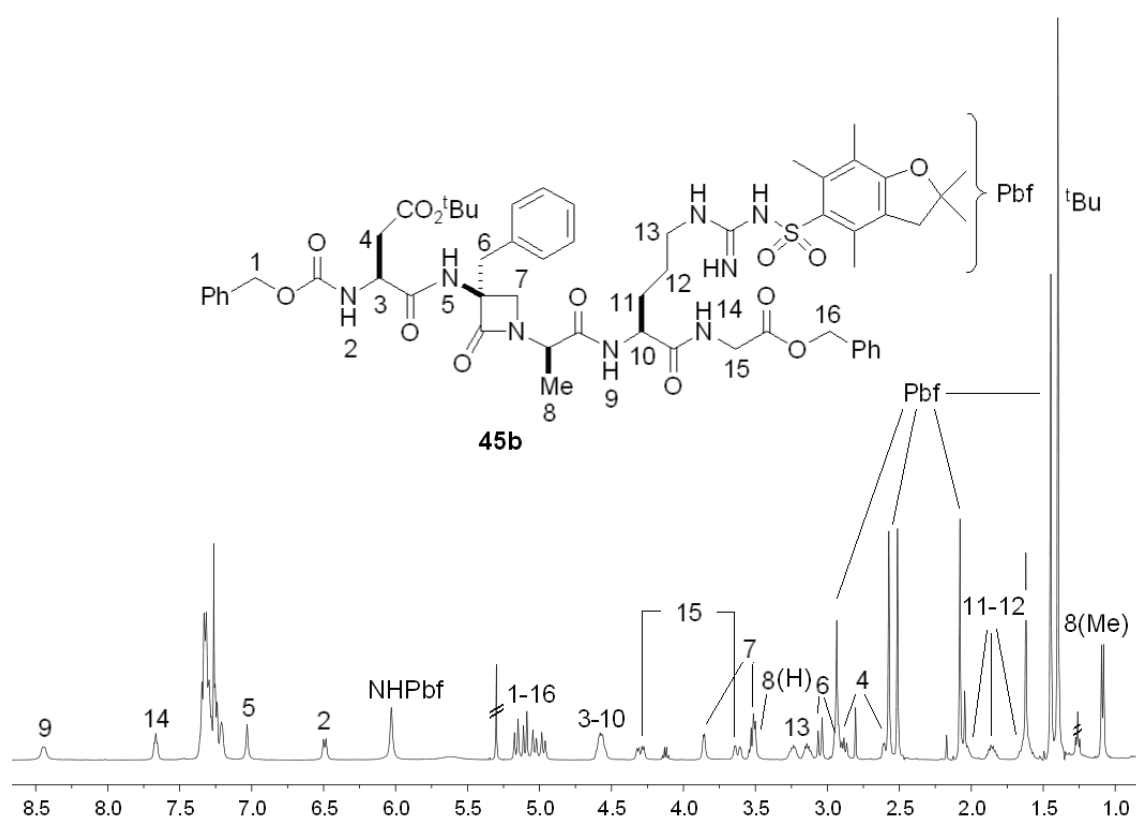
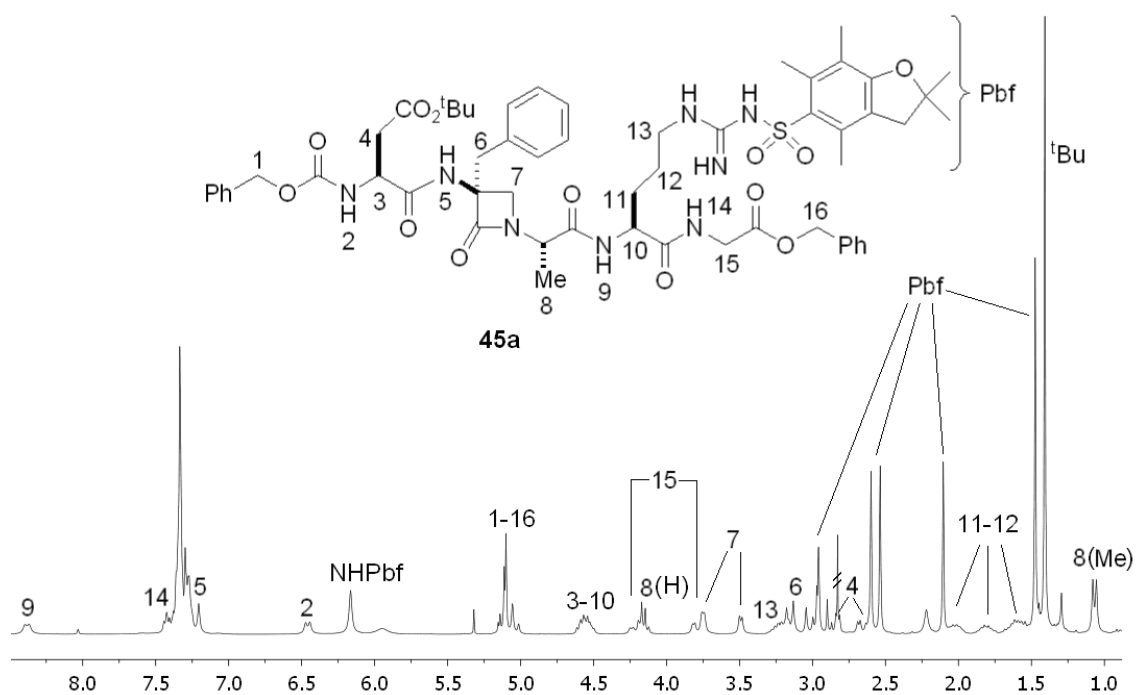


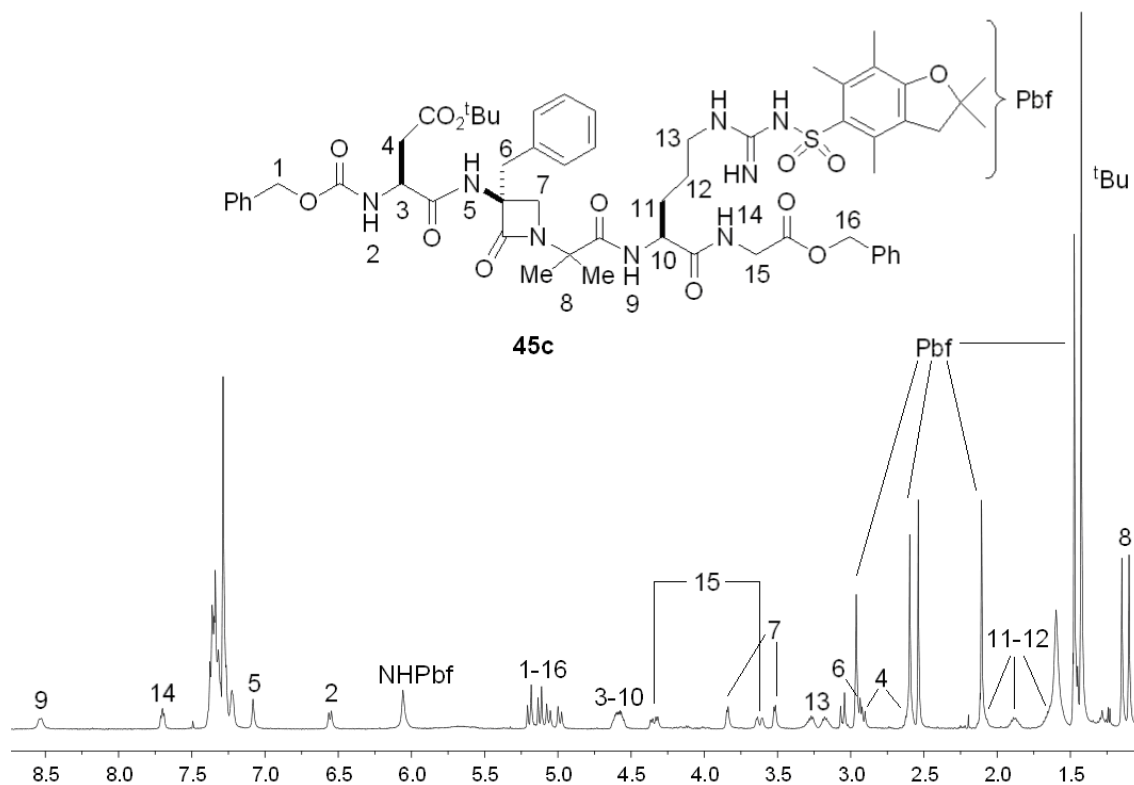




**Figura 3.25:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **49a-c** en  $\text{CDCl}_3$ .

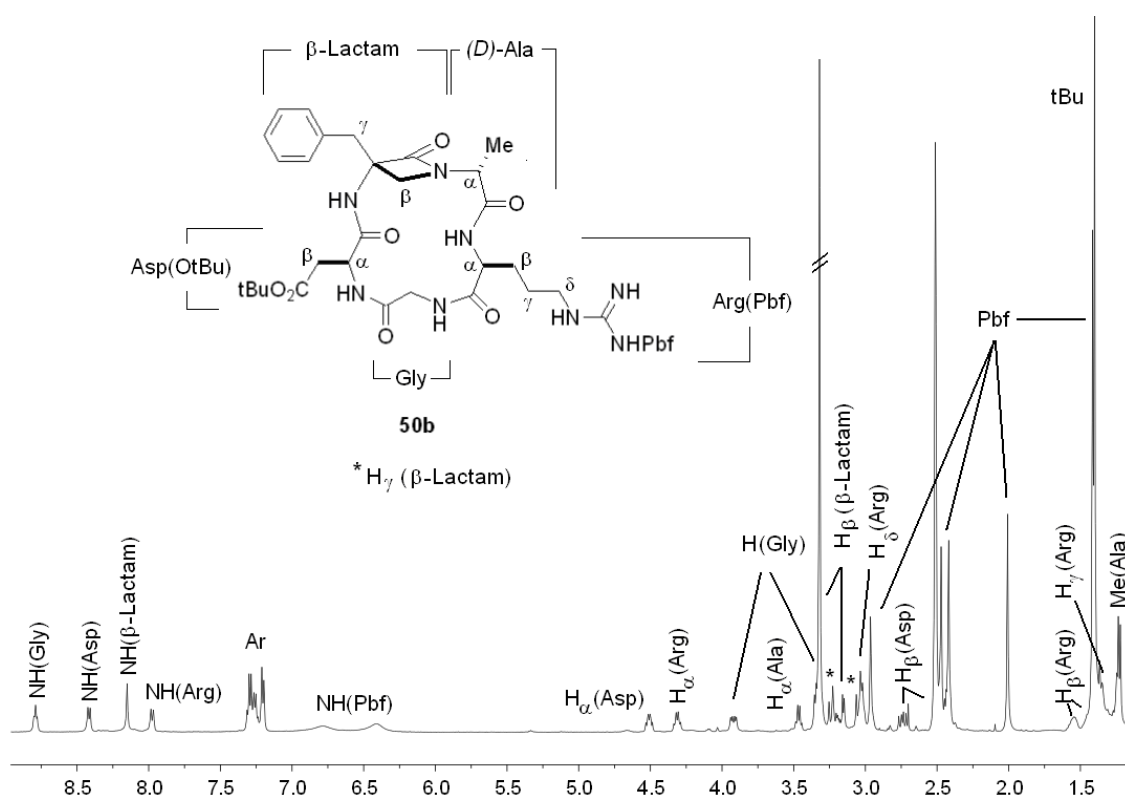
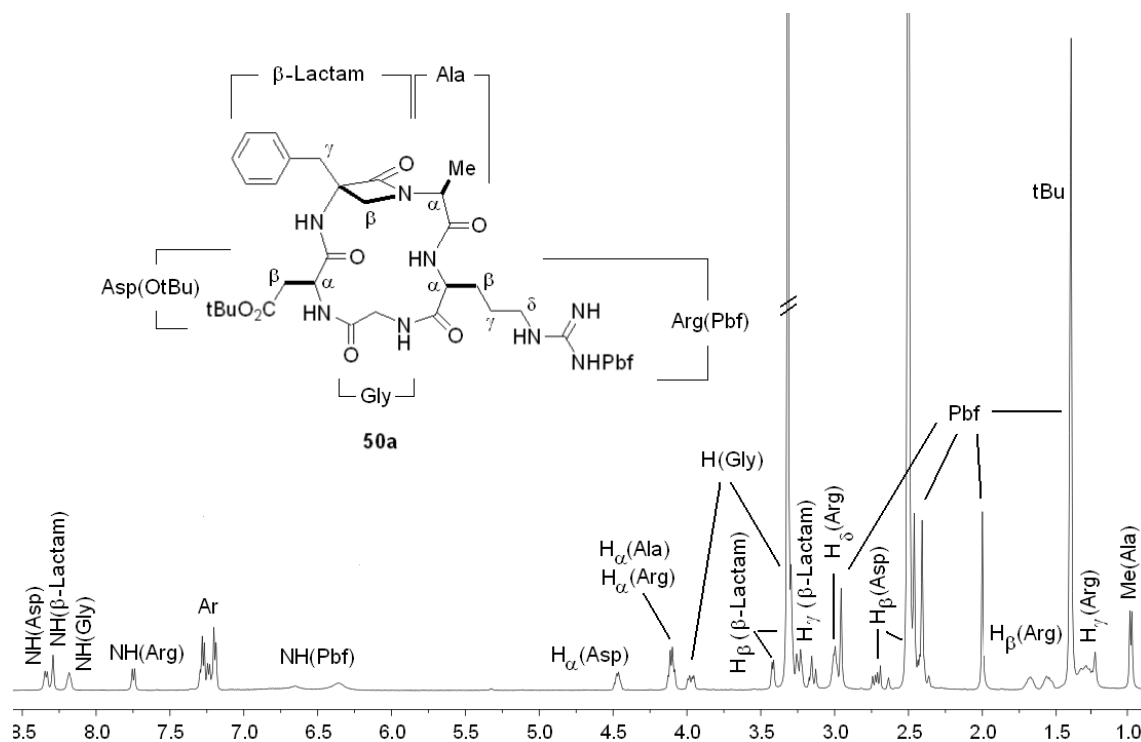
Para el acoplamiento del residuo de ácido aspártico con los bloques  $\beta$ -lactámicos derivados de la desnosilación de **49a-c** se utilizó un nuevo método para evitar la preparación del fluoruro de ácido aspártico  $\text{Cbz-Asp}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-F}$  (**40**) cuya manipulación presenta inconvenientes prácticos debido a la toxicidad de los reactivos empleados en su preparación. Alternativamente, empleando HATU como reactivo de acoplamiento y  $\text{KHCO}_3$  como base, se consiguió simplificar sustancialmente esta etapa alcanzando rendimientos de producto puro que fueron de 62 y 65% para los compuestos **45a-b**, y del 70% para **45c**. En la siguiente figura se muestran los espectros de protón de los compuestos **45a-c**. En ella se observa la desaparición de las señales del grupo nosilo (Ns) y la aparición de nuevas señales del resto de ácido aspártico acoplado como el protón amida (señal 2), las señales de los protones  $\alpha$  y  $\beta$  del resto aspártico (señales 3 y 4) y la señal a 1.4 ppm del grupo  $t\text{Bu}$ . Además, se observan nuevas señales a 5 ppm (1) procedentes de la introducción del Cbz acoplado.

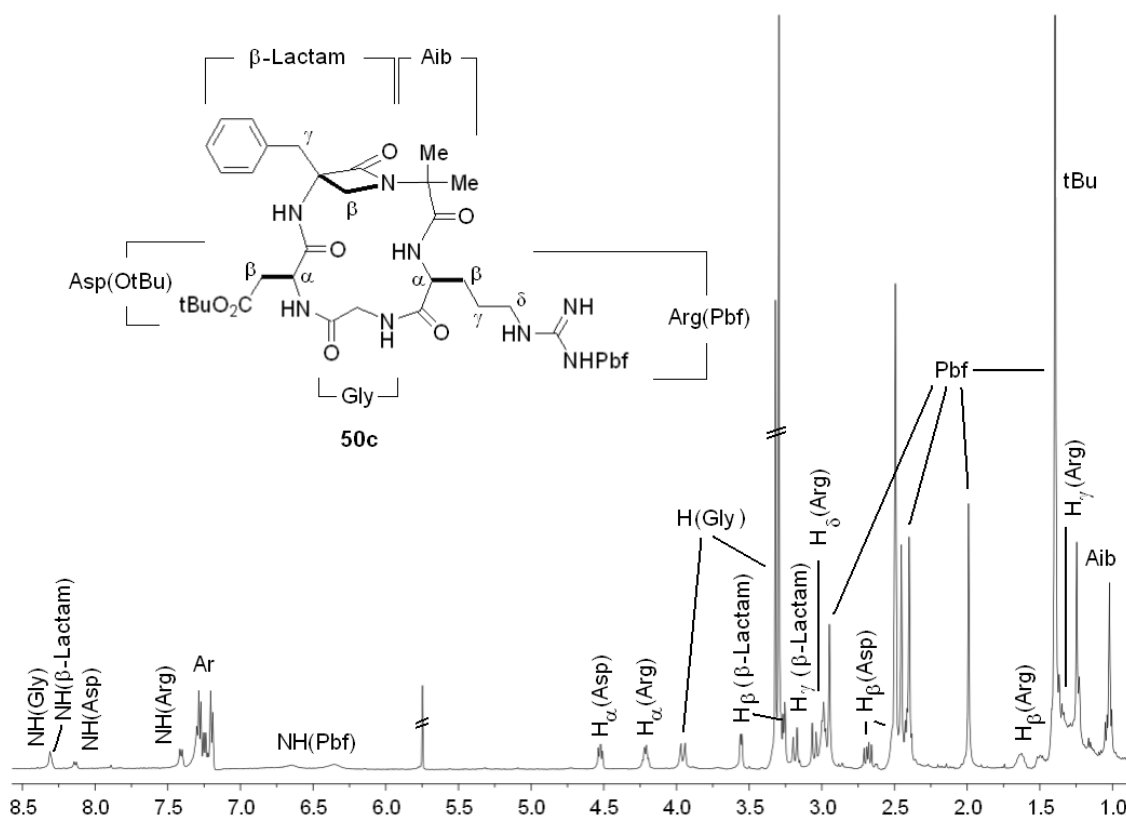




**Figura 3.26:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **45a**, **45b** y **45c** en  $\text{CDCl}_3$ .

Con la desprotección hidrogenolítica catalizada por Pd/C de los extremos N- y C-terminales de los compuestos **45a-c** se obtuvieron de forma prácticamente cuantitativa los pseudopéptidos lineales correspondientes, listos para su ciclación (**Esquema 3.26**). Ésta se llevó a cabo según el procedimiento descrito anteriormente; esto es, en DMF con HATU, HOAt,  $\text{KHCO}_3$  a una concentración de sustrato 4mM y a  $-10^\circ\text{C}$  durante 20h. La purificación de los ciclopéptidos se efectuó por cromatografía de capa fina preparativa, obteniéndose los pseudopéptidos  $\beta$ -lactámicos protegidos con rendimientos globales que fueron del 60% para los compuestos **50a** y **50b** respectivamente y un 70% para el compuesto **50c**. En la siguiente figura se muestran los espectros  $^1\text{H}$  RMN obtenidos de los ciclos **50a-c** en  $\text{DMSO}_{d6}$ . En ellos se observa la desaparición de las señales de **45a-c** correspondientes a los protones del éster bencílico (16) y del carbamato bencílico (1), al tiempo que se mantiene el mismo número de señales amida (2, 5, 9 y 14).

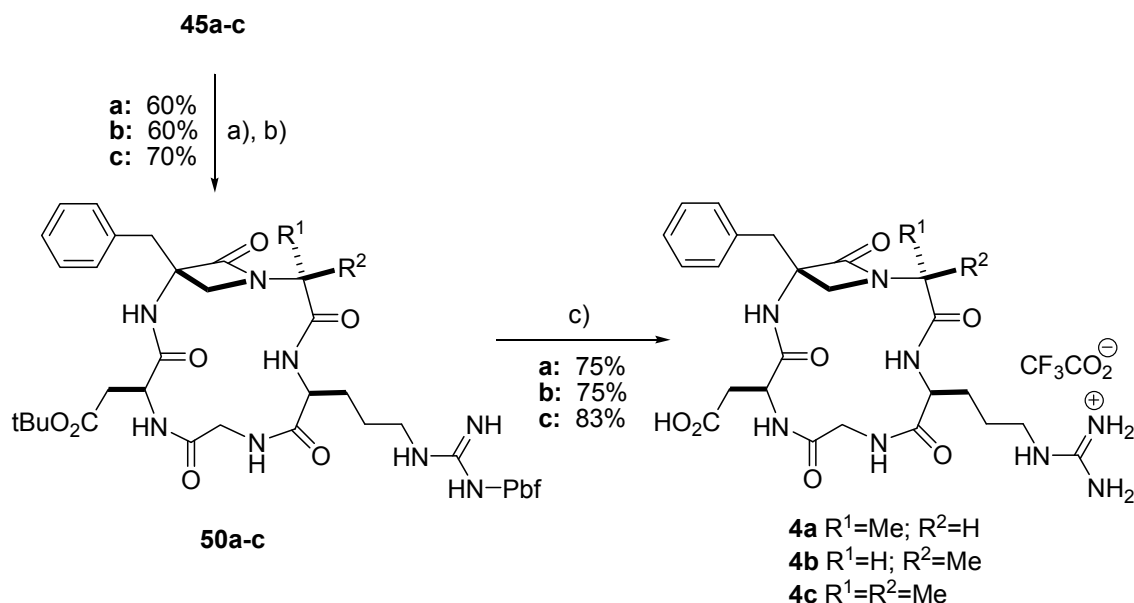




**Figura 3.27:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **50a**, **50b** y **50c** en  $\text{DMSO-d}_6$ .

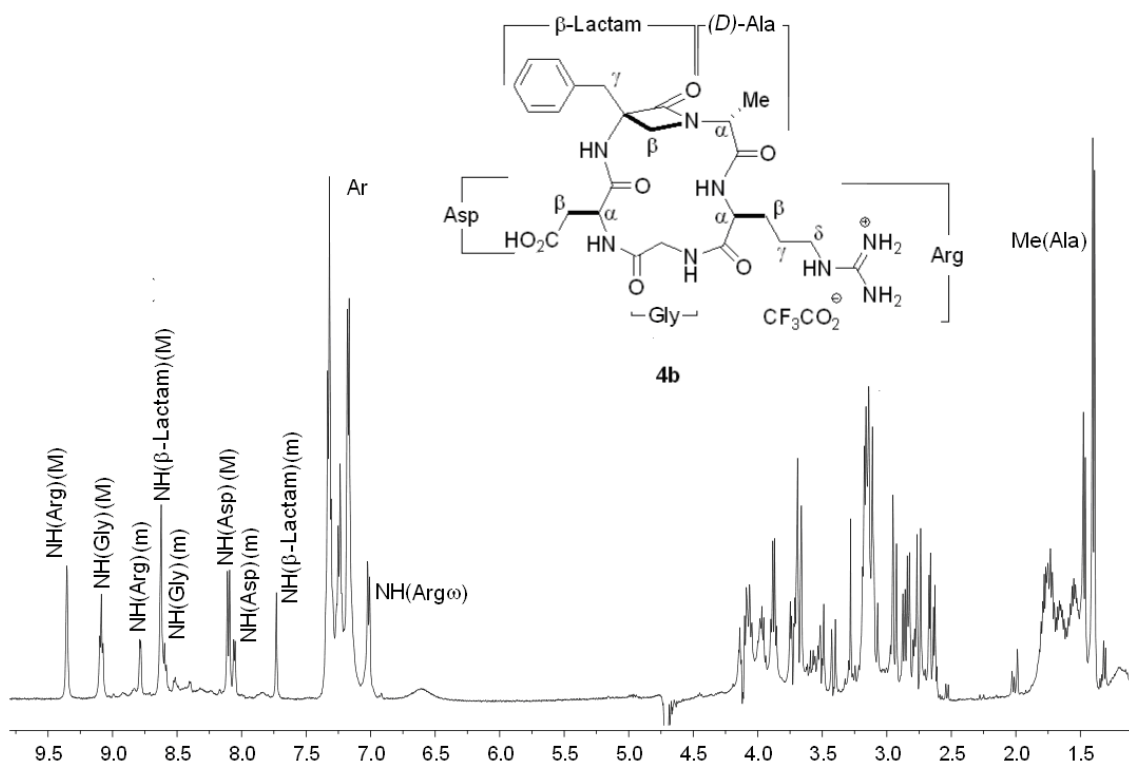
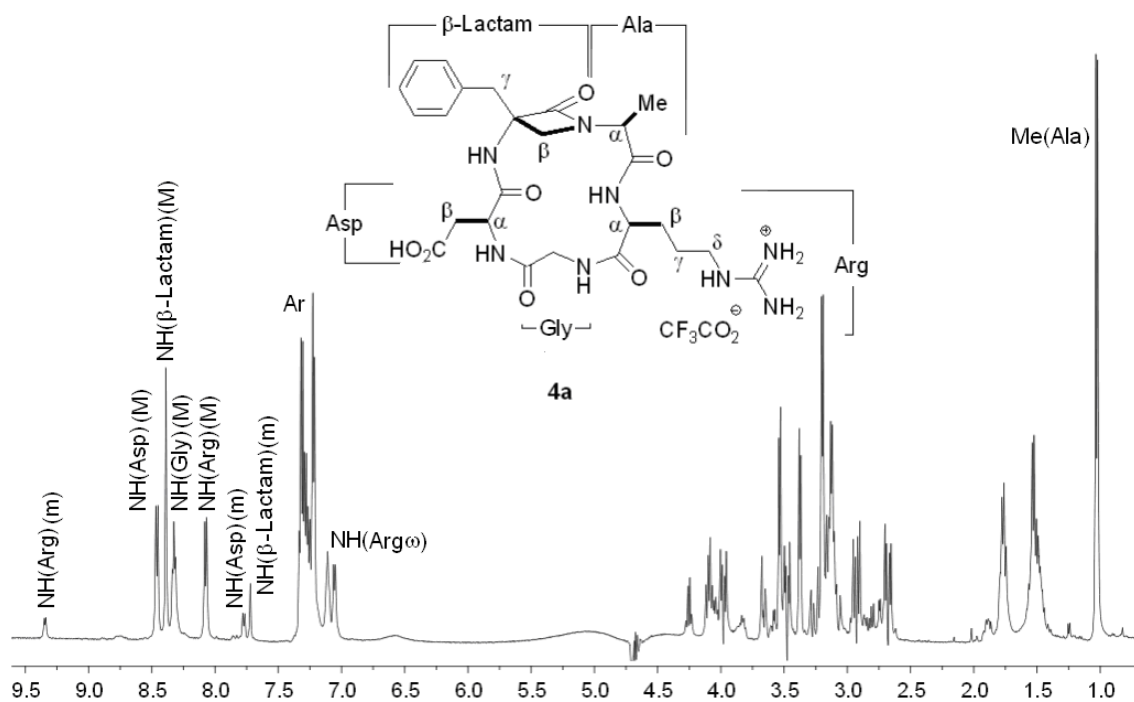
Además, como se observa en la **Figura 3.27**, las mayores diferencias entre los espectros de los ciclos **50a-c** se encuentran en los protones amídicos que varían sus desplazamientos químicos dependiendo de la sustitución en la posición en  $\alpha'$  adyacente a la  $\beta$ -lactama.

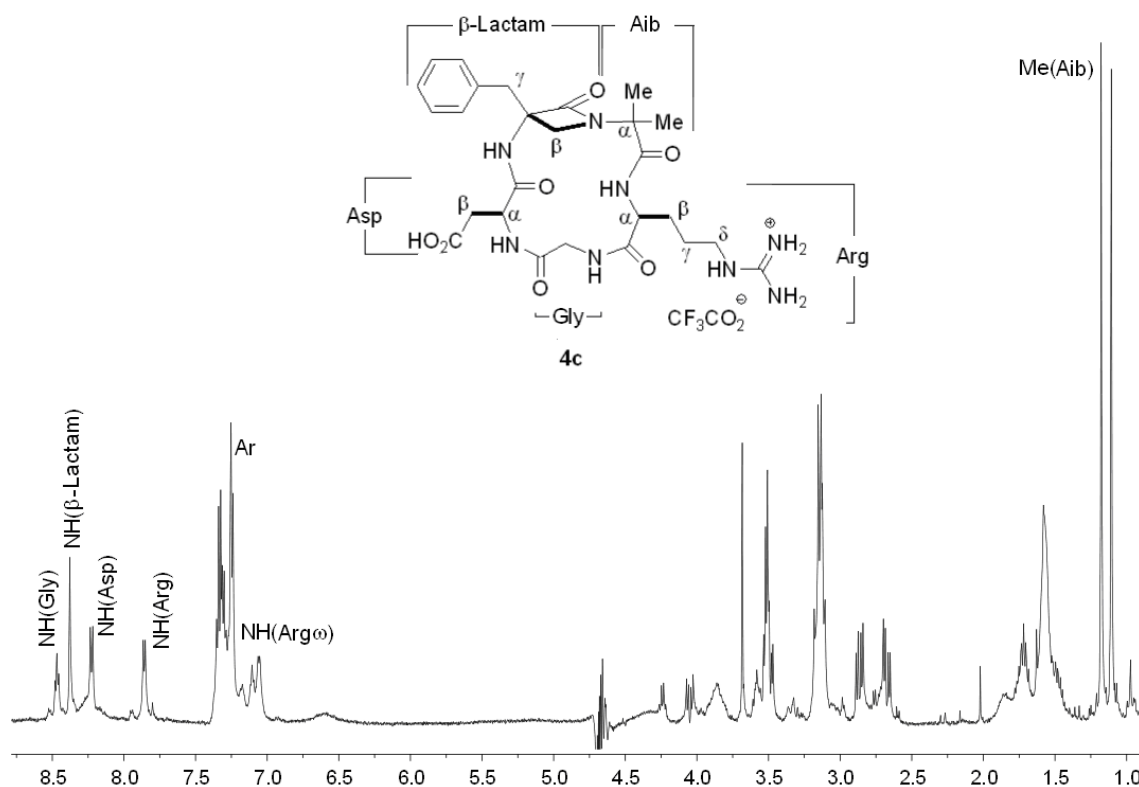
Por último, la desprotección de los grupos *tert*-butilo y Pbf de los diferentes ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos intermedios se llevó a cabo con ácido trifluoroacético. Las sales trifluoroacéticas **4a-c** resultantes se purificaron por precipitación en éter diisopropílico y los productos finales se aislaron con rendimientos oscilaron entre el 75 y el 83%.



**Esquema 3.26:** a)  $H_2$  (1atm.), Pd/C (10%), MeOH, t.a., 6h; b) HATU (1.2eq), HOAt (1.4eq),  $KHCO_3$  (10eq), DMF,  $-10^\circ C$ , 24h; c)  $F_3CCO_2H$ ,  $35^\circ C$ , 1h; luego recristalización en  $iPr_2O$ .

Los espectros  $^1H$ -RMN se adquirieron en  $H_2O/D_2O$  (9:1) empleando una secuencia de pulsos con saturación de disolvente (WATERGATE). Las señales observadas fueron consistentes con las estructuras esperadas, tal y como se puede ver en la **Figura 3.28**, en la que se muestran la asignación de los protones amídicos de los ciclos **4a-c**. Es importante señalar que en los espectros de los compuestos **4a** y **4b** se observa la presencia de dos juegos de señales pertenecientes a dos conformeros distinguibles a temperatura ambiente y que fueron designados como (M) el mayoritario y (m) el minoritario. Por contra, en el espectro del ciclo **4c** se observó un único conformero. La asignación completa de las diferentes señales se detallará más adelante al describir su comportamiento conformacional.





**Figura 3.28:** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) de los compuestos **4a**, **4b** y **4c** en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1).

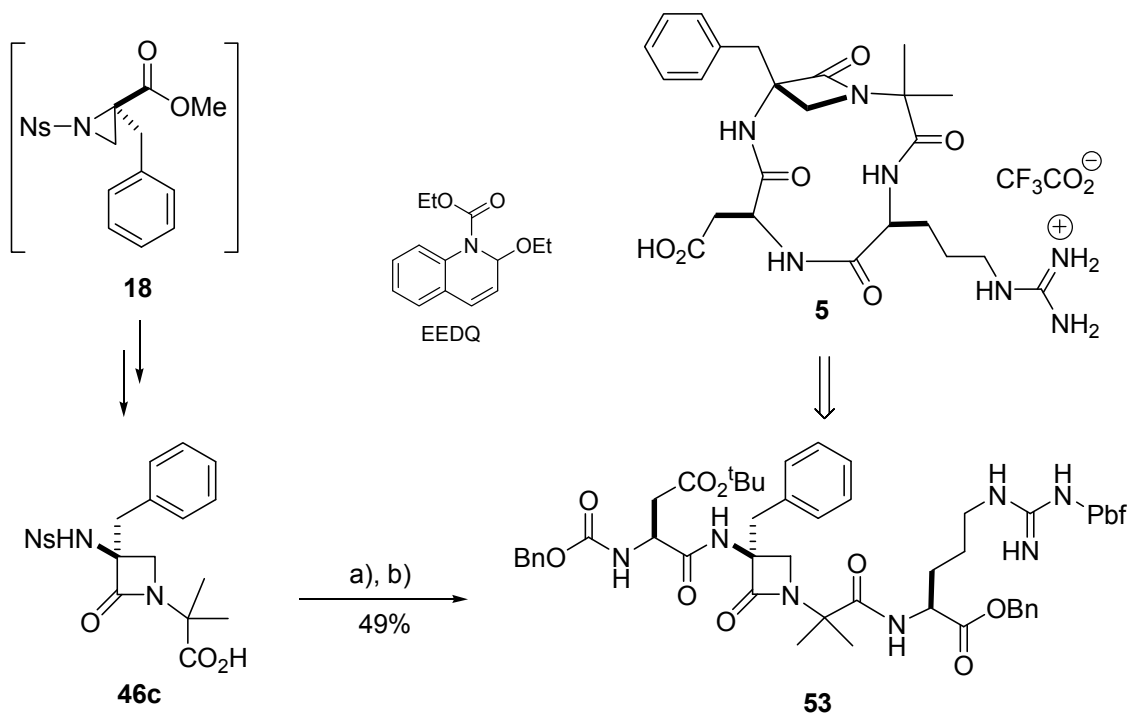
### 3.2.3. Síntesis del mimético tetrapeptídico **5**, del tipo *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Asp]

Como se mencionó en la introducción, una de las variables que puede condicionar la conformación y la bioactividad de los péptidos cíclicos de tipo RGD es el tamaño del anillo macrocíclico<sup>69</sup>. Se sabe que el grupo guanidinio de la cadena lateral de la arginina (R) y el grupo carboxilo del ácido aspártico (D) interaccionan con diferentes regiones de las integrinas (ver apartado 1.3.1). Asimismo, también es conocido que la glicina no es reconocida por ningún bolsillo o “pocket” de dichas integrinas, actuando únicamente como un separador de ambos residuos. Por este motivo, decidimos estudiar la influencia de la eliminación del residuo de glicina sobre la actividad biológica del mimético correspondiente. Para ello, sintetizamos el ciclotetrapéptido *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Asp] **5** siguiendo una estrategia sintética similar a la

<sup>69</sup> Morera, E.; Nalli, M.; Mollica, A.; Paradisi, M. P.; Aschi, M.; Gavuzzo, E.; Mazzab, F.; Lucente, G. J. *Peptide Sci.*, **2005**, *11*, 104-111.



utilizada en el caso de los ciclos de tipo RGD, pero acoplando en este caso el éster bencílico H-Arg(Pbf)OBn **51** a la  $\beta$ -lactama **46c** (**Esquema 3.27**).

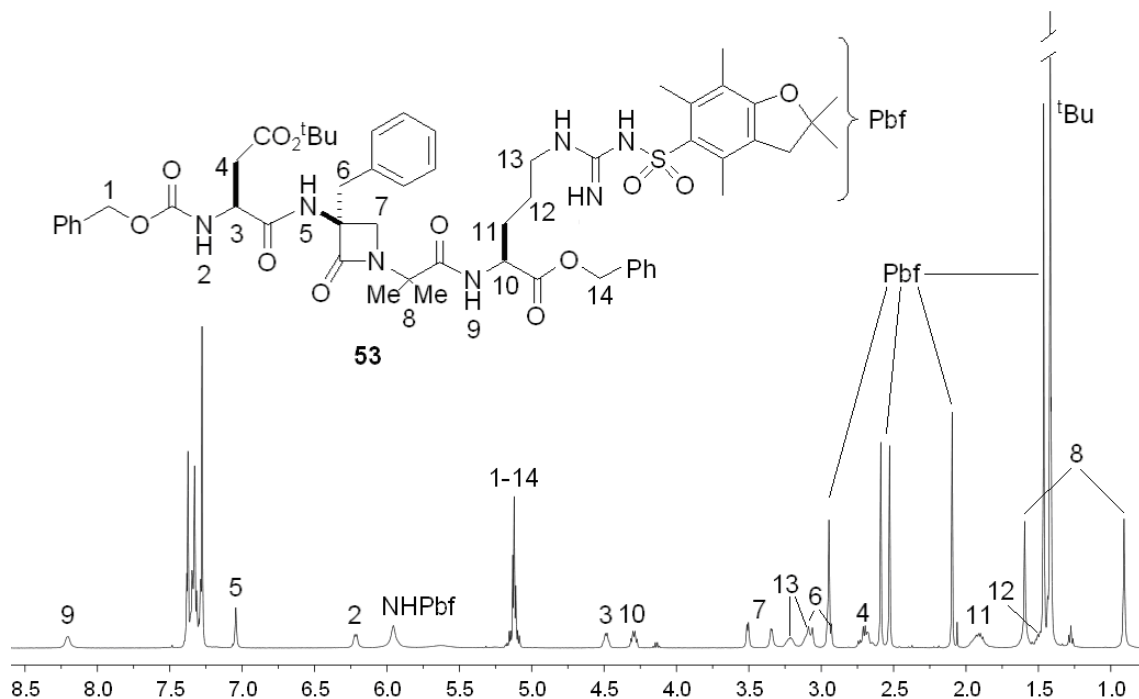


**Esquema 3.27:** a) H-Arg(Pbf)OBn (**51**) (1eq), EEDQ (2eq),  $CH_2Cl_2$ ,  $-10^\circ C \rightarrow t.a.$  20h; b) PhSH (2eq),  $K_2CO_3$  (1eq), MeCN, t.a., 1.5h, luego Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (1eq), HATU (1.3eq),  $KHCO_3$  (5eq), DMF,  $0^\circ C \rightarrow t.a.$ , 16h.

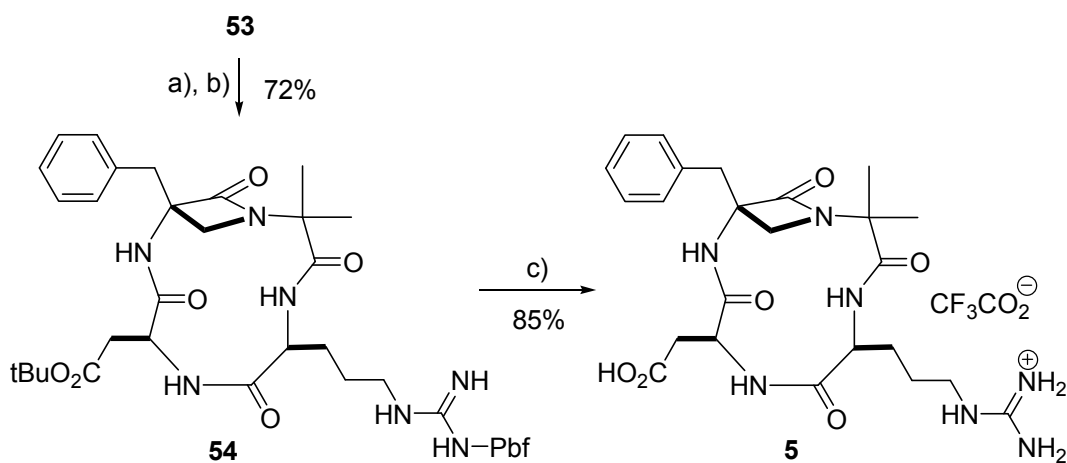
En la **Figura 3.29** se muestra el espectro de  $^1H$ -RMN del péptido  $\beta$ -lactámico **53**. En él se puede observar que presenta una apariencia similar a la del péptido  $\beta$ -lactámico RGD **45c** (ver **Figura 3.26**), sólo que en este caso no aparecen las señales de la Gly2 (señal 15). Otra peculiaridad es la gran separación de los protones metílicos del residuo Aib (señal 8) respecto del péptido  $\beta$ -lactámico RGD **45c**. Además, en este caso los protones en  $\beta$  del residuo de ácido aspártico (señal 4) aparecen juntos formando un multiplete, y no como doble doblete como ocurría anteriormente.

Tras purificar el tetrapéptido  $\beta$ -lactámico **53** se procedió a la desprotección de los grupos bencílicos terminales por hidrogenólisis catalizada con Pd/C y, finalmente, se cicló siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de los ciclopentapéptidos. El crudo obtenido fue purificado por cromatografía en placa preparativa aislándose el producto final con un 72% de rendimiento. Por último, se desprotegieron los residuos de ácido aspártico y arginina con ácido trifluoroacético a  $35^\circ C$  bajo atmósfera de

nitrógeno, obteniéndose el ciclotetrapéptido **5** como sal de trifluoroacetilo con un 85% de rendimiento (**Esquema 3.28**).

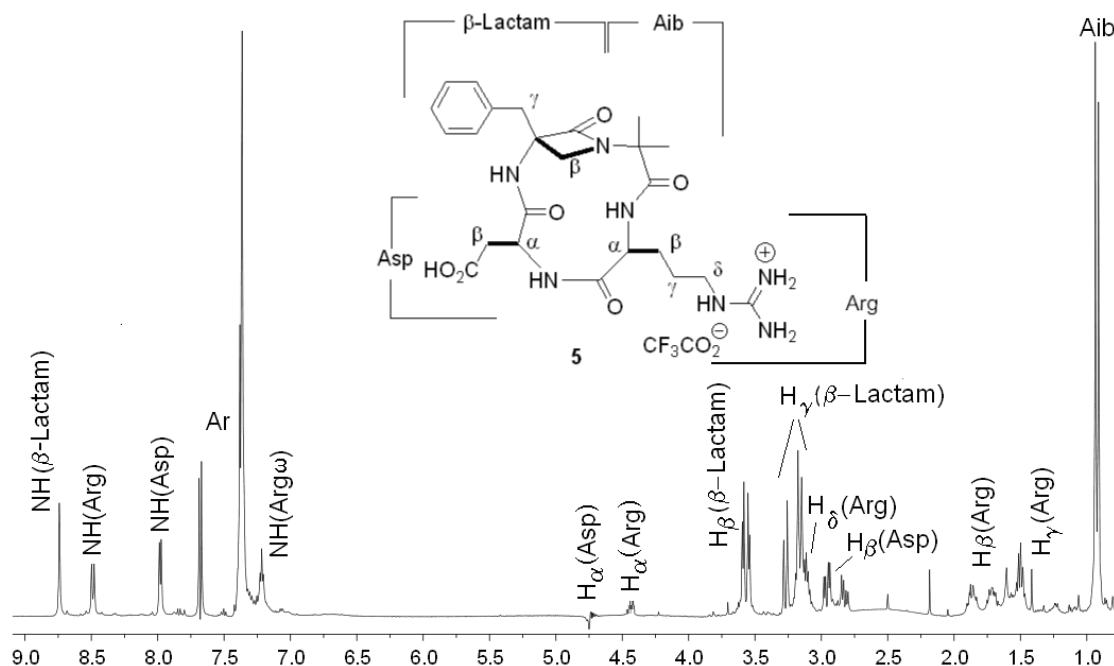


**Figura 3.29:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **53** en  $\text{CDCl}_3$ .



**Esquema 3.28:** a)  $\text{H}_2$  (1atm),  $\text{Pd/C}$  (10%),  $\text{MeOH}$ , t.a., 5h; b)  $\text{HATU}$  (1.2eq),  $\text{HOAt}$  (1.4eq),  $\text{KHCO}_3$  (10eq),  $\text{DMF}$ ,  $-10^\circ\text{C}$ , 24h; c)  $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ ,  $35^\circ\text{C}$ , 1h; luego, recristalizar con  $i\text{Pr}_2\text{O}$ .

La estructura del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **5** fue consistente con los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, que se adquirieron en agua empleando una secuencia de pulsos con saturación de disolvente (WATERGATE), tal y como se observa en la siguiente figura. Los detalles de su análisis conformacional se discuten en el apartado **3.3**.



**Figura 3.30:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500MHz) del compuesto **5** en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) a 300K.

### 3.2.4. Modificación de ciclopeptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD mediante cicloadición alquino-azida

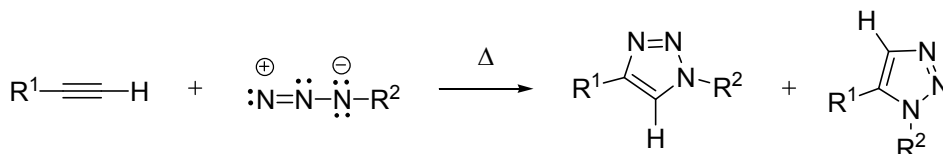
La posibilidad de funcionalizar peptidomiméticos bioactivos hace que éstos adquieran todavía más relevancia en el descubrimiento de fármacos. De hecho, la introducción de diferentes grupos funcionales permite variar la interacción del peptidomimético con su receptor modificando la bioactividad inicial. Esta funcionalización es más interesante si la modificación tiene lugar sobre el propio compuesto bioactivo, ya que de esta forma se podría preparar el máximo de compuestos diferentes empleando el mínimo de etapas sintéticas. Con el objeto de llevar a la práctica esta idea, en este apartado se describirá la síntesis de una serie de ciclopeptidomiméticos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD preparados empleando la “Química clic” entre azidas y acetilenos para dar 1,2,3-triazoles<sup>70</sup>.

<sup>70</sup> Para revisiones de métodos de síntesis de 1,2,3-triazoles, ver: (a) L’Abbe, G. *Chem. Rev.* **1969**, 69, 345-363; (b) Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York **1984**; (c) Sha, C. K.; Mohanakrishnan, A. K. *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*; Padwa, A., Pearson, W. H., Eds.; Wiley: New York **2002**; 623. (d) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28, 278-308. (e) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2952-3015. (f) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 971-975.



**Figura 3.31:** Hipótesis de la bio-isostería amida-triazol. Los 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos son isómeros de trans-amidas y los 1,5-disustituídos, de cis-amidas.

Los 1,2,3-triazoles son un tipo de heterociclos de gran afinidad biológica y que ya han sido empleados, entre otros usos, como nuevos compuestos bioactivos<sup>71</sup>. Además, debido a la similitud en las propiedades estructurales y electrónicas entre el enlace C-N=N del anillo de triazol, y el enlace amida (**Figura 3.31**), los 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos pueden emplearse como isópteros de amidas<sup>70(d)</sup>. Este hecho es particularmente interesante en la química de los peptidomiméticos ya que el anillo de triazol es más estable a la hidrólisis que el enlace amida<sup>72</sup>.



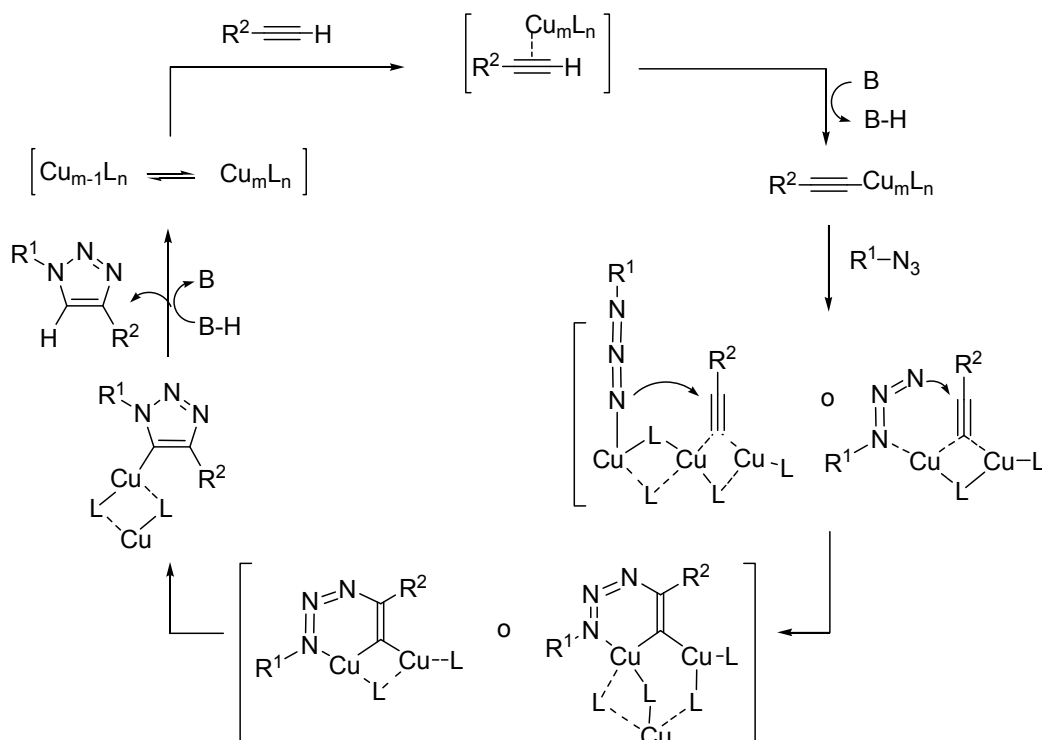
**Esquema 3.29:** Reacción de Huisgen entre alquinos y azidas para dar 1,2,3-triazoles disustituídos.

La ruta convencional de síntesis de triazoles es a partir de la cicloadición [2+3] de Huisgen entre alquinos y azidas orgánicas. Sin embargo, esta vía proporciona frecuentemente mezclas de 1,2,3-triazoles 1,4 y 1,5 disustituídos<sup>70(b)</sup>. Para solventar este problema, Meldal<sup>70(e)</sup> y Sharpless<sup>73</sup> desarrollaron una variante de la cicloadición [2+3] de Huisgen catalizada por Cu (I) que a partir de alquinos terminales y azidas orgánicas, proporciona exclusivamente 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos. En el **Esquema 3.30** se detalla un mecanismo propuesto por dichos autores para explicar el ciclo catalítico de la ciclación alquino/azida promovido por Cu(I) y la formación preferente de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos.

<sup>71</sup> Para revisiones sobre las aplicaciones de 1,2,3-triazoles ver: (a) Lee, L. V.; Mitchell, M. L.; Huang, S. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9588. (b) Angell, Y. L.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1674-1689.

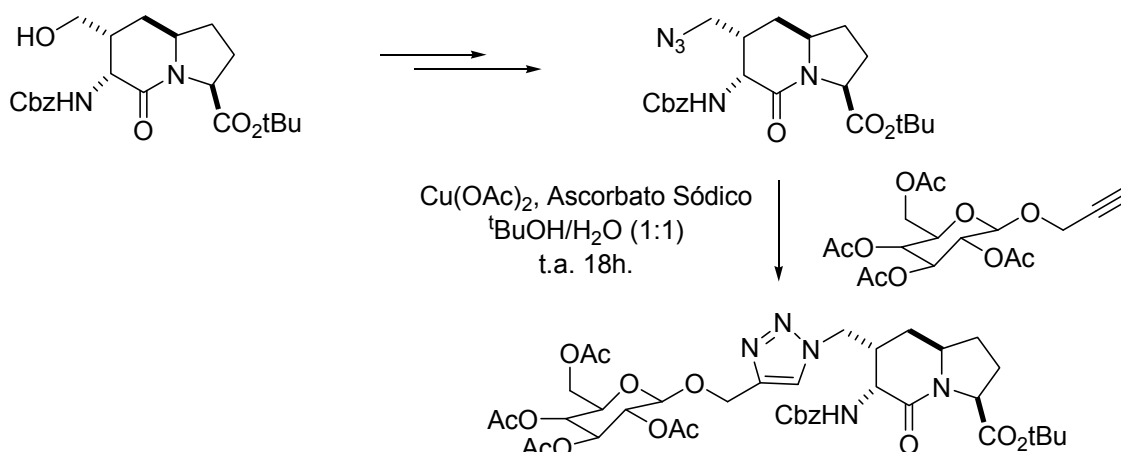
<sup>72</sup> Chen, P.C.; Wharton, R.E.; Patel, P. A.; Oyelere A. K. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2007**, *15*, 7288-7300

<sup>73</sup> (a) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(1), 210-216. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.



**Esquema 3.30:** Mecanismo propuesto para la cicloadición alquino-azida catalizada por  $Cu(I)$  (CuAAC) para dar 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos.

Aunque hay algún antecedente reciente sobre la funcionalización mediante reacciones “clic” alquino-azida de tripéptidos lineales de tipo RGD<sup>74</sup>, la introducción de esta funcionalización en lactamas betágenas de tipo Freidinger cuenta con un único antecedente y ha sido descrito por Scolastico<sup>75</sup> (**Esquema 3.31**).

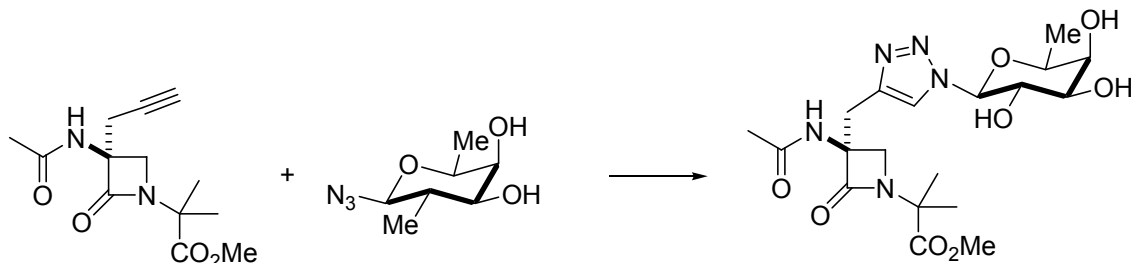


**Esquema 3.31:** Modificación de una lactama de Freidinger mediante la reacción “clic” azido-alquino catalizada por  $Cu(I)$ .

<sup>74</sup> Kuijpers, B. H. M.; Groothuys, S.; Soede, A. C.; Laverman P.; Boerman, O. C; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1847-1854.

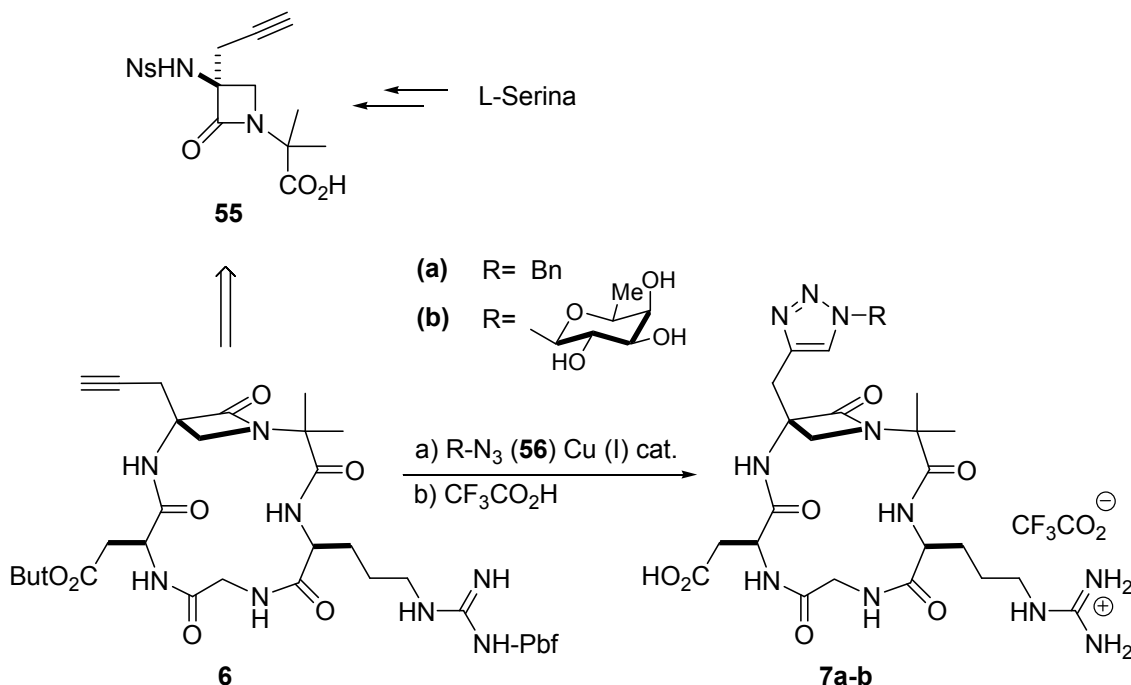
<sup>75</sup> Arosio, D.; Bertoli, M.; Manzoni, L.; Scolastico, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3697-3700.

Recientemente, en nuestro laboratorio<sup>76</sup>, E. Balentová e I. Azcune han demostrado que es posible emplear esta metodología sobre núcleos  $\beta$ -lactámicos. En concreto, han descrito la preparación de glicopeptidomiméticos inhibidores de lectinas a partir de  $\alpha$ -propargil  $\beta$ -lactamas y una serie de glicosilazidas.



**Esquema 3.32:** Síntesis de híbridos  $\beta$ -lactama-glicósido mediante cicloadición alquino-azida catalizada por Cu(I).

Siguiendo esta línea de investigación nos propusimos sintetizar el ciclopeptidomimético  $\beta$ -lactámico de tipo RGD **6** portador de un grupo alquino susceptible de ser empleado para llevar a cabo reacciones de cicloadición “clic” con diversas azidas funcionalizadas. Lógicamente, el intermedio clave para la preparación de **6** fue la  $\alpha$ -propil- $\beta$ -lactama **55** (Esquema 3.33).

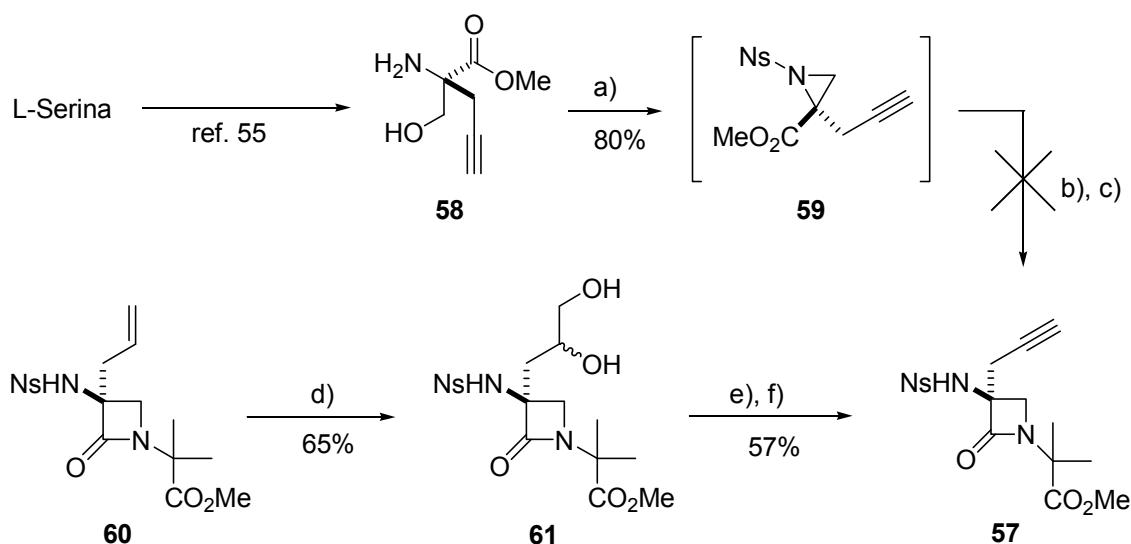


**Esquema 3.33:** Aplicación de la cicloadición “clic” alquino-azida a ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD.

<sup>76</sup> Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentova, E.; Azcune, I.; Santos, I.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, J.; Miranda, J. I. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 2227-2230.

### 3.2.4.1. Síntesis del ciclopéptido propargílico *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg-Gly-Asp] **6**

La primera parte de la síntesis consistió en preparar la  $\alpha$ -propargil- $\beta$ -lactama **57**, éster metílico del intermedio carboxílico **55** (**Esquema 3.34**). Para ello se partió del  $\alpha$ -propargilserinato de metilo **58** y se siguió la ruta de la aziridina mencionada anteriormente. Al intentar preparar la propargil-aziridina **59** y abrirla con el  $\alpha$ -aminoisobutirato de metilo **19**, pudimos comprobar que la  $\beta$ -lactama esperada **57** no se formaba según el procedimiento habitual, probablemente porque la acidez del protón acetilénico pudiera interferir la etapa de ciclación del  $\beta$ -aminoéster intermedio a la  $\alpha$ -propargil- $\beta$ -lactama final.



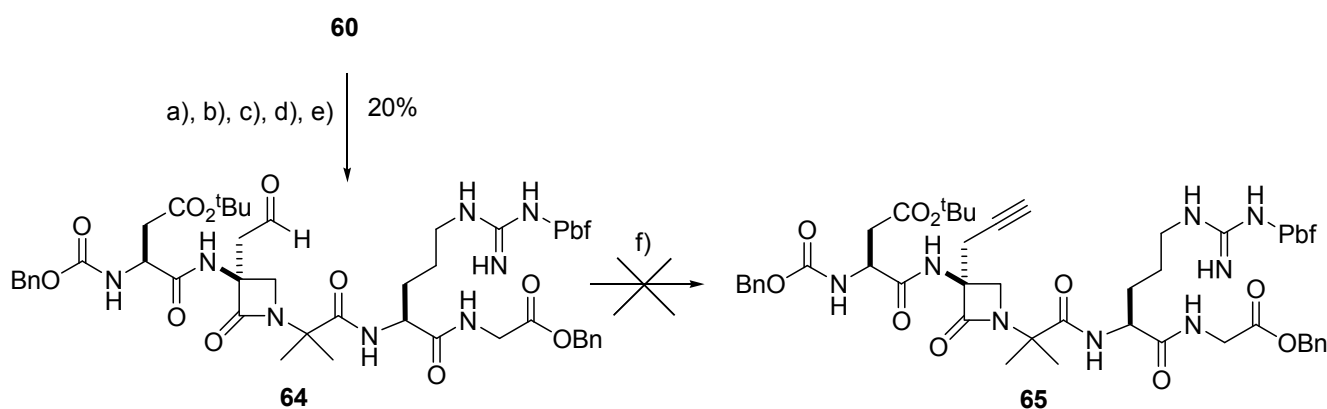
**Esquema 3.34:** a)  $\text{NsCl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , *reflujo*, 16h; b)  $\text{H}_2\text{NC}(\text{Me})_2\text{CO}_2\text{Me}$  (**19**),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , *t.a.*, 16h; c)  $\text{LHMDS}$ ,  $\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 30min; d)  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$  (*cat.*),  $\text{DABCO}$  (*cat.*),  $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 24h; e)  $\text{SiO}_2/\text{NaIO}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow t.a.$ , 1h; f)  $(\text{MeO})_2\text{P}(=\text{O})\text{C}(=\text{N}_2)\text{COMe}$  (**63**),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow t.a.$ , 5h.

Por ello se optó por preparar dicha propargil  $\beta$ -lactama **57** a partir de la  $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama **60** siguiendo una ruta alternativa puesta a punto en nuestro laboratorio por E. Balentová e I. Azcune (**Esquema 3.34**). Así, el diol **61** se obtuvo por oxidación de Sharpless de la  $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama **60** y seguidamente se oxidó al aldehído correspondiente con peryodato sódico soportado en gel de sílice. Finalmente el aldehído intermedio se homologó con el fosfonato de Bestman-Ohira<sup>77</sup> **63** en medio

<sup>77</sup> (a) Pietruszka, J.; Witt, A. *Synthesis*, **2006**, 4266-4268. (b) Ohira, S. *Synth. Commun.*, **1989**, 19, 561. (c) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestman, H. J. *Synlett*, **1996**, 521.

básico obteniéndose la  $\alpha$ -propargil  $\beta$ -lactama **57** con un rendimiento global del 40% desde la  $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama **60**.

Tras el éxito alcanzado en la transformación alilo→propargilo sobre grupos anclados en el anillo  $\beta$ -lactámico, se pensó en trasladar dicha conversión al péptido  $\beta$ -lactámico abierto **64** (**Esquema 3.35**). De esta forma, la disponibilidad del alquino **65** hubiera permitido su transformación en los triazoles correspondientes con varias azidas y la preparación posterior de los ciclopéptidos deseados. Sin embargo, la homologación aldehído-alquino con el reactivo de Bestman-Ohira no funcionó en este caso, a pesar de intentar la transformación bajo múltiples condiciones de reacción.



**Esquema 3.35:** a)  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 1.5h; b)  $\text{H-Arg(Pbf)-Gly-OBn}$  (**34**),  $\text{EEDQ}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h; c)  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$  (cat.),  $\text{DABCO}$  (cat.),  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 24h; d)  $\text{SiO}_2/\text{NaIO}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 1h; e)  $\text{Cbz-Asp(OtBu)-OH}$ ,  $\text{HATU}$ ,  $\text{HOAt}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h; f)  $(\text{MeO})_2\text{P(=O)C(=N}_2\text{)COMe}$  (**63**),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 5h.

En vista de las dificultades observadas, nos planteamos cambiar los grupos protectores bencílicos empleados hasta ahora por los grupos protectores Fmoc y el éster de fluorenilo (Fm)<sup>78</sup> adaptados a la síntesis en disolución. Dichos grupos presentan una reactividad ortogonal a los grupos Boc y Pbf, y pueden desprotegerse en medio básico por lo que no afecta al resto de grupos protectores presentes en el peptidomimético. Además, el éster de fluorenilo (Fm) resiste las condiciones aplicadas durante la desprotección del grupo nosilo ( $\text{PhSH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) pero es liberado fácilmente en presencia de piperidina<sup>78</sup> En consecuencia, nos propusimos preparar el

<sup>78</sup> (a) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409. (b) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214. (c) Sheppard, R. J. *Peptide Sci.* **2003**, 9, 545-552. (d) Fields, G. B. *Methods in Molecular Biology.* **1994**, 35, 17-27.

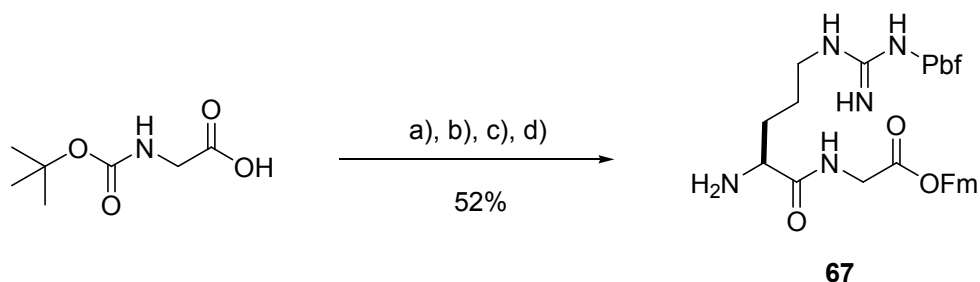


[illegible]

**Esquema 3.36:** a)  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 1.5h; b)  $\text{H-Arg(Pbf)-Gly-OFm}$  (**67**),  $\text{EEDQ}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h; c)  $\text{PhSH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeCN}/\text{DMSO}$  (10/1),  $\text{t.a.}$ , 3h; d)  $\text{Fmoc-Asp-(O}^t\text{Bu)-OH}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{HATU}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ ; e)  $\text{Piperidina}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{t.a.}$ , 1h; f)  $\text{HATU}$ ,  $\text{HOAT}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $-10^\circ\text{C}$ , 16h.

La síntesis comenzó con la desprotección del éster metílico **57** por saponificación con hidróxido de litio en THF/H<sub>2</sub>O. Al ácido β-lactámico obtenido se le acopló el dipéptido H-Arg(Pbf)-Gly-OFm **67** preparado previamente a partir de la Boc-Gly-OFm comercial utilizando una metodología convencional (**Esquema 3.37**). Tras purificar el dipéptido β-lactámico **65** (**Esquema 3.36**) se desprotegió el grupo nosilo y se acopló la α-amino-β-lactama peptídica intermedia resultante con Fmoc-Asp(OtBu)-OH comercial empleando HATU y bicarbonato potásico como reactivos. Finalmente se desprotegieron simultáneamente los extremos N- y C- terminales del pseudopéptido **66** con piperidina, se purificó el pentapéptido libre intermedio por filtración sobre gel de sílice y el producto crudo se cicló siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

(ver Sección 3.2.2., **Esquema 3.26**). Se obtuvo así el ciclo de RGD propargílico **6** con un 70% de rendimiento.



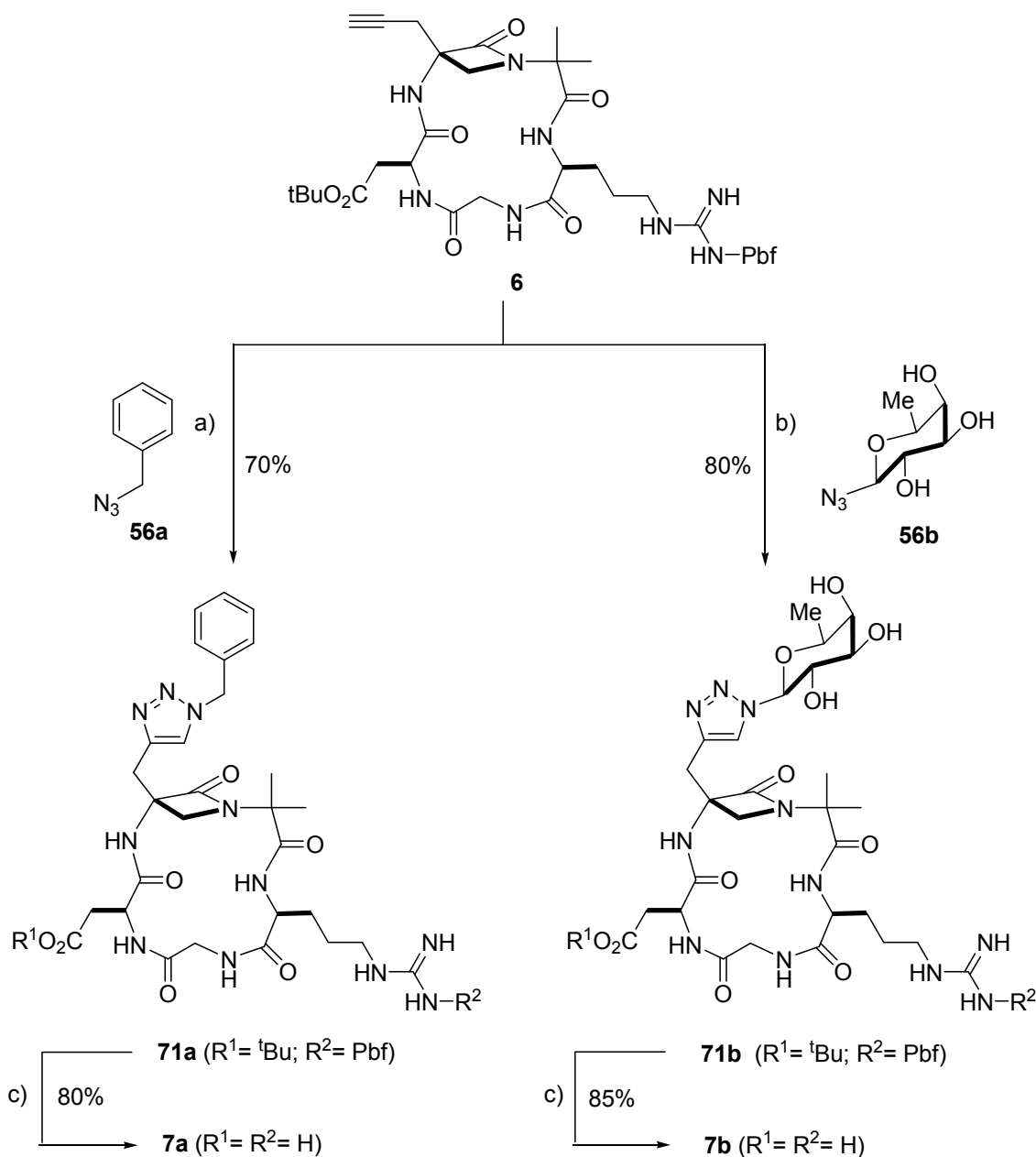
**Esquema 3.37:** a) *Fmoc-OH*, DCC, DMAP (cat.), de 0°C → t.a., 24h; b) *HCO<sub>2</sub>H*, t.a., 1.5h; c) *Boc-Arg(Pbf)-OH*, HOBt, EDC·HCl, *CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>*, 0°C→t.a., 16h; d) *HCO<sub>2</sub>H*, t.a., 1.5h.

#### 3.2.4.2. Modificación “clic” del compuesto propargílico ciclo-[β-Lactam-Aib-Arg-Gly-Asp] **6**

Una vez preparado el ciclopeptido RGD propargílico **6**, se procedió a su modificación por reacción “clic” con dos azidas. En concreto se seleccionaron la bencil azida **56a** y la β-(L)-fucosil-azida **56b**. De esta forma, se pretendía completar el estudio de actividad biológica que comenzamos con los ciclopeptidomiméticos RGD del tipo **3** y **4**. En concreto, la comparación del ciclo **7a** con el ciclo **4c** (**Esquema 3.26**) preparado anteriormente permitiría establecer el efecto del grupo triazol en la actividad biológica. Y, finalmente, con el ciclopeptido sustituido con el derivado de la fucosa, ciclopeptido **7b**, se podría estudiar un efecto análogo para un sustituyente con un grupo muy polar y relativamente voluminoso.

Los detalles de la funcionalización “clic” del ciclopeptido **6** se resumen en el **Esquema 3.38**. En la etapa de cicloadición, la adición de una disolución 0.2 M de sulfato de Cu(II) y 1M de ascorbato sódico en agua desoxigenada sobre una mezcla del alquino **6** y la correspondiente azida **56** en *tert*-butanol/agua/THF, provocó una suave reacción que al cabo de 24h proporcionó los triazoles **71a** y **71b** con rendimientos aislados del 70% y el 80% respectivamente. Seguidamente, los dos ciclopeptidos β-lactámicos triazólicos se desprotegeron del grupo Pbf del residuo arginina y del éster de *tert*-butilo del residuo ácido aspártico. Para ello, se siguió el procedimiento habitual consistente en un tratamiento con ácido trifluoroacético a 33°C durante una hora seguido de precipitación de la sal de trifluoroacetilo resultante con éter diisopropílico y

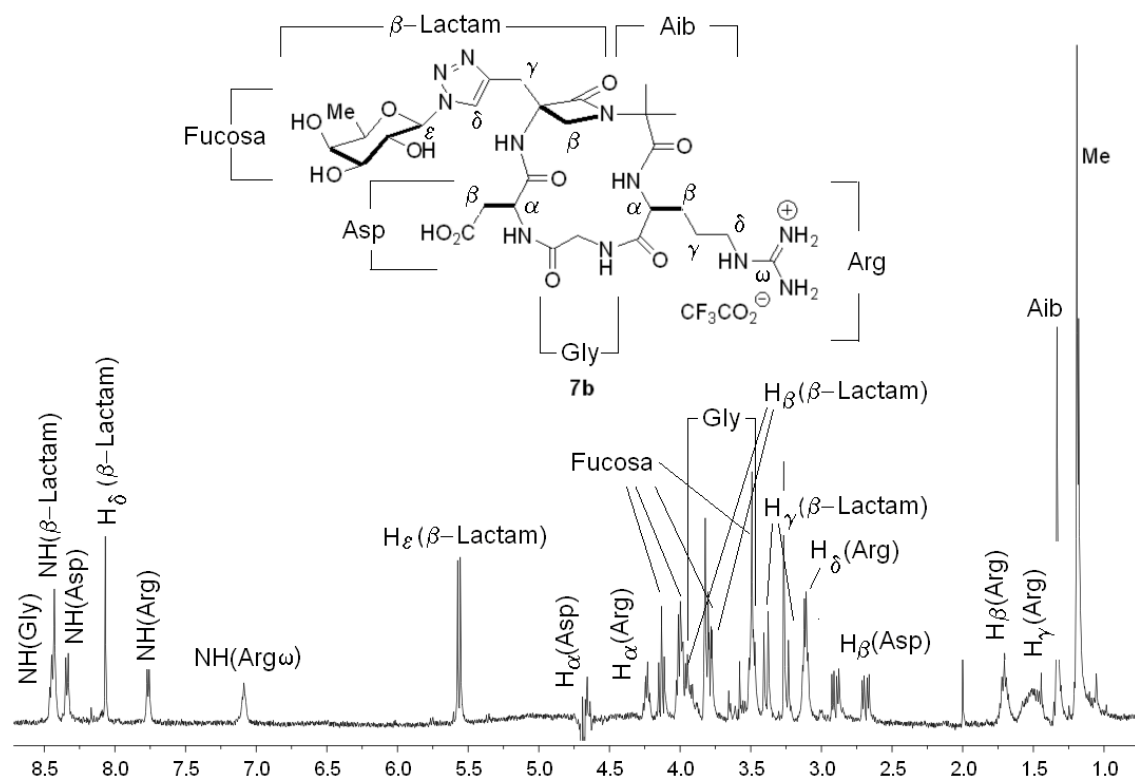
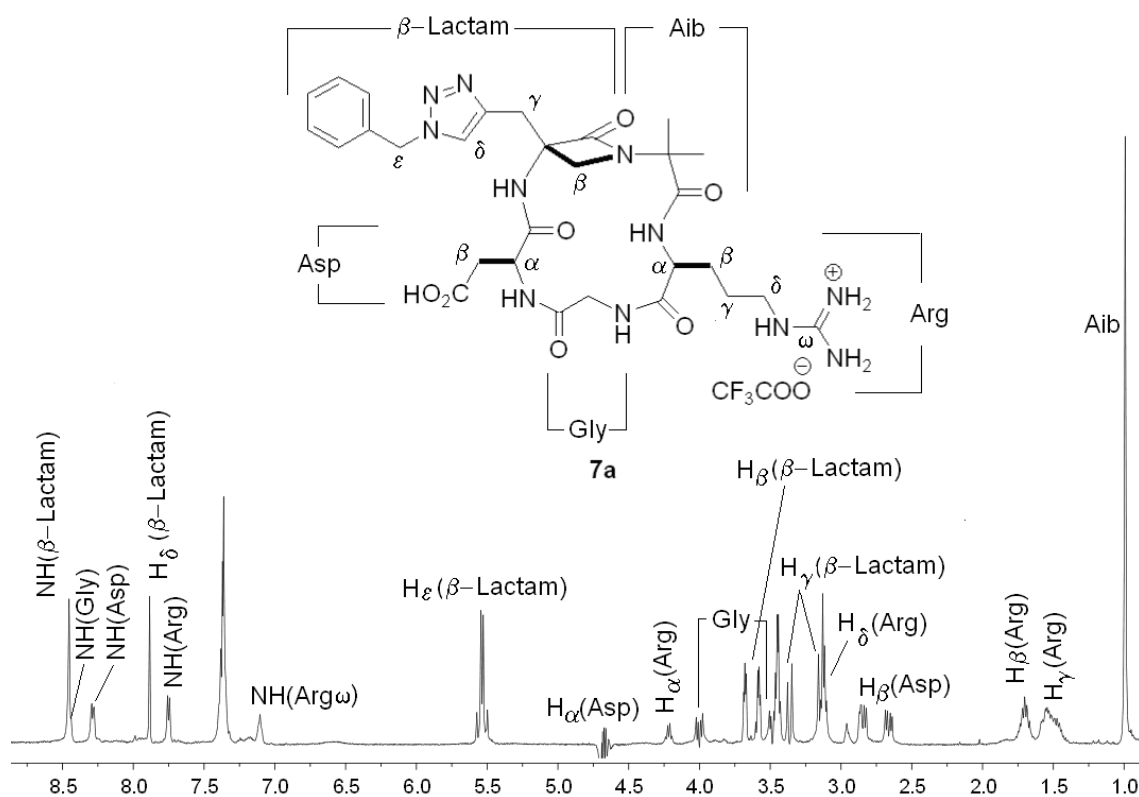
centrifugación para aislar el producto. Los rendimientos de la etapa de desprotección fueron de un 80% y de un 85% para los ciclos **7a** y **7b** respectivamente.



**Esquema 3.38:** a) **56a**,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.2M, Ascorbato de Na 1M,  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (1/1/1); b) **56b**,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.2M, Ascorbato de Na 1M,  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (1/1/1); c) TFA,  $33^\circ\text{C}$ , 1h.

En la siguiente figura se muestran los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de disoluciones acuosas de los productos **7a** y **7b** con la asignación de las señales características de ambos ciclopeptidomiméticos. En dichos espectros, y a modo de ejemplo, se aprecian tanto la señal del protón del anillo de triazol ( $\text{H}\delta$ - $\beta$ -Lactam hacia 8 ppm), como los cuatro

protones amida en la región entre 7.75-8.50 ppm, lo cual prueba la estabilidad del anillo triazólico a las condiciones ácidas de desprotección aplicadas.

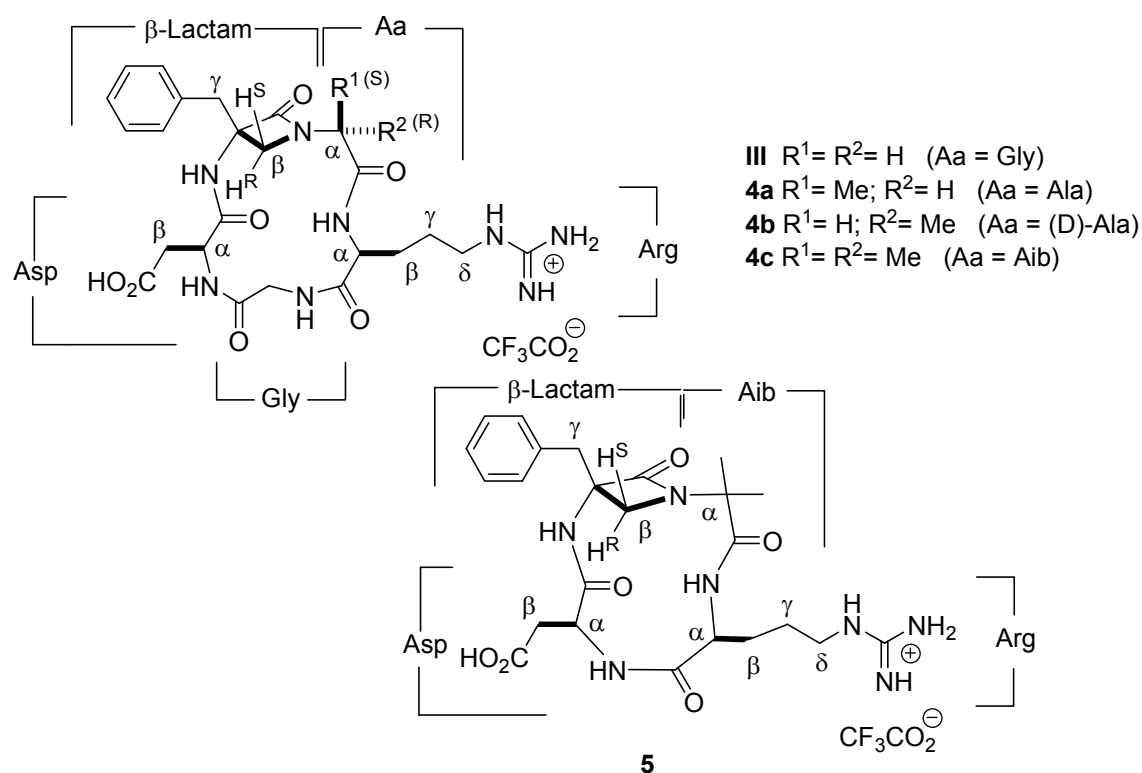


**Figura 3.32:** Espectros  $^1\text{H}$  RMN (500MHz) de los ciclopeptidomiméticos **7a** y **7b** en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) a 300K.

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

Tras sintetizar los diferentes miméticos de ciclopéptidos RGD se pasó a realizar su estudio conformacional mediante técnicas de RMN siguiendo la misma metodología empleada en los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **1** y **2** (apartado 3.1.4.1) que se basó en el método ISPA<sup>61</sup>. En este caso, el análisis se llevó a cabo con las sales trifluoroacéticas de los pentapéptidos cíclicos **4a-c** y del análogo tetrapeptídico **5**, utilizando una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) como disolvente para imitar de la manera más fidedigna posible el medio fisiológico. Además, estos resultados se compararon con los datos conformacionales obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio por I. Loinaz<sup>46</sup> para el compuesto **III**, carente de sustitución en el residuo (2).

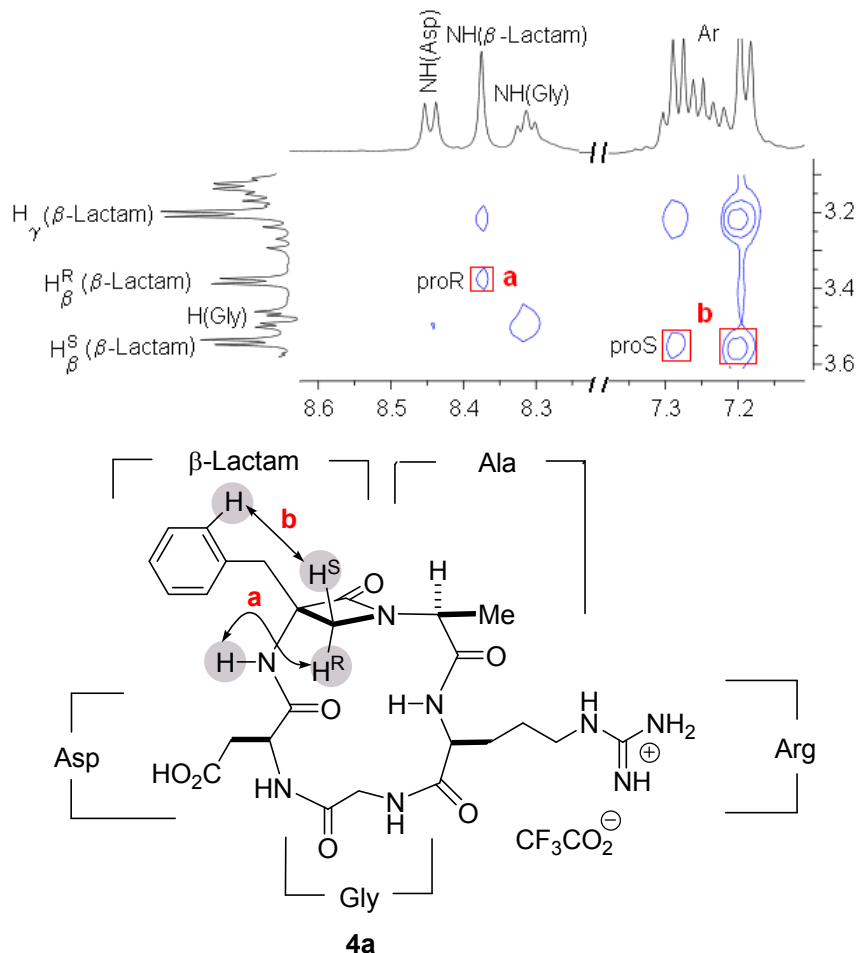
La nomenclatura posicional para la asignación de los protones fue la mostrada en la **Figura 3.33**. Se designó cada aminoácido del ciclo con su acrónimo y sus protones se localizaron según la nomenclatura general ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc...) excepto para el fragmento de la  $\beta$ -lactama que se indicó como " $\beta$ -Lactam".



**Figura 3.33:** Nomenclatura posicional de los ciclopentapéptidos miméticos de tipo RGD **4a-c** y el ciclótetrapéptido **5**.

Los estudios se realizaron a una concentración aproximada de 1mM y a una temperatura de 300 K en  $H_2O/D_2O$  (9/1). En primer lugar se llevó a cabo la asignación de todas las señales a partir de los espectros  $^1H$ , COSY y ROESY de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-Ala-Gly-Arg-Asp] **4a**, *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-(D)-Ala-Gly-Arg-Asp] **4b**, *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-Aib-Gly-Arg-Asp] **4c** y el ciclótetrapéptido *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-Aib-Arg-Asp] **5**. La asignación completa de los ciclos se muestra en detalle en el Anexo.

En primer lugar se identificaron las amidas NH( $\beta$ -Lactam), que aparecieron como singletes por carecer de protones adyacentes. A través de las señales de cruce del espectro COSY se fueron asignando los diferentes juegos de señales de cada ciclo (ver Anexo).



**Figura 3.34:** Ampliación del espectro ROESY del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **4a** mostrando las señales de cruce entre el protón  $H^R$  y el protón amídico  $\beta$ -lactámico **a** y el protón  $H^S$  y el grupo aromático **b**.

Por su parte, a partir de las señales de cruce del espectro ROESY (**Figura 3.34**) se pudieron distinguir los protones diastereotópicos  $H^S$ - $\beta$ -Lactam y  $H^R$ - $\beta$ -Lactam por sus respectivas señales de cruce con los protones aromáticos y el protón NH amida de la  $\beta$ -lactama.

En la **Tabla 3.7** se recogen los desplazamientos químicos de los protones más significativos de los diferentes ciclopéptidos. En el caso de los miméticos en los que el resto (Aa) está constituido por (L)-Ala o (D)-Ala se identificaron dos juegos de señales a temperatura ambiente que se asignaron a otros tantos conformeros por cada caso. Éstos se designaron como M (mayoritario) y m (minoritario). Desafortunadamente, el conformero minoritario del ciclo **4a** (m) no pudo identificarse adecuadamente debido a que sus señales fueron muy débiles, por lo que únicamente se anotaron los desplazamientos de los protones amida del mismo.

**Tabla 3.7:** Desplazamientos químicos (ppm) de los protones más significativos de los miméticos cíclicos  $\beta$ -lactámicos **III**, **4a-c** y **5** medidos en  $H_2O/D_2O$  (9/1) a 300K.

Ciclo	$\beta$ -Lactam		Aa		Arg <sup>c)</sup>		Asp		Gly
	$H^S_\beta/H^R_\beta$	$H_\gamma$	$H_\alpha$	$H_\beta$	$H_\alpha$	$H_\beta$	$H_\alpha$	$H_\beta$	
<b>III</b>	3.83/3.63	3.47/3.10	3.92/3.77	---	3.94	1.58	4.55	2.85/2.67	4.23/3.50
<b>4a</b> (M) <sup>a)</sup>	3.54/3.35	3.20	4.24	1.02	4.08	1.52	4.58	2.93/2.68	3.98/3.48
<b>4b</b> (M) <sup>b)</sup>	3.72/3.51	3.71/2.77	3.89	1.40	4.06	1.60	4.97	2.85/2.65	4.16/3.75
<b>4b</b> (m) <sup>b)</sup>	3.44/3.10	3.15/2.97	3.96	1.47	3.98	1.60	4.47	2.81/2.66	4.12/3.53
<b>4c</b>	3.60	3.15	---	1.21/1.12	4.25	1.86/1.59	4.69	2.92/2.71	4.02/3.50
<b>5</b>	3.59/3.55	3.27/3.17	---	0.91/0.90	4.43	1.88/1.72	4.75	2.96/2.82	---

a) Relación de conformeros (M/m) 9/1; las señales del conformero minoritario (m) no pudieron identificarse correctamente.

b) Relación de conformeros (M/m) 7/3.

c) Los desplazamientos químicos de los protones  $H_\gamma$  y  $H_\delta$  del residuo Arg se muestran en la parte experimental.

Tras asignar las señales de los espectros, se realizó una deriva térmica entre 300K y 325K en  $H_2O/D_2O$  (9/1) con intervalos de 5K y se calcularon los coeficientes térmicos ( $\Delta\delta(H^N)/\Delta T$ ) de los protones amida de los diferentes ciclos para saber si participaban o no en enlaces de hidrógeno intramoleculares. En la **Tabla 3.8** se muestran los valores del desplazamiento químico en ppm de los diferentes NH amídicos y los correspondientes coeficientes térmicos<sup>79</sup>.

En agua, el valor límite del coeficiente térmico de un NH amídico que participa en un enlace de hidrógeno intramolecular es de  $-4\text{ppb/K}^{80}$ . Por lo tanto, se puede considerar que los protones amídicos cuyos coeficientes térmicos sean menores o iguales a esta

<sup>79</sup> Para ver en detalle las gráficas de las derivas térmicas y los espectros, ver anexo.

<sup>80</sup> Cierpicki, T.; Otlewski, J. *J. Biomolec. NMR*, **2001**, 21, 249-261.



magnitud (en valor absoluto) participan en cierta medida en enlaces de hidrógeno intramoleculares.

**Tabla 3.8:** Desplazamientos químicos de los NH amídicos (ppm) y coeficientes térmicos (ppb/K) medidos en  $H_2O/D_2O$  (9/1)<sup>a)</sup>.

Ciclo	$\beta$ -Lactam		Arg		Asp		Gly	
	NH	$\Delta\delta(H^N)/\Delta T$	NH	$\Delta\delta(H^N)/\Delta T$	NH	$\Delta\delta(H^N)/\Delta T$	NH	$\Delta\delta(H^N)/\Delta T$
<b>III</b>	7.73	<u>-1.0</u>	8.83	-5.6	7.85	<u>-2.8</u>	8.62	-7.8
<b>4a</b> (M) <sup>b)</sup>	8.39	-6.6	8.08	-8.0	8.46	-6.5	8.33	-6.4
<b>4a</b> (m) <sup>b)</sup>	7.72	<u>-0.5</u>	9.36	-8.2	7.78	<u>-2.2</u>	----	----
<b>4b</b> (M) <sup>c)</sup>	8.62	-13.1	9.36	-8.1	8.10	-4.1	9.09	-7.8
<b>4b</b> (m) <sup>c)</sup>	7.73	<u>-1.6</u>	8.79	-5.8	8.05	<u>-2.9</u>	8.60	-8.4
<b>4c</b>	8.38	-7.3	7.79	-6.8	8.30	-6.6	8.47	-7.3
<b>5</b>	8.69	-5.9	8.45	-4.4	7.94	-4.0	----	----

a) Coeficientes resaltados, correspondientes a protones amídicos susceptibles de participar en enlaces de hidrógeno intramoleculares

b) Relación de conformeros (M/m): 9/1.

c) Relación de conformeros (M/m): 7/3.

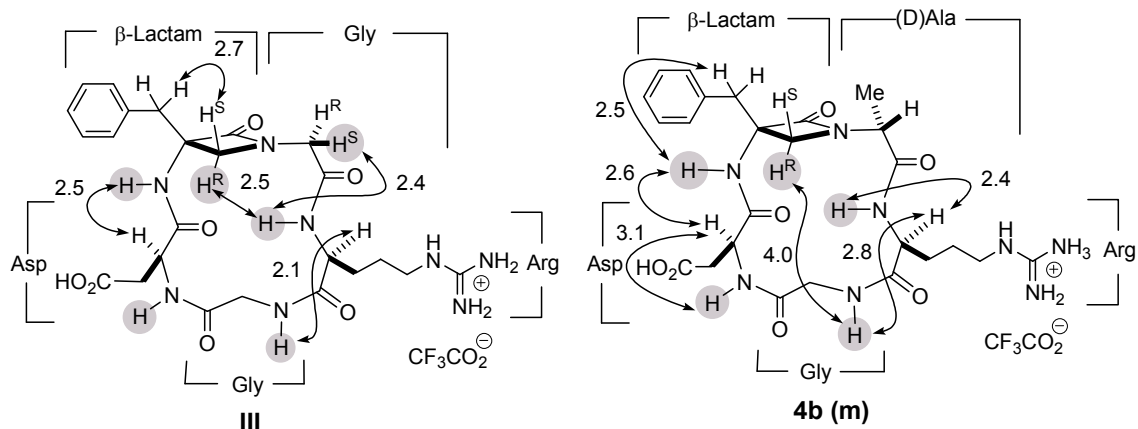
Así, según esta diferenciación, en el caso de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[RGD- $\beta$ -Lactam-Aa] **III** y **4a-c** podemos distinguir dos tipos de familias conformacionales. La primera, que denominaremos (X), estaría formada por el único conformero del ciclo **III** y los conformeros minoritarios de los ciclos **4a** y **4b**. Contendría protones amídicos de bajo coeficiente térmico en los residuos  $\beta$ -Lactam y Asp, así como los correspondientes giros, por lo que también la denominaremos “ $\gamma$ -girada”. La otra familia, que denominaremos (Y) o “abierta”, muestra todos los coeficientes térmicos mayores de -4 ppb/K y, por tanto, no contendría giros. Esta familia estaría formada por el único conformero del ciclo **4c** y los conformeros mayoritarios de los ciclos **4a** y **4b**. Finalmente, aunque el ciclotetrapéptido  $\beta$ -lactámico **5** no es directamente comparable a los pentapéptidos **4** por carecer del residuo de glicina, presenta valores de coeficientes térmicos altos por lo que también se le asignó una conformación “abierta” que denominaremos (Z). Para conocer cuáles son los aceptores en los enlaces de hidrógeno antedichos y elucidar así la conformación detallada de las diferentes familias conformacionales, se integraron algunas señales de cruce de los espectros ROESY. En la **Tabla 3.9** y en la **Figura 3.35** se muestran las principales distancias promedio de cada ciclopéptido  $\beta$ -lactámico.

**Tabla 3.9:** Algunas distancias interprotónicas promedio (en Å) de los ciclopéptidos **III**, **4a-c** y **5** obtenidas a partir de los espectros ROESY registrados a 300K en H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1). <sup>a)</sup>

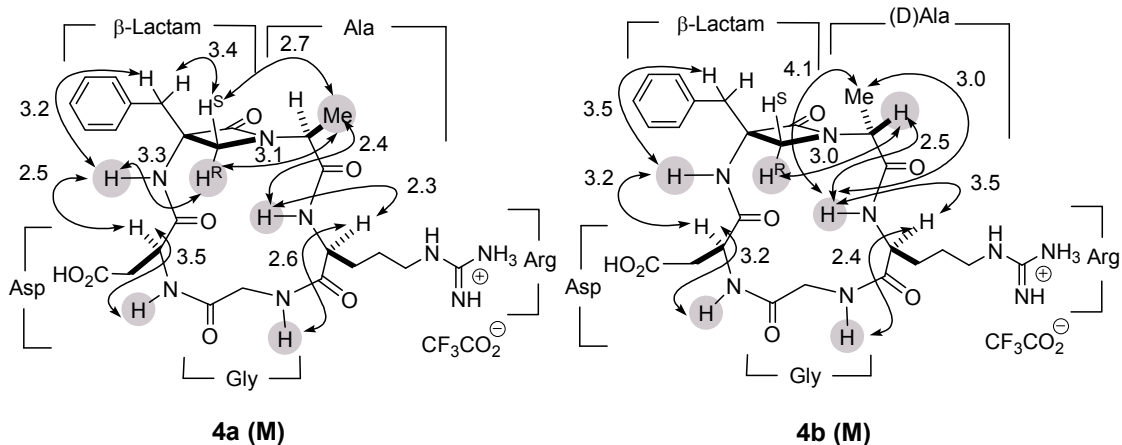
H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>	III	4a (M)	4b (M)	4b (m)	4c	5
NH(Arg)	H <sup>R</sup> <sub>β</sub> -(β-Lactam	2.5	-----*	-----*	-----*	3.2	2.2
	Aa <sup>R</sup>	-----*	-----*	4.1	-----*	-----*	-----*
	Aa <sup>S</sup>	2.4	2.4	2.5	-----*	2.9	2.8
	Arg-α	-----*	2.3	3.5	2.4	3.0	3.0
	NH(Asp)	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	2.1
NH(Gly)	Gly <sup>S</sup>	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	Gly <sup>R</sup>	-----*	-----*	2.9	4.0	3.4	-----*
	Arg-α	2.1	2.6	2.4	2.8	2.7	-----*
NH(Asp)	Gly <sup>S</sup>	2.3	-----*	-----*	-----*	2.7	-----*
	Gly <sup>R</sup>	-----*	-----*	-----*	3.1	-----*	-----*
	Asp-α	-----*	3.5	3.2	3.1	3.1	2.2
	NH(Arg)	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	3.6
NH(β-Lactam)	H <sup>R</sup> <sub>β</sub> -(β-Lactam	-----*	3.3	-----*	-----*	3.6	3.3
	Asp-α	2.5	2.5	3.2	2.6	2.5	2.2
	CH <sub>2</sub> -Ph	-----*	3.2	3.5	2.5	3.0	2.8
	NH(Asp)	3.8	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
H <sup>S</sup> <sub>β</sub> -(β-Lactam)	H <sub>γ</sub> -(β-Lactam)	2.7	3.4	-----*	-----*	3.0	-----*
	Aa <sup>S</sup>	-----*	3.1	-----*	-----*	2.5	2.6
	Aa <sup>R</sup>	-----*	-----	-----*	3.2	-----*	2.8
H <sup>R</sup> <sub>β</sub> -(β-Lactam)	Aa <sup>S</sup>	-----*	2.7	3.0	-----*	-----*	2.3
	Aa <sup>R</sup>	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*

\* No se observa señal ROE.

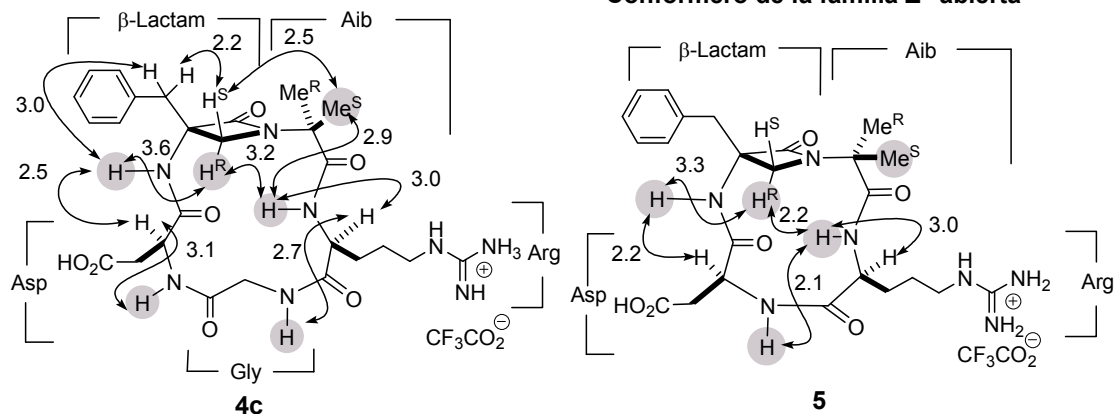
a) Distancias de referencia. Ciclo **III**: [CH<sup>R</sup><sub>β</sub>-(β-Lactam)-CH<sup>S</sup><sub>β</sub>-(β-Lactam)]=1.8 Å; Ciclos **4a** y **4c**: [CH-Gly1<sup>S</sup>-CH-Gly1<sup>R</sup>]=1.8 Å; Ciclo **4b**: [CH<sup>R</sup><sub>γ</sub>-(β-Lactam)-CH<sup>S</sup><sub>γ</sub>-(β-Lactam)]=1.8 Å; Ciclo **5**: [NH-Arg<sub>γ</sub>-CH-Arg<sub>δ</sub>]=1.8 Å.

Confórmers de la familia X " $\gamma$ -girada"

## Confórmers de la familia Y "abierta"



## Confórmero de la familia Z "abierta"



**Figura 3.35:** Distancias interprotónicas (en Å) determinadas a partir de experimentos ROESY en disolución de  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  para los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos de tipo RGD III, 4c y 5.

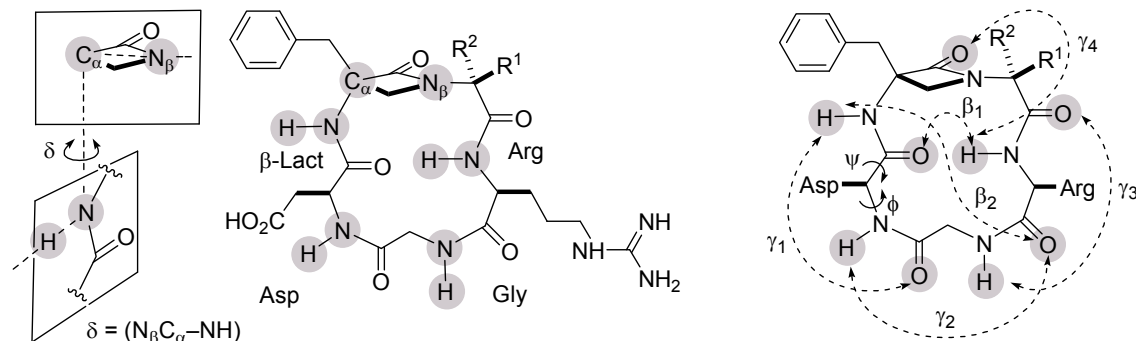
También se calcularon los ángulos diedros entre los NH amídicos y los protones C $\alpha$ H adyacentes a través de la ecuación de Karplus<sup>62</sup> y las constantes de acoplamiento  $^3J(\text{HN-C}\alpha\text{H})$  de los protones amida de los ciclos. En la siguiente tabla se muestran dichos valores para cada uno de los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos RGD, apreciándose que las familias conformacionales definidas según los enlaces de hidrógeno intramoleculares también son homogéneas en lo que respecta a sus valores de  $^3J(\text{HN-C}\alpha\text{H})$  y sus ángulos diedros  $\phi(\text{HN-C}\alpha\text{H})$  (**Tabla 3.10**). Se confirma así la presencia de tres familias conformacionales que dependen del tipo de sustitución en el residuo (2) de los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos **4a-c** y de la falta del residuo de glicina en el ciclopeptido **5**.

**Tabla 3.10:** Ángulos diedros de los ciclopeptidos **III**, **4a-c** y **5** calculados a partir de las constantes de acoplamiento de los protones amida aplicando la ecuación de Karplus.

Familia Conformacional	Ciclo	$^3J(\text{HN-C}\alpha\text{H})$			$\phi(\text{HN-C}\alpha\text{H})$		
		NHArg	NHGly	NHAsp	NHArg	NHGly R/S	NHAsp
<b>X “<math>\gamma</math>-girada”</b>	<b>III</b>	-----	-----	5.4	-----	-----	-130
	<b>4a (m)</b>	5.9	-----	7.4	+134	-----	-146
	<b>4b (m)</b>	-----	6.2	5.3	-----	+20/+136	-129
<b>Y “abierta”</b>	<b>4a (M)</b>	7.5	5.8	8.0	+146	-133/-26	-151
	<b>4b (M)</b>	-----	5.5	8.8	-----	-131/-30	-159
	<b>4c</b>	7.3	5.9	8.3	+145	-133/-25	-154
<b>Z “abierta”</b>	<b>5</b>	9.8	-----	6.8	+180	-----	-168

Seguidamente, se aplicó el método *Simulated Annealing*<sup>63</sup> empleando las distancias interprotónicas de la **Tabla 3.9** como restricciones para calcular los grupos conformacionales o clusters de los compuestos **III** y **4a-c**. En el caso del compuesto **5**, se emplearon como restricción los ángulos diedros  $\phi(\text{HN-C}\alpha\text{H})$ , ya que ninguna de las señales de los protones geminales permitió establecer distancias interprotónicas de referencia fiables. El margen aplicado a cada restricción de distancia fue de  $\pm 0.3$  Å y las simulaciones se realizaron empleando el programa X-PLOR-NIH 2.16<sup>64</sup>. De los conjuntos de 100 estructuras resultantes para cada compuesto se seleccionaron aquellas que no incumplían ninguna restricción o sólo una. Dichas estructuras se agruparon en diferentes clusters siguiendo el mismo criterio que en el apartado 3.1.4.1, reuniéndolas según los conjuntos de orientaciones de los grupos amida con respecto al plano medio molecular de cada ciclopeptido definido por el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta$  (ver **Tabla 3.11** y **Tabla 3.12**).

**Tabla 3.11:** Clusters conformacionales de los ciclopéptidos **III** y **4a-c** definidos según el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta^a$  y las distancias  $\text{C}\underline{\text{O}}\cdots\text{H}\text{N}$  de los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares.



Cluster (n) <sup>b</sup>	$\delta = (\text{N}\beta\text{C}\alpha\text{--NH})$				Distancia $\text{C}\underline{\text{O}}\cdots\text{H}\text{N}$ (Å) <sup>c</sup>					
	$\langle\delta\rangle_{\beta\text{-Lact}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Gly}}$	$\langle\delta\rangle_{\text{Arg}}$	$\langle\gamma_1\rangle (\phi;\psi)_{\text{Asp}}^d$	$\langle\gamma_2\rangle$	$\langle\gamma_3\rangle$	$\langle\gamma_4\rangle$	$\langle\beta_1\rangle$	$\langle\beta_2\rangle$
<b>III-A (49) X</b>	-58.0	+50.4	-69.2	+107.0	<u>2.3</u> (-94;+51)	3.1	3.6	4.2	4.9	5.2
<b>III-B (20) X</b>	-56.0	+55.6	-90.5	-96.4	<u>2.0</u> (-87;+52)	3.9	4.4	2.8	6.7	4.9
<b>III-C (20) Y</b>	-69.1	-97.9	-96.9	-98.7	3.2 (+49;+46)	5.2	4.3	2.8	6.5	5.2
<b>III-D (20) Y</b>	-64.6	-84.1	-70.1	+99.3	3.7 (+60;+54)	5.0	3.3	4.8	5.1	5.0
<b>4a-A (16) X</b>	-56.0	+71.2	-71.3	-129.0	<u>1.7</u> (-72;+65)	4.2	4.6	3.3	5.3	5.8
<b>4a-B (11) X</b>	-57.2	+72.1	-74.3	+110.1	<u>1.7</u> (-71;+66)	4.2	3.9	4.4	5.0	5.4
<b>4a-C (29) Y</b>	-50.7	-89.1	-68.9	+108.0	2.9 (+50;+35)	5.2	3.6	4.5	5.3	5.3
<b>4a-D (10) Y</b>	-55.0	-94.2	-66.8	+133.1	2.8 (+48;+34)	5.2	4.4	3.4	5.3	5.8
<b>4b-A (31) X</b>	-40.6	+57.3	-79.6	+114.0	<u>2.3</u> (-89;+39)	4.0	4.1	3.9	5.3	5.3
<b>4b-B (48) Y</b>	+60.9	+82.9	-74.1	-113.8	3.6 (-58;+54)	4.1	4.2	4.0	5.3	6.0
<b>4c-A (57) Y</b>	-62.8	+39.5	-89.3	+113.5	2.8 (-17;+44)	3.8	4.3	3.6	4.8	5.3
<b>4c-B (2) Y</b>	-165.0	+52.0	+60.0	+115.0	3.2 (-10;+128)	4.3	5.2	3.7	<u>1.6</u>	6.5

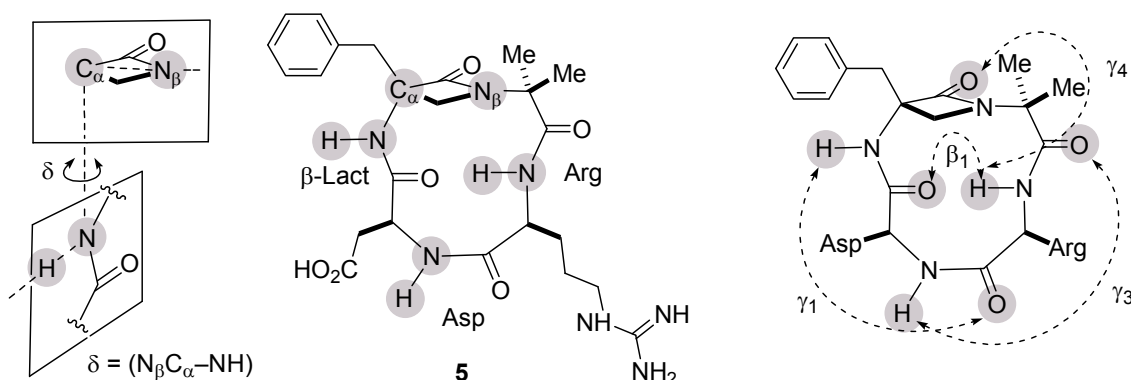
a) Una orientación anterior o posterior del enlace  $\text{CON-H}$  al plano medio del macrociclo se corresponde, respectivamente, con un signo positivo  $\delta$  (+) o negativo  $\delta$  (-).

b) Entre paréntesis se indica el número de estructuras que incumplen una o ninguna de las restricciones de distancia interprotónica. Familia conformacional **X**, ciclos “girados”; Familia conformacional **Y**, ciclos “abiertos”.

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

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

**Tabla 3.12:** Clusters conformacionales del ciclopéptido **5** definidos según el signo del ángulo pseudodiedro  $\delta^a$  y distancias  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  de los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares.



Cluster (n) <sup>b)</sup>	$\delta = (\text{N}\beta\text{C}\alpha\text{-NH})$			Distancia $\text{CO}\cdots\text{HN}$ (Å)			
	$\langle\delta_2\rangle_{\beta\text{-Lact}}$	$\langle\delta_2\rangle_{\text{Asp}}$	$\langle\delta_4\rangle_{\text{Arg}}$	$\langle\gamma_1\rangle (\phi, \psi)_{\text{Asp}}^{\text{d)}$	$\langle\gamma_3\rangle$	$\langle\gamma_4\rangle$	$\langle\beta_1\rangle$
<b>5-A (97) Z</b>	-30.1	+67.8	+96.3	<u>2.4</u> (-101; +37)	4.7	3.0	4.8

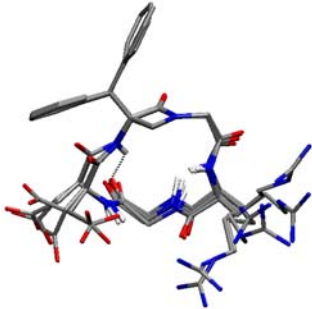
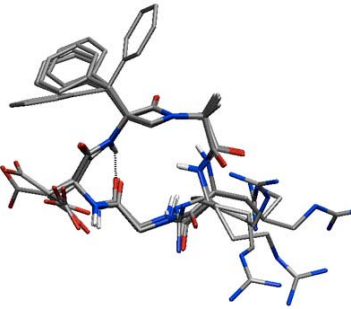
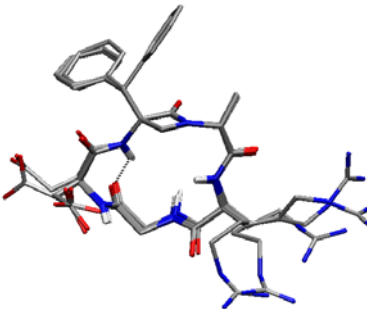
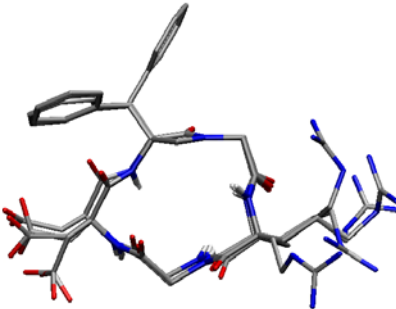
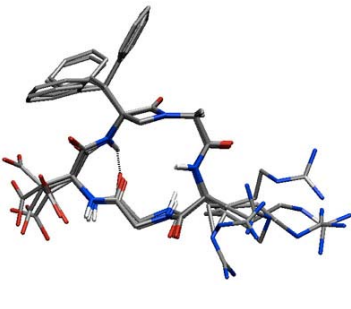
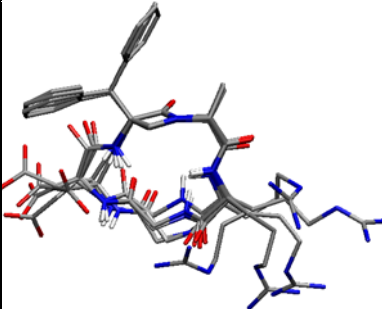
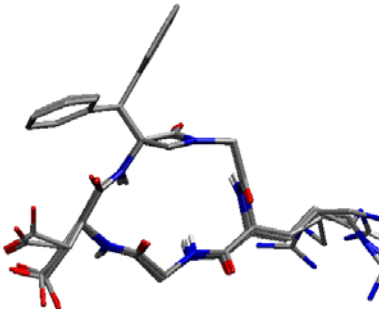
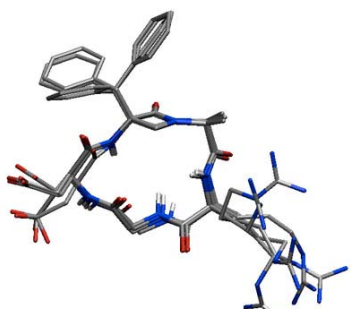
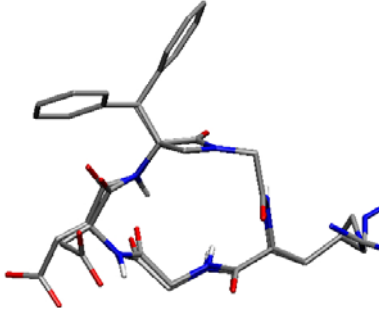
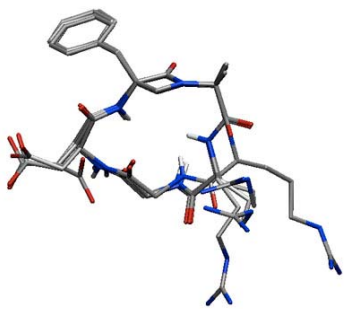
a) Una orientación anterior o posterior del enlace  $\text{CON-H}$  al plano medio del macrociclo se corresponde, respectivamente, con un signo positivo  $\delta$  (+) o negativo  $\delta$  (-).

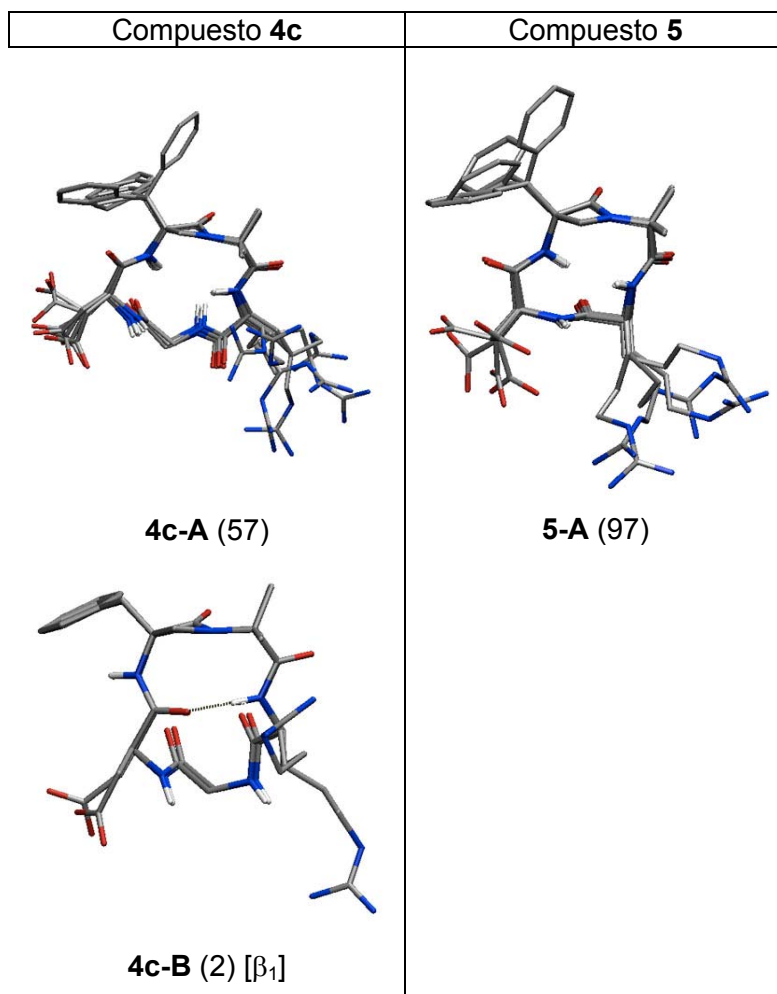
b) Entre paréntesis se indica el número de estructuras que incumplen una o ninguna de las restricciones de distancia interprotónica.

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

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

En las **Figura 3.36** se muestran los principales clusters conformacionales de los compuestos **III**, **4a-c** y **5**, representados mediante la superposición de cinco de sus estructuras de menor energía. En el caso del ciclopéptido **III** los clusters mayoritarios (**III-A** y **III-B**) contienen 69 de las 91 estructuras válidas y se corresponden, de manera aproximada, con los confórmeros de la familia “ $\gamma$ -girada” (**X**). En ellas, existe un enlace de hidrógeno  $\beta\text{-Lactam}(\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C})\text{Gly2}$  estabilizando un giro  $\gamma_1^i$  de tipo inverso, que está en excelente acuerdo con el bajo coeficiente térmico ( $-1.0$  ppb/K) medido para el protón NH  $\beta\text{-Lactam}$  (**Tabla 3.8**). A pesar de ello, las estructuras de los clusters **III-A** y **III-B** muestran un valor promedio del segundo enlace de hidrógeno  $\gamma_2$  [ $3.1$  Å;  $\text{Asp}(\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C})\text{Arg}$ ] que es relativamente largo para el coeficiente térmico observado para dicho protón ( $-2.8$  ppb/K). Unas características estructurales similares se observan en los clusters **4a-A**, **4a-B** y **4b-A** que, por consiguiente, también pueden asociarse a la familia conformacional **X**.

Compuesto III	Compuesto 4a	Compuesto 4b
		
<b>III-A (49) [<math>\gamma_1</math>]</b>	<b>4a-A (16) [<math>\gamma_1</math>]</b>	<b>4b-A (31) [<math>\gamma_1</math>]</b>
		
<b>III-B (20) [<math>\gamma_1</math>]</b>	<b>4a-B (11) [<math>\gamma_1</math>]</b>	<b>4b-B (48)</b>
		
<b>III-C (20)</b>	<b>4a-C (29)</b>	
		
<b>III-D (2)</b>	<b>4a-D (10)</b>	



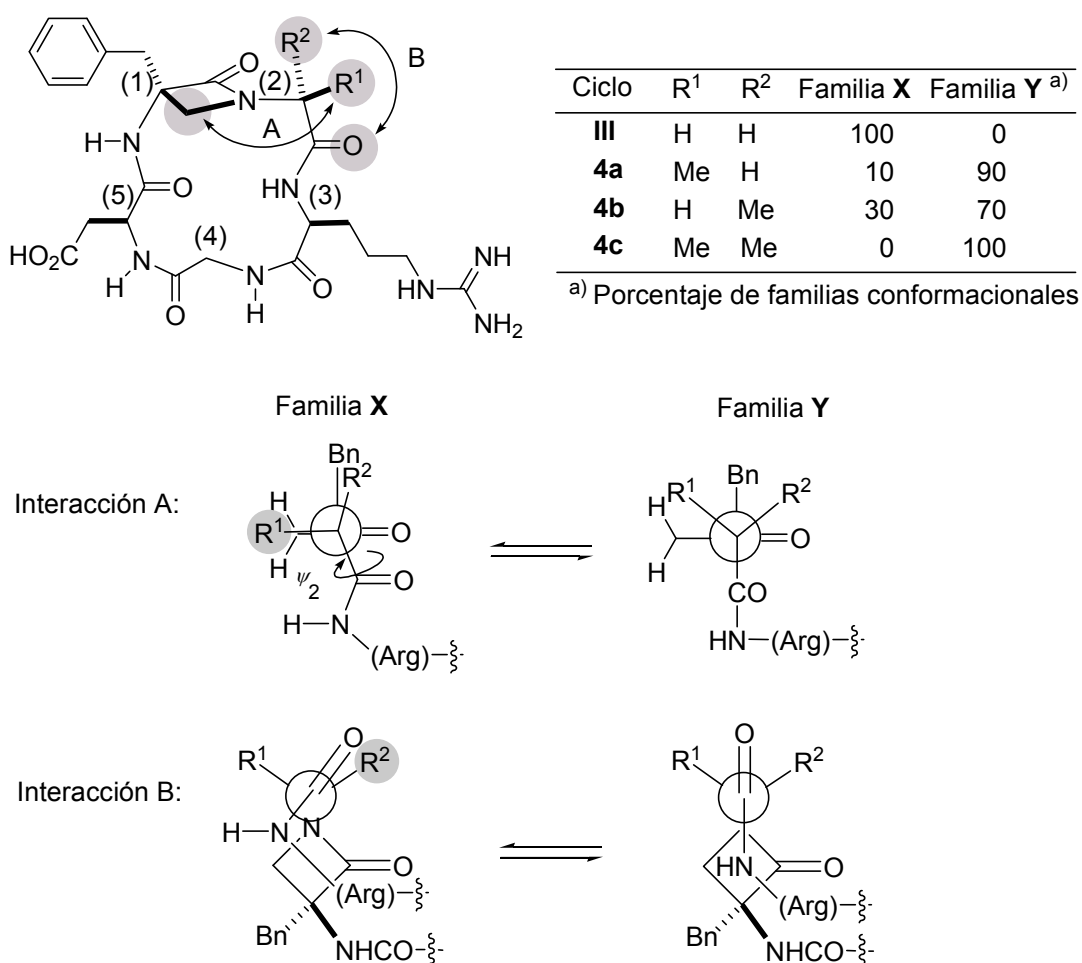
**Figura 3.36:** Clusters conformacionales representativos de los ciclopeptidos  $\beta$ -lactámicos ciclo-[  $\beta$ -Lactam-Aa-Arg-Gly-Asp] **4a-c** y ciclo-[  $\beta$ -Lactam-Aib-Arg-Asp] **5** en agua, obtenidos por cálculos de *Simulated Annealing* restringido con distancias interprotónicas determinadas por RMN.

Por su parte, los clusters **III-C**, **III-D**, **4a-C**, **4a-D**, **4b-B**, **4c-A** y **4c-B** carecen de estructuras con enlaces de hidrógeno intramoleculares y, por ello, se pueden asignar razonablemente a la familia conformacional “abierta” (**Y**). Esta atribución es, además, consistente con los altos coeficientes térmicos medidos para todos los protones amídicos de los compuestos **4a**-(M), **4b**-(M) y **4c** (Tabla 3.8). Por último, la aplicación de la técnica de *Simulated Annealing* al compuesto **5** proporcionó un único cluster de 97 estructuras carentes de enlaces de hidrógeno intramoleculares que responde a las características estructurales de la familia conformacional “abierta” **Z** y que es consistente con los altos coeficientes térmicos observados para sus protones amídicos. En este caso, aunque la distancia  $\beta$ -Lactam(NH $\cdots$ O=C)Arg es relativamente



corta (2.4 Å), los ángulos diedros  $\langle \phi_{\text{Asp}} \rangle = -100.7$  y  $\langle \psi_{\text{Asp}} \rangle = +36.8$  muestran una considerable divergencia con los valores canónicos de un giro  $\gamma$  inverso ( $\phi = -65$  y  $\psi = +65$ ), por lo que puede considerarse que el enlace de hidrógeno del giro  $\gamma_1^i$  no se llega a estabilizar.

Estos resultados pueden ser explicados teniendo en cuenta las diferentes interacciones estéricas de los sustituyentes  $R^1$  y  $R^2$  del residuo (2) con el puente metilénico del residuo  $\beta$ -Lactam (interacción A) y con el carbonilo del propio residuo (interacción B). En la **Figura 3.37** se muestran de manera esquemática las proyecciones de Newman de las familias conformacionales “ $\gamma$ -girada” (**X**) y “abierta” (**Y**), seleccionadas para poner de manifiesto las interacciones de tipo A y tipo B. En las primeras se eclipsa el nitrógeno  $\beta$ -lactámico tras el átomo  $C\alpha(2)$  y en las segundas se eclipsa el átomo  $C\alpha(2)$  tras el carbono carbonílico del mismo residuo.

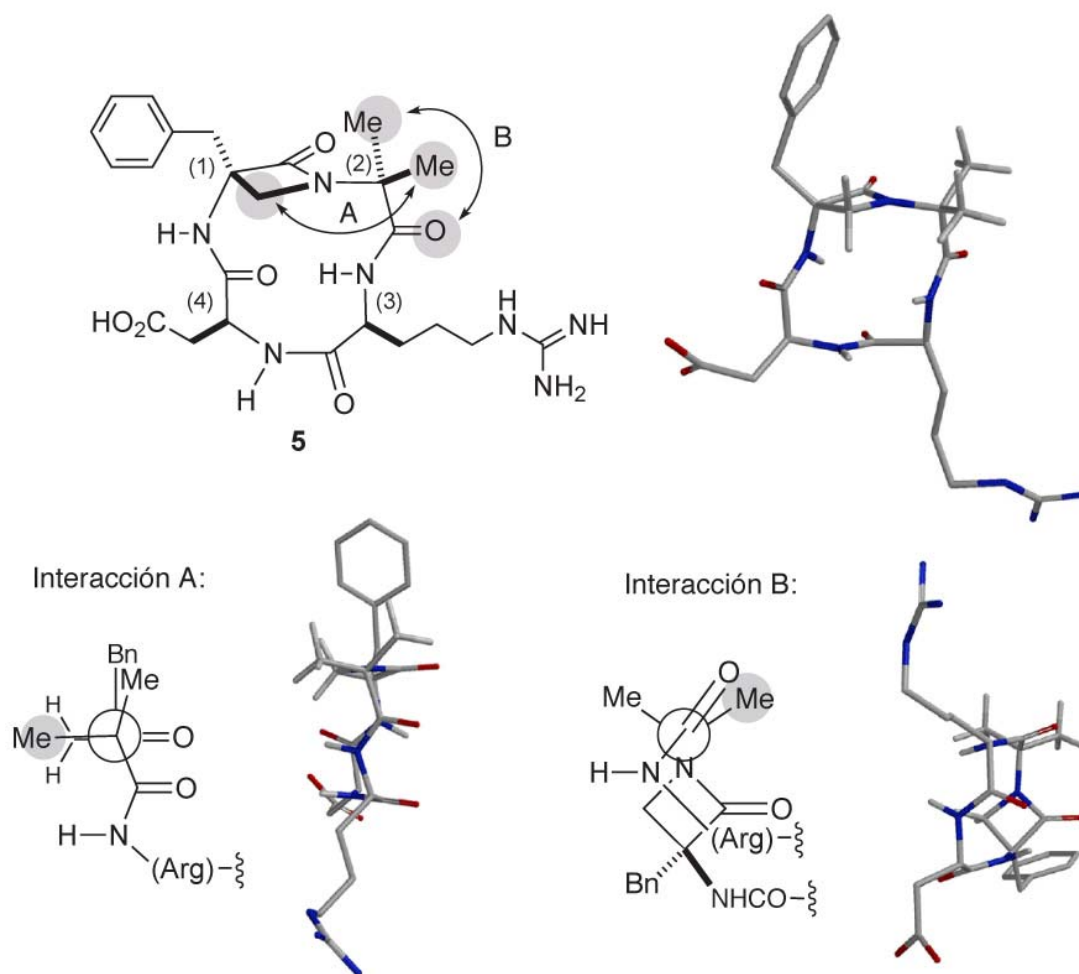


**Figura 3.37:** Modelo de las interacciones estéricas determinantes de la estabilidad relativa de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **4a-c**.

La familia conformacional **X**, cuyo paradigma es el *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam-Aa-Gly-Arg-Asp] (compuesto **III**), posee sendos enlaces de hidrógeno intramoleculares en torno al giro  $\gamma_1$  [ $\beta$ -Lactam(NH $\cdots$ O=C)Gly] y al giro  $\gamma_2$  [Asp(NH $\cdots$ O=C)Arg]. La formación de dichos giros se realiza a pesar del eclipsamiento de los dos protones C $\alpha$ H del residuo (2) de glicina: uno de ellos ( $R^1 = H$ ) con el metileno de la  $\beta$ -lactama (interacción A) y el otro ( $R^2 = H$ ) con el carbonilo de la propia glicina (interacción B). Como resultado, el enlace amida Gly-Arg se orienta saliendo del plano medio del macrociclo. La sustitución del residuo (2) de glicina por uno de alanina ( $R^1 = Me$ ;  $R^2 = H$ ) en el compuesto **4a** incrementa considerablemente la interacción de tipo A, haciendo rotar el enlace  $\psi_2$  hasta situar la amida Gly-Arg coplanar al macrociclo peptídico. Este giro provoca, a su vez, la ruptura de los enlaces de hidrógeno [ $\beta$ -Lactam(NH $\cdots$ O=C)Gly] y [Asp(NH $\cdots$ O=C)Arg] y la consiguiente desaparición de los giros  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$ . De este modo, en el compuesto **4a** predomina la familia conformacional “abierta” (**Y**) que el análisis experimental ha demostrado que se halla en una proporción del 90%. Cuando se analiza el caso del derivado de D-alanina **4b** ( $R^1 = H$ ;  $R^2 = Me$ ), la desestabilización estérica con respecto al compuesto **III** es algo menor que en el caso de **4a**, ya que la interacción del grupo metilo  $R^2$  con el metileno  $\beta$ -lactámico es inexistente. Sin embargo, se produce un incremento de las interacciones de tipo B entre dicho grupo metilo y el carbonilo del propio residuo de D-alanina, que también favorece la formación de la familia conformacional “abierta” (**Y**). La proporción relativa de dicha familia conformacional (70%) en el ciclopéptido **4b** sugiere que las interacciones estéricas de tipo B son algo más débiles que las de tipo A. Por último, en el caso del compuesto **4c** se produce un efecto cooperativo de los dos tipos de interacción (A y B) mencionados anteriormente. Como resultado se crea un doble impedimento estérico por parte de ambos grupos metilo que sólo puede ser mitigado cuando el residuo de Aib (2) adopta una disposición doblemente alternada con respecto al metileno  $\beta$ -lactámico y a su propio grupo carbonilo. Por ello, el ciclopéptido **4c** únicamente adopta conformaciones de la familia **Y**.

Por último, la falta del residuo de glicina aumenta extraordinariamente la rigidez del esqueleto peptídico del ciclotetrapéptido  $\beta$ -lactámico **5**, que presenta una conformación “abierta” (**Z**) sin enlaces de hidrógeno estables. La inspección de la estructura derivada del análisis de clusters reveló que en este caso la única disposición posible de los grupos metilo del residuo de Aib (2) era la doblemente eclipsada, análoga a la observada en la familia **X**. Esta característica permite explicar adecuadamente algunos detalles experimentales, como el fuerte NOE observado entre

los protones de amida NH(Arg) y NH(Asp), situados a 2.1 Å de distancia en el mismo lado del ciclo. Así pues, la tercera familia conformacional **Z** puede considerarse como mixta, ya que comparte características estructurales de las familias **X** e **Y**.



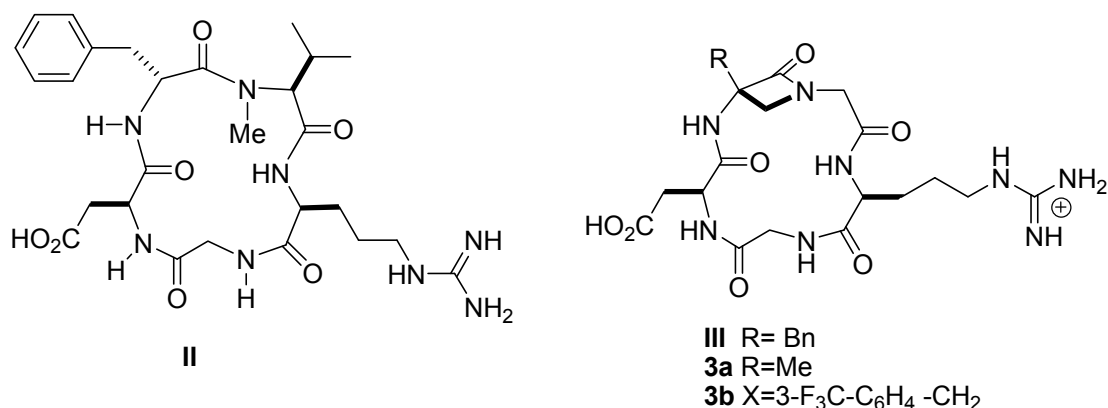
**Figura 3.38:** Modelo de las interacciones estéricas en el conformero representativo del ciclopéptido  $\beta$ -lactámico **5**.

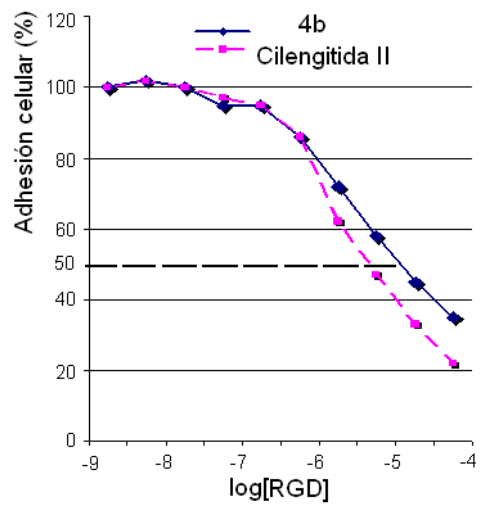
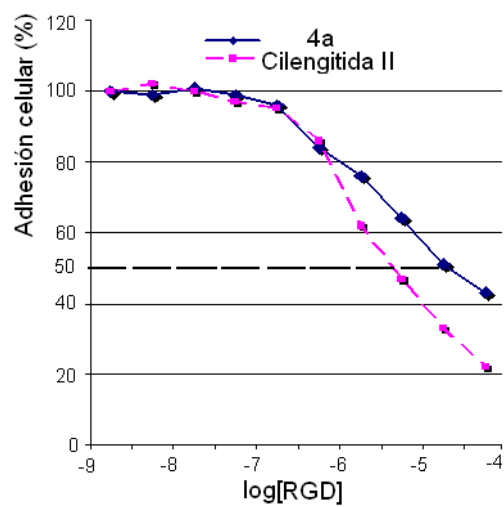
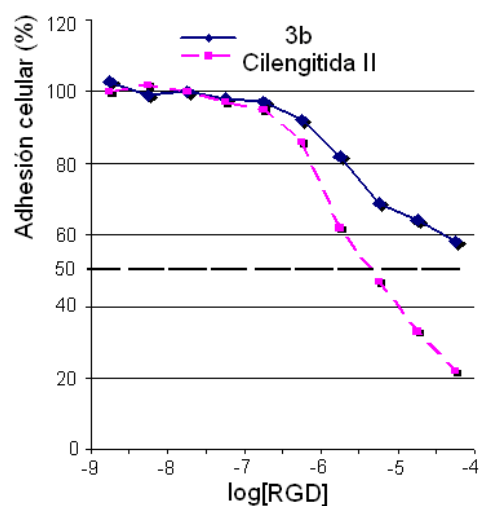
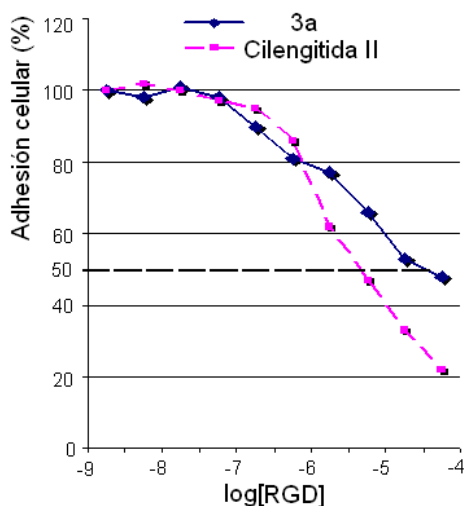
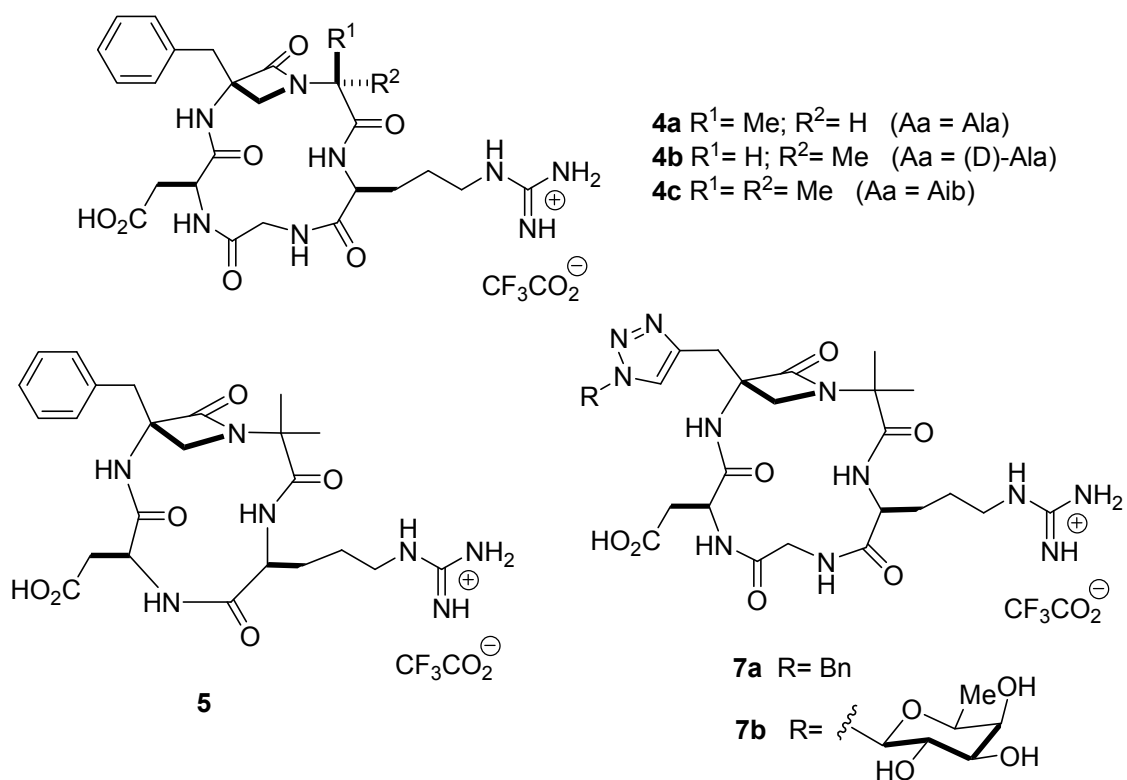


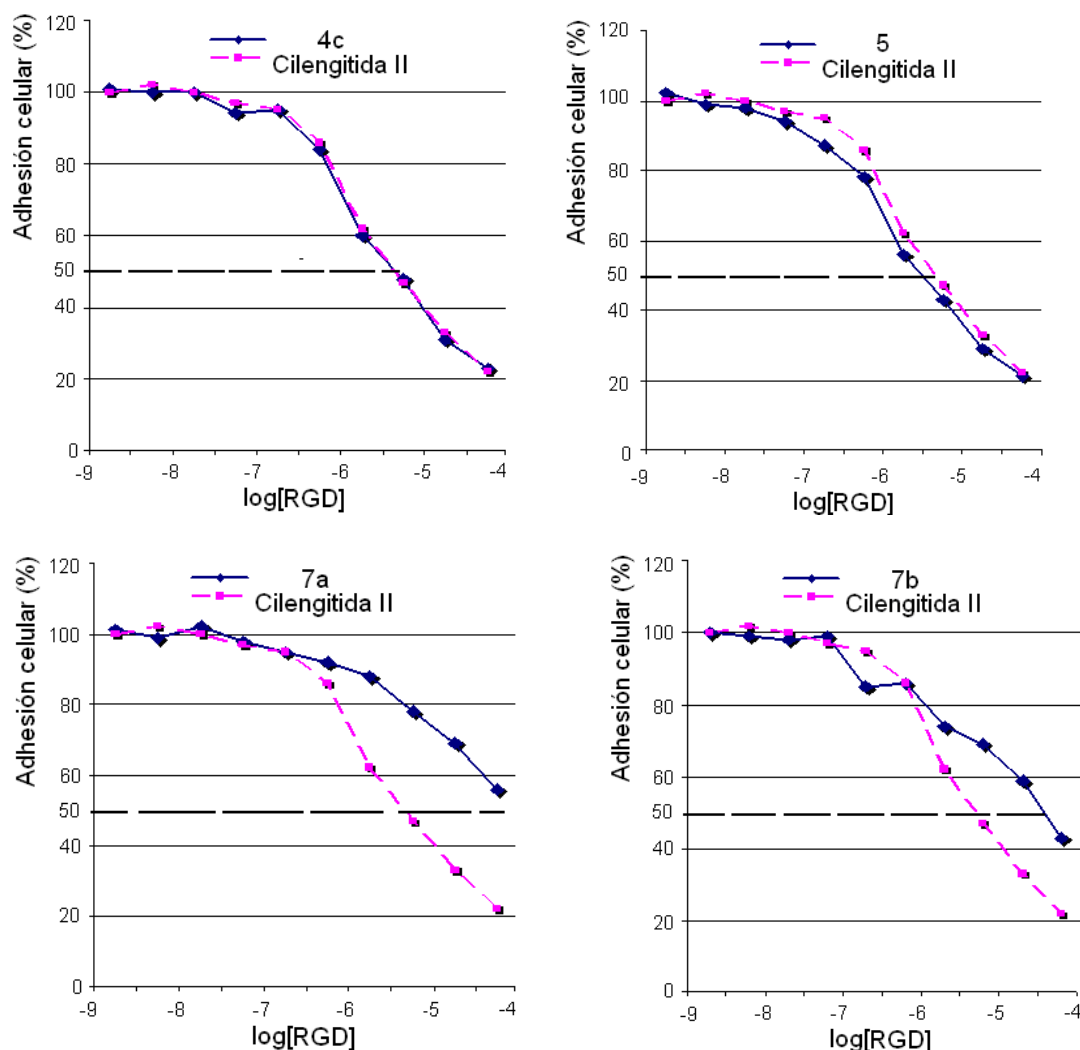
### 3.4. Estudios de inhibición de adhesión de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos de tipo RGD

La evaluación biológica de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **3a-b**, **4a-c**, **5** y **7a-b** fue realizada en los laboratorios de la empresa Genetadi S. L. por los doctores José Luís Castrillo y Antonio Laso. Los ensayos consistieron en cultivar células HUVEC sobreexpresadas en integrina  $\alpha_v\beta_3$  en placas de superficie funcionalizada con vitronectina bajo condiciones atmosféricas, de pH y temperatura adecuadas para obtener una capa de células homogénea. Seguidamente, se aplicó tripsina (una enzima proteolítica) para romper la interacción de los receptores celulares con la vitronectina, permitiendo la liberación de la capa celular. Las células fueron colocadas en placas de cultivo que contenían diferentes concentraciones de los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos **3a-b**, **4a-c**, **5** y **7a-b**.

Como referencia se empleó cilengitida (**II**), que fue preparada en nuestro laboratorio. Después, se volvieron a cultivar en las condiciones originales durante 20 minutos en otra placa idéntica a la inicial de tal forma que sólo las células cuyos receptores no habían sido bloqueados por los ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos pudieran adherirse a la placa funcionalizada con vitronectina. La comparación del número de células adheridas inicialmente frente a las adheridas tras ser tratadas con distintas concentraciones de ciclopéptidos  $\beta$ -lactámicos proporcionó los valores de porcentaje de inhibición de adhesión celular que se muestran en la **Figura 3.39** incluyendo la curva de adhesión de la cilengitida (**II**) como referencia. Obviamente, cuanto mayor sea la pendiente de caída de la curva, tanto más activo será el compuesto







**Figura 3.39:** Gráficas de inhibición de la adhesión sobre vitronectina de células HUVEC sobreexpresadas en integrina  $\alpha_v\beta_3$  en presencia de los ciclopéptidos RGD **3a-b**, **4a-c**, **5** y **7a-b** (en trazo continuo), comparadas con la inhibición de cilengitida (en trazo discontinuo). La ordenada representa el porcentaje de adhesión y la abcisa el logaritmo de la concentración del correspondiente ciclopéptido RGD.

El valor de  $IC_{50}$  para este ensayo se determinó midiendo la concentración mínima de ciclopéptido necesaria para reducir el porcentaje de adhesión celular al 50% (marcado punteado en las gráficas de la **Figura 3.39**) y se comparó con el de la cilengitida **II** que presentó una  $IC_{50}$  consistente con los datos descritos en la bibliografía<sup>43(b),81</sup>.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la capacidad inhibitoria de los miméticos  $\beta$ -lactámicos **3a-b** es menor que la de cilengitida (**II**), por lo que la

<sup>81</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.

sustitución del grupo bencilo por otros de mayor o menor tamaño en la posición  $\alpha$  de la  $\beta$ -lactama del mimético afecta negativamente a la interacción con la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Así, tanto el sustituyente  $\text{CH}_3$  poco voluminoso del ciclo **3a** y en especial el sustituyente voluminoso y electronegativo  $3\text{-CF}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2$  del ciclo **3b** no permiten un anclaje tan selectivo como el bencílico presente en la cilengitida (**II**) lo que hace que disminuya la potencia inhibitoria de dichos ciclos. Este mismo efecto se observa en los ciclos **7a-b** en los que se sustituyó el grupo bencilo por un N-bencil triazol (**7a**) y por un  $\beta$ -fucosil triazol (**7b**).

Por otro lado, la potencia de los ciclos **4a-c**, en los que el residuo Aa (2) es un grupo L-Ala, D-Ala o un grupo Aib, aumenta según el grado de sustitución en la posición  $\alpha'$  y depende de la configuración de dicho estereocentro. La potencia es máxima para el ciclo con el grupo disustituído Aib igualando la potencia de la cilengitida (**II**). Además, es menor para el ciclo monosustituído de configuración (L-Ala), **4a** que para su diastereoisómero (D-Ala) **4b**.

Finalmente, el único mimético que muestra una potencia inhibitoria mayor que cilengitida (**II**) es el ciclotetrapéptido **5**. Este resultado sugiere que una menor separación entre los residuos de ácido aspártico (D) y arginina (R) junto a la disustitución en el residuo (2) del ciclo con un grupo Aib aumenta la potencia de los ligandos frente a integrinas  $\alpha_v\beta_3$ .



### 3.5 Conclusiones:

1- Las macrociclaciones de pseudopentapéptidos del tipo H-Aa-( $\beta$ -Lactam)-Aa<sub>3</sub>-OH y pseudotetrapéptidos H-Aa-( $\beta$ -Lactam)-Aa<sub>2</sub>-OH conteniendo como segundo residuo una  $\alpha$ -amino- $\alpha$ -alquil- $\beta$ -lactama enantiopura, conducen a la formación de los correspondientes ciclopentapéptidos y ciclotetrapéptidos  $\beta$ -lactámicos con buenos rendimientos. La reacción tolera una amplia gama de sustituyentes y grados de sustitución en la posición C $\alpha$  del anillo  $\beta$ -lactámico y en el residuo contiguo a éste.

2- El fragmento de  $\alpha$ -amino- $\alpha$ -alquil- $\beta$ -lactama provoca un fuerte efecto gammágeno en ciclopentapéptidos de tipo *ciclo*-[Aa-( $\beta$ -Lactam)-Aa<sub>3</sub>], que se manifiesta mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares estables en disolución de DMSO o agua. Esta tendencia contrasta con el efecto betágeno observado en los pseudopéptidos abiertos de los que proceden.

3- Las poblaciones conformacionales de los ciclopentapéptidos  $\beta$ -lactámicos RGD de tipo *ciclo*-[( $\beta$ -Lactam)-Aa-Arg-Gly-Asp] en agua pueden ser moduladas modificando el grado de sustitución y la configuración del residuo contiguo al anillo  $\beta$ -lactámico. Dichas poblaciones se agrupan en dos familias principales: una “gammágena” con un enlace de hidrógeno fuerte entre NH de la  $\beta$ -lactama y en carbonilo de la glicina (giro gamma inverso), y otra familia “abierta” sin enlaces de hidrógeno estables.

4- El ciclotetrapéptido  $\beta$ -lactámico *ciclo*-[( $\beta$ -Lactam)-Aib-Arg-Asp] adopta en agua una conformación “abierta” sin enlaces de hidrógeno estables.

5- Tanto los ciclopéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos *ciclo*-[( $\beta$ -Lactam)-Aa-Arg-Gly-Asp] como el ciclotetrapéptido desprovisto del residuo de glicina *ciclo*-[( $\beta$ -Lactam)-Aib-Arg-Asp] presentan una alta potencia inhibidora de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en ensayos de adhesión sobre células HUVEC y confirman la validez general del diseño basado en la inclusión de  $\beta$ -lactamas en péptidos formulada por nosotros (LSAD).

6- En los ciclopéptidos RGD del tipo *ciclo*-[( $\beta$ -Lactam)-Aa-Arg-Gly-Asp] la sustitución del grupo bencilo de la posición C $\alpha$  de la  $\beta$ -lactama por grupos menores o más polares disminuye la potencia inhibitoria del mimético sobre la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , mientras que la disustitución del residuo contiguo a la  $\beta$ -lactama la aumenta. Por último, la eliminación del residuo de glicina del motivo RGD también incrementa de manera

importante e inesperada la capacidad inhibitoria.

## **4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES Y DATOS DE CARACTERIZACIÓN**



#### 4.1. Nomenclatura:

En este apartado se empleará la nomenclatura peptídica para nombrar los diferentes peptidomiméticos, es decir, la abreviatura de los aminoácidos con los grupos protectores; por ejemplo, Boc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH. Si en la estructura se encuentra el anillo β-lactámico, éste se nombrará como β-Lactam seguido del sustituyente en α que contenga. Este último indicará entre paréntesis. En todos los casos su configuración será (S) (por ejemplo, H-Gly-β-Lactam(Bn)-(Gly)<sub>3</sub>-OH). La asignación de las señales de <sup>1</sup>H RMN de los protones β-lactámicos se indicará como CHβ-β-Lactam y CHγ-β-Lactam, mientras que para el resto de señales se adoptará la misma nomenclatura que en los apartados correspondientes al análisis conformacional (3.1.4. y 3.3.).

#### 4.2. Técnicas generales:

Todas las reacciones, excepto las que tengan lugar en medio acuoso, se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno con agitación mecánica en matraces de vidrio precalentados a la llama. Los disolventes fueron secados y destilados antes de su uso siguiendo los procedimientos habituales<sup>82</sup>. El tetrahidrofurano (THF) y el éter dietílico (Et<sub>2</sub>O) se destilaron sobre sodio metálico y benzofenona como indicador. El diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y la N,N-dimetilformamida (DMF) se destilaron sobre hidruro cálcico y se almacenaron sobre tamiz molecular de 4Å.

La purificación de los crudos de reacción se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice 60 (Merk 60F 230-400 mesh) o por cromatografía de capa fina empleando placas de gel de sílice 60-F (Merk Kiesselgel 60). La visualización se realizó con luz UV o utilizando como revelador una mezcla de ácido fosfomolibdico y nitrato de cerio (IV) y amonio, o bien ácido nítrico/sulfúrico y agua.

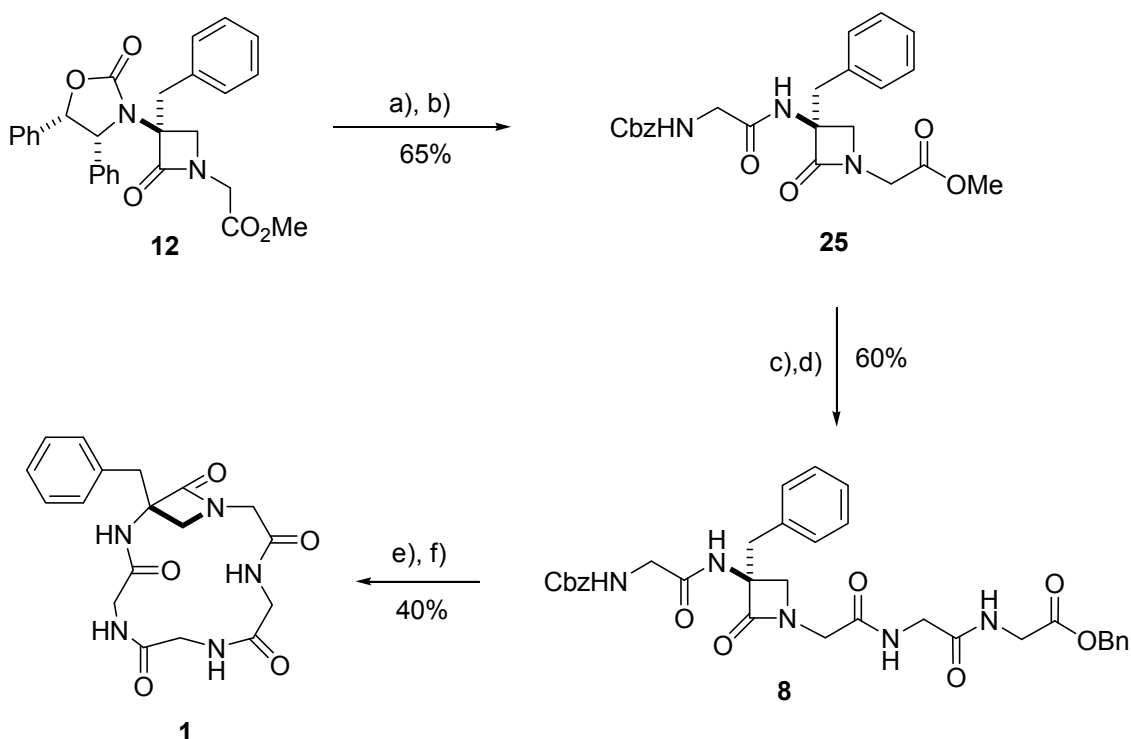
Los espectros <sup>1</sup>H NMR se registraron a 200, 300 o 500 MHz y los espectros <sup>13</sup>C NMR a 50 o 125MHz, empleando, respectivamente, espectrómetros Varian Gemini 200, Bruker Avance DPX300 y DPX500. Los valores de desplazamiento químico δ (ppm) se determinaron tomando como referencia los residuos de disolventes: CDCl<sub>3</sub> δH (7.26 ppm), MeOH<sub>d4</sub> δH (3.33 ppm, H<sub>2</sub>O 4.7 ppm), DMSO<sub>d6</sub> δH (2.5ppm, H<sub>2</sub>O 3.3 ppm) para <sup>1</sup>H NMR y CDCl<sub>3</sub> δC (77.16 ppm), MeOH<sub>d4</sub> δC (49.1 ppm), DMSO<sub>d6</sub> δC (39.4 ppm) para <sup>13</sup>C NMR.

<sup>82</sup> Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon: Oxford **1993**.

Los puntos de fusión no están corregidos y se determinaron en un aparato Büchi SMP-20. Los espectros de masas se realizaron según las características del producto y se señalan los valores de fragmentación obtenidos en las fichas de datos espectroscópicos. Los espectros de infrarrojo de transformada de Fourier (Shimadzu IR-435) se registraron empleando pastillas de KBr por adición del producto disuelto en diclorometano o en metanol. La rotación óptica específica se midió a temperatura ambiente en diclorometano o en metanol a la concentración indicada en las fichas de datos espectroscópicos empleando un polarímetro Perkin-Elmer 243B provisto de lámpara de sodio (589nm).

### 4.3. Síntesis de ciclopéptidos $\beta$ -lactámicos conteniendo residuos de glicina y alanina:

#### 4.3.1. Síntesis del ciclopentapéptido *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-(Gly)<sub>4</sub>] 1:



**Esquema 4.1:** a) Pd/C 10%, MeOH, 150 psi, 45°C, 24h; b) Cbz-Gly-OH (1.2eq), HOBt (1.2eq), TEA (3eq), EDC·HCl (1.5eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a., 16h; c) LiOH·H<sub>2</sub>O (1.5eq), THF/H<sub>2</sub>O, t.a. 2h; d) H-Gly-Gly-OBn **14** (1.1eq), HOBt (1.1eq), TEA (5eq), EDC·HCl (1.5eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a. 16h; e) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), 1atm., MeOH, t.a., 5h; f) DPPA (1.5eq), KHCO<sub>3</sub> (15eq), DMF, -15°C, 5 días.

**25**

Una suspensión de la 3-bencil-3-[(4*R*, 5*S*)-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-[(metoxycarbonil)metil]-azetidín-2-ona **12** (635 mg, 1.35 mmol) y Pd al 10% sobre carbono (65 mg) en metanol (30 mL) se agitó sobre atmósfera de hidrógeno durante 24 h a una

b) Acoplamiento peptídico: Sobre una disolución enfriada a 0°C de la  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactama intermedia resultante (1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) se añadió una disolución de Cbz-(Gly)-OH (231 mg, 1.10 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Luego, se añadieron consecutivamente Et<sub>3</sub>N (0.45 mL, 3.2 mmol), HOBt (189 mg 1.40 mmol) y EDC·HCl (307 mg, 1.60 mmol) y la mezcla se agitó durante 16h dejando que la temperatura subiera lentamente. Pasado ese tiempo, la disolución se lavó consecutivamente con HCl 1M (3 X 10mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 X 10mL), la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/10). Rendimiento: 385 mg (65%). Sólido blanco.

**8**

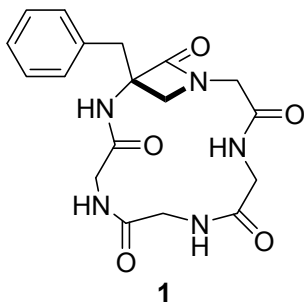
Sobre una disolución de Cbz-Gly-[β-Lactam(Bn)]-Gly-OMe **25** (208 mg, 0.50 mmol) en THF (5 mL) enfriada a 0°C se añadió una disolución de

LiOH·H<sub>2</sub>O (32 mg, 1.0 mmol) en H<sub>2</sub>O (5 mL). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1h. Tras comprobar que la reacción había finalizado (TLC Hexano/EtOAc (1:1)) la mezcla se acidificó con una disolución acuosa de ácido cítrico al 5%, se evaporó el THF a presión reducida, y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3

X 5 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se evaporó a presión reducida. Rendimiento: 212 mg (100%).

d) Acoplamiento peptídico: En un matraz con atmósfera de nitrógeno se vertió una disolución del tosilato de la amina  $\text{H}-(\text{Gly})_2\text{-OBn}$  (177 mg, 0.6 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (10/1 mL). La disolución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se añadieron consecutivamente  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.35 mL, 2.5 mmol), una disolución del ácido  $\text{Cbz-Gly-}[\beta\text{-Lactam(Bn)}]\text{-Gly-OH}$  (212 mg, 0.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL),  $\text{HOBT}$  (81.1 mg, 0.60 mmol) y  $\text{EDC}$  (191.7 mg, 1 mmol). La disolución se agitó dejando subir lentamente la temperatura de  $0^\circ\text{C}$  a temperatura ambiente durante 20 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se lavó consecutivamente con una disolución 0.1 M de  $\text{HCl}$  (2 X 10 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose el compuesto **8** que fue utilizado en las siguientes etapas sin purificar. Rendimiento: 190 mg (60%). Aceite incoloro (cristalización en  $\text{EtOAc}$ ).

#### 4.3.1.3. Desprotección y ciclación: *ciclo-}[\beta\text{-Lactam(Bn)}]\text{-(Gly)}\_4\text{ 1*:



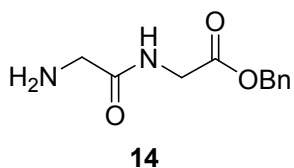
e) Hidrogenólisis: Se agitó una suspensión de  $\text{Cbz-Gly-}[\beta\text{-Lactam(Bn)}]\text{-(Gly)}_3\text{-OBn}$  **8** (50.4 mg, 0.08 mmol) y  $\text{Pd}$  al 10% sobre carbono (10 mg) en metanol (5 mL) bajo presión atmosférica de  $\text{H}_2$  durante 5 h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN ( $\text{MeOH}_{d4}$ ) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla a través de celita, lavando la misma con una mezcla de metanol/ $\text{DMF}$

(10/1) y el filtrado se evaporó a presión reducida. Rendimiento: 85%.

f) Ciclación: El crudo obtenido en la etapa anterior se disolvió en  $\text{DMF}$  (80 mL) previamente desgasificada por borboteo de  $\text{N}_2$  y se enfrió a  $-10^\circ\text{C}$  en un criogenador. Sobre la mezcla agitada y enfriada a  $-10^\circ\text{C}$  se añadieron consecutivamente  $\text{KHCO}_3$  (40 mg, 0.40 mmol) y  $\text{DPPA}$  (0.025 mL, 0.10 mmol). La reacción se siguió por RMN. Al cabo de 5 días, la mezcla se evaporó a presión reducida sin calentar el baño y sin dejar que se secase completamente. El residuo obtenido se diluyó con  $\text{MeOH}$  y se filtró a vacío. El filtrado se evaporó y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa (eluyente:  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1/3). Rendimiento: 20 mg (40%). Aceite incoloro



#### 4.3.1.4. Procedimiento de la síntesis del precursor H-Gly-Gly-OBn 14:



##### a) Preparación del tosilato del éster bencílico de la glicina:

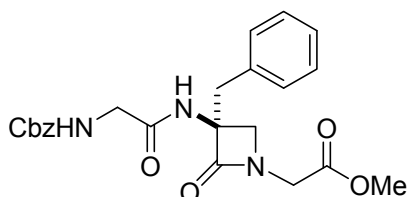
Sobre una suspensión de glicina (7.55 g, 100 mmol) en tolueno/BnOH (60/40 mL), se añadió TosOH·H<sub>2</sub>O (19.5 g, 102 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a reflujo con eliminación azeotrópica de agua durante 16 h. Después la

disolución se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. El sólido así obtenido se filtró lavándose con éter dietílico varias veces. Finalmente el sólido se secó a vacío obteniéndose el tosilato del éster bencílico de la glicina. Rendimiento: 1.2 g, 7.5 mmol 90%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.10 (sa., 3H, NH<sub>3</sub>), 7.69 (d, 2H, J=7.3 Hz, Ar), 7.29-7.26 (m, 5H, Ar), 7.00 (d, 2H, J=7.3 Hz, Ar), 5.00 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 2H, Gly), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

b) Acoplamiento peptídico con Boc-Gly-OH: El tosilato así obtenido (1.2 g, 7.5 mmol) se disolvió en EtOAc (50 mL) y se basificó lentamente con NaHCO<sub>3</sub> hasta pH≈9. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron, obteniéndose el éster bencílico de la glicina como un aceite incoloro con un rendimiento del 70 %. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.37 (s, 5H, Ar), 5.17 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.49 (s, 2H, Gly), 1.71 (s, 2H, NH<sub>2</sub>). Dicho aminoéster se disolvió bajo atmósfera de nitrógeno en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (50 mL) y se enfrió a 0°C. Sobre dicha disolución se añadieron consecutivamente bajo atmósfera de nitrógeno Boc-Gly-OH (1.31 g, 7.50 mmol), HOBt (1.11 g, 8.25 mmol), TEA (1.25 mL, 9 mmol) y EDC·HCl (1.73 g, 9 mmol). La mezcla se agitó durante 16h dejando subir lentamente la temperatura hasta temperatura ambiente. La disolución obtenida se lavó con HCl 0.1M (2 X 15 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 X 15 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó obteniéndose el dipéptido N-Boc protegido Boc-Gly-Gly-OBn que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: EtOAc/Hex. 1/1) obteniéndose un sólido blanco (80% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.37 (s, 5H, Ar), 6.63 (sa, 1H, NH), 5.20 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.17 (sa, 1H, NH), 4.11 (d, 2H, J=4.1 Hz, Gly), 3.86 (d, 2H, J=3.9 Hz, Gly), 1.46 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 174.3, 173.8, 157.3, 156.0, 81.7, 80.2, 43.2, 42.1, 30.6, 28.1.

c) Desprotección del grupo Boc: El dipéptido Boc-Gly-Gly-OBn (0.97 g, 3.3 mmol) se disolvió en EtOH (15 mL) y sobre la disolución resultante se goteó bajo atmósfera de

nitrógeno a 0°C una disolución de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (628 mg, 3.3 mmol) en EtOH (5 mL). La disolución se agitó durante 16h a temperatura ambiente. Una vez terminada la reacción, la disolución se evaporó hasta sequedad y el producto se purificó por precipitación en éter dietílico. Rendimiento: 90%.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.78 (s, 1H, NH), 7.36 (s, 5H, Ar), 5.16 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.11 (d, 1H,  $J=4.1\text{Hz}$ , Gly2), 3.39 (s, 2H, Gly1), 1.73 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

**Cbz-Gly- $\beta$ -Lactam(Bn)-Gly-OMe**Referencia N°  
**25**

P.M. (g/mol)

439.46

Punto Fusión (°C)

48-50

 $[\alpha]_D^{25}$  (c=1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-15.5

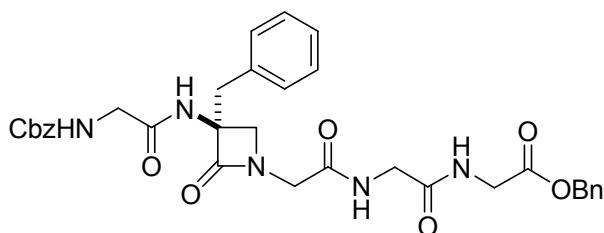
Fórmula Empírica  <b>C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub></b>	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 62.86	H 5.73	N 9.56	C 60.86	H 5.24	N 10.07

IR (cm <sup>-1</sup> , KBr)	3310, 1743, 1683, 1527, 1216, 1051
-----------------------------	------------------------------------

MS m/z	MS1: 440.5 (M <sup>+</sup> +1)
Fuente ESI	MS2(440.5): 395.5(45.0); 332.5(108); 247.5(193)
Pol. positiva	MS3(395.5): 367.5(28)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>	<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>
7.35-7.17 (m, 10H) Ar	169.7
6.53 (sa, 1H) NH(Gly1)	168.5
5.37 (s, 1H) NH( $\beta$ -Lactam)	168.3
5.09 (s, 2H) Ph-CH <sub>2</sub> -O-	134.6
4.12 (d, 1H, J=17.6Hz) Gly2	130.0
3.80 (d, 1H, J=17.6Hz) Gly2	128.6
3.85 (m, 2H) Gly1	128.5
3.80 (d, 1H, J=5.9Hz NCHC) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)	128.1
3.69 (s, 3H) O-Me	128.0
3.63 (d, 1H, J=5.9Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)	127.3
3.23 (dd, 2H, J=13.9Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)	68.3
	67.0
	52.3
	52.1
	42.7

Comentarios:

**Cbz-Gly-β-Lactam(Bn)-(Gly)<sub>3</sub>-OBn**

Referencia N°

**9**

P.M. (g/mol)

629.66

Punto Fusión (°C)

68-70 (EtOAc)

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.9, EtOAc)

+39.3

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 62.95	H 5.60	N 11.12	C 64.05	H 5.77	N 10.83

**C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>**IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)

3296, 1758, 1667, 1530, 1192

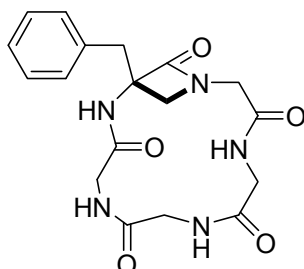
HPLC-MS  
Fuente ESI  
Pol. positivaMS1: 630.2 (M<sup>+</sup>+1)  
MS2(630.2): 586.3(43.9); 522.2(108); 437.2(193); 364.2(266)  
MS3(586.2): 557.2(29); 364.2(222)<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.36 (sa, 1H) NH(Gly3)  
 7.38-7.32 (m, 10H) Ar  
 6.95 (sa, 1H) NH(Gly4)  
 6.64 (s, 1H, NH(β-Lactam))  
 5.53 (sa, 1H) NH(Gly1)  
 5.13 (s, 2H) CO-O-CH<sub>2</sub>-Ph  
 5.10 (s, 2H) Ph-CH<sub>2</sub>-O-CON  
 4.26 (d, 1H, J=17.6Hz) Gly2  
 4.13 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=J<sub>2</sub>=5.7Hz) Gly1  
 3.97 (m, 2H) Gly1, Gly3  
 3.90 (sa, 1H, C<sub>q</sub>CHN) CHβ-(β-Lactam)  
 3.83 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=J<sub>2</sub>=6.0Hz) Gly4  
 3.74 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=J<sub>2</sub>=6.0Hz) Gly4  
 3.48 (d, 1H, J=17.6Hz) Gly2  
 3.47 (sa, 1H, C<sub>q</sub>CHN) CHβ-(β-Lactam)  
 3.17 (d, 1H, J=14.1Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 3.08 (d, 1H, J=14.1Hz) CHγ-(β-Lactam)

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

170.4	66.8
169.5	51.0
169.3	44.8
168.4	44.1
168.0	42.7
156.6	40.9
135.9	38.3
134.9	
133.2	
129.6	
128.5	
128.3	
128.1	
128.0	
127.8	
127.5	
68.1	
66.8	

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam(Bn)-(Gly)<sub>4</sub>]**Referencia N°  
**1**

P.M. (g/mol)

387.39

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.25, DMSO)

+7.1°

Fórmula Empírica  <b>C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub></b>	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 55.81	H 5.46	N 18.08	C 51.83	H 5.96	N 17.92

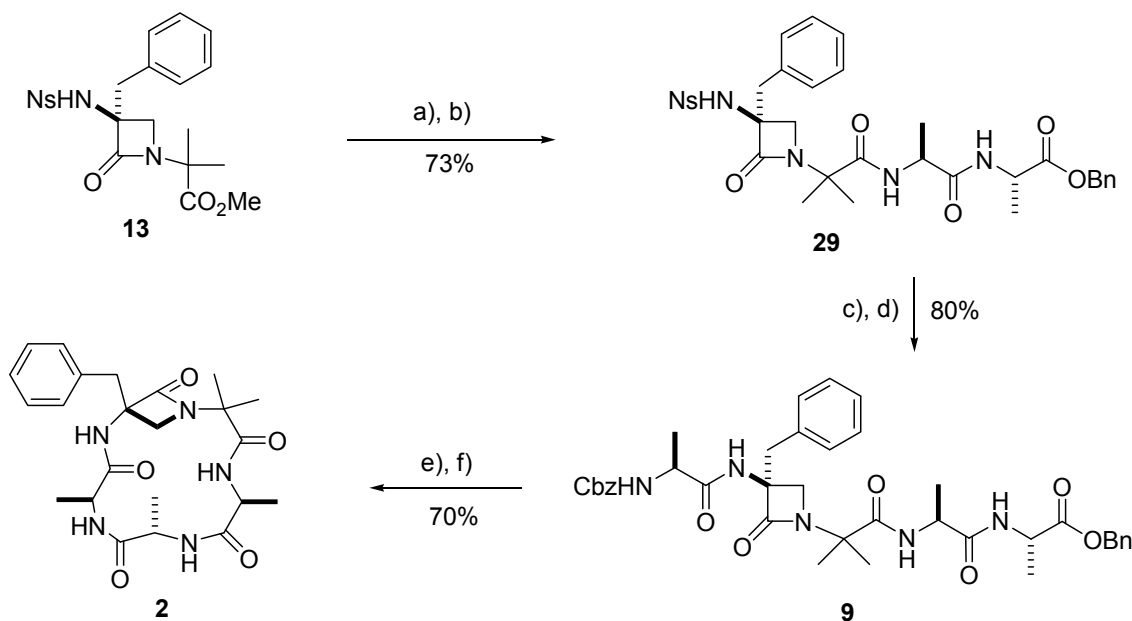
IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3290, 1753, 1671, 1545, 1185
----------------------------	------------------------------

HPLC-MS	MS1: 386.1(M <sup>+</sup> -1)
Fuente ESI	MS2(386.1): 198.8(188.6), 271.9(115.5), 342.0(45.4)
Pol. positiva	MS3(271.9): 187.8(84.1), 226.8(45.1), 244.8(27.1)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) DMSO <sub>d6</sub>	<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) DMSO <sub>d6</sub>
8.68 (sa, 1H) NH(Gly3) 8.07 (s, 1H) NH(β-Lactam) 7.91 (sa, 1H) NH(Gly2) 7.84 (sa, 1H) NH(Gly4) 7.30-7.21 (m, 5H) Ar 4.21 (d, 1H, J=15.8Hz) Gly1 3.98 (d, 1H, J=14.6Hz) Gly2 3.93 (d, 1H, J=15.2Hz) Gly4 3.59 (s, 2H) Gly3 3.51 (d, 1H, J=15.2Hz) Gly4 3.44 (d, 1H, J=14.6Hz) Gly2 3.33 (m, 3H) CH <sub>γ</sub> -(β-Lactam), CHβ-(β-Lactam) 3.23 (d, 2H, J=13.9Hz) CH <sub>γ</sub> -(β-Lactam) 3.17 (d, 1H, J=15.8Hz) Gly1	

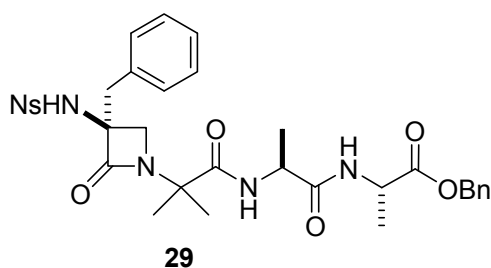
**Comentarios:** La baja solubilidad del compuesto impidió obtener un espectro interpretable de <sup>13</sup>C-NMR.

#### 4.3.2. Síntesis del ciclopentapéptido *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>3</sub>] 2:



**Esquema 4.2:** a) LiOH·H<sub>2</sub>O (10eq), THF/H<sub>2</sub>O, 0°C → t.a., 1h; b) H-Ala-Ala-OBn **28** (1.2eq), EEDQ (2.0eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a., 16h; c) PhSH (2eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1eq), MeCN, t.a., 1.5 h d) Cbz-Ala-OH (1.1eq), HOBT (1.2eq), Et<sub>3</sub>N (5eq), EDC·HCl (2.0eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a., 16h; e) Pd/C (20%), MeOH, t.a., 5h; f) HATU (1.3 eq), HOAt (1.6eq), KHCO<sub>3</sub> (10eq), 24h

##### 4.3.2.1. Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn **29**:



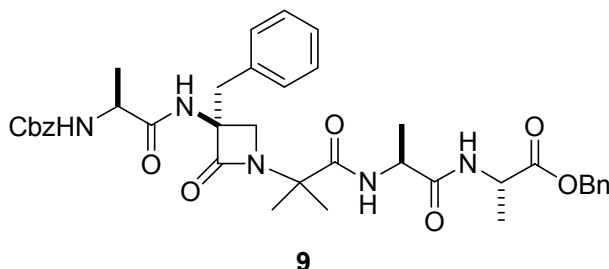
a) Saponificación del grupo CO<sub>2</sub>Me: Sobre una disolución de Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-OMe **13** (2.3 g, 5.0 mmol) en THF (70 mL) enfriada a 0°C se añadió una disolución de LiOH·H<sub>2</sub>O (2.1 g, 49.4 mmol) en H<sub>2</sub>O (8 mL). La disolución se agitó a temperatura ambiente

durante 1.5 h. Tras comprobar que la reacción ya había finalizado (TLC Hexano/EtOAc (1:1)) el producto se extrajo con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y la fase acuosa se acidificó con HCl 0.1M. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 X 50 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida. Rendimiento: 1.94 g (86%).

b) Acoplamiento peptídico: En un matraz secado a la llama bajo atmósfera de nitrógeno se vertió una disolución del ácido Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-OH (1.94 g, 4.3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). La disolución se enfrió a -10°C y se añadieron

consecutivamente la amina H-(Ala)<sub>2</sub>-OBn (1.41 g, 5.6 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (2.13 g, 8.6 mmol). La disolución se agitó a -10°C durante 30 min y seguidamente a temperatura ambiente durante 20h. Transcurrido este tiempo se lavó la mezcla sucesivamente con una disolución 1 M de HCl (2 X 10 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex. 5/1). Rendimiento: 190 mg (60%). Sólido amarillento.

#### 4.3.2.2. Síntesis de Cbz-Ala- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn 9:

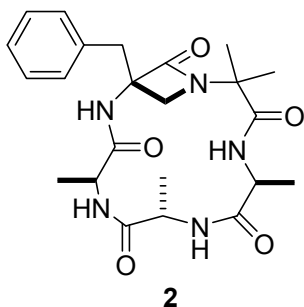


*b) Preparación de H- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn:* Sobre una mezcla de Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn **29** (290 mg, 0.47 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (15 mL), se añadieron a temperatura ambiente tiofenol (0.2 mL, 1.97 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (260 mg, 1.89 mmol). La

mezcla se agitó a la misma temperatura hasta que la reacción terminó (entre 1-3 h, seguimiento por TLC y <sup>1</sup>H NMR). Después se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en exceso (2-3 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min, y se filtró sobre celita a vacío. El filtrado se evaporó a presión reducida obteniéndose el intermedio H- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn que se utilizó en el siguiente paso sin purificar.

*c) Acoplamiento peptídico:* La amina anteriormente preparada ( $\approx$  0.47 mmol) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) seco y se enfrió a 0°C con un baño de agua-hielo. A la disolución se le añadió Cbz-Gly-OH (98 mg, 0.47 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.33 mL, 2.35 mmol), HOBt (76 mg, 0.56 mmol) y finalmente EDC·HCl (180 mg, 0.94 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16h dejándola templar suavemente hasta temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se lavó consecutivamente con una disolución acuosa de HCl 0.1M (2 X 20 mL), disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando EtOAc como eluyente. Rendimiento: 230 mg (80%). Sólido incoloro.

#### 4.3.2.3. Síntesis de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>3</sub>] **2**:

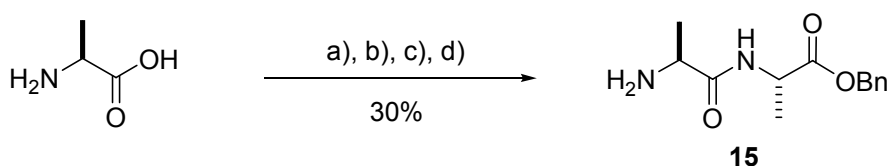


d) Hidrogenólisis: Se agitó una suspensión de Cbz-Ala- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn **9** (266 mg, 0.38 mmol) y Pd (10%) sobre carbono (33 mg) en metanol (20 mL) bajo presión atmosférica de H<sub>2</sub> durante 5h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN (MeOH-d<sub>4</sub>) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla a través de celita, lavando la misma con metanol y el

filtrado se evaporó a presión reducida.

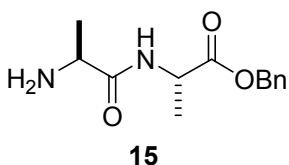
e) Ciclación: El crudo así obtenido se disolvió en DMF (80 mL) previamente desgasificada por borboteo de N<sub>2</sub> y se enfrió a -15°C en un criogénador. Manteniendo la agitación se añadieron consecutivamente KHCO<sub>3</sub> (380 mg, 3.8 mmol), HOAt (67.2 mg, 0.49 mmol) y HATU (216.7 mg, 0.57 mmol). Al cabo de 24h de agitación a -15°C la mezcla se evaporó en un rotavapor a presión reducida sin calentar el baño y sin dejar que se secase completamente. El residuo obtenido se diluyó con MeOH y se filtró a vacío. El filtrado se evaporó y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa MeCN/H<sub>2</sub>O/TFA (90/10/0.1). Rendimiento: 121 mg (70%). Aceite.

#### 4.3.3. Preparación del tosilato del precursor C-prottegido H-Ala-Ala-OBn **15**:



**Esquema 4.4:** a) TosOH·H<sub>2</sub>O (1.02eq), BnOH/Tolueno, reflujo, 16h; b) NaHCO<sub>3</sub>, EtOAc; c) Boc-Ala-OH (1eq), EEDQ (2.0eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15°C → t.a. 8h; d) HCO<sub>2</sub>H (5.6mL/mmol), t.a., 3h.

a) Preparación del tosilato de H-Ala-OBn: Sobre una disolución de (L)-alanina (8.9 g,



100 mmol) en tolueno/BnOH (60 mL/50 mL), se añadió el ácido *p*-toluensulfónico (TosOH·H<sub>2</sub>O, 22.8 g, 120 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a reflujo con eliminación azeotrópica de agua durante 5h. Después la disolución se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. El sólido



obtenido se precipitó con éter dietílico y se recrystalizó con una mezcla de EtOH/Et<sub>2</sub>O. Finalmente, el sólido se secó a vacío obteniéndose el tosilato del éster bencílico de la glicina con un rendimiento del 60%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.25 (sa., 3H, NH<sub>3</sub>), 7.74 (d, 2H, J=7.7 Hz, Ar), 7.30-7.22 (m, 5H, Ar), 7.06 (d, 2H, J=7.7 Hz, Ar), 5.03 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1H, H(Ala)), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.43 (d, 3H, J=1.4 Hz, CH<sub>3</sub>(Ala)).

*b) Acoplamiento peptídico con Boc-Ala-OH:* El tosilato obtenido en la etapa precedente (3.73 g, 20 mmol) se disolvió en EtOAc (20 mL) y se basificó lentamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta pH $\approx$ 9. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 X 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó, obteniéndose el éster bencílico de la (L)-alanina como un aceite incoloro con un rendimiento del 95%. El aminoéster así obtenido (3.78 g, 20 mmol) se disolvió bajo atmósfera de nitrógeno en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro y la disolución se enfrió a -15°C. Se añadieron bajo atmósfera de nitrógeno la Boc-Ala-OH (3.73 g, 20 mmol) y etoxicarbonildihidroquinolina ó EEDQ (9.9 g, 40 mmol), y la mezcla se agitó durante 8h dejando subir lentamente la temperatura. La disolución obtenida se lavó consecutivamente con HCl 1M (2 X 25 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 X 25 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 X 20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó obteniéndose el dipéptido Boc-Ala-Ala-OBn como un sólido blanco que no se purificó para su uso en la siguiente etapa. Rendimiento: 80%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.35 (s, 5H, Ar), 7.22 (sa, 1H, NH), 7.13 (sa, 1H, NH); 5.18 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.62 (m, 1H, H(Ala)), 4.33 (m, 1H, H(Ala)), 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.40-1.33 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>(Ala)).

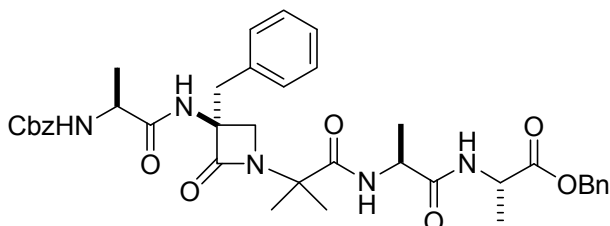
*c) Desprotección del grupo Boc:* El dipéptido Boc-Ala-Ala-OBn (3.5 g, 10 mmol) se disolvió bajo atmósfera de nitrógeno en ácido fórmico del 97% (HCO<sub>2</sub>H, 56 mL, 31 mmol). La disolución se agitó durante 3h a temperatura ambiente siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina (eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/10). Una vez terminada la misma, la disolución se evaporó hasta sequedad obteniéndose H-Ala-Ala-OBn como un líquido incoloro. Rendimiento: 75%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, MeOH<sub>d4</sub>)  $\delta$  = 7.35 (s, 5H, Ar), 5.12 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.53 (m, 1H, H(Ala)), 4.26 (m, 1H, H(Ala)), 3.39 (s, 2H, Gly1), 1.48 (d, 3H, J= 1.5 Hz, CH<sub>3</sub>(Ala)), 1.39 (d, 3H, J= 1.5 Hz, CH<sub>3</sub>(Ala)).

#### 4.3.4. Síntesis del precursor H-Aib-OMe **19** a partir del ácido $\alpha$ -aminoisobutírico<sup>83</sup>:

Tras gotear lentamente cloruro de tionilo (29.2 mL, 400 mmol) sobre MeOH (400 mL) enfriado a 0°C, se añadió el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (20.6 g, 200 mmol). La mezcla se agitó durante 16h dejándola templar lentamente a temperatura ambiente. Después, la disolución se evaporó a presión reducida. El sólido blanco obtenido se suspendió en éter dietílico (75 mL), se filtró y se secó a vacío obteniéndose el clorhidrato de HCl·H-Aib-OMe con un rendimiento del 95%. El clorhidrato (9.2 g, 60 mmol) así obtenido se suspendió en MeCN anhidro (50 mL) y se añadió KHCO<sub>3</sub> hasta pH básico. La mezcla se filtró y se evaporó a presión reducida sin calentamiento obteniéndose el aminoéster libre H<sub>2</sub>N-CMe<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Me **19** (5.2 g, 45 mmol) como un aceite incoloro. Rendimiento: 75%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 3.29 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.10 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>).

<sup>83</sup> (a) Dubnisson, C.; Fukunato, Y.; Hegedus, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 13, 3697-3704. (b) Gilbertson, S. R.; Chen, G.; Kao, J.; Beatty, A.; Campana, Ch. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5557-5566.



**Cbz-Ala-β-Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>2</sub>-OBn**

Referencia N°

**9**

P.M. (g/mol)

699.79

Punto Fusión (°C)

74-76

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-86.4

Fórmula  
Empírica**C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 65.22

H 6.48

N 10.01

C 59.61

H 5.73

N 9.05

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3297, 3053, 2988, 2913;1734;1667,1546;1452; 1381; 1245; 1207; 1056;  
850; 738; 698

HPLC-MS

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 722.3(M<sup>+</sup>+Na); 700.4(M<sup>+</sup>+1)

MS2(700.3): 493.2(100); 521.2(79); 592.3(47); 422.2(14)

MS3(493.2): 288.0(100); 422.1(62); 335.2(37); 378.3(36); 353.2(28)

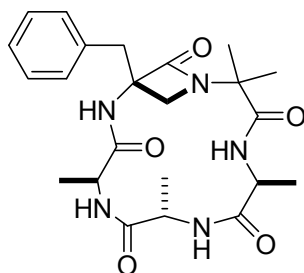
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.45(d., 1H, J=7.9Hz) NH(Ala3)  
 7.36-7.31(m, 10H) Ar  
 7.28(m., 1H) NH(Ala4)  
 6.99(sa, 1H) NH(β-Lactam)  
 5.43(sa, 1H) NH(Ala1)  
 5.15(m, 4H) 2XOCH<sub>2</sub>Ph  
 4.52(m, 2H) CHAla3, CHAla4  
 4.26(m, 1H) CHAla1  
 3.71(d, 1H, J=6.0Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.43(sa, 1H, J=6.0Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.11(d, 1H, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 2.97(d, 1H, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 1.46(d, 3H, J=7.3Hz) CH<sub>3</sub>Ala3  
 1.40(d, 3H, J=7.2Hz) CH<sub>3</sub>Ala4  
 1.34(d, 3H, J=7.1Hz) CH<sub>3</sub>Ala1  
 1.25(s, 3H) CH<sub>3</sub>(Aib)  
 1.09(s, 3H) CH<sub>3</sub>(Aib)

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

173.8	67.2
173.6	66.2
173.4	59.5
173.0	50.9
168.1	50.1
156.7	48.9
136.5	48.2
136.1	38.6
133.5	24.3
130.9	24.0
129.0	17.8
129.0	17.7
128.9	
128.6	
128.5	
128.4	
128.3	
128.1	
67.6	

Comentarios:

**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-(Ala)<sub>3</sub>]**Referencia N°  
**2**

P.M. (g/mol)

457.52

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.5, MeOH)

-85.1

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	<b>C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub></b>					
	C 55.81	H 5.46	N 18.08	C 56.08	H 6.00	N 17.85

IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3301, 3045, 2995, 1734,1546;1452; 1381
----------------------------	--

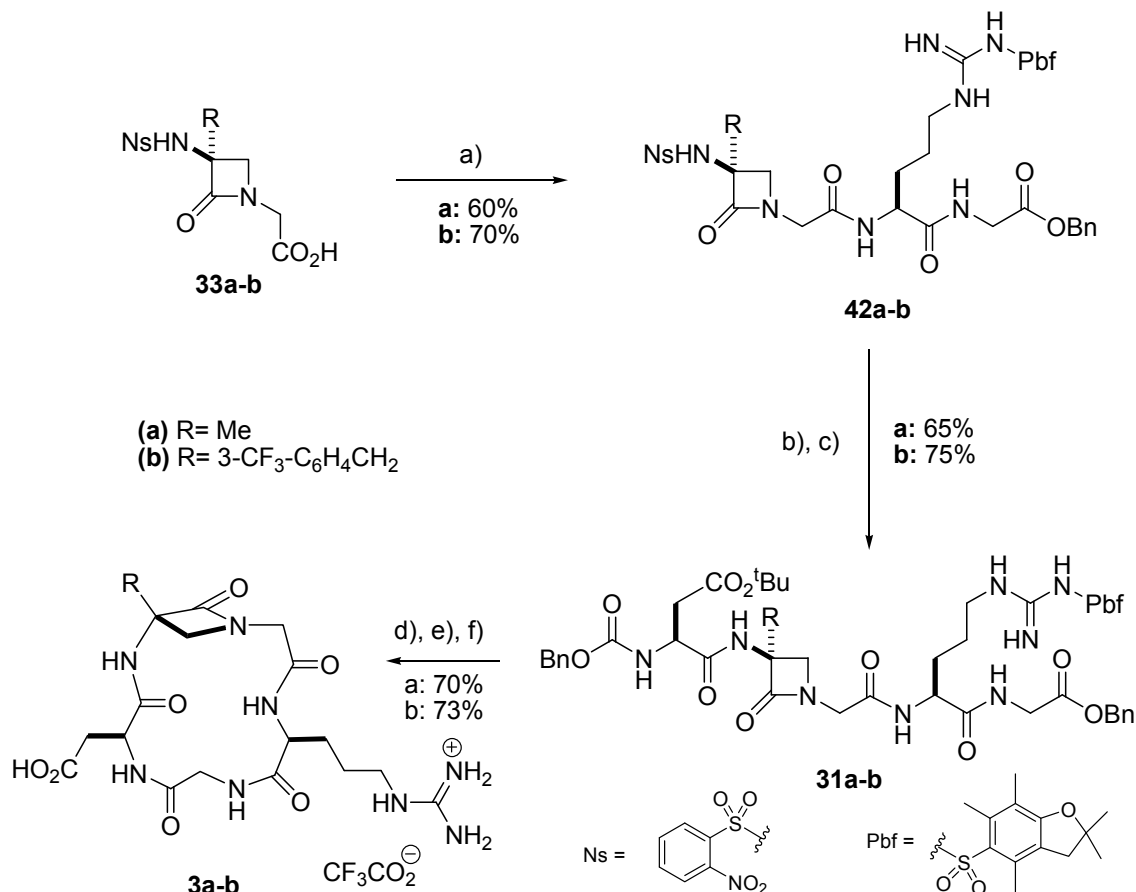
MS m/z	MS1: 456.2(M <sup>+</sup> -1)
Fuente ESI	MS2(456): 254.9(100); 236.9(31); 331.0(28); 199.8(16)
Pol. negativa	MS3(254.9): 236.8(100)
	MS4(236.8): 122.8(100); 165.8(84); 112.8(42)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) DMSO <sub>d6</sub> 340K	<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) MeOH <sub>d4</sub> 300K	
8.06 (s, 1H) NH(β-Lactam)	174.9	15.4
7.82 (m, 2H) NH(Ala4), NH(Ala3)	174.4	15.3
7.71 (d, 1H, J=7.6 Hz) NH(Ala2)	173.3	14.9
7.33-7.22 (m, 5H) Ar	167.4	
4.23 (m, 1H) HAla4	134.2	
4.18 (m, 1H) HAla2	130.7	
4.14 (m, 1H) HAla3	128.0	
3.70 (d, 1H, J=5.5Hz) CHβ-(β-Lactam)	126.9	
3.29 (d, 1H, J=5.5Hz) CHβ-(β-Lactam)	66.8	
3.20 (d, 1H, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)	58.9	
3.04 (d, 2H, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)	51.8	
1.28 (d, 3H) CH <sub>3</sub> Ala3	50.3	
1.27 (d, 3H) CH <sub>3</sub> Ala2	49.6	
1.24 (d, 3H) CH <sub>3</sub> Ala4	36.8	
1.18 (s., 3H) CH <sub>3</sub> (Aib)	27.3	
1.00 (s, 3H) CH <sub>3</sub> (Aib)	22.3	
	22.2	

Comentarios:

#### 4.4. Síntesis de ciclopeptidomiméticos de tipo RGD a partir de $\beta$ -lactamas $\alpha$ -sustituídas:

##### 4.4.1. Compuestos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam(R)-Gly] 3a-b:



**Esquema 4.3:** a) *H*-Arg(Pbf)-Gly-OBn **40** (1.1eq), *H*OBt (1.1eq), Et<sub>3</sub>N (5eq), EDC·HCl (1.5eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a. 16h; b) PhSH (2eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1eq), MeCN, t.a., 1.5h; b) Cbz-Asp(OtBu)-F **49** (1.5eq), NMM (3eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → t.a. 16h; c) Pd/C (10%), 1atm.H<sub>2</sub>, MeOH, t.a., 5h; d) HATU (1.2eq), HOAt (1.4eq), KHCO<sub>3</sub> (10eq), DMF, -10°C, 24h; g) F<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H, 35°C, 1h; luego recristalización en *i*Pr<sub>2</sub>O.

##### 4.4.1.1. Procedimiento general para la síntesis de ácidos Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-OH 3a-b:

Sobre una disolución del correspondiente alcohol  $\beta$ -lactámico Ns- $\beta$ -Lactam(R)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH **47a-b** (197 mg, **47a** y 284 mg **47b**, 0.60 mmol) en acetona (15 y 18 mL respectivamente) se añadió a temperatura ambiente una disolución del reactivo de Jones (0.5 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1h observando la desaparición del alcohol por TLC (EtOAc/Hex 1/1). Tras comprobar por análisis de

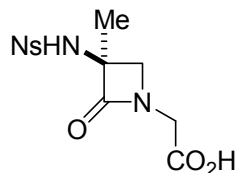
RMN de una alícuota la desaparición total del alcohol de partida, se añadió  $i$ PrOH (35 mL) formándose un precipitado de color verde que se disolvió en agua (25 mL) y se extrajo el producto con EtOAc (3 X 25 mL). La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex 5/1) Rendimientos: 156 mg **33a** y 205 mg **33b** (60 y 70 % respectivamente).

**Reactivo de Jones:**

Se disuelven 6.7 g de  $CrO_3$  en 12.5 mL de  $H_2O$  y se añaden con cuidado 5.8 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, las sales que precipitan se disuelven en una cantidad mínima de agua de forma que el volumen total de la disolución resultante no sobrepase los 22.5 mL<sup>84</sup>.

---

<sup>84</sup> Paquette L. A., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, 126.

**Ns-β-Lactam(Me)-Gly-OH**Referencia N°  
**33a**M.W (g/mol)  
343.31Punto Fusión (°C)  
149-151
 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.0, MeOH )  
+25.4°

Fórmula Empírica  <b>C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S</b>	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 41.98	H 3.82	N 12.24	C 43.41	H 4.26	N 11.28

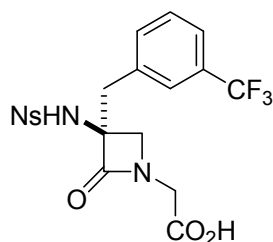
IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	2934, 2860, 1748, 1708, 1546, 1458, 1168, 822
----------------------------	---

MS m/z Fuente ESI Pol.negativa	MS1:341(M <sup>+</sup> -2) MS2(341): 283(58); 239(102); 207(134); 169(172); 139(202)
--------------------------------------	---

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) MeOH <sub>d</sub> <sub>4</sub>	<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) MeOH <sub>d</sub> <sub>4</sub>
8.21-8.18 (m, 1H) Ar. Ns	170.8
7.86-7.83 (m, 3H) Ar. Ns	169.9
4.13 (d, 1H J= 18.3 Hz) NCH <sub>2</sub> CO	148.9
3.87 (d, 1H, J= 18.3 Hz) NCH <sub>2</sub> CO	135.9
3.76 (d, 1H, J=5.5Hz) CHβ-(β-Lactam)	134.8
3.43 (d, 1H, J=5.5Hz) CHβ-(β-Lactam)	133.3
1.59 (s, 3H) CH <sub>3</sub>	131.3
	125.6
	67.7
	56.4
	43.2
	20.9

Comentarios:



**Ns-β-Lactam(3-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)-Gly-OH**Referencia N°  
**33b**

M.W (g/mol)

487.41

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.2, MeOH )

+36.1°

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	<b>C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S</b>					
	C 46.82	H 3.31	N 8.62	C 47.01	H 2.95	N 8.66

IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	2922, 2860, 1742, 1702, 1650, 1540, 1464, 1342, 1174, 1134, 822
----------------------------	---

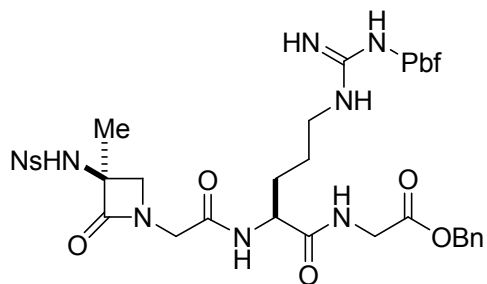
MS m/z	MS1: 486.2(M <sup>+</sup> -1)
FuenteESI	MS2(486.2): 338.9(147.3); 283.9(202.3); 239.9(246.3); 200.9(39)
Pol. negativa	MS3(239.9): 224.9(15); 182.8(57.1)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>	<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) MeOH <sub>d</sub> <sub>4</sub>	
8.17 (d, 1H, J=7.4Hz) Ar. Ns	170.6	71.5
7.89 (d, 1H, J=7.5Hz) Ar. Ns	168.2	54.4
7.77-7.75 (m. 2H) Ar. Ns	148.7	43.2
7.28 (s, 4H) Ar	135.1	40.7
5.94 (s, 1H) NH(β-Lactam)	134.8	
4.15 (d, 1H, J= 18.3 Hz) NCH <sub>2</sub> CO	134.5	
3.94 (d, 1H, J= 18.3 Hz) NCH <sub>2</sub> CO	134.2	
3.90 (d, 1H, J=3.9Hz) CHβ-(β-Lactam)	133.8	
3.72 (d, 1H, J=3.9Hz) CHβ-(β-Lactam)	133.5	
3.24 (s, 2H) 3-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	130.8	
	129.8	
	127.9	
	126.5	
	125.7	
	124.7	

Comentarios:

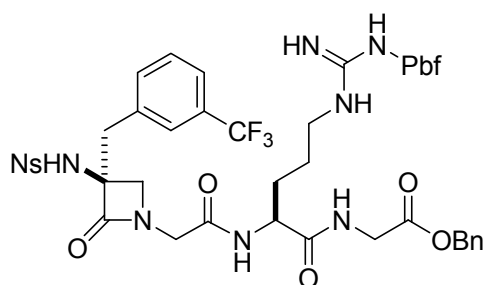
#### 4.4.1.2. Procedimiento general para la síntesis de Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 42a-b:

a) Acoplamiento peptídico: En un matraz previamente secado a la llama bajo atmósfera de nitrógeno se vertió una disolución del correspondiente ácido Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-OH (601 mg **33a**, 853 mg **33b**, 1.75 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). La disolución se enfrió a 0°C y se añadieron consecutivamente la amina H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (1.00 g, 1.75 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) y Et<sub>3</sub>N (0.49 mL, 3.5 mmol), HOBt (331 mg, 2.45 mmol) y EDC·HCl (537 mg, 2.80 mmol). La mezcla se agitó durante 16h dejando que la temperatura del baño subiera lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, la disolución se lavó consecutivamente con HCl 1M (2 X 25 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 X 25 mL). Finalmente la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/20). Rendimientos: 1.02 g **42a**, 1.19 g **42b**, (65% 70% respectivamente).



+12.3°

Comentarios:

**Ns-β-Lactam(3-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn**Referencia N°  
**42b**M.W (g/mol)  
1043.10Punto Fusión (°C)  
aceite[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> (c= 1.2, MeOH )  
+2.4°

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
<b>C<sub>47</sub>H<sub>53</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub></b>	C 54.12	H 5.12	N 10.74	C 52.38	H 5.48	N 9.88

IR(cm <sup>-1</sup> ,KBr)	3336, 2974, 2934, 1754, 1652, 1542, 1456, 1170, 1126
---------------------------	--

MS m/z	MS1: 1041.3(M*-2)
Fuente ESI	MS2(1041.3): 1024.2(17.1); 747.2(294.1); 582.1(459.2); 293(748.3)
Pol. positiva	MS3(1024.2): 1006.1(18.1); 916.1(108.1); 428.0(596.2)
	MS4(916.1): 701.4(214.7); 428.0(488.1)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>		<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>		
8.21 (d, 1H, J=6.8Hz) Ar.Ns	3.23 (m, 2H) HδArg	172.5	128.5	19.4
7.78 (d, 1H, J=6.8Hz) Ar.Ns	2.95 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf	169.9	128.2	18.1
7.68-7.61 (m, 2H) Ar.Ns	2.58 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf	167.7	126.9	12.6
7.54 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.51 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf	166.8	125.1	
7.46 (sa, 1H) NHGly	2.09 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf	158.9	124.8	
7.46-7.43 (m, 2H) Ar	2.03 (m, 1H) HβArg	156.6	117.7	
7.35 (sa, 1H) NHArg	1.83 (m, 1H) HβArg	147.0	86.6	
7.38-7.27 (m, 7H) Ar	1.62 (m, 2H) HδArg	138.4	70.9	
6.50-6.22 (sa, 2H) NHPbf	1.46 (s, 6H) 2x CH <sub>3</sub> Pbf	135.3	67.1	
5.13 (s, 2H) OCH <sub>2</sub> Ph		134.9	55.2	
4.61 (m, 1H) HαArg		134.5	53.6	
4.22 (d, 1H, J=17.1Hz) Gly1		133.9	53.1	
4.06 (2dd, 2H, J <sub>1</sub> =4.9, J <sub>2</sub> =17.6Hz) Gly2		133.8	43.2	
3.90 (d, 1H, J=5.9Hz) CHβ-(β-Lactam)		133.4	41.4	
3.57 (d, 1H, J=17.1Hz) Gly1		132.8	40.1	
3.52 (d, 1H, J=5.9Hz) CHβ-(β-Lactam)		132.3	29.8	
3.32 (m, 2H) CHγ-(β-Lactam)		131.2	29.2	
		130.8	28.6	
		129.1	28.4	
		128.6	25.7	

Comentarios:

#### 4.4.1.3. Procedimiento general para la síntesis de Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 31a-b:

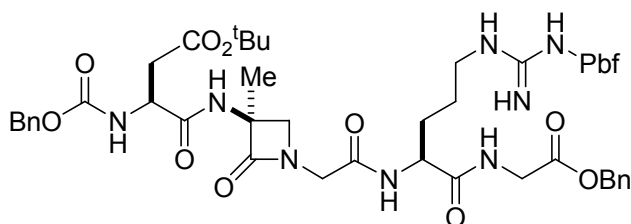
a) Formación del fluoruro de ácido<sup>85</sup>: Se enfrió a  $-20^{\circ}\text{C}$  y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , una disolución de Cbz-Asp(OtBu)-OH (400.1 mg, 1.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (10 mL). Se añadió piridina anhidra (0.12 mL, 1.5 mmol) y seguidamente se goteó fluoruro de cianurilo (1.01 g, 7.50 mmol) sobre la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante 1.5 h a dicha temperatura y se vertió sobre agua y hielo. Se decantó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 X 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose así el producto **40** (0.52 g, 100%) que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.37 (m, 5H, Ar); 5.76 (d, 1H,  $J = 10.4$  Hz, NH); 5.16 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 4.84 (m, 1H, Gly); 3.01 (dd, 1H,  $J = 4.4, 17.6$  Hz, Asp $\beta$ ); 2.79 (dd, 1H,  $J = 3.9, 4.6, 17.6, 16.9$  Hz, Asp $\beta$ ); 1.45 (s, 9H, O<sup>t</sup>Bu).

b) Preparación de la amina libre: Sobre una mezcla de la correspondiente Ns- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH **42a-b** (1.0 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (20 mL), se añadieron a temperatura ambiente tiofenol (0.20 mL, 2.0 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (138 mg, 1.0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción terminó (entre 1-3 h, seguimiento por TLC y  $^1\text{H}$  NMR). Después se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en exceso y la mezcla se agitó a temperatura ambiente 15 min tras los cuales se filtró a vacío sobre celita. Finalmente el filtrado se evaporó en un rotavapor obteniéndose el intermedio H- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH correspondiente que se utilizó en el siguiente paso sin purificar.

d) Acoplamiento peptídico: Sobre una disolución de la correspondiente H- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn (1 mmol) y N-metilmorfolina recientemente destilada (303 mg, 3 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (50 mL), se goteó a  $0^{\circ}\text{C}$  una disolución de Cbz-Asp(OtBu)-F **40** (0.52 g, 1.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (10 mL). La reacción se agitó durante 16h dejando que alcanzara lentamente la temperatura ambiente. Una vez terminada, se lavó consecutivamente con HCl (0.1M) (2 X 20 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 X 20mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de Hexano/EtOAc (1:7). Rendimiento: 0.56 g **31a**, 0.64 g **31b**, (65% y 75% respectivamente).

<sup>85</sup> Carpino, A., Manssur, E.-S. M. E., Sadat-Aalae, D. J. *Org. Chem.*, **1991**, 56, 2611-2614.

**Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(Me)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn**



Referencia N°  
**31a**

P. M. (g/mol)  
1019.17

Punto Fusión (°C)  
133-135

$[\alpha]_D^{25}$  (c=1.6, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
-49.1°

Fórmula Empírica  <b>C<sub>50</sub>H<sub>66</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S</b>	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 58.92	H 6.53	N 10.99	C 58.29	H 6.55	N 10.85

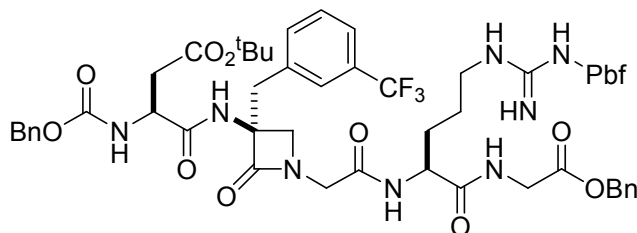
IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3294, 3074, 2970, 2934, 1776, 1745, 1632, 1550, 1100, 1054, 822
----------------------------	---

MS m/z	MS1: 1019.4 (M*)
Fuente ESI	MS2(1019.4): 963.4(56); 693.3(326.1)
Pol. positiva	MS3(963.4): 855.4(108); 693.3(270.1); 665.4(298)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>		<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>	
8.60 (sa, 1H) NHArg	2.62 (m, 1H) HβAsp	172.0	81.6
7.39 (sa, 1H) NHGly2	2.58 (s, 3H) MePbf	171.7	67.0
7.36-7.30 (m, 10H) Ar	2.53 (s, 3H) MePbf	169.8	66.8
6.98 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.09 (s, 3H) MePbf	169.8	64.8
6.46 (d, 1H, J=8.7Hz) NHAsp	2.06 (m, 1H) HβArg	169.4	54.0
6.06 (sa, 2H) NH(Argω)	1.83 (m, 1H) HβArg	167.8	53.3
5.16-4.98 (m, 4H,) 2XOCH <sub>2</sub> Ph	1.62 (m, 2H) HδArg	158.4	52.9
4.60 (m, 2H) HαArg, HαAsp	1.54 (s, 3H) CH <sub>3</sub>	156.2	51.1
4.28 (m, 2H) Gly1, Gly2	1.46 (s, 6H) 2xCH <sub>3</sub> Pbf	156.1	45.5
3.98 (d, 1H, J=4.8Hz)	1.41 (s, 9H) O <sup>t</sup> Bu	138.0	43.0
CHβ-(β-Lactam)		135.8	40.9
3.72 (m, 1H) Gly2		134.9	36.9
3.71 (d, 1H, J=17.7Hz) Gly1		132.9	28.7
3.40 (d, 1H, J=4.8Hz)		132.0	28.3
CHβ-(β-Lactam)		128.3	28.1
3.28-3.17 (m, 2H) HδArg		128.1	27.7
2.94 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf		128.0	25.4
2.90 (dd, 1H, J=8.7, 16.7 Hz)		127.7	19.6
HβAsp		124.3	19.0
		117.1	17.7
		86.1	12.2

Comentarios:

**Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(3-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn**



Referencia N°  
**31b**

M.W (g/mol)

1163.26

Punto Fusión (°C)

aceite

(c= 0.6, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

-45.1°

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 58.85	H 5.98	N 9.63	C 58.15	H 6.21	N 9.71

IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3447, 3334, 3053, 1734, 1664, 1541, 1461, 1329, 1259, 1174, 1122, 735
----------------------------	---

HPLC-MS	MS1: 1163.4 (M <sup>+</sup> +1)
Fuente ESI	MS1 (1163.4): 1107.4(56); 837.3(326.1)
Pol. negativa	MS2 (837.0): 819.4(17.6); 793.6(43.4); 778.4(58.6); 625.3(211.7);

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>		<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) CDCl <sub>3</sub>		
8.40 (sa, 1H) NHArg		172.2	126.7	25.4
7.56 (sa, 1H) NHGly2	2.84 (dd, 1H, J=8.5, 16.6 Hz) HβAsp	172.1	124.6	19.2
7.32-7.26 (m, 10H) Ar	2.61 (m, 1H) HβAsp	170.2	124.5	17.9
7.48 (d, 1H, J=8.7Hz) NHAsp	2.58 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf	168.5	117.4	12.4
7.16 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.51 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf	167.6	86.3	
6.06 (sa, 2H) NH(Argω)	2.09 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf	158.7	82.2	
5.14-5.02 (m, 4H) 2XOCH <sub>2</sub> Ph	2.00 (1H, m) HβArg	156.8	68.3	
4.60 (m, 1H) HαArg	1.81 (1H, m) HβArg	156.1	67.3	
4.51 (m, 2H) HαAsp	1.61 (2H, m) HδArg	138.3	67.2	
4.28 (d, 1H, J=18.1Hz) Gly2	1.46 (6H, s) 2xCH <sub>3</sub> Pbf	136.0	52.9	
4.14 (m, 1H) Gly1	1.38 (9H, s) O <sup>t</sup> Bu	134.4	52.0	
3.94 (d, 1H, J=4.9Hz) CHβ-(β-Lactam)		133.3	51.0	
3.79 (m, 1H) CHGly2		132.3	45.7	
3.55 (d, 1H, J=18.1Hz) CHGly1		129.3	43.2	
3.50 (d, 1H, J=4.9Hz) CHβ-(β-Lactam)		129.2	41.2	
3.20-3.11 (m, 2H) HδArg		128.6	40.6	
3.20 (d, 2H, J=14.4Hz) CHγ-(β-Lactam)		128.6	38.7	
3.11 (d, 2H, J=14.4Hz) CHγ-(β-Lactam)		128.4	36.4	
2.94 (s, 2H,) CH <sub>2</sub> Pbf		128.3	28.6	
		128.3	27.9	
		128.2	29.7	
		127.9	28.8	

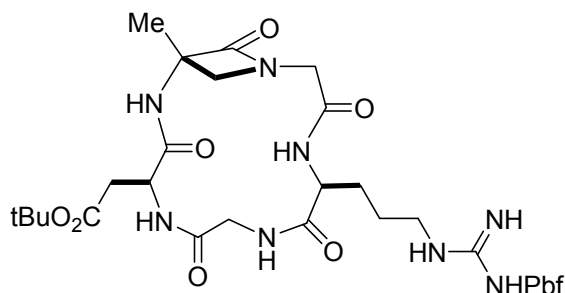
Comentarios:

**4.4.1.4. Síntesis de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] 44a-b:**

d) *Hidrogenólisis*: Se agitó una suspensión de la correspondiente Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **31a-b** (0.30 mmol) y Pd al 10% sobre carbono (60 mg) en metanol (20 mL) bajo presión atmosférica de H<sub>2</sub> durante 5h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN (MeOH<sub>d4</sub>) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla a través de celita, lavando la misma con metanol y se evaporó el disolvente a presión reducida.

e) *Ciclación*: El crudo así obtenido se disolvió en DMF anhidro grado biotech (200 mL) y se enfrió a -10°C en un criogénador. Se añadieron consecutivamente KHCO<sub>3</sub> (0.30 mg, 3.0 mmol), HOAT (65 mg, 0.48 mmol) y HATU (148 mg, 0.39 mmol). La mezcla se agitó a -10°C y siguiéndose el avance de la reacción por RMN. Al cabo de 24h la mezcla se evaporó a presión reducida sin calentar el baño y sin dejar que se secase completamente. El residuo obtenido se diluyó en EtOAc (40 mL) y se lavó consecutivamente con agua destilada (1 X 15 mL), HCl (0.1M) (2 X 20 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa (eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/15). Rendimientos: 163 mg **44a**, 193 mg **44b** (62% y 67% respectivamente). Aceite incoloro.



**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Me)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)]**Referencia N°  
**44a**P. M. (g/mol)  
776.90Punto Fusión (°C)  
aceite $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.5, MeOH)  
-16.9°

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 54.11	H 6.75	N 14.42	C 51.48	H 6.79	N 13.73

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3437, 3321, 3059, 2975, 2930, 1757, 1669, 1550, 1456, 1408,  
1369, 1254, 1155, 1107

MS m/z

MS1: 775.4(M<sup>+</sup>-1)

Fuente ESI

MS2(775.4): 701.4(74); 293.0(482.4)

Pol. negativa

MS3(701.4): 658.2(43.2); 407.1(294.3); 364.1(337.3); 293.0(408.4)

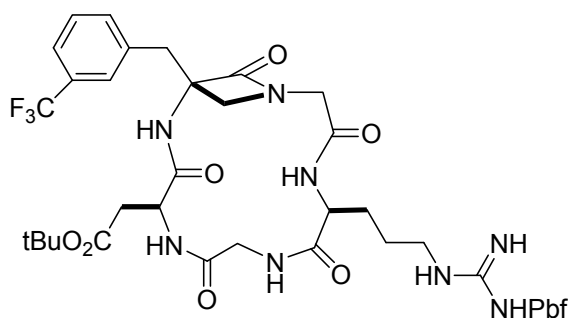
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.72 (sa, 1H) NHGly2	2.47 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
8.36 (s, 1H) NH(β-lactam)	2.42 (sa, 4H) CH <sub>3</sub> Pbf,
8.26 (s, 1H) NHAsp	HβAsp
8.24 (s, 1H) NHArg	2.00 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
6.64 (sa, 3H) NH(Argω)	1.58 (m, 1H) H <sub>γ</sub> Arg
4.49 (m, 1H) H <sub>α</sub> Asp	1.49 (m, 1H) H <sub>γ</sub> Arg
4.22 (m, 1H) H <sub>α</sub> Arg	1.48-1.46 (m, 2H)HβArg
3.94 (dd, 1H, J= 6.6, 14.7Hz)	1.44 (s, 3H) CH <sub>3</sub>
H <sub>α</sub> Gly2	1.41 (s, 3H) 2x CH <sub>3</sub> Pbf
3.87 (d, 1H, J=14.1Hz) Gly1	1.36 (s, 9H) O <sup>t</sup> Bu
3.45 (d, 1H, J=14.1Hz) Gly1	
3.40 (d, 1H, J=5.9Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.30 (d, 1H, J=5.9Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.19 (dd, 1H, J=5.5, 14.7Hz)Gly2	
3.03 (m, 2H) HδArg	
2.96 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf	
2.67 (dd, 1H, J=9.5, 16.1 Hz)	
HβAsp	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

173.0	46.9
170.8	44.2
169.6	43.0
169.6	36.2
167.3	28.8
166.9	28.1
157.9	26.1
156.8	19.4
137.7	18.5
134.7	18.1
131.9	12.7
124.8	
116.7	
86.7	
80.6	
65.7	
55.8	
55.4	
53.0	
49.7	

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam(3-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)]**Referencia N°  
**44b**

M.W (g/mol)

921.00

Punto Fusión (°C)

aceite

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> (c= 1, MeOH )

-9.9°

Fórmula  
Empírica**C<sub>42</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 54.77

H 6.02

N 12.17

C 53.95

H 6.15

N 11.48

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

3429, 3302, 3057, 1748, 1663, 1552, 1330, 1162, 1124, 848

MS m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 919.4 (M<sup>+</sup>-2)

MS2(919.4): 845.2(74.2)

MS3(845.2): 730.5(114.7); 591.1(254.1); 551.1(294.1); 532.3(312.9)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.43 (t, 1H, J=5.5, 11.5Hz) NHGly2

8.22 (s, 1H) NH(β-Lactam)

8.20 (d, 1H, J=8.2Hz) NHAsp

8.00 (d, 1H, J=8.3Hz) NHArg

7.57-7.50 (m, 4H) Ar

6.71 (sa, 1H) NH(Argω)

6.45 (sa, 2H) NH(Argω)

4.50 (m, 1H) HαAsp

4.21 (m, 1H) HαArg

3.94 (dd, 1H, J= 6.9, 14.2Hz) Gly2

3.82 (d, 1H, J=14.1Hz) Gly1

3.46 (d, 1H, J=6.2Hz) CHβ-(β-Lactam)

3.39 (d, 1H, J=13.6Hz) CHγ-(β-Lactam)

3.34 (d, 1H, J=13.6Hz) CHγ-(β-Lactam)

3.33-3.31 (m, 2H) Gly1, CHβ-(β-Lactam)

3.18 (dd, 1H, J= 6.9, 14.2Hz) Gly2

3.04 (m, 2H) HδArg

2.96 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf

2.71 (dd, 1H, J=8.9,

J'=16.0Hz)HβAsp

2.48 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf2.42 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf

2.40(sa, 1H) HβAsp

2.01 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf

1.63-1.58 (m, 2H)

HβArg

1.53-1.48 (m, 2H)

HδArg

1.41 (s, 6H) 2x CH<sub>3</sub>Pbf1.38 (s, 9H) O<sup>t</sup>Bu<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm)DMSO<sub>d6</sub>

173.4

121.1

34.5

170.7

116.5

26.8

169.4

85.8

26.4

169.3

80.4

25.1

167.3

68.9

17.7

167.1

59.3

16.6

157.9

53.1

10.6

156.2

53.1

137.5

51.7

136.4

51.7

133.4

51.7

132.4

49.4

131.6

45.5

128.2

43.0

126.2

42.0

124.1

39.3

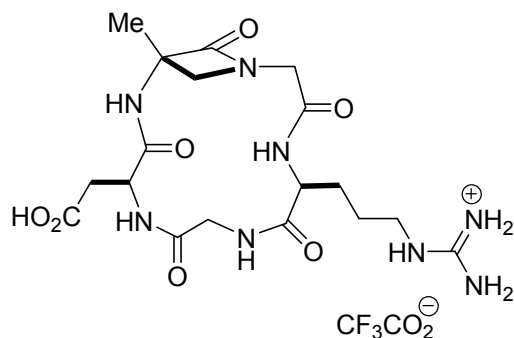
122.9

36.3

Comentarios:

#### 4.4.1.5. Procedimiento general para la síntesis de los trifluoroacetatos de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg-Gly-Asp] 3a-b:

Se agitó una disolución del correspondiente *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(R)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] **44a-b** (0.1 mmol) en ácido trifluoroacético (1.4 mL) a 35 °C y durante 1h. Pasado ese tiempo, se adicionó éter diisopropílico (25 mL) a 0°C para hacer precipitar el producto y la suspensión se centrifugó. El residuo sólido se lavó con  $i\text{Pr}_2\text{O}$  (2 X 5 mL) y el producto se secó a presión reducida. Rendimiento: 46 mg, (80%) para ambos casos. Calculado para un equivalente de ácido trifluoroacético. Sólido blanco.

**ciclo-[β-Lactam(Me)-Gly-Arg-Gly-Asp]**Referencia N°  
**3a**

M.W (g/mol)

582.49

Punto Fusión (°C)

134-136°C

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.03, MeOH )

-34.4°

Fórmula  
Empírica**C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 41.24

H 5.02

N 19.24

C 45.77

H 5.65

N 13.79

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

2930, 2860, 1745, 1709, 1648, 1544, 1514, 1456, 818

MS m/z

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 487.3(M<sup>+</sup>+H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H)

MS2(487.2): 469.2(18); 459.2(28); 442.2(45); 329.2(158); 197.0(290.2)

MS3(459.2): 442.2(17); 347.2(112); 352.1(107.1)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)

8.93 (d, 1H, J=4.0Hz) NHAsp  
 8.68 (t, 1H, J=6.0, J'=12.2Hz) NHGly2  
 8.03 (d, 1H, J=6.6Hz) NHArg  
 7.82 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 7.11 (sa, 2H) NHωArg  
 4.69 (m, 1H) HαAsp  
 4.01 (dd, 1H, J=7.1, 17.1Hz) Gly2  
 3.98 (m, 1H) HαArg  
 3.85 (d, 1H, J=15.5Hz) Gly1  
 3.71 (d, 1H, J=15.5Hz) Gly1  
 3.65-3.56 (m, 1H) Gly2  
 3.50 (d, 1H, J=13.4Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.37 (d, 1H, J=13.4Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.11 (m, 2H) CHδArg  
 2.83 (m, 2H) CHβAsp  
 1.75-1.70 (m, 2H) CHβArg  
 1.61-1.48 (m, 1H) CHγArg  
 1.41 (s, 3H) CH<sub>3</sub>  
 1.18-1.15 (m, 1H) CHγArg

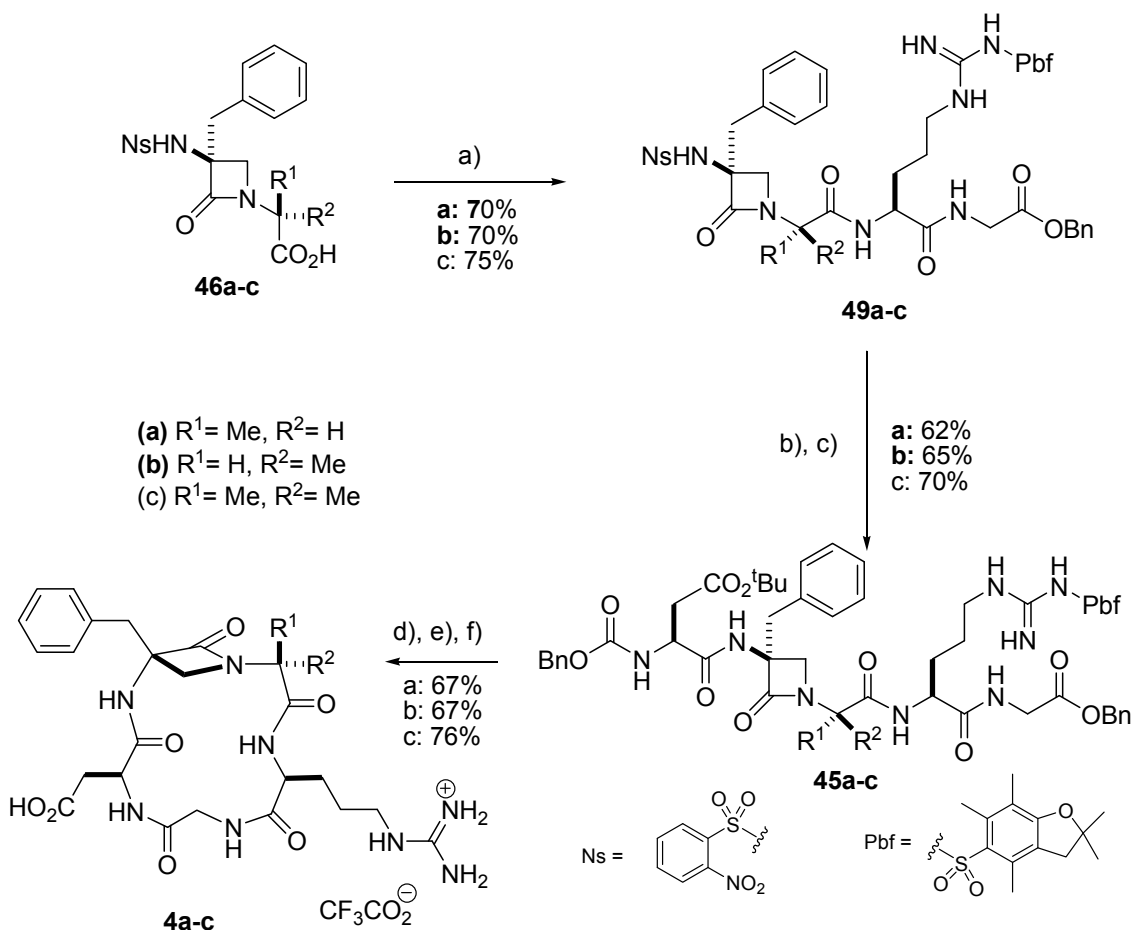
<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)

174.9  
 172.3  
 171.9  
 167.3  
 157.5  
 56.0  
 51.9  
 49.5  
 48.8  
 44.3  
 41.1  
 35.8  
 27.0  
 26.8  
 24.9  
 24.7  
 21.3

Comentarios:

#### 4.5. Síntesis de ciclopeptidomiméticos de tipo RGD a partir de $\beta$ -lactamas $\alpha$ , $\alpha'$ -polisustituídas:

##### 4.5.1. Compuestos *ciclo*-[Arg-Gly-Asp- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa] **4a-c**:

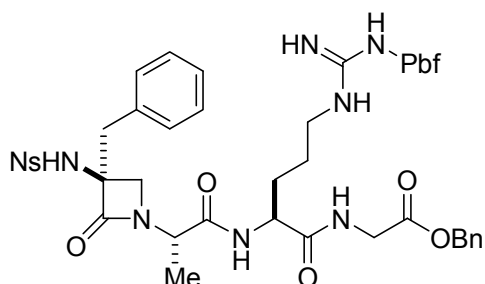


**Esquema 5.3:** a) Para los compuestos **49a** y **49b**: *H*-Arg(*Pbf*)-Gly-OBn **40** (1.1eq), *HOBt* (1.1eq), *TEA* (5eq), *EDC*·*HCl* (1.5eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 16h; para el compuesto **45c**: *H*-Arg(*Pbf*)-Gly-OBn **40** (1.1eq), *EEDQ* (2eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ ; b) *PhSH* (2eq),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1eq), *MeCN*, *t.a.*, 1.5h c) *CbzHN*-Asp(*O<sup>t</sup>Bu*)-OH (1eq), *HATU* (1.3eq),  $\text{KHCO}_3$  (5eq), *DMF*,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h; e)  $\text{H}_2$ , *Pd/C* (10%), 1atm., *MeOH*, *t.a.*, 5h f) *HATU* (1.2eq), *HOAt* (1.4eq),  $\text{KHCO}_3$  (10eq), *DMF*,  $-10^\circ\text{C}$ , 24h; g)  $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ ,  $35^\circ\text{C}$ , 1h; luego recristalización en  $i\text{Pr}_2\text{O}$ .

#### 4.5.1.1. Procedimiento general para la síntesis de Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn **49a-c**:

El procedimiento seguido para la preparación de los compuestos **49a-b** fue idéntico al descrito en el punto **5.4.1.2.**. Para el compuesto **49c** el procedimiento seguido fue el siguiente:

En un matraz previamente secado a la llama bajo atmósfera de nitrógeno se vertió una disolución de Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-OH **53c** (1.92 g, 4.3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). La disolución se enfrió a -10°C y se añadieron consecutivamente la amina H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (2.58 g, 4.5 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y EEDQ (2.13 g, 8.6 mmol). La disolución se agitó a -10°C durante 30 min y seguidamente a temperatura ambiente durante 20h. Transcurrido este tiempo se lavó la mezcla consecutivamente con una disolución 1 M de HCl (2 X 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex. 5/1). Rendimientos: **49a**: 2.97 g (70%), **49b**: 2.97 g (70%) y **49c**: 3.23 g (75%).

**Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-OBn**

Referencia N°

**49a**

P.M. (g/mol)

989.12

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+33.5

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>47</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>**

C 57.07

H 5.71

N 11.33

C 56.18

H 5.85

N 10.39

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

3387, 2924, 2236, 1753, 1668, 1628, 1537, 1542, 1351, 1266, 1176, 1105, 849, 784

MS m/z

MS1:1003.15(M<sup>+</sup>); 1004.3; 1005.3; 1025.3

Fuente ESI

MS2(1003.3): 733.2(270.1); 676.5(326.8)

Pol. positiva

MS3(733.2): 705.4(27.8); 691.3(41.9); 676.2(57); 543.2(190)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.19 (d, 1H, J=7.6Hz) Ar.Ns

7.82 (d, 1H, J=7.6Hz) Ar.Ns

7.67 (m, 1H) Ar.Ns

7.63 (m, 1H) Ar.Ns

7.63 (m., 1H) NHGly

7.30-7.25 (m, 12H) Ar, NHArg,

NH(β-Lactam)

6.20 (sa, 2H) NHωArg

5.10 (s, 2H) OCH<sub>2</sub>Ph

4.53 (m, 1H) HαArg

4.25 (m, 1H) HαAla

4.04 (m, 2H) CHGly

3.68 (d, 1H, J=4.9Hz) CHβ-(β-Lactam)

3.52 (d, 1H, J=4.9Hz) CHβ-(β-Lactam)

3.19 (m, 2H) HδArg

3.17(d, 2H, J=14.2Hz) CHγ-(β-Lactam)

2.93 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf2.56 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf2.49 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf2.07 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf

1.95-1.8 (m, 2H) HβArg

1.61(m, 2H) HγArg

1.45 (s, 6H) 2xCH<sub>3</sub>Pbf

1.30 (d, 3H, J=7.0Hz)

CH<sub>3</sub>Ala<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.9

131.4

53.6

170.7

130.6

53.4

170.3

129.3

43.6

167.3

128.8

41.8

159.2

128.6

40.7

156.8

128.4

30.1

147.6

128.2

29.7

138.7

128.0

29.0

135.7

125.7

25.9

135.5

125.2

19.8

133.9

118.0

18.4

133.6

86.9

15.6

133.0

70.0

12.9

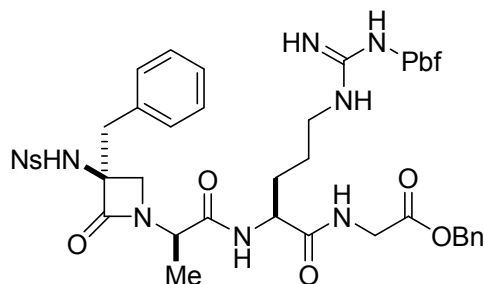
132.4

67.5

132.3

53.9

Comentarios:

**Ns-β-Lactam(Bn)-(D)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-OBn**

Referencia N°

**49b**

P.M. (g/mol)

989.12

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+11.6

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>47</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>**

C 57.07

H 5.71

N 11.33

C 56.17

H 5.84

N 10.39

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

3387, 2924, 2236, 1753, 1668, 1628, 1537, 1542, 1351, 1266, 1176, 1105, 849, 784

MS m/z

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1:1003.15(M\*); 1004.3; 1005.3; 1025.3

MS2(1003.3): 733.2(270.1); 676.5(326.8)

MS3(733.2): 705.4(27.8); 691.3(41.9); 676.2(57); 543.2(190)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.29(d, 1H, J=9.0Hz) Ar.Ns  
 7.83 (d, 1H, J=9.0Hz) Ar.Ns  
 7.36-7.26 (m, 13H) NHGly, Ar, NHArg, NH(β-Lactam)  
 6.20 (sa, 2H) NH(Argω)  
 5.14 (s, 2H) OCH<sub>2</sub>Ph  
 4.57 (m, 1H) HαArg  
 4.01 (m, 3H) Gly, HαAla  
 3.77 (d, 1H, J=6.0Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.60 (d, 1H, J=6.0Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.24-3.15 (m, 4H) CH<sub>2</sub>δArg, CHγ-(β-Lactam)  
 2.94 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.58 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.51 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf

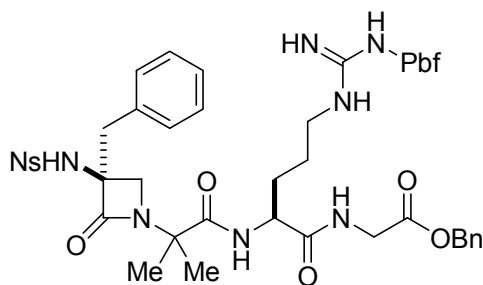
2.08 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.95-1.81 (m, 2H) CH<sub>2</sub>βArg  
 1.61(m, 2H) CH<sub>2</sub>γArg  
 1.45 (s, 6H) 2xCH<sub>3</sub>Pbf  
 1.30 (d, 3H, J=7.1Hz) CH<sub>3</sub>Ala

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.9	128.8	29.7
170.7	128.6	29.0
170.3	128.4	25.9
167.3	128.2	19.8
159.2	128.0	18.4
156.8	125.7	15.6
147.6	125.2	12.9
138.7	118.0	
135.7	86.9	
135.5	70.0	
133.9	67.5	
133.6	53.9	
133.0	53.6	
132.4	53.4	
132.3	43.6	
131.4	41.8	
130.6	40.7	
129.3	30.1	

Comentarios:



**Ns-β-Lactam(Bn)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OBn**

Referencia N°

**49c**

P.M. (g/mol)

1003.15

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+27.1

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>48</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>**

C 57.47

H 5.83

N 11.17

C 56.38

H 5.29

N 11.52

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3387, 2924, 2361, 1753, 1668, 1628, 1537, 1542, 1351, 1266, 1176,  
1105, 849, 784

MS m/z

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1:1003.15(M\*); 1004.3; 1005.3; 1025.3

MS2(1003.3): 733.2(270.1); 676.5(326.8)

MS3(733.2): 705.4(27.8); 691.3(41.9); 676.2(57); 543.2(190)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.27 (d, 1H, J=7.9Hz) Ar.Ns  
 7.86 (d, 1H, J=7.9Hz) Ar.Ns  
 7.77 (t, 1H, J=7.6, 15.6Hz) Ar.Ns  
 7.68 (t, 1H, J=7.6, 15.6Hz) Ar.Ns  
 7.51 (t, 1H, J=5.5, 11.0Hz) NHGly  
 7.39 (d, 1H, J=7.9Hz) NHArg  
 7.38 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 7.34-7.24 (m, 10H) Ar  
 6.15 (sa, 2H) NHPbf  
 5.14 (s, 2H) OCH<sub>2</sub>Ph  
 4.45 (m, 1H) CH<sub>α</sub>Arg  
 4.04 (d, 2H, J=5.8Hz) Gly  
 3.67 (d, 1H, J=5.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.55 (d, 1H, J=5.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.20 (m, 2H) CH<sub>2δ</sub>Arg  
 3.14(2d, 2H, J=13.4Hz) CHγ-(β-Lactam)

2.94 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.57 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.50 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.08 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.95-1.81 (m, 2H)  
 CH<sub>2γ</sub>Arg  
 1.64-1.57 (m, 2H)  
 CH<sub>2β</sub>Arg  
 1.45 (s, 6H) 2xCH<sub>3</sub> Pbf  
 1.24 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Aib  
 1.04 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Aib

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

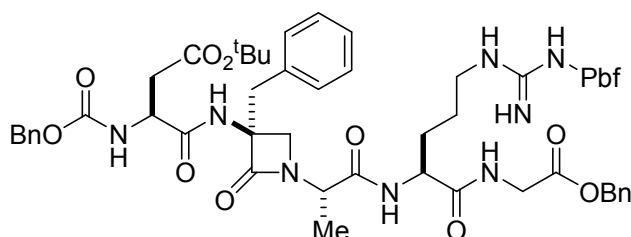
173.1	128.8	28.4
172.6	128.6	25.9
169.7	128.4	23.7
166.3	128.2	19.4
158.8	128.0	18.0
156.4	125.2	12.5
147.3	124.7	
138.4	117.5	
135.5	86.4	
135.0	68.7	
133.9	67.0	
133.6	60.0	
133.0	53.5	
132.3	51.3	
131.0	43.3	
132.4	41.5	
131.0	28.8	
130.7	28.7	

Comentarios:

**4.5.1.2. Procedimiento general para la preparación de 45a-c por acoplamiento peptídico de H- $\beta$ -lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn 49a-c con el ácido Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH:**

a) Preparación de las aminas H- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn: Sobre una mezcla de la correspondiente Ns- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn **49a-c** (2.8 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/DMSO (30/2.5 mL), se añadieron a temperatura ambiente tiofenol (0.570 mL, 5.60 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (387 mg, 2.8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción terminó tras una 1-3 h (seguimiento por TLC y <sup>1</sup>H NMR). Después se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en exceso y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min tras los cuales la suspensión se filtró sobre celita a vacío. Finalmente el filtrado se evaporó en un rotavapor obteniéndose el intermedio  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactámico correspondiente junto con 2-tiofenil-nitrobenceno, que no se separó de la mezcla para realizar la siguiente reacción.

b) Acoplamiento peptídico: La correspondiente H- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn ( $\approx$  2.8 mmol) preparada según el procedimiento anterior se disolvió en DMF (30 mL) seco y se enfrió a -10°C. A la disolución se le añadió Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.90 g, 2.8 mmol), KHCO<sub>3</sub> (1.40 g, 14 mmol), y HATU (1.60 g, 4.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16h dejando que la temperatura subiera lentamente. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida sin dejarla secar completamente. Después, se diluyó en EtOAc (50 mL) y se lavó consecutivamente con una disolución acuosa de HCl 0.1M (2 X 20 mL), una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex. 5/1). Rendimientos: **45a**: 1.93 g (62%), **45b**: 2.02 g (65%) y **45c**: 2.20 g (70%).

**Cbz-Asp(OtBu)-β-Lactam(Bn)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-OBn**

Referencia N°

**45a**

P.M. (g/mol)

1109.29

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-65.8

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>57</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub>**

C 61.72

H 6.54

N 10.10

C 61.18

H 6.77

N 10.12

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3326, 2964, 2934, 2361, 1743, 1673, 1547, 1452, 1362, 1256, 1151, 1095,  
857, 784

MS m/z\*

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 1109.3(M\*)

MS2(1109.3): 784.3(325.0)

MS3(784.3): 676.2(108.1); 619.2(165.1)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.44 (sa, 1H) NHArg

7.67 (sa, 1H) NHGly

7.33-7.21 (m, 15H) Ar

7.03 (s, 1H) NH(β-Lactam)

6.48 (d, 1H, J=8.8Hz) NHAsp

6.03 (s, 2H) NH(Argω)

5.15-4.96 (m, 4H) 2XOCH<sub>2</sub>Ph

4.58 (m, 1H) HαAsp

4.58 (m, 1H) HαArg

4.30 (dd, 1H, J=6.9, 17.8Hz) Gly

3.85 (d, 1H, J=4.4Hz.) CHβ-(β-Lactam)

3.64 (dd, 1H, J=6.9, 17.8Hz) Gly

3.53 (m, 3H) CHβ-(β-Lactam), CHAla

3.23-3.14 (m, 2H) CH<sub>2</sub>δArg

3.05 (d, 1H, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)

2.94 (m, 4H) CHγ-(β-Lactam), CH<sub>2</sub>Pbf, HβAsp

2.58 (m, 1H) HβAsp,

CH<sub>3</sub>Pbf2.51 (3H, s) CH<sub>3</sub>Pbf2.08 (3H, s) CH<sub>3</sub>Pbf

2.05 (1H, m) HβArg

1.86 (1H, m) HβArg

1.63 (2H, m) HγArg

1.45 (6H, s) 2xCH<sub>3</sub>Pbf1.40 (9H, s) O<sup>t</sup>Bu

1.09 (3H, d, J=7.2Hz)

CH<sub>3</sub>Ala<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.2

128.1

25.8

171.1

128.0

20.0

170.3

124.6

19.0

168.5

117.5

14.2

158.7

86.4

12.7

157.0

82.2

156.2

67.6

138.4

67.2

136.1

67.1

135.3

53.2

135.2

51.3

133.5

50.9

133.3

48.1

132.4

43.5

130.2

41.2

129.0

40.7

128.8

38.7

128.7

36.7

128.6

29.0

128.5

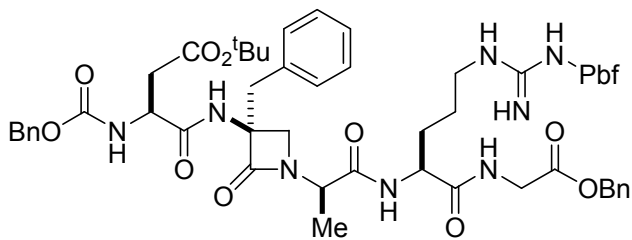
28.7

128.4

28.0

Comentarios:

**Cbz-Asp(OtBu)-β-Lactam(Bn)-(D)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-OBn**



Referencia N°

**45b**

P.M. (g/mol)

1109.29

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.7, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-89.7

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>57</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub>**

C 61.72

H 6.54

N 10.10

C 61.21

H 6.75

N 10.07

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

3326, 2964, 2934, 2361, 1743, 1673, 1547, 1452, 1362, 1256, 1151, 1095, 857, 784

MS m/z\*

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 1109.3(M\*)

MS2(1109.3): 784.3(325.0)

MS3(784.3): 676.2(108.1); 619.2(165.1)

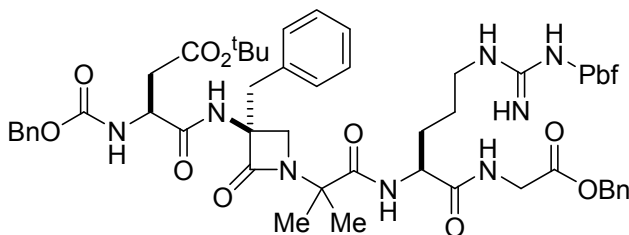
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.35 (d, 1H, J=7.9Hz) NHArg	2.94 (m, 3H) CH <sub>2</sub> Pbf,
7.41 (t, 1H, J=5.6; 10.5Hz) NHGly	CHβAsp
7.36-7.25 (m, 15H) Ar	2.63 (m, 4H) CHβAsp,
7.19 (s, 1H) NH(β-Lactam)	CH <sub>3</sub> Pbf
6.42 (d, 1H, J=8.4Hz) NHAsp	2.52 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf
6.15 (s, 2H) NH(Argω)	2.09 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf
5.12-4.99 (m, 4H) 2XCH <sub>2</sub> Ph	1.99 (1H, m) CHβArg
4.55 (m, 1H) HαAsp	1.80 (1H, m) CHβArg
4.55 (m, 1H) HαArg	1.55 (2H, m) CH <sub>2</sub> γArg
4.15 (dd, 1H, J=6.3Hz) Gly	1.46 (6H, s) 2xCH <sub>3</sub> Pbf
4.15 (q, 1H, J=6.4Hz) HαAla	1.39 (9H, s) <sup>t</sup> Bu
3.76 (dd, 1H, J=4.6Hz) Gly	1.05 (3H, d, J=7.3Hz)
3.76 (d, 1H, J=4.4Hz.) CHβ-(β-Lactam)	CH <sub>3</sub> Ala
3.47 (d, 1H, J=5.2Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.23 (m, 2H) HδArg	
3.13 (d, 1H, J=13.8Hz.) CHγ-(β-Lactam)	
3.00 (d, 1H, J=13.8Hz.) CHγ-(β-Lactam)	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.5	128.4	40.7
172.0	128.4	38.6
170.4	128.3	36.5
170.2	128.2	28.8
170.1	128.2	28.6
158.6	127.9	28.0
157.0	124.5	25.5
156.1	117.4	19.3
138.3	86.3	17.9
136.1	82.0	15.4
135.1	67.6	12.5
133.4	67.3	
132.7	67.1	
132.3	54.0	
130.4	53.0	
128.8	50.8	
128.7	43.3	
128.6	41.1	

Comentarios:

**Cbz-Asp(OtBu)-β-Lactam(Bn)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OBn**

Referencia N°

**45c**

P.M. (g/mol)

1123.32

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-85.0

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

**C<sub>58</sub>H<sub>74</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub>**

C 62.01

H 6.64

N 9.98

C 61.08

H 6.48

N 9.67

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

3326, 2964, 2934, 2361, 1743, 1673, 1547, 1452, 1362, 1256, 1151, 1095, 857, 784

MS m/z\*

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 1123.5(M\*)

MS2(1123.5): 797.4(326.1); 632.1(491.2)

MS3(797.4): 689.3(108.1); 632.3(165.1); 573.3(221.1)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.50 (1H, d, J=7.1Hz) NHArg	2.57 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf
7.69 (1H, t, J=J'=5.7, 5.7Hz) NHGly	2.51 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf
7.33-7.21 (15H, m) Ar	2.08 (3H, s) CH <sub>3</sub> Pbf
7.13 (1H, s) NH(β-Lactam)	2.08 (1H, m) HβArg
6.54 (1H, d, J=8.8Hz) NHAsp	1.85 (1H, m) HβArg
6.11 (2H, s) NH <sub>2</sub> (Argω)	1.63 (1H, m) HγArg
5.17-4.96 (4H, m) 2XCH <sub>2</sub> Ph	1.55 (1H, m) HγArg
4.60 (1H, m) HαAsp	1.45 (6H, s)
4.52 (1H, m) HαArg	2XCH <sub>3</sub> Pbf
4.28 (1H, dd, J=6.5, 17.7Hz) Gly	1.40 (9H, s) <sup>t</sup> Bu
3.81 (1H, d, J=4.6Hz) CHβ-(β-Lactam)	1.11 (3H, s) CH <sub>3</sub> Aib
3.64 (1H, dd, J=5.0, 17.7Hz) Gly	1.07 (3H, s) CH <sub>3</sub> Aib
3.48 (1H, d, J=4.6Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.19 (2H, m) CH <sub>2</sub> δArg	
3.04 (1H, d, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)	
2.94 (1H, d, J=13.5Hz) CHγ-(β-Lactam)	
2.94 (2H, s) CH <sub>2</sub> Pbf	
2.88 (1H, dd, J=9.0, 16.7Hz) HβAsp	
2.62 (1H, dd, J=9.0, 16.7Hz) HβAsp	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

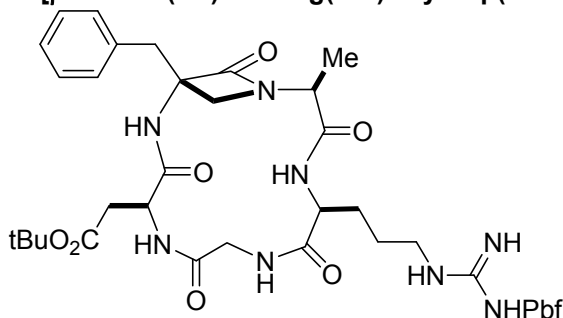
173.5	128.4	36.5
172.7	128.4	28.6
172.2	128.3	28.1
171.1	128.2	25.7
170.3	128.2	24.0
168.1	127.9	23.7
158.6	124.5	21.1
157.1	117.4	19.3
156.2	86.3	18.0
138.3	67.4	14.3
136.1	66.0	12.5
135.1	60.4	
133.4	59.0	
132.7	51.0	
132.3	48.0	
130.4	43.3	
128.8	41.1	
128.7	40.7	
128.6	38.4	

Comentarios:

**4.5.1.3. Síntesis de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] 47a-c:**

d) Hidrogenólisis: Se agitó una suspensión de la correspondiente Cbz-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-OBn (186 mg **45a** y **45b** y 191 mg **45c**, 0.17 mmol) y Pd al 10% sobre carbono (37 mg **45a** y **45b** y 38 mg **45c**) en metanol (15 mL) bajo presión atmosférica de H<sub>2</sub> durante 16h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN (MeOH<sub>d4</sub>) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla a través de celita, lavando la misma con metanol y se evaporó el disolvente a presión reducida.

e) Ciclación: El crudo así obtenido (0.17 mmol) se disolvió en DMF anhidro grado biotech (200 mL) y se enfrió a -10°C en un criogénador. Se añadieron consecutivamente KHCO<sub>3</sub> (255 mg, 2.55 mmol), HOAT (37 mg, 0.27 mmol) y HATU (84 mg, 0.22 mmol), y la mezcla se agitó a -10°C siguiéndole el avance de la reacción por RMN. Al cabo de 24h la mezcla se evaporó a presión reducida sin calentar el baño y sin dejarla secarse completamente. El residuo obtenido se diluyó en EtOAc (20 mL) y se lavó consecutivamente con agua destilada (1 X 15 mL), HCl (0.1M) (2 X 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa (eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/15). Rendimientos: **47a**: 88.4 mg (60%), **47b**: 88.4 mg (60%) y **47c**: 104.8 mg (70%).

**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**Referencia N°  
**47a**

P.M. (g/mol)

867.02

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.02, CH<sub>3</sub>OH)

-4.3°

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

**C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S**

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 58.18

H 6.74

N 12.92

C 57.61

H 6.86

N 11.89

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

3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095

MS\* m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 867.0 (M\*)

MS2(867.0): 811.0(56.0); 540 (327.0)

MS3(811.0): 541(270); 523.9(17.1); 495.9(28)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.35 (d, 1H, J=7.6Hz) NHAsp  
 8.29 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 8.18 (sa, 1H) NHGly  
 7.74 (d, 1H, J=8.2Hz) NHArg  
 7.28-7.19 (m, 5H) Ar  
 6.64-6.37 (sa, 2H) NH(Argω)  
 4.46 (m, 1H) HαAsp  
 4.11 (m, 2H) HαArg, HαAla  
 3.96 (dd, 1H, J= 6.1,13.9Hz) Gly  
 3.42 (d, 1H, J=5.4Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.28 (m, 1H) CHβ-(β-Lactam)  
 3.24 (d, 1H, J=13.4Hz.) CHγ-(β-Lactam)  
 3.23 (ov, 1H) Gly  
 3.15 (d, 1H, J=13.4Hz.) CHγ-(β-Lactam)  
 3.00 (m, 2H) CH<sub>2</sub>δArg  
 2.96 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.69 (dd, 1H J=4.7,16.3Hz)CHβAsp

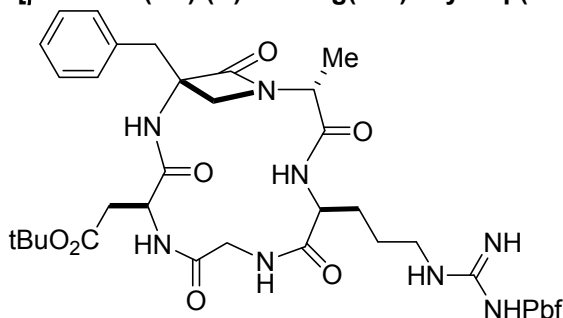
2.46 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.41 (s, 4H) CH<sub>3</sub>Pbf,  
 CHβAsp  
 2.00 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.68 (m, 1H) CHβArg  
 1.57 (m, 1H) CHβArg  
 1.40 (s, 6H) 2X CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.40 (s, 9H) <sup>t</sup>Bu  
 1.24 (m, 2H) CH<sub>2</sub>γArg  
 0.98 (d, 3H, J=7.2Hz)  
 CH<sub>3</sub>

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.4  
171.5  
170.3  
170.2  
170.1  
165.8  
158.3  
156.9  
138.1  
136.7  
132.3  
130.9  
128.8  
127.5  
125.2  
117.1  
87.2  
81.0  
68.5  
55.7

52.0  
50.4  
50.3  
44.3  
43.4  
37.7  
36.5  
29.2  
28.6  
26.7  
19.8  
18.5  
14.3  
13.1

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam(Bn)-(D)-Ala-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**Referencia N°  
**47b**

P.M. (g/mol)

867.02

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-40.1°

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

**C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S**

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 58.18

H 6.74

N 12.92

C 57.61

H 6.91

N 11.81

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

3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095

MS\* m/z

MS1: 867.0 (M\*)

Fuente ESI

MS2(867.0): 811.0(56.0); 540 (327.0)

Pol. negativa

MS3(811.0): 541(270); 523.9(17.1); 495.9(28)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.78 (sa, 1H) NHGly  
 8.41 (d, 1H, J=7.9Hz) NHAsp  
 8.14 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 7.98 (d, 1H, J=7.3Hz) NHArg  
 7.29-7.19 (m, 5H) Ar  
 6.64-6.37 (sa, 2H) NH(Argω)  
 4.49 (m, 1H) HαAsp  
 4.30 (m, 1H) HαArg  
 3.90 (dd, 1H, J= 6.3,14.0Hz) Gly  
 3.46 (m, 1H) HαAla  
 3.34 (m, 1H) CHβ-(β-Lactam)  
 3.22 (d, 1H, J=13.4Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 3.20 (m, 1H) Gly  
 3.14 (d, 1H, J=6.1Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.04 (d, 1H, J=13.4Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 3.02 (m, 2H) CH<sub>2</sub>δArg  
 2.96 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.70 (dd, 1H, J=9.4,16.2Hz) CHβAsp

2.46 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.41 (s, 4H) CH<sub>3</sub>Pbf,  
 CHβAsp  
 2.00 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.54 (m, 1H) CHβArg  
 1.44 (m, 1H) CHβArg  
 1.40 (s, 6H) 2X CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.39 (s, 9H) O<sup>t</sup>Bu  
 1.36 (m, 2H) CH<sub>2</sub>γArg  
 1.22 (d, 3H, J=7.1Hz)  
 CH<sub>3</sub>Ala

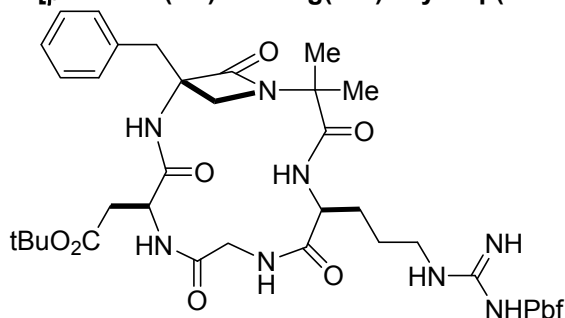
<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

173.9  
171.1  
170.6  
170.3  
169.7  
167.7  
158.5  
156.7  
138.0  
135.4  
133.0  
128.0  
127.0  
124.7  
117.1  
86.3  
81.0  
68.2  
55.9  
53.4

51.5  
50.1  
43.6  
42.6  
39.9  
36.9  
35.7  
28.1  
27.4  
27.1  
25.7  
18.6  
17.1  
13.6  
11.3

Comentarios:



**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**Referencia N°  
**47c**P.M. (g/mol)  
881.05Punto Fusión (°C)  
aceite $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
-16.5

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 58.62	H 6.86	N 12.72	C 57.39	H 6.95	N 12.49

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

3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095

MS\* m/z  
Fuente ESI  
Pol. negativaMS1: 881.4 (M\*)  
MS2(881.3): 825.3(56.1); 555.3(326.1)  
MS3(825.3): 555.3(270); 538.2(17.1); 527.2(28.1); 511.3(44)<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , ppm) DMSO-d<sub>6</sub>

8.30 (sa, 1H) NHGly	2.46 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
8.29 (s, 1H) NH( $\beta$ -Lactam)	2.40 (s, 4H) CH <sub>3</sub> Pbf,
8.13 (d, 1H, J=7.9Hz) NHAsp	CH $\beta$ Asp
7.40 (d, 1H, J=7.3Hz) NHArg	1.99 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
7.30-7.19 (m, 5H) Ar	1.63 (m, 1H) CH $\beta$ Arg
6.64-6.37 (sa, 2H) NHArg $\omega$	1.51 (m, 1H) CH $\beta$ Arg
4.52 (m, 1H) H $\alpha$ Asp	1.40 (s, 6H) 2X CH <sub>3</sub> Pbf
4.22 (m, 1H) H $\alpha$ Arg	1.40 (s, 9H) <sup>t</sup> Bu
3.96 (dd, 1H, J= 5.4, 14.7Hz) Gly	1.34 (m, 2H) CH <sub>2</sub> $\delta$ Arg
3.56 (d, 1H, J=5.9Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)	1.25 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib
3.30 (m, 1H) Gly	1.02 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib
3.26 (d, 1H, J=5.9Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)	
3.19 (d, 1H, J=13.7Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)	
3.06 (d, 1H, J=13.7Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)	
3.00 (m, 2H) H $\delta$ Arg	
2.95 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf	
2.69 (dd, 1H, J=8.8,16.1Hz) CH $\beta$ Asp	

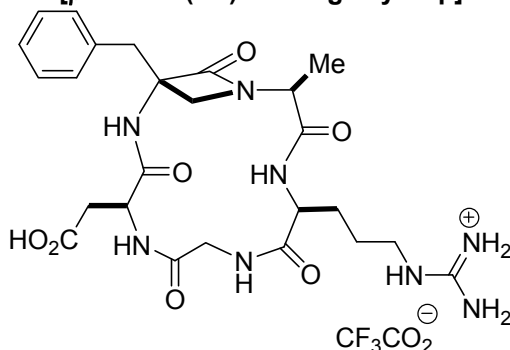
<sup>13</sup>C-NMR ( $\delta$ , ppm) MeOH-d<sub>4</sub>

173.0	59.1
172.9	53.7
171.7	53.5
170.7	50.3
169.7	43.8
166.8	42.6
158.4	40.2
156.6	37.0
151.9	35.8
138.0	28.0
138.0	27.5
134.7	27.1
133.1	22.3
132.1	21.7
130.2	18.3
128.0	17.1
126.9	11.3
124.6	
117.0	
86.3	
81.1	
66.8	

Comentarios:

#### 4.5.1.4. Preparación de los ciclopéptidos *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg-Gly-Asp] **4a-c:**

Se agitó una disolución del correspondiente *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aa-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] **47a-c** (70 mg, **47a** y **47b**, 71 mg, **47c**, 0.081 mmol) en ácido trifluoroacético (1.0 mL) a 35 °C y durante 1h. Pasado ese tiempo, se adicionó éter diisopropílico (10 mL) a 0°C para hacer precipitar el producto final y la suspensión se centrifugó. El residuo sólido centrifugado se lavó con más  $i$ Pr<sub>2</sub>O (4 X 5 mL) y se secó a presión reducida. Rendimientos calculado con un equivalente de ácido trifluoroacético: **4a**: 41 mg (75%), **4b**: 41 mg (75%) y **4c**: 46 mg (83%).

**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-Arg-Gly-Asp]**

Referencia N°

**4a**

P. M. (g/mol)

672.61

Punto Fusión (°C)

Desc. 230-232°C

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.1, MeOH)

-74.3

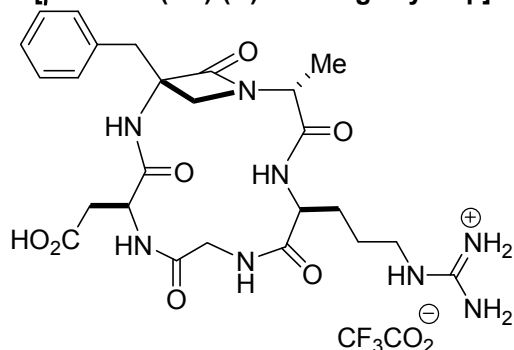
Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	<b>C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub></b>					
	C 48.21	H 5.24	N 16.66	C 45.42	H 6.16	N 15.59

IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3452, 3331, 1743, 1651, 1542
----------------------------	------------------------------

MS m/z	MS1: 558.6 (M <sup>+</sup> -CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H)
Fuente ESI	MS2(558.6): 541.5(17.1);514.6(44);410.6(148)
Pol. positiva	MS3(541.5): 524.4(17.1);450.5(90)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O (1/9) relación confórmeros 9M/1m		<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O(1/9)	
9.35/8.08 (d, 1H, J=5.9; 7.5Hz) NHArg (m/m)	3.13 (m, 2H) Argδ(M)	174.4	43.6
8.47/7.78 (d, 1H, J=8.0; 7.4Hz) NHAsp (M/m)	2.93 (dd, 1H, J=8.3; 17.5Hz) HβAsp(M)	173.4	40.7
8.40/7.72 (s, 1H) NH(β-Lactam)(M/m)	2.68 (dd, 1H, J=8.3; 17.5Hz) HβAsp(M)	171.6	36.8
8.33/7.30 (t, 1H, J <sub>A</sub> =5.8; 12.0Hz) NHGly (M/m)	1.76 (m, 2H) HβArg(M)	171.3	33.9
7.33-7.06 (m, 5H) Ar	1.52 (m, 2H) HγArg(M)	170.9	26.3
7.11 (sa, 1H) NH(Argω)	1.02 (d, 3H, J=7.3Hz) CH <sub>3</sub> (Ala(M))	167.8	24.6
4.58/4.58 (m, 1H) HαAsp(M/m)		157.0	12.3
4.24 (m, 1H) CHAla(M)		135.0	
4.10 (m, 1H) HαArg(M)		130.2	
3.98 (dd, 1H, J=7.0;15.6Hz) Gly(M)		129.9	
3.54 (d, 1H, J=6.5Hz) CHβ-(β-Lactam) (M)		128.6	
3.48 (dd, 1H, J=7.0Hz; 15.6Hz) Gly(M)		127.4	
3.38 (d, 1H, J=6.5Hz) CHβ-(β-Lactam) (M)		67.6	
3.20 (m, 2H) CHγ-(β-Lactam) (M)		54.3	
		51.6	
		50.5	
		49.0	

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam(Bn)-(D)-Ala- Arg-Gly-Asp]**

Referencia N°

**4b**

P. M. (g/mol)

672.61

Punto Fusión (°C)

Desc. 228-230°C

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.1, MeOH)

-90.3

Fórmula  
Empírica**C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 48.21

H 5.24

N 16.66

C 44.42

H 5.94

N 15.75

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

3455, 3329, 1745, 1653, 1539

MS\* m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 558.6 (M\*-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H)

MS2(558.6): 541.5(17.1);514.6(44);410.6(148)

MS3(541.5): 524.4(17.1);450.5(90)

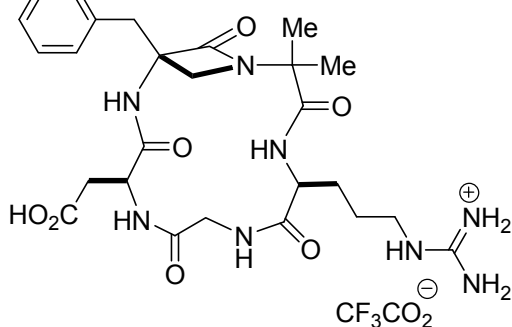
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9) relación confórmeros 7M/3m.

9.36/8.79 (sa, 1H) NHArg (M/m)	2.85/2.81 (m, 1H)
9.09/8.60 (t, 1H) NHGly (M/m)	HβAsp (M/m)
8.62/7.73 (s, 1H) NH(β-Lactam) (M/m)	2.66/2.66 (dd, 1H)
8.10/8.05 (d, J=8.8, 5.0Hz) NHAsp (M/m)	HβAsp (M/m)
7.33-7.02 (m, 5H, Ar)	1.79/1.73 (sa, 2H)
4.97/4.47 (sa, 1H) HαAsp (M/m)	HγArg (M/m)
4.12 (m, 1H) Gly (M/m)	1.60 (sa, 2H)HβArg(M/m)
4.06/3.98 (m, 1H) HαArg (M/m)	1.47/1.40 (d, 3H, J=7.3, 7.1Hz) Me (m/M)
3.96/3.89 (m, 1H) NCHCH <sub>3</sub> (m/M)	
3.72/3.42 (m, 1H) CHβ-(β-Lactam) (M/m)	
3.72/3.53 (m, 1H) Gly(M/m)	
3.70/3.17 (m, 1H) CHγ-(β-Lactam) (M/m)	
3.42/3.10 (m, 1H) CHβ-(β-Lactam) (M/m)	
3.16 (m, 2H) Arg-δ (M/m)	
3.14/2.97 (m, 1H) CHγ-(β-Lactam) (M/m)	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O(1/9)

175.4	64.6
175.0	63.2
174.7	58.5
174.3	56.5
173.7	55.8
172.9	51.9
171.2	51.4
170.9	49.3
157.4	44.0
135.3	43.5
133.7	41.9
131.0	41.0
130.9	40.9
130.8	38.8
130.7	35.9
130.1	35.3
129.4	27.2
129.3	27.1
129.1	27.0
128.9	24.7
128.4	24.6
127.8	16.6

Comentarios:

**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-RGD]**Referencia N°  
**4c**

P. M. (g/mol)

686.64

Punto Fusión (°C)

Desc. 234-236°C

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.2, MeOH)

-24.2°

Fórmula  
Empírica**C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 48.98

H 5.43

N 16.32

C 42.3

H 5.3

N 14.4

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

3460, 3341, 1740, 1648, 1539

MS\* m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 573.3 (M<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)

MS2(573.3): 556.2(17.1);528.3(45);426.2(147.1);409.2(164.1)

MS3(356.3): 511.2(17.1);443.2(85.1);356.3(172);312.1(216.2)

MS4(356.3): 339.2(17.1);338.1(18.2);271.1(85.2);254(102.3)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)

8.47 (t, 1H, J= 5.9, 12.2Hz) NHGly  
 8.38 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 8.30 (d, 1H, J=8.3Hz) NHAsp  
 7.79 (d, 1H, J=7.3Hz) NHArg  
 7.35-7.24 (m, 5H) Ar  
 7.12-7.08 (sa, 3H) NH(Argω)  
 4.69 (sa, 1H) HαAsp  
 4.25 (dd, 1H, J= 5.9, 17.1Hz) HαArg  
 4.03 (dd, 1H, J= 7.3, 15.6Hz) Gly  
 3.60 (d, 1H, J=3.9Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.50 (m, 1H) Gly  
 3.17-3.10 (m, 4H) HδArg; CHγ-(β-Lactam)  
 2.98 (d, 1H, J=3.9Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 2.92 (dd, 1H, J=6.8,17.1Hz) HβAsp  
 2.71 (dd, 1H, J=6.8,17.1Hz) HβAsp

1.86 (sa, 1H) HβArg  
 1.78-1.69 (m, 1H) HγArg  
 1.59 (sa, 2H) HβArg  
 1.21 (s, 3H) Me  
 1.12 (s, 3H) Me

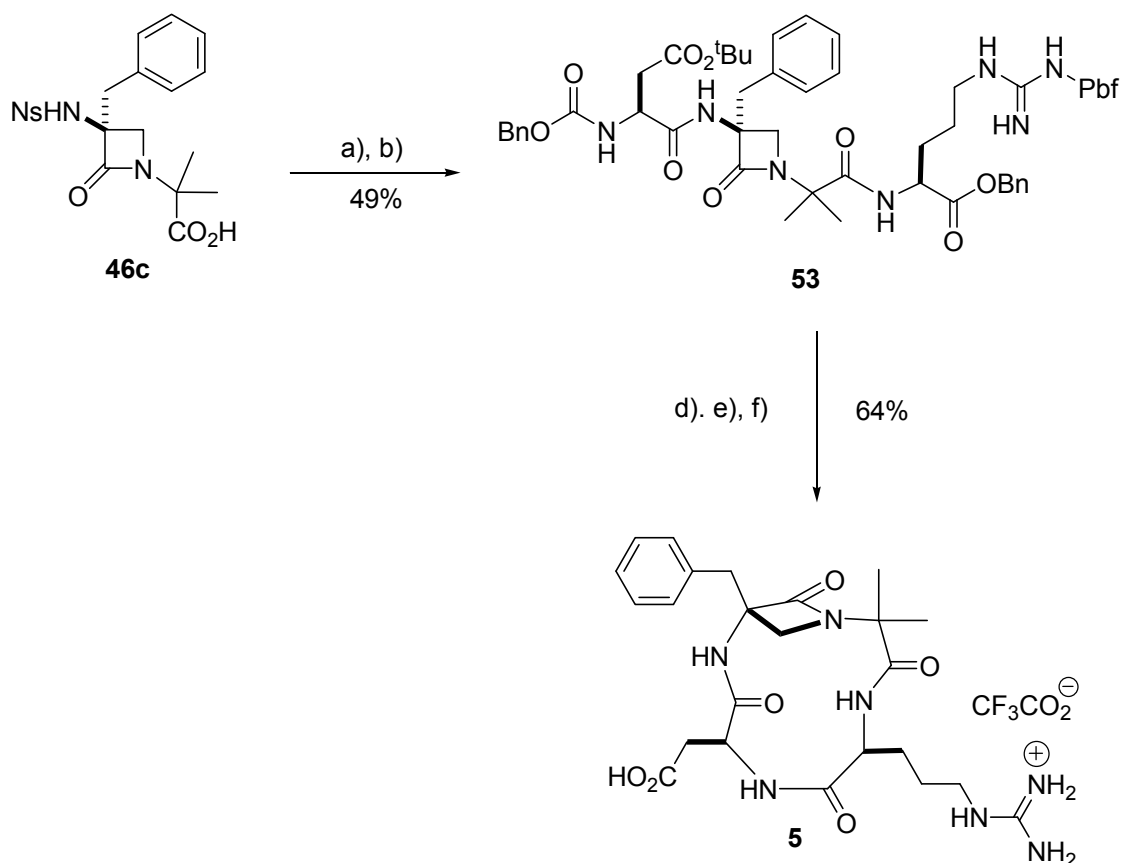
<sup>13</sup>CNMR(δ,ppm)  
D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O(1/9)

174.8  
174.5  
173.7  
172.2  
171.7  
168.1  
157.4  
134.9  
130.7  
129.0  
127.9  
66.8  
59.9  
54.5  
50.8

49.2  
44.3  
41.1  
39.2  
37.2  
34.6  
27.5  
24.8  
22.6  
22.0

Comentarios:

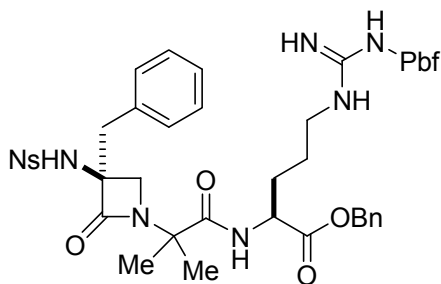
#### 4.5.2. Síntesis del tetrapéptido cíclico *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam (Bn)-Aib-Arg-Asp] **5**:



**Esquema 4.4:** a) *H*-Arg(Pbf)OBn (**51**) (1eq), EEDQ (2eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C} \rightarrow t.a.$  20h; b) *PhSH* (2eq),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1eq), MeCN, *t.a.*, 1.5h, luego *Cbz*-Asp(*O*<sup>*t*</sup>Bu)-OH (1eq), HATU (1.3eq),  $\text{KHCO}_3$  (5eq), DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow t.a.$ , 16h.

##### 4.5.2.1. Procedimiento general:

El compuesto **52** se preparó con un rendimiento del 65% siguiendo el procedimiento **5.4.1.2.** pero acoplando en este caso el éster bencílico *H*-Arg(Pbf)OBn **51** a la  $\beta$ -lactama **46c**. La transformación **52**→**53** se realizó según el procedimiento **5.4.1.3.** con un rendimiento del 75%. Finalmente, el producto **5** se obtuvo aplicando los procedimientos **5.4.1.4.** y **5.4.1.5.** con un rendimiento global del 64%.

**Ns-β-Lactam(Bn)-Aib-Arg(Pbf)-OBn**Referencia N°  
**52**

P.M. (g/mol)

946.10

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+26.4°

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 58.40	H 5.86	N 10.36	C 57.18	H 5.91	N 10.19

**C<sub>46</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>**IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)

3348, 3375, 2972, 2922, 1748, 1613, 1543, 1457, 1349, 1269, 1167, 1108

MS m/z

MS1=946.10 (M\*)

Fuente ESI

MS2(946.5); 676.4(270.1)

Pol. positiva

MS3(676.4): 648.4(28.0); 619.4(57); 316.3(360.1).

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

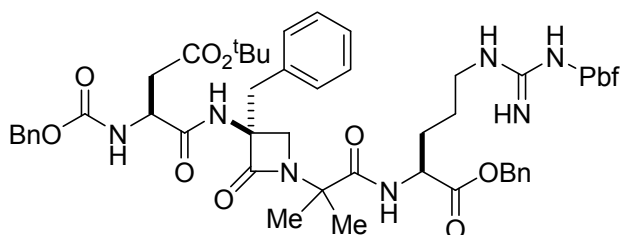
8.28 (m, 1H) Ar.Ns  
 7.90 (m, 1H) Ar.Ns  
 7.77-7.71 (m, 2H) Ar.Ns  
 7.44 (d, 1H, J=7.9Hz) NHArg  
 7.37-7.26 (m, 10H) Ar  
 6.47 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 6.12-6.05 (sa, 3H) NH(Argω)  
 5.22-5.14 (m, 2H) OCH<sub>2</sub>Ph  
 4.56 (m, 1H) HαArg  
 3.58 (d, 1H, J=5.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.49 (d, 1H, J=5.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.20 (m, 1H) HδArg  
 3.12 (dd, 2H, J=13.4,29.7Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 3.10 (m, 1H) HδArg

2.96 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.59 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.53 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.10 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.87 (m, 2H) HβArg  
 1.61 (m, 2H) HγArg  
 1.47 (s, 6H) 2xCH<sub>3</sub>Pbf  
 1.45 (s, 3H) CH<sub>3</sub>  
 0.86 (s, 3H) CH<sub>3</sub>

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

173.3	128.0	18.0
171.6	127.9	14.5
165.6	125.1	14.2
158.7	124.6	12.5
156.1	117.5	12.3
147.3	86.4	
138.3	69.1	
135.4	67.0	
134.8	60.7	
133.8	52.5	
133.3	51.1	
133.1	43.2	
133.0	40.8	
132.3	40.0	
131.3	28.8	
130.6	28.6	
128.6	26.0	
128.6	24.2	
128.4	23.1	
128.3	19.3	

Comentarios:

**Cbz-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-β-Lactam(Bn)-Aib-Arg(Pbf)-OBn**

Referencia N°

**53**

P.M. (g/mol)

1066.27

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-44.0°

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

**C<sub>56</sub>H<sub>71</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S**

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 63.08

H 6.71

N 9.20

C 62.18

H 6.64

N 9.15

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3428, 3332, 2987, 2911, 1748, 1667, 1549, 1452, 1366, 1258,  
1167, 1108

MS m/z\*

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1=1066.3=M\*

MS2(1066.5)=915.6(150.9); 1000.6(85.1)

MS3(1000.6)=915.6(85); 835.5(165.1).

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

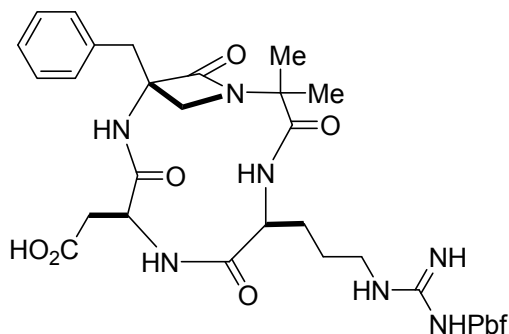
8.20 (sa, 1H) NHArg  
 7.38-7.27 (m, 15H) Ar  
 7.04 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 6.21 (d, 1H, J=7.2Hz) NHAsp  
 5.95 (s, 2H) NH(Argω)  
 5.15-5.08 (m, 4H) CH<sub>2</sub>Ph  
 4.48 (m, 1H) HαAsp  
 4.29 (m, 1H) HαArg  
 3.50 (d, 1H, J=4.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.34 (d, 1H, J=4.8Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.21 (m, 1H) HδArg  
 3.08 (m, 1H) HδArg  
 3.07 (d, 1H, J=12.9Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 2.93 (d, 1H, J=12.9Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 2.94 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.77-2.64 (m, 2H) HβAsp

2.58 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.52 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.09 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 1.90 (m, 2H) HβArg  
 1.59 (s, 3H) CH<sub>3</sub>  
 1.49 (m, 2H) Hδrg  
 1.46(s, 6H) 2xCH<sub>3</sub>Pbf  
 1.41 (9H) O<sup>t</sup>Bu  
 0.90 (3H, s) CH<sub>3</sub>

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

173.7	117.4
171.4	86.3
171.3	82.2
170.3	67.4
166.9	66.8
158.6	66.1
156.6	60.1
156.2	53.0
138.3	51.8
136.0	47.4
135.6	43.2
133.3	40.8
133.2	38.6
132.3	37.0
130.4	28.6
128.6	28.0
128.5	25.8
128.3	24.3
128.2	23.3
128.0	19.3
127.7	17.9
124.5	12.5



**ciclo-[β-Lactam (Bn)-Aib-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)]**

Referencia N°

**54**

P.M. (g/mol)

839.42

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c=1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-13.3°

Fórmula  
Empírica**C<sub>42</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 60.05

H 7.32

N 11.67

C 58.98

H 6.89

N 11.71

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

3439, 3332, 2933, 1747, 1667, 1560, 1448, 1261, 1160, 1107, 1027

MS\* m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

Masa exacta: 823.3876; Masa calculada: 823.3938

55.1, 57.1, 69.1, 71.1, 81.1, 83.1, 85.1, 95.1, 97.1, 109.1, 111.1, 123.1, 125.1

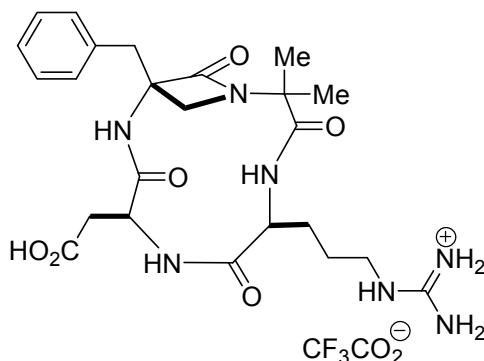
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

9.47 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.41 (s, 4H) CH <sub>3</sub> Pbf, HβAsp
8.19 (d, 1H, J=9.9Hz) NHArg	1.99 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
7.49 (d, 1H, J=5.9Hz) NHAsp	1.70 (m, 1H) HβArg
7.44-7.28 (m, 5H) Ar	1.52 (m, 1H) HβArg
6.64-6.37 (sa, 3H) NHArgω	1.40 (s, 6H) 2xCH <sub>3</sub> Pbf
4.59 (m, 1H) HαAsp	1.35 (m, 2H) HδArg
4.25 (m, 1H) HαArg	1.33 (s, 9H) O <sup>t</sup> Bu
3.41 (d, 1H, J=5.0Hz) CHβ-(β-Lactam)	0.79 (s, 3H) CH <sub>3</sub>
3.38 (d, 1H, J=13.1Hz) CHγ-(β-Lactam)	0.78 (s, 3H) CH <sub>3</sub>
3.31 (d, 1H, J=5.0Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.08 (d, 1H, J=13.1Hz) CHγ-(β-Lactam)	
2.98 (m, 2H) HδArg	
2.95 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf	
2.76(m, 1H) HβAsp	
2.46 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) MeOH<sub>d4</sub>

172.5	52.0
171.3	49.9
168.9	41.2
166.3	38.6
157.0	36.1
155.1	35.6
136.6	35.1
132.1	28.8
130.6	25.9
129.3	25.6
126.7	24.5
125.8	21.7
123.1	20.9
115.6	16.8
84.8	15.6
79.9	9.7
65.0	
57.1	

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam (Bn)-Aib-Arg-Asp]**

Referencia N°

**5**

P.M. (g/mol)

629.59

Punto Fusión (°C)

240

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.5, MeOH)

-85.6

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 49.60	H 5.44	N 15.57	C 49.48	H 5.74	N 15.86

**C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>**IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)

3462, 3343, 1742, 1644, 1543

MS\* m/z

MS1=516.7(M<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Fuente ESI

MS2(516.8)= 443.2(100); 442.8(87); 225.1(44); 369.2(37); 493.8(33)

Pol. positiva

MS3(443.2)= 369.2(100); 385.7(61); 225.0(58); 516.2(56); 370.1(55)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) ) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1/9)

8.74 (1H, s) NH(β-Lactam)	2.82 (1H, dd, J=7.0, 16.6Hz) HβAsp
8.49 (1H, d, J=9.8Hz) NHArg	
7.98 (1H, d, J=6.8Hz) NHAsp	1.88 (1H, m) HβArg
7.76 (2H, m) Ar	1.72 (1H, m) HβArg
7.37 (3H, m) Ar	1.50 (2H, m) HδArg
7.22 (1H, m) NH(Argω)	0.90 (3H, s) CH <sub>3</sub>
4.75 (1H, m) HαAsp	0.91 (3H, s) CH <sub>3</sub>
4.43 (1H, m) HαArg	
3.59 (1H, d, J=6.1Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.55 (1H, d, J=6.1Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.27 (1H, d, J=13.2Hz) CHγ-(β-Lactam)	
3.17 (1H, d, J=13.2Hz) CHγ-(β-Lactam)	
3.15 (2H, m) HδArg	
2.96 (1H, dd, J=7.0, 16.6Hz) HβAsp	

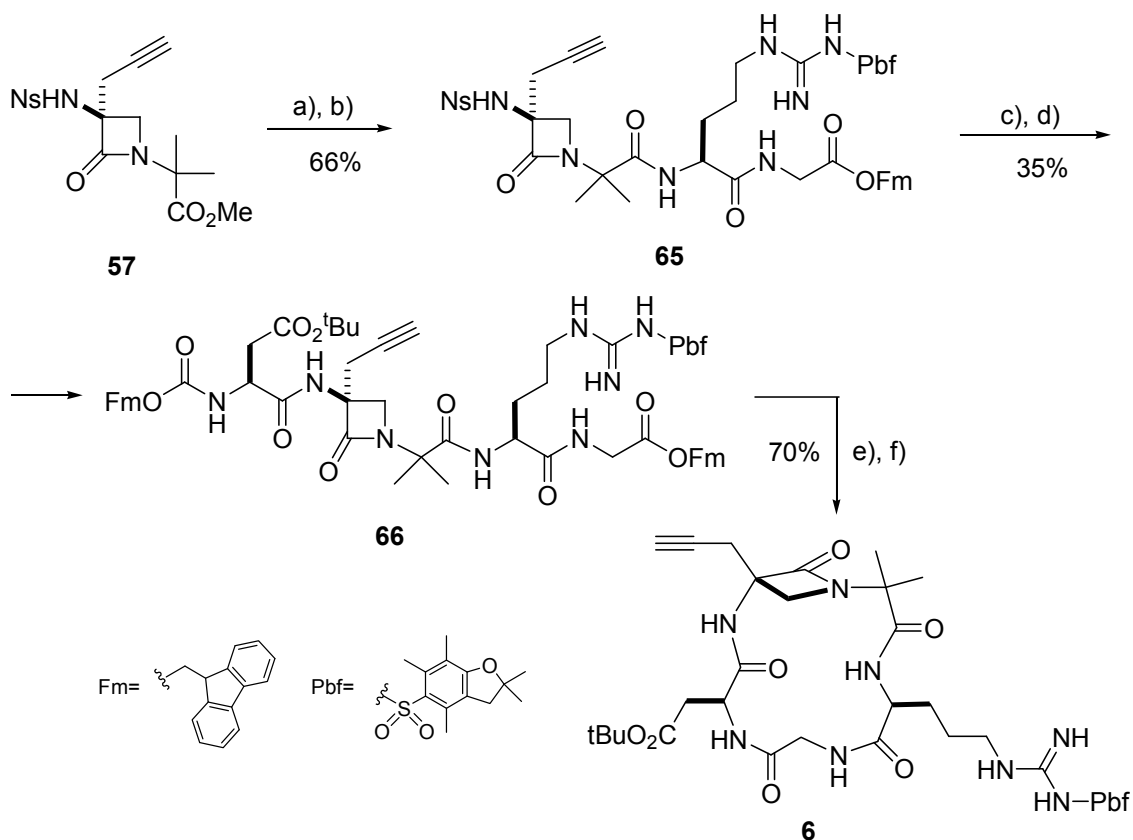
<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) MeOH<sub>d4</sub>

175.5	36.3
173.9	31.1
173.9	26.2
171.8	24.3
167.5	23.3
158.4	15.0
143.2	
135.0	
132.0	
129.2	
128.3	
127.2	
126.2	
68.1	
59.6	
59.7	
51.6	
41.4	
38.0	

Comentarios:

#### 4.6. Síntesis de ciclopeptidomiméticos RGD a partir de $\alpha$ -propargil- $\beta$ -lactamas:

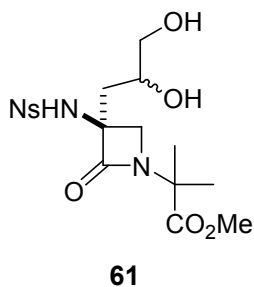
##### 4.6.1. Síntesis de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg-Gly-Asp] **6**:



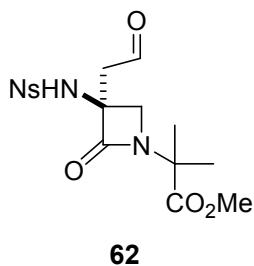
**Esquema 5.4:** a)  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$  (cat.), DABCO (cat.),  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 24h; b)  $\text{SiO}_2/\text{NaIO}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  a t.a., 1h; c)  $(\text{MeO})_2\text{P}(=\text{O})\text{C}(=\text{N}_2)\text{COMe}$  **63**,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 5h; d)  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 1.5h; b)  $\text{H-Arg}(\text{Pbf})\text{-Gly-OFm}$  **67**, EEDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a., 16h; c)  $\text{PhSH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeCN}/\text{DMSO}$  (10/1), t.a., 3h; d)  $\text{Fmoc-Asp}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-OH}$ ,  $\text{KHCO}_3$ , HATU, DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow$  t.a.; e) Piperidina,  $\text{KHCO}_3$ , DMF, t.a., 1h; f) HATU, HOAT,  $\text{KHCO}_3$ ,  $-10^\circ\text{C}$ , 16h.

##### 4.6.1.1. $\alpha$ -Propargil $\beta$ -lactama **57** a partir de la $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama **60**:

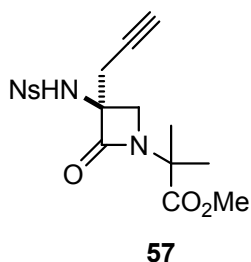
a) Dihidroxilación de la  $\alpha$ -alil- $\beta$ -lactama **60**: En un matraz previamente secado a la llama bajo atmósfera de nitrógeno y enfriado a  $0^\circ\text{C}$  se vertió una disolución de (S) 3-alil-1-2-metil-2(metoxycarbonil)propil]-3-(2-nitrobenenosulfonamido)-azetidin-2-ona **60** (1.56 g, 3.4 mmol) en  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (15/30 mL) sobre una mezcla de  $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$  (27 mg, 0.07 mmol), DABCO (116 mg, 3.4 mmol),  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (3.34 g, 10.1 mmol), y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.40 g, 10.1 mmol) en  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (15 mL). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 20h.



Transcurrido este tiempo se diluyó con EtOAc (25 mL) y se lavó consecutivamente con agua y una disolución saturada de NaCl (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo consistente en una mezcla diastereomérica del diol **61** que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación. Rendimiento: 0.98 g (65%).

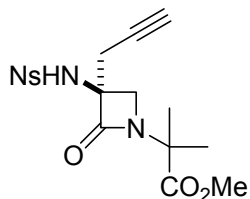


b) Oxidación a la  $\alpha$ -(formil-metil)- $\beta$ -lactama **62**: El diol  $\beta$ -lactámico **61** obtenido en la etapa anterior (0.98 g, 2.21 mmol) se diluyó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (40 mL), se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y a la disolución resultante se le añadió peryodato sódico sobre gel de sílice<sup>86</sup>  $\text{SiO}_2/\text{NaIO}_4$  (13.6 g). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 min a  $0^\circ\text{C}$  y otros 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró sobre celita y se evaporó el filtrado a presión reducida obteniéndose la  $\alpha$ -(formil)- $\beta$ -lactama **62** que se utilizó sin purificaren la siguiente etapa. Rendimiento: 0.89 g (95%).



c) Homologación aldehído-alquino: La  $\alpha$ -(formil)- $\beta$ -lactama **62** (0.89 g, 2.1 mmol) se disolvió en MeOH seco (30 mL), la disolución resultante se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se le añadieron  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.58 g, 4.2 mmol) y el fosfonato de Bestman-Ohira<sup>77</sup>  $(\text{MeO})_2\text{P}(=\text{O})\text{C}(=\text{N}_2)\text{COMe}$  **63** (0.60 mg, 3.15 mmol) previamente sintetizado. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5h dejando subir la temperatura lentamente hasta temperatura ambiente. Tras ello, la mezcla se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se diluyó en EtOAc (20 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 10 mL). Luego se secó el disolvente sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex. 1/1). Rendimiento: 516 mg (60%).

<sup>86</sup> Zhong, Y-L., Shing T. K. M., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 2622-2624.

**Ns- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-OMe**Referencia N°  
**57**

P.M. (g/mol)

409.41

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.7, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+41.9

Fórmula  
Empírica**C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 49.87

H 4.68

N 10.26

C 49.68

H 4.70

N 10.18

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

2970, 2120, 1785, 1735, 1736, 1459, 1361

MS m/z  
Ion polarity neg  
Ion source ESIMS1: 408.1(M<sup>+</sup>-1)  
MS2(408.1): 200.7(207.4); 136.9(271.2); 121.9(286.2)  
MS3(200.7): 136.8(63.9)<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

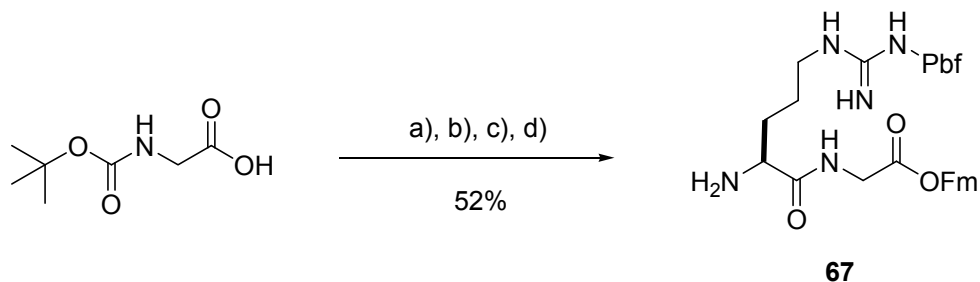
8.17-8.12 (m, 1H) Ar. Ns.  
 7.91-7.86 (m, 1H) Ar. Ns.  
 7.75-7.71 (m, 2H) Ar. Ns.  
 6.10 (s, 1H) NH( $\beta$ -Lactam)  
 3.76 (d, 1H, J= 5.6 Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)  
 3.70 (s, 3H) OMe  
 3.49 (d, 1H, J= 5.6 Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)  
 2.78 (d, 2H, J= 2.4Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)  
 2.08 (m, 1H) CH  
 1.62 (s, 3H) CH<sub>3</sub>  
 1.51 (s, 3H) CH<sub>3</sub>

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

173.2	66.5
164.4	59.5
147.8	52.9
135.6	52.5
133.9	29.9
133.5	25.3
133.3	24.2
131.1	24.1
130.1	
125.6	
73.2	

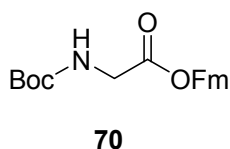
Comentarios:

#### 4.6.1.2. Preparación de H-Arg(Pbf)-Gly-OFm 67:



**Esquema 3.37:** a) *Fmoc*-OH, DCC, DMAP (cat.); b)  $\text{HCO}_2\text{H}$ , t.a., 1.5h; c) *Boc*-Arg(Pbf)-OH, HOBT, EDC·HCl,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 16h; d)  $\text{HCO}_2\text{H}$ , t.a., 1.5h.

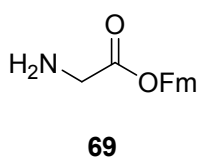
a) Preparación del *Boc*-Gly-OFm: A una disolución de *Boc*-Gly-OH (1.17g, 6.70 mmol)



en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30ml) se añadieron a temperatura ambiente y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , DCC (1.66 g, 8 mmol), Fm-OH (1.58g, 8 mmol) y DMAP (164mg, 1.34 mmol). La mezcla se agitó durante 6h a temperatura ambiente. Después, se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) y se

filtró sobre celita para eliminar el precipitado formado. El filtrado se lavó con HCl 0.5M (3 X 15 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó en rotavapor. El crudo obtenido se purificó en columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: EtOAc/Hex 1/4) obteniendo un aceite incoloro. Rendimiento: 2.0 g (85%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.60 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.42 (t, 2H,  $J = 7.5$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 7.34 (t, 2H,  $J = 7.5$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 4.45 (d, 2H,  $J = 7.1\text{Hz}$ ,  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.25 (t, 1H,  $J = 7.0$ ,  $J' = 14.5\text{ Hz}$ , H-Fm), 4.03 (sa, 2H,  $\text{OCH}_2\text{-Fm}$ ), 1.48 (s, 9H, tBu).

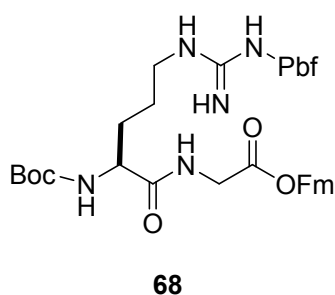
b) Desprotección de grupo *Boc*: Se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera de



$\text{N}_2$  una disolución de *Boc*-Gly-OFm (0.59 g, 1.67 mmol) en  $\text{HCO}_2\text{H}$  (9.5 ml) durante 2h. Después, la mezcla se evaporó, el residuo obtenido se diluyó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se basificó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo el producto con EtOAc (3 X 25 mL).

La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó en rotavapor. Obteniéndose un aceite incoloro. Rendimiento: 381 mg (90%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.59 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.42 (t, 2H,  $J = 7.5$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 7.34 (t, 2H,  $J = 7.5$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 6.09 (sa, 1H,  $\text{NH-CO}$ ), 4.46 (d, 2H,  $J = 7.1\text{Hz}$ ,  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.25 (t, 1H,  $J = 7.0$ ,  $J' = 14.5\text{ Hz}$ , H-Fm), 3.52 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{-Fm}$ ), 1.46 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

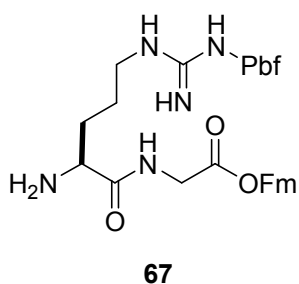
c) Acoplamiento peptídico con Boc-Arg(Pbf)-OH: En un matraz previamente secado a



la llama en atmósfera de nitrógeno se añadió una disolución de Boc-Arg(Pbf)-OH (527mg, 1.0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL). La disolución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se le añadieron consecutivamente una disolución de la amina H-Gly-OFm **69** (254 mg, 1.0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL), EDC·HCl (249 mg, 1.3 mmol), HOBt (202 mg, 1.5 mmol). La disolución se agitó a

$0^\circ\text{C}$  durante 30 min y a temperatura ambiente durante 20h. Transcurrido este tiempo se lavó la mezcla con una disolución 1 M de HCl (2 X 10 mL) y con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc/Hex: 3/1). Rendimiento: 570 mg (75%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.74 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.62 (sa, 1H, NH-Arg), 7.55 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.38 (t, 2H,  $J = 7.4$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 7.28 (t, 2H,  $J = 6.0$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 6.31 (sa, 1H, NH-Gly), 4.36 (d, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ ,  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.35 (m, 1H, Arg $\alpha$ ), 4.19 (t, 1H,  $J = 7.0$ ,  $J' = 14.5\text{ Hz}$ , H-Fm), 4.08 (dd,  $J = 17.4$ , 10.3, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fm}$ ), 3.29-3.22 (sa, 2H, Arg $\delta$ ), 2.91 (s, 2H, Pbf), 2.56 (s, 3H, Pbf), 2.49 (s, 3H, Pbf), 2.06 (s, 3H, Pbf), 1.89 (m, 1H, CH-Arg $\beta$ ), 1.69-1.62 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-Arg}\beta$ , CH-Arg $\beta$ ), 1.44 (s, 6H, Pbf), 1.40 (s, 9H, tBu).

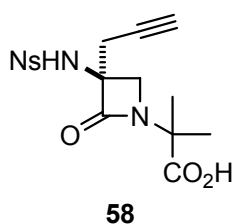
d) Desprotección del grupo Boc: Se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera



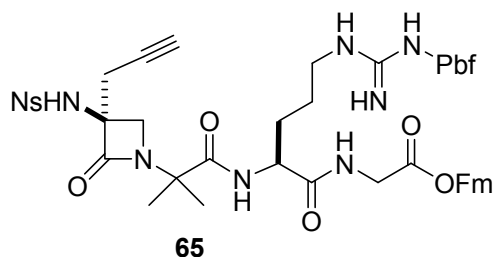
de  $\text{N}_2$  una disolución de Boc-Gly-OFm (290 mg, 0.4 mmol) en  $\text{HCO}_2\text{H}$  (8 ml) durante 3h. Después, la mezcla se evaporó, el residuo obtenido se diluyó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se basificó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo el producto con EtOAc (3 X 25 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó en rotavapor. Obteniéndose un aceite incoloro.

Rendimiento: 238 mg (90%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.13 (sa, 1H, NH-Arg), 7.74 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.55 (d, 2H,  $J = 7.5\text{Hz}$ , Fm), 7.38 (t, 2H,  $J = 7.4$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 7.29 (t, 2H,  $J = 6.0$ ,  $J' = 14.5\text{Hz}$ , Fm), 6.31 (sa, 3H, NH-Gly, NHArg $\omega$ ), 4.36 (d, 2H,  $J = 7.3\text{Hz}$ ,  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.18 (t, 1H,  $J = 7.0$ ,  $J' = 14.5\text{ Hz}$ , H-Fm), 4.08 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fm}$ ), 3.63 (m, 1H, Arg $\alpha$ ), 3.22 (sa, 2H, Arg $\delta$ ), 2.91 (s, 2H, Pbf), 2.56 (s, 3H, Pbf), 2.498 (s, 3H, Pbf), 2.06 (s, 3H, Pbf), 1.86 (m, 1H, CH-Arg $\beta$ ), 1.67 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-Arg}\beta$ , CH-Arg $\beta$ ), 1.44 (s, 6H, Pbf).

#### 4.6.1.3. Procedimiento para el acoplamiento peptídico de Ns-β-Lactam(propargil)-Aib-OH **58** con H-Arg(Pbf)-Gly-OFm **67**:

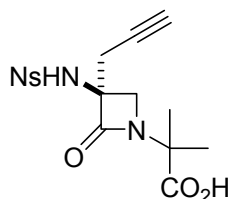


d) Saponificación del grupo  $\text{CO}_2\text{Me}$ : La metoxycarbonil-β-lactama **58** (516 mg, 1.26 mmol) se disolvió en THF (15 mL). La disolución se enfrió a 0°C y se le añadió una disolución de LiOH·H<sub>2</sub>O (265 mg, 6.3 mmol) en H<sub>2</sub>O (15 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Tras comprobar que la reacción ya había finalizado (TLC Hexano/EtOAc (1:1)) el producto se extrajo con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 X 15 mL) y las fases acuosas combinadas se acidificaron con HCl 0.1M. Seguidamente, se extrajo con EtOAc (3 X 15 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Tras evaporar el disolvente a presión reducida se obtuvo el ácido β-lactámico **58** crudo, que fue utilizado en la siguiente etapa sin purificar. Rendimiento: 473 mg (95%).



e) Acoplamiento peptídico: En un matraz previamente secado a la llama en atmósfera de nitrógeno se añadió una disolución del ácido β-lactámico **58** (473 mg, 1.2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL). La disolución se enfrió a -10°C y se le añadieron consecutivamente una disolución de la amina H-Arg(Pbf)-Gly-OFm **67** (0.8 g, 1.2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) y EEDQ (0.60 g, 2.4 mmol). La disolución se agitó a -10°C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 20h. Transcurrido este tiempo se lavó la mezcla con una disolución 1 M de HCl (2 X 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente EtOAc). Rendimiento: 873 mg (70%).



**Ns- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-OH**

Referencia N°

**58**

P.M. (g/mol)

395.39

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+7.5

Fórmula  
Empírica**C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 48.36

H 4.82

N 10.57

C 48.91

H 4.94

N 10.85

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

3340, 2119, 2940, 1735, 1712, 1450, 1353, 911, 728

MS m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 394.0(M<sup>+</sup>-1)

MS2(394.0): 191.8(202.2); 200.7(193.3); 346.9(47.1)

MS3(191.8): 147.8(44); 107.9(83.9)

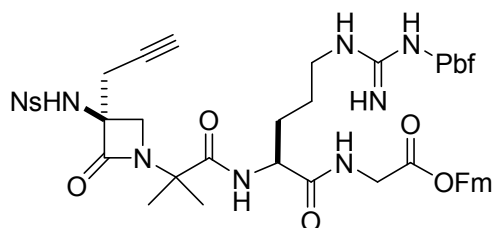
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.18-8.17 (m, 1H) Ar. Nos.  
 7.92-7.90 (m, 1H) Ar. Nos.  
 7.76-7.73 (m, 2H) Ar. Nos.  
 6.49 (s, 1H) NH(β-Lactam)  
 3.82 (d, 1H, J= 5.6 Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.56 (d, 1H, J= 5.6 Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 2.82 (d, 2H, J= 2.4Hz) CHγ-(β-Lactam)  
 2.09 (sa, 1H) CH  
 1.67 (s, 3H) CH<sub>3</sub>  
 1.56 (s, 3H) CH<sub>3</sub>

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

174.2	65.9
165.2	59.0
147.8	50.4
134.9	23.8
133.7	22.9
132.3	22.8
130.3	
124.6	
77.0	
72.0	

Comentarios:

**Ns-β-Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm**

Referencia N°

**65**

P.M. (g/mol)

1039.18

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

+17.5

Fórmula  
Empírica

Análisis Elemental

**C<sub>50</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>**

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 58.94

H 5.63

N 10.78

C 57.49

H 5.89

N 11.13

IR(cm<sup>-1</sup>, KBr)3344; 2987; 2912; 2122, 1748; 1664; 1616; 1546; 1344; 1264; 1169;  
1104; 988; 733; 592

MS m/z

Fuente ESI

Pol. negativa

MS1: 1037.5(M<sup>+</sup>-1)

MS2(1037.5): 859.2(178.3)

MS3(178.3): 293.0(566.2); 657.2(202); 253.0(606.2); 310.0(549.2)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

8.25 (d, 1H, J=8.2Hz) Ar.Ns  
 7.85 (d, 1H, J=7.8Hz) Ar.Ns  
 7.79 (m, 13H) Ar.Ns; Fmoc  
 7.66 (m, 2H) Ar.Ns.; NHGly  
 7.60-7.58 (m, 2H) Fmoc  
 7.42-7.36 (m, 3H) Fmoc, NHArg  
 7.31-7.30 (m, 2H) Fmoc  
 6.19 (sa, 1H) NH(β-Lactam)  
 6.08 (sa, 2H) NH(Argω)  
 4.56 (m, 1H) HαArg  
 4.42-4.34 (m, 2H) COCH<sub>2</sub>OFmoc  
 4.23 (t, 1H, J=4.2Hz) CHFmoc  
 4.12 (m, 2H) Gly  
 3.79 (d, 1H, J=3.7Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.68 (d, 1H, J=3.7Hz) CHβ-(β-Lactam)  
 3.24 (m, 2H) HδArg  
 2.93 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf  
 2.77-2.74 (m, 2H, J=7.6Hz) CHγ-(β-Lactam)

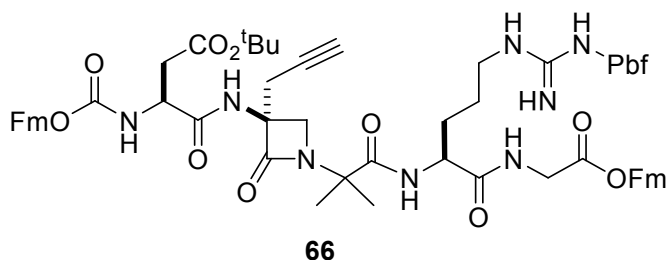
2.57 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.50 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.22 (sa, 1H)  
 CH(propargilo)  
 2.08 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf  
 2.01-1.83 (m, 2H)  
 HβArg  
 1.63 (m, 2H) HγArg  
 1.60 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Aib  
 1.51 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Aib  
 1.46 (s, 6H)  
 2xCH<sub>3</sub>Pbf

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) CDCl<sub>3</sub>

172.8	117.5
172.4	86.4
169.9	73.4
165.2	67.4
158.7	66.4
156.3	60.3
147.3	53.3
143.4	52.2
141.2	46.6
138.3	43.2
134.8	41.3
133.9	40.5
133.7	29.1
133.6	28.6
133.0	25.7
132.3	24.7
130.8	24.2
127.9	24.0
127.2	19.3
125.2	17.9
124.6	12.5
120.0	

Comentarios:

#### 4.6.1.4. Procedimiento para el acoplamiento peptídico de Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH y la amina H- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm:



##### a) Preparación de la amina

libre: Sobre una mezcla de Ns- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm **65** (0.87 g, 0.84 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/DMSO (25/2.5mL), se añadieron a

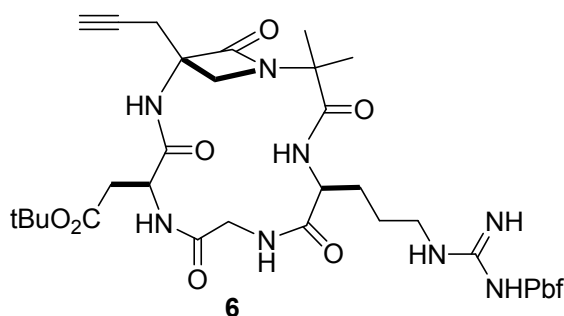
temperatura ambiente tiofenol (0.17 mL, 1.68 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (118 mg, 0.84 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó (entre 1-3 h, seguimiento por TLC y <sup>1</sup>H NMR). Después se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en exceso y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 15 min, tras los cuales se filtró sobre celita a vacío. Finalmente el filtrado se evaporó en un rotavapor obteniéndose el intermedio H- $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm que fue empleado sin purificación adicional en la etapa siguiente.

b) Acoplamiento peptídico: La amina anteriormente preparada ( $\approx$  0.84 mmol) se disolvió en DMF destilada y seca (70 mL) y se enfrió a 0°C con un baño de agua-hielo. A la disolución resultante se le añadió Fmoc-Arg(Pbf)-OH (380 mg, 0.90 mmol), KHCO<sub>3</sub> (421 mg, 4.2 mmol), y finalmente HATU (383 mg, 1.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16h dejando que la temperatura subiera lentamente hasta temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se lavó consecutivamente con HCl 0.1M (2 X 20 mL), una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL) y una disolución saturada de NaCl (1 X 20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (eluyente EtOAc). Rendimiento: 367 mg (35%).



#### 4.6.1.5. Síntesis de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)] 6:

a) Desprotección: Sobre una disolución del péptido lineal Fmoc-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam-



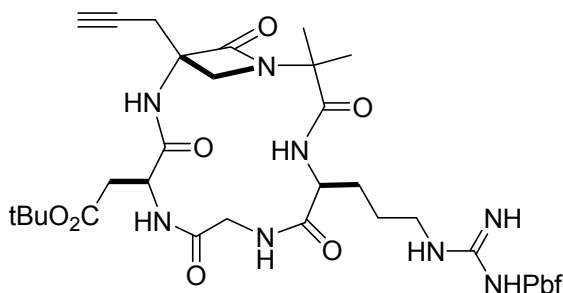
(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OFm **66**

(150 mg, 0.12 mmol) en DMF destilado (10 mL) se añadió piperidina (0.89 mL, 9 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera de  $N_2$  durante 1h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN ( $MeOH_{d4}$ ) para

comprobar que la reacción había finalizado, la mezcla se evaporó a temperatura ambiente y presión reducida obteniendo el precursor lineal desprotegido. Luego se volvió a disolver en DMF y se volvió a evaporar hasta eliminar completamente el exceso de piperidina.

b) Ciclación: El péptido H-Asp(OtBu)- $\beta$ -Lactam-(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-OH (102 mg, 0.12 mmol) libre de piperidina se disolvió en DMF (125 mL) grado Biotech y se enfrió a  $-15^\circ C$  en un criogenizador. Se añadieron consecutivamente  $KHCO_3$  (123 mg, 1.3 mmol), HOAT (32 mg, 0.23 mmol) y HATU (68 mg, 0.19 mmol) y la mezcla se agitó a  $-15^\circ C$  durante 24h. Después, la mezcla se evaporó a presión reducida sin calentar el baño y sin dejar que se secase completamente. El residuo obtenido se diluyó en EtOAc (30 mL) y se lavó consecutivamente con agua destilada (1 X 10 mL), HCl 0.1M (2 X 10 mL) y con una disolución acuosa saturada de  $NaHCO_3$  (2 X 20 mL). La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa (eluyente  $MeOH/CH_2Cl_2$  1/10). Rendimiento: 70 mg, 0.08 mmol (70%).

**ciclo-[β-Lactam(propargil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**



Referencia N°  
**6**

P.M. (g/mol)

828.97

Punto Fusión (°C)

aceite

$[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.9, MeOH)

-9.0

Fórmula Empírica	I) Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 56.51	H 6.81	N 13.52	C 55.96	H 6.93	N 12.97

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

3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 2125, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095

MS\* m/z

Fuente ESI

Pol. positiva

MS1: 829.4 (M\*)

MS2(829.5): 773.5(56.1); 503.3(326.2)

MS3(503.3): 459.3(44); 486.2(17.1); 475.2(28); 444.2(59.1)

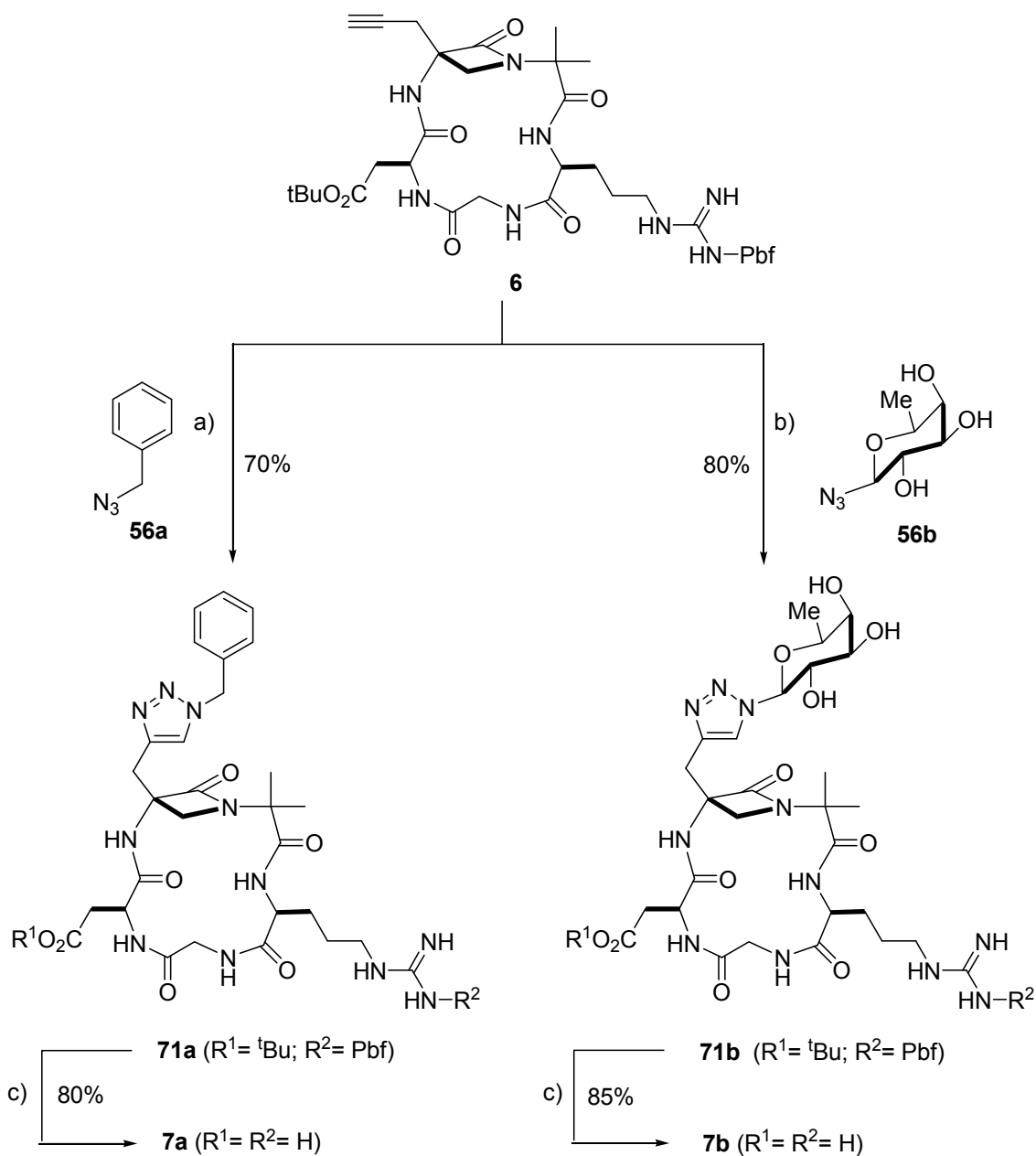
<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.43 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.02 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
8.35 (sa, 1H) NHGly	1.68 (m, 1H) HβArg
8.19 (d, 1H, J=8.2Hz) NHAsp	1.52 (m, 1H) HβArg
7.56 (d, 1H, J=7.6Hz) NHArg	1.52 (s, 3H) CH <sub>3</sub>
6.64-6.37 (sa, 3H) NHArgω	1.42 (s, 6H) 2xCH <sub>3</sub> Pbf
4.54 (m, 1H) HαAsp	1.38 (s, 9H) <sup>t</sup> Bu
4.27 (m, 1H) HαArg	1.36 (m, 2H) HδArg
3.96 (dd, 1H, J= 4.0, 14.7Hz) Gly	1.33 (s, 3H) CH <sub>3</sub>
3.64 (d, 1H, J=3.6Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.57 (d, 1H, J=3.6Hz) CHβ-(β-Lactam)	
3.30 (m, 1H) Gly	
3.04 (m, 2H) HδArg	
2.97 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf	
2.90 (m, 1H) CHγ-(β-Lactam)	
2.65 (m, 1H) HβAsp	
2.59 (d, 1H) CHγ-(β-Lactam)	
2.48 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf	
2.43 (s, 4H) CH <sub>3</sub> Pbf, HβAsp	
2.08 (sa., 1H) CH(propargilo)	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) MeOH<sub>d4</sub>

174.7	45.0
174.6	43.9
173.1	41.4
172.2	37.0
171.0	29.0
167.7	28.7
159.8	28.3
158.0	24.1
139.3	23.0
134.2	19.6
133.5	18.4
118.4	12.5
87.7	
82.6	
78.6	
72.7	
66.1	
61.2	
55.3	
51.9	
50.7	
45.8	

#### 4.6.1.6. Procedimiento general para la preparación de 1,2,3-triazoles 1,4 disustituídos 71a-b:

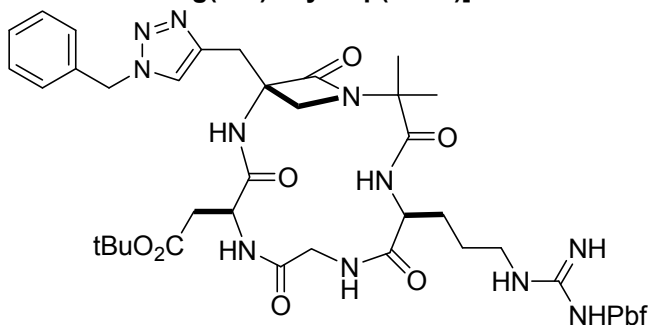


**Esquema 4.5:** a) **56a**,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.2M, Ascorbato de Na 1M,  $tBuOH/H_2O/THF$  (1/1/1); b) **56b**,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.2M, Ascorbato de Na 1M,  $tBuOH/H_2O/THF$  (1/1/1); c) TFA, 32°C, 1h. c) TFA, 32°C, 1h, luego  $iPr_2O$ .

**Procedimiento general:** Sobre una disolución del ciclopéptido RGD **6** (47 mg, 0.06 mmol) y la correspondiente azida **56a** o **56b** (0.06 mmol) en una mezcla de  $THF/tBuOH/H_2O$  (2/2/2 mL) purgada con  $N_2$ , se añadieron una disolución 0.2M de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (57  $\mu L$ , 0.011 mmol) y 1M de ascorbato sódico (23  $\mu L$ , 0.023 mmol) en

agua purgada con N<sub>2</sub>. La mezcla que tomó color amarillo se agitó a temperatura ambiente durante 24h. Pasado este tiempo, se añadió EtOAc (5 mL) y la mezcla se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido, de color verdoso, se volvió a diluir con EtOAc (10 mL) y se lavó consecutivamente con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (1 X 10 mL), con una disolución saturada en NaHCO<sub>3</sub> (2 X 20 mL) y con una disolución saturada en NaCl (2 X 20 mL). La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en placa fina preparativa (eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/7). Rendimientos: **71a**: 45 mg (70%) y **72b**: 46 mg (80%).



**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(1-bencil-1,2,3-triazol-4-il-metil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**Referencia N°  
**71a**

P.M. (g/mol)

962.13

Punto Fusión (°C)

aceite

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

-8.0

Fórmula  
Empírica**C<sub>46</sub>H<sub>63</sub>N<sub>11</sub>O<sub>10</sub>S**

Análisis Elemental

Calculado (%)

Encontrado (%)

C 57.42

H 6.60

N 16.01

C 56.78

H 6.82

N 15.80

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

3361, 2945, 1740, 1653, 1462, 915, 730

MS m/z

MS1: 962.5(M<sup>+</sup>+1)

Fuente ESI

MS2: 636.3(326.3); 906.4(56.2); 637.3(325.3)

Pol. positiva

MS3(636.3): 619.3(17); 608.3(28); 535.3(101); 591.3(45)

<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , ppm) DMSO-d<sub>6</sub>

8.38 (sa, 2H) NHGly, C=CH-N

8.14 (d, 1H, J=8.2Hz) NHAsp

7.91 (s, 1H) NH( $\beta$ -Lactam)

7.41 (d, 1H, J=8.7Hz) NHArg

7.36-7.32 (m, 5H) Ar

6.74-6.45 (sa, 3H) NH(Arg $\omega$ )5.58 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Ph4.56 (m, 1H) H $\alpha$ Asp4.25 (m, 1H) H $\alpha$ Arg

3.99 (dd, 1H, J= 6.7, 14.5Hz) Gly

3.57 (d, 1H, J=5.8Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)3.55 (d, 1H, J=13.4Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)3.41 (d, 1H, J=5.8Hz) CH $\beta$ -( $\beta$ -Lactam)

3.32 (m, 1H) Gly

3.03 (d, 1H, J=13.4Hz) CH $\gamma$ -( $\beta$ -Lactam)3.02 (m, 2H) H $\delta$ Arg2.98 (s, 2H) CH<sub>2</sub>Pbf

2.69 (dd, 1H, J=8.8, 16.1Hz)

H $\beta$ Asp2.49 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf2.44 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf2.45(overload, 1H) H $\beta$ Asp2.03 (s, 3H) CH<sub>3</sub>Pbf1.63 (m, 1H) H $\beta$ Arg1.51 (m, 1H) H $\beta$ Arg1.43 (s, 6H) 2x CH<sub>3</sub>Pbf1.39 (s, 9H) <sup>t</sup>Bu1.34 (m, 2H) H $\delta$ Arg1.17 (s, 3H) CH<sub>3</sub>1.03 (s, 3H) CH<sub>3</sub><sup>13</sup>C-NMR ( $\delta$ , ppm) MeOH-d<sub>4</sub>

172.7

117.4

172.2

86.7

171.2

81.4

170.5

65.9

166.6

59.3

158.9

54.1

157.0

51.0

142.1

49.6

138.4

43.7

135.9

43.0

133.4

35.9

132.5

28.3

129.2

27.8

128.7

27.5

128.7

27.5

128.6

27.4

128.6

22.7

128.5

21.8

128.4

18.7

125.0

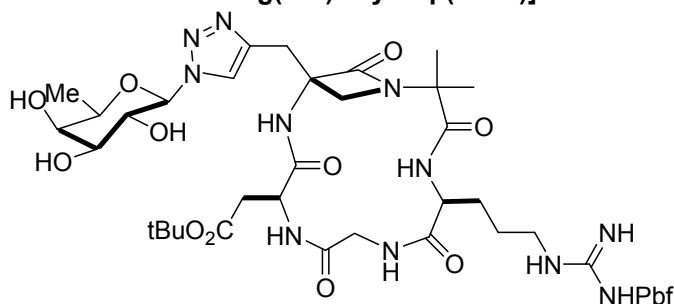
17.5

124.4

11.6

Comentarios:

**ciclo-[β-Lactam(1-β-(D)-fucosil-1,2,3-triazol-4-il-metil)-Aib-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)]**



Referencia N°  
**71b**

P.M. (g/mol)

1018.14

Punto Fusión (°C)

aceite

$[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.2, MeOH)

-11

Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 53.08	H 6.63	N 15.13	C 54.32	H 6.65	N 15.59

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

3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095

MS\* m/z  
Fuente ESI  
Pol. positiva

MS1: 829.4 (M\*)  
MS2(829.5): 773.5(56.1); 503.3(326.2)  
MS3(773.5): 503.3(270)  
MS4(503.3): 459.3(44); 486.2(17.1); 475.2(28); 444.2(59.1)

<sup>1</sup>H-NMR (δ, ppm) DMSO<sub>d6</sub>

8.49 (sa, 1H) NHGly	2.96 (s, 2H) CH <sub>2</sub> Pbf
8.38 (s, 1H) NH(β-Lactam)	2.67 (m, 1H) CHβAsp
8.30 (d, 1H, J=7.9Hz) NHAsp	2.47 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
7.89 (s, 1H) C=CH-N	2.41 (s, 4H) CH <sub>3</sub> Pbf,
7.52 (d, 1H, J=7.8Hz) NHArg	CHβAsp
6.64-6.37 (sa, 2H) NH(Argω)	2.00 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Pbf
5.43 (d, 1H) H1-fucosa	1.63 (m, 1H) CHβArg
4.56 (m, 1H) HαAsp	1.51 (m, 1H) CHβArg
4.24 (m, 1H) HαArg	1.41 (s, 6H) 2XMePbf
3.94 (m, 1H) Gly	1.38 (s, 9H) <sup>t</sup> Bu
3.86 (m, 2H) H2-H5-fucosa	1.29 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib
3.59 (d, 1H, J=5.4Hz) CHβ-(β-Lactam)	1.23 (sa, 2H) CH <sub>2</sub> δArg
3.54 (m, 2H) H3-H4-fucosa	1.13 (d, 3H, J=6.2Hz)
3.46 (d, 1H, J=14.4Hz) CHγ-(β-Lactam)	CH <sub>3</sub> -fucosa
3.33 (m, 2H) CHβ-(β-Lactam); Gly	1.06 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib
2.99 (m, 3H) CH <sub>2</sub> δArg, CHγ-(β-Lactam)	

<sup>13</sup>C-NMR (δ, ppm) MeOH<sub>d4</sub>

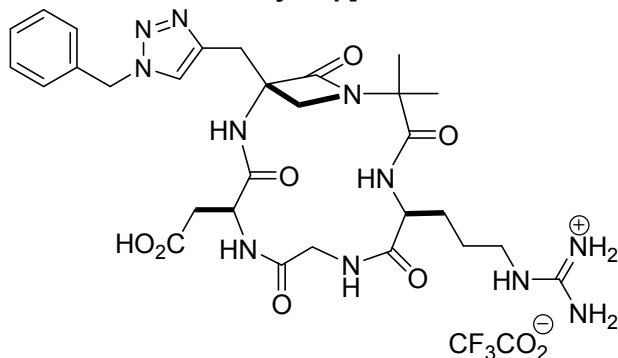
173.4	66.1
172.3	59.6
171.5	53.8
170.3	51.1
167.0	43.9
158.9	43.0
141.6	36.0
138.4	29.8
133.3	27.8
132.5	27.4
125.0	22.8
123.1	22.0
117.5	18.6
89.1	17.4
86.7	15.9
81.6	11.6
74.6	
74.3	
72.0	
70.1	

**4.6.1.7. Procedimiento general de la síntesis de las sales trifluoroacéticas de *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(1-alkyl-1,2,3-triazol-4-yl-methyl)-Aib-Arg-Gly-Asp] 7a-b:**

Los compuestos **7a** y **7b** se prepararon aplicando los procedimientos **5.4.1.4.** y **5.4.1.5.**

Se agitó una disolución de *ciclo*-[Asp(OtBu)-[( $\beta$ -Lactam(propargyl)-Arg(Pbf)-Gly] **71a** y **71b** (40 mg, 0.042 mmol **71a**, 0.039 mmol **71b**) en ácido trifluoroacético (2.0 mL) a 35 °C y durante 2h. Pasado ese tiempo, se adicionó diisopropiléter (15 mL) a 0°C para hacer precipitar el producto final y la suspensión se centrifugó. El residuo se lavó con más diisopropiléter (2 X 10 mL) y el producto se secó a presión reducida. Los rendimientos calculados con un equivalente de ácido trifluoroacético: **7a**: 26 mg (80%) y **7b**: 27 mg (85%).

**ciclo-[β-Lactam(1-bencil-1,2,3-triazol-4-il-metil)-Aib-Arg-Gly-Asp]**



Referencia N°  
**7a**

P.M. (g/mol)  
767.71

Punto Fusión (°C)  
Desc. 228-232

$[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.2, MeOH)  
-11

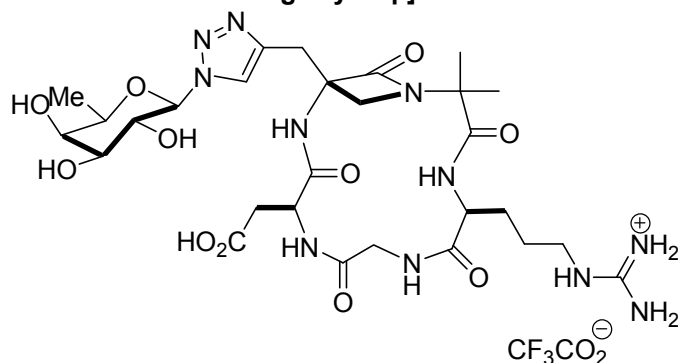
Fórmula Empírica	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 48.50	H 5.25	N 20.07	C 48.17	H 5.10	N 19.53

IR(cm <sup>-1</sup> , KBr)	3427, 3326, 2974, 2970, 2965, 1728, 1648, 1547, 1261, 1095
----------------------------	--

MS* m/z	MS1=653.7(M*-CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )
Fuente ESI	MS2(653.7)= 636.6(17.1); 608.7(45); 506.6(147)
Pol. positiva	MS3(636.6)= 619.6(17.1); 464.6(172); 420.6(216)

<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9/1)		<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9/1)	
8.45 (sa, 2H) NH(β-Lactam), NHGly	1.68 (m, 2H) CH <sub>2</sub> βArg	174.3	27.1
8.30 (d, 1H, J=8.4Hz) NHAsp	1.40 (s, 6H) 2XCH <sub>3</sub> Pbf	173.8	26.9
7.86 (s, 1H) C=CH-N	1.52 (m, 2H) CH <sub>2</sub> γArg	173.4	24.4
7.72 (d, 1H, J=7.3Hz) NHArg	0.98 (s, 6H) 2XCH <sub>3</sub>	171.8	22.2
7.35-7.32 (m, 5H) Ar		171.2	21.5
7.09 (sa, 2H) NH(Argω)		166.8	
5.52 (m, 2H) CH <sub>2</sub> Ph		157.0	
4.60 (m, 1H) HαAsp		141.5	
4.20 (m, 1H) HαArg		135.0	
3.96 (dd, 1H, J= 7.0, 15.6Hz) Gly		128.4	
3.47 (dd, 1H, J=5.2, 15.4Hz) Gly		124.9	
3.41 (s, 2H) CHβ-(β-Lactam)		71.7	
3.33 (d, 1H, J=15.1Hz) CHγ-(β-Lactam)		65.4	
3.11 (d, 1H, J=15.1Hz) CHγ-(β-Lactam)		59.6	
3.10 (m, 2H) CH <sub>2</sub> δArg		54.1	
2.85 (dd, 1H, J=7.6,17.2Hz) CHβAsp		48.9	
2.65 (dd, 1H, J=6.7,17.4Hz) CHβAsp		43.9	
		40.7	
		34.1	

Comentarios:

**ciclo-[ $\beta$ -Lactam(1- $\beta$ -fucosa-4-bencil-azatriazol)-Aib-Arg-Gly-Asp]**Referencia N°  
**7b**

P.M. (g/mol)

823.73

Punto Fusión (°C)

Desc. 225-230

 $[\alpha]_D^{25}$  (c= 0.2, MeOH)

-9.0

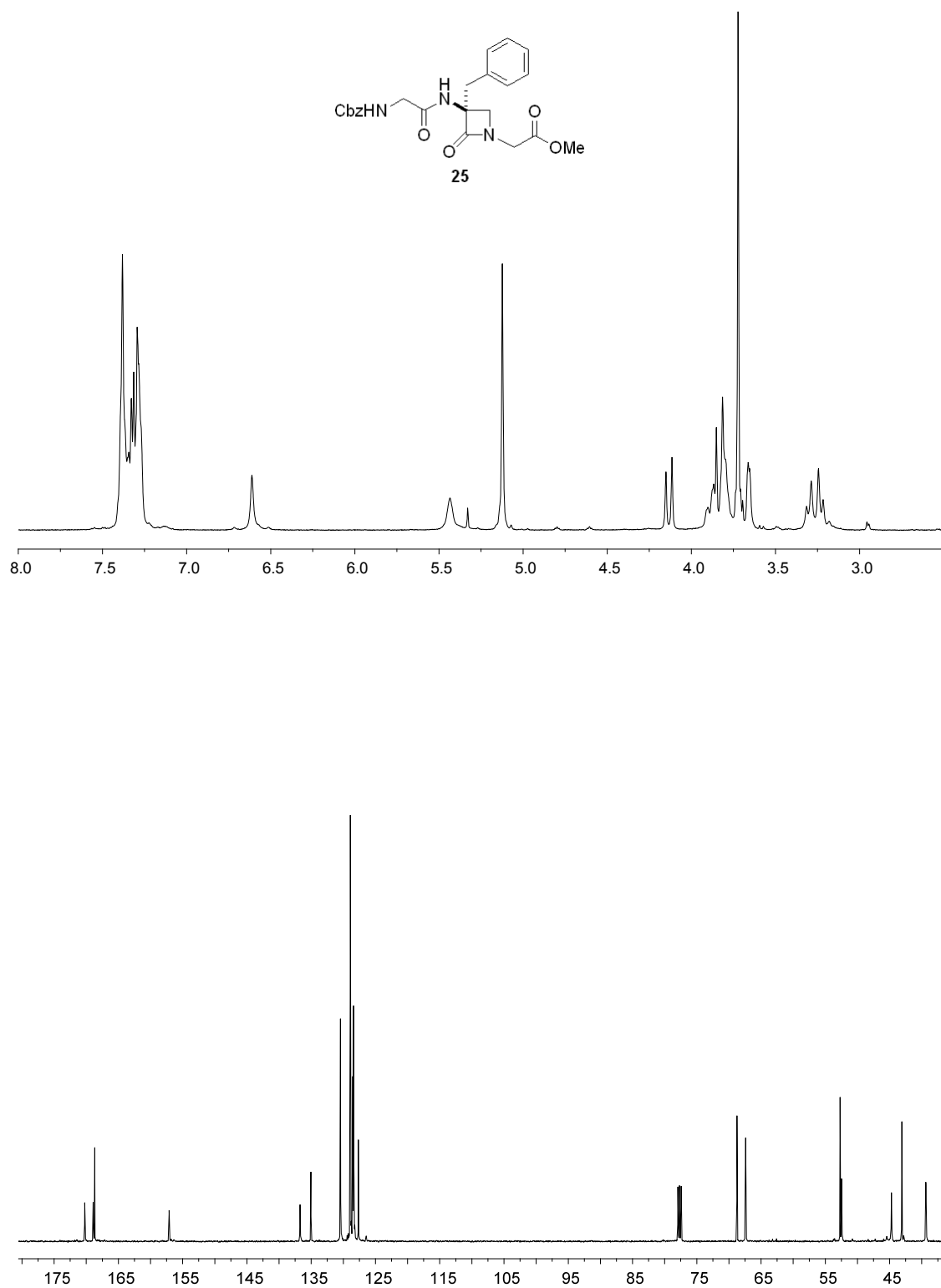
Fórmula Empírica  <b>C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>F<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub></b>	Análisis Elemental					
	Calculado (%)			Encontrado (%)		
	C 43.74	H 5.38	N 18.70	C 43.52	H 5.40	N 17.92
IR(cm <sup>1</sup> , KBr)	3433, 3340, 2976, 2968, 2960, 1730, 1651, 1545, 1260, 1098					
MS* m/z Fuente ESI Pol. positiva	MS: 709.7(M*-CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H) MS2(709.7): 691.7(18); 681.7(28); 664.7(45); 464.6(245.1)					
<sup>1</sup> H-NMR (δ, ppm) H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9/1)			<sup>13</sup> C-NMR (δ, ppm) H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (9/1)			
8.46 (t, 1H, J=6.2Hz) NHGly			174.3			
8.44 (s, 1H) NH(β-Lactam)			34.1			
8.35 (d, 1H, J=7.8Hz) NHAsp			27.1			
8.07 (s, 1H) CH=C-N			26.9			
7.77 (d, 1H, J=7.5Hz) NHArg			24.4			
7.09 (sa, 2H) NH(Argω)			22.2			
5.57 (d, 1H, J=9.4Hz) H-fucosa			21.5			
4.68 (m, 1H) HαAsp						
4.24 (m, 1H) HαArg						
4.14 (m, 1H) H-fucosa						
4.01 (m, 1H) H-fucosa						
3.97 (m, 1H) Gly						
3.83 (m, 2H) CHβ-(β-Lactam)						
3.78 (m, 1H) CHβ-(β-Lactam)						
3.50 (m, 1H) H-fucosa						
3.48 (m, 1H) Gly						
3.40 (d, 1H, J=15.0Hz) CHγ-(β-Lactam)						
3.26 (d, 1H, J=15.0Hz) CHγ-(β-Lactam)						
3.11 (m, 2H) CH <sub>2</sub> δArg						
2.91 (dd, 1H, J=7.6, 17.3Hz) CHβAsp						
2.69 (dd, 1H, J=7.6, 17.3Hz) CHβAsp						
1.71 (m, 2H) CH <sub>2</sub> γArg						
1.52 (m, 2H) CH <sub>2</sub> βArg						
1.34 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib						
1.20 (s, 3H) CH <sub>3</sub> (fucosa)						
1.19 (s, 3H) CH <sub>3</sub> Aib						

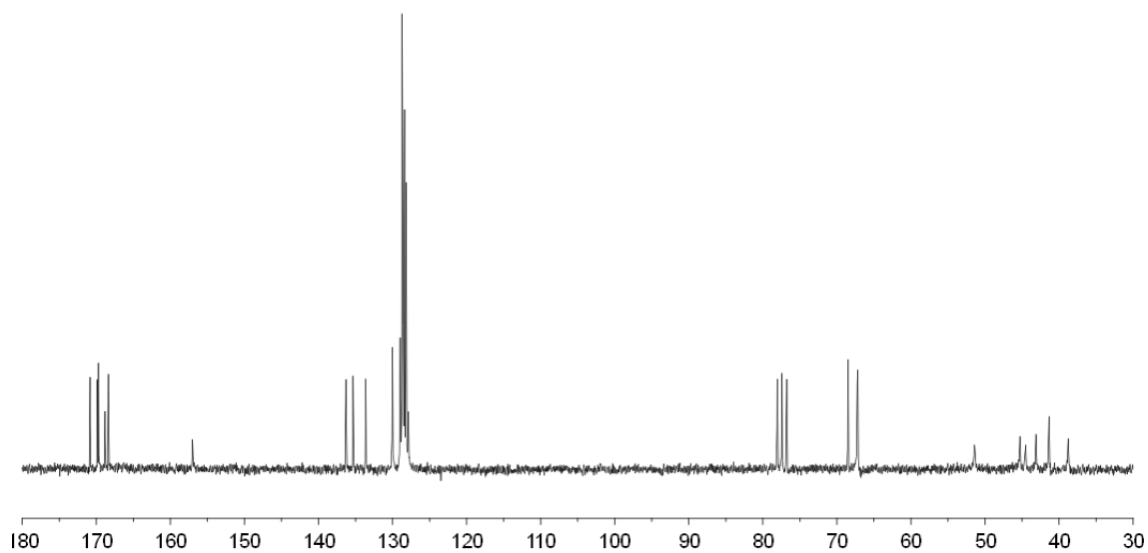
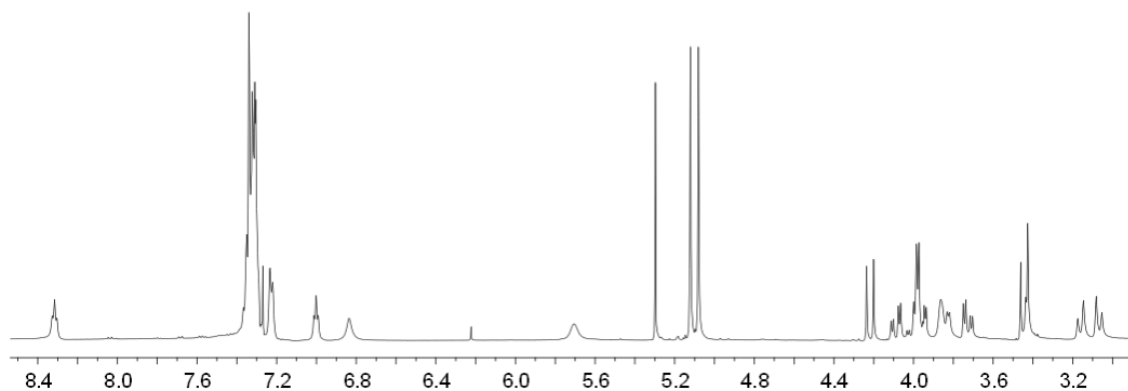
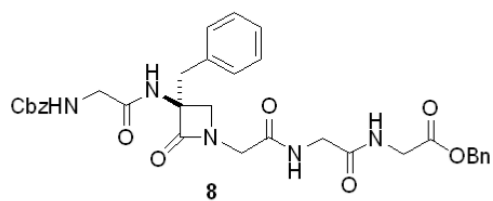


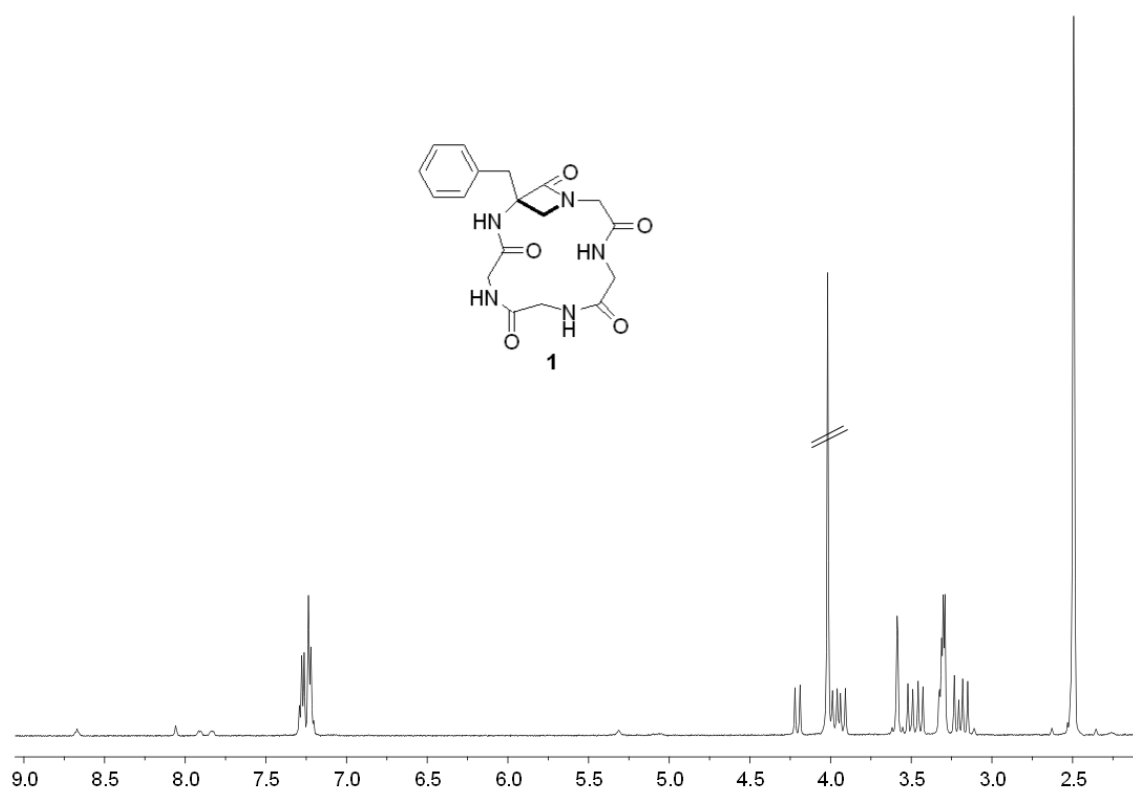
## **5. ANEXOS**

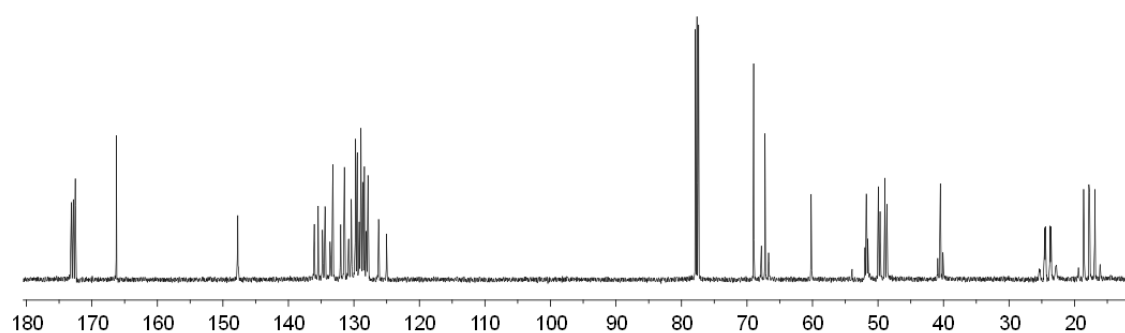
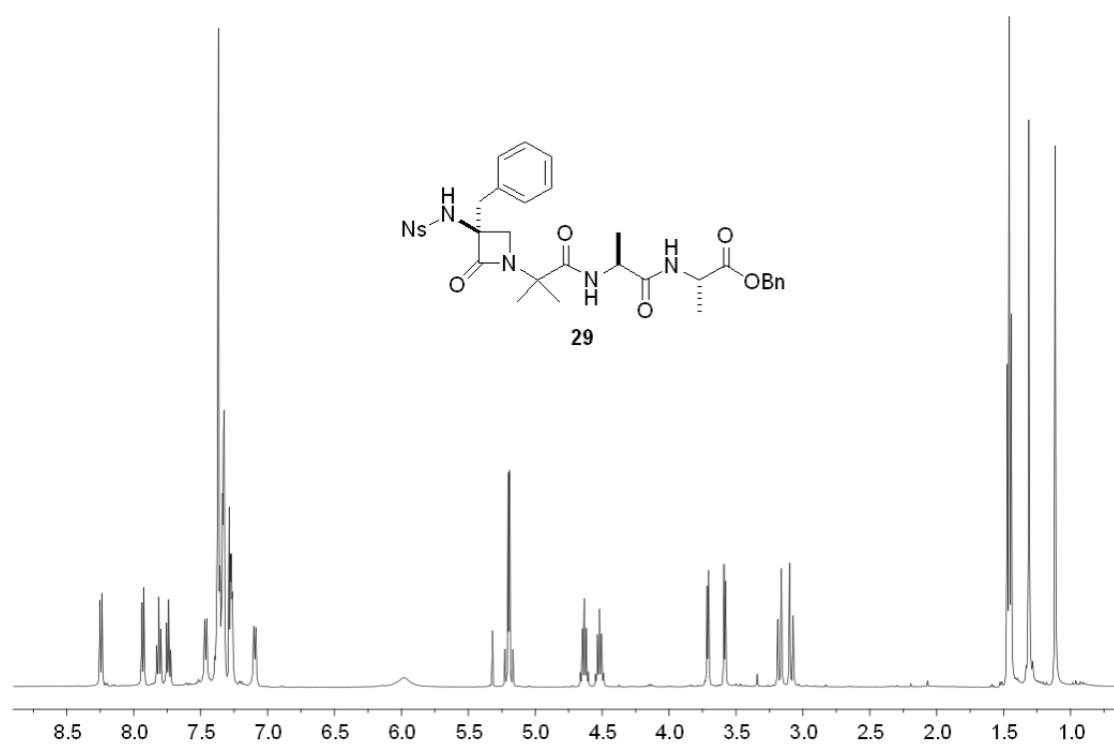


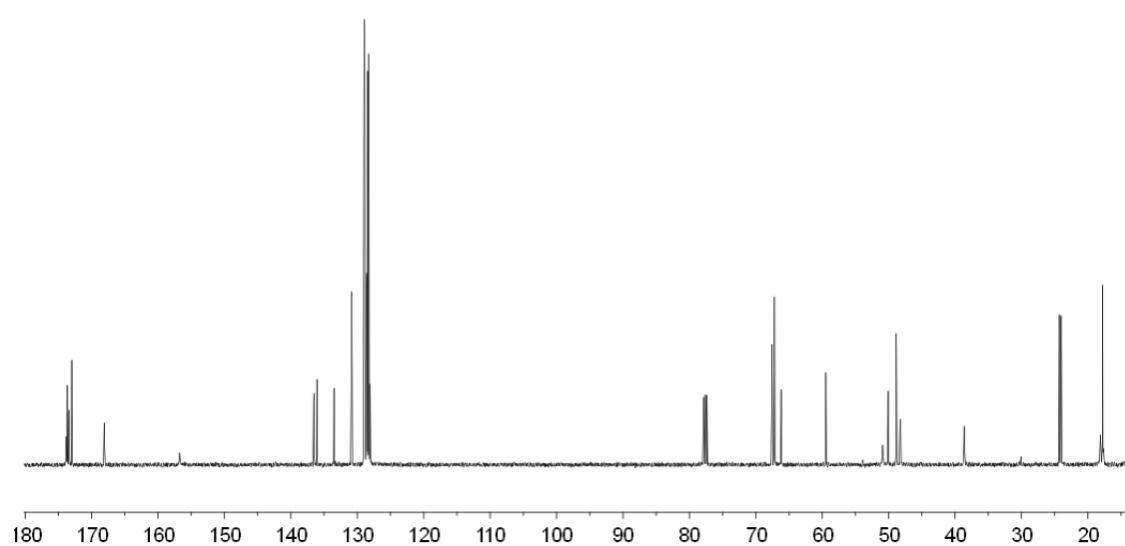
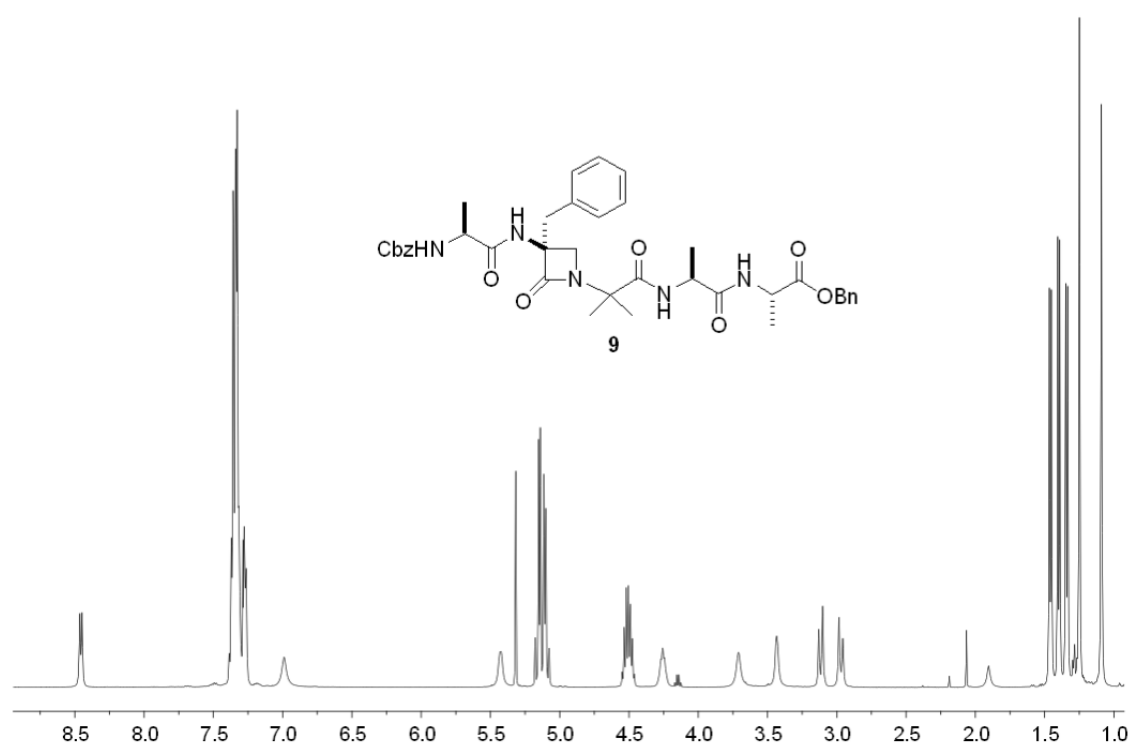


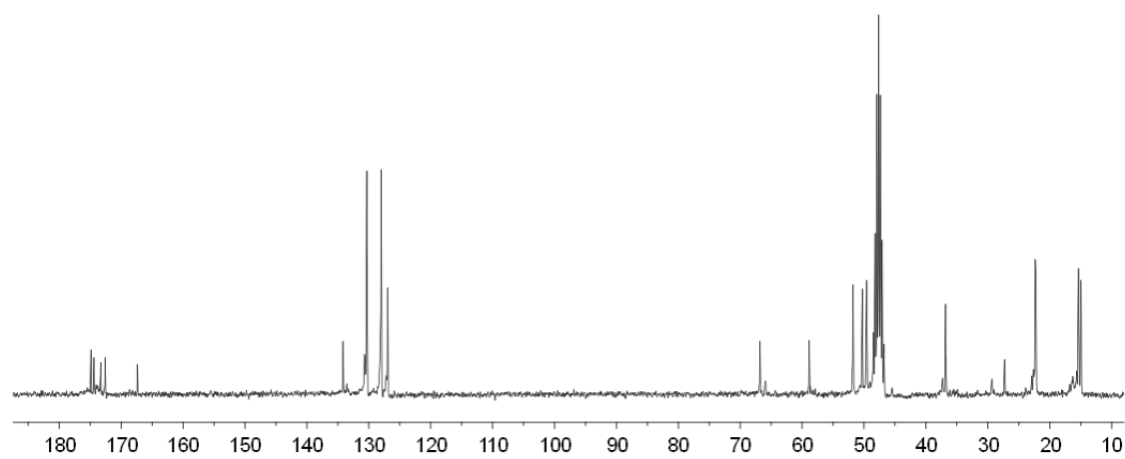
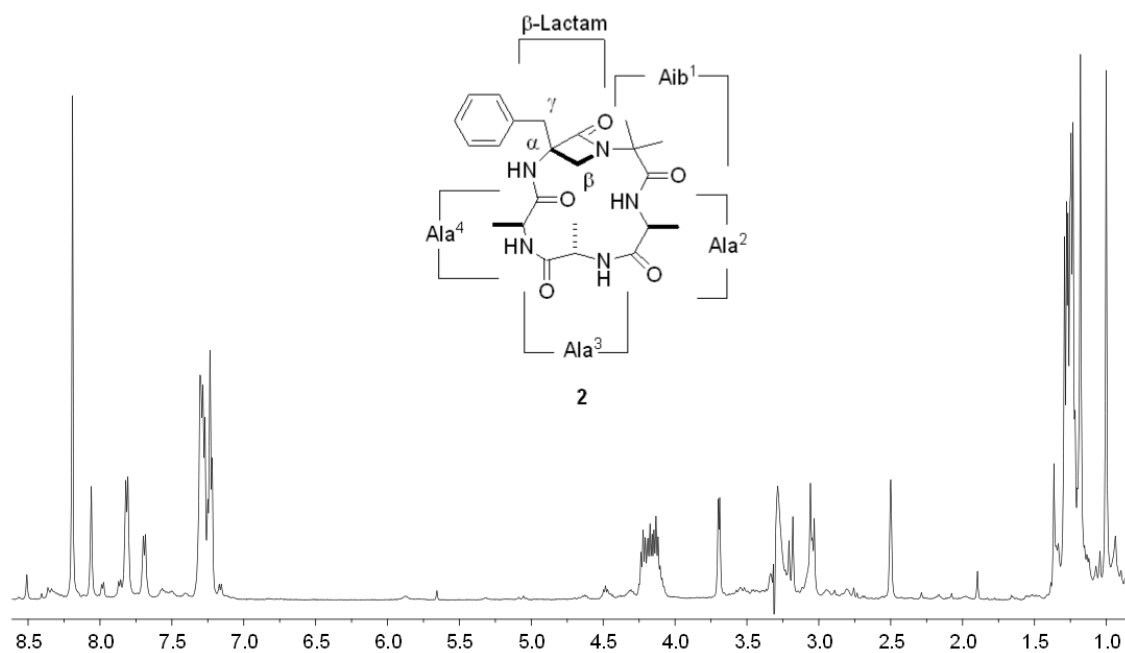
**5.1. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN:**

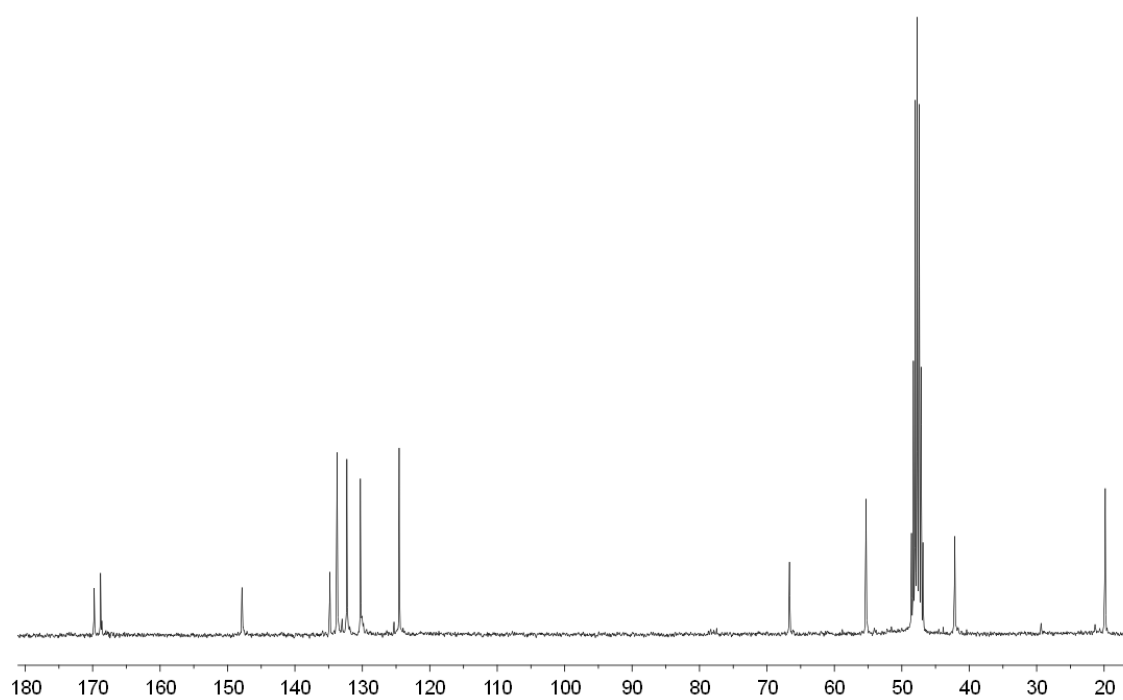
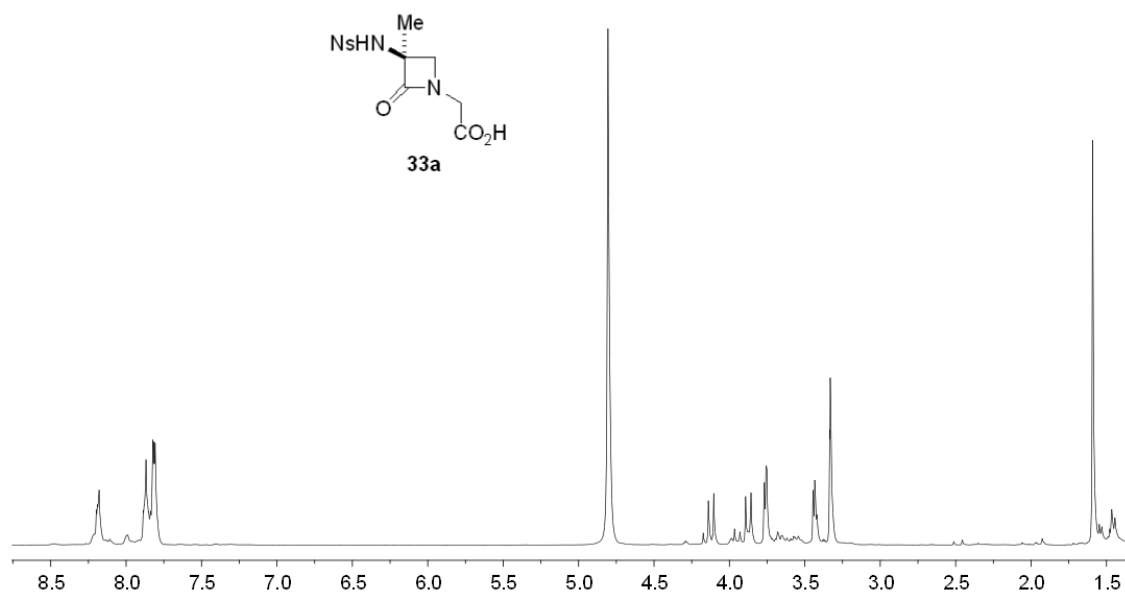


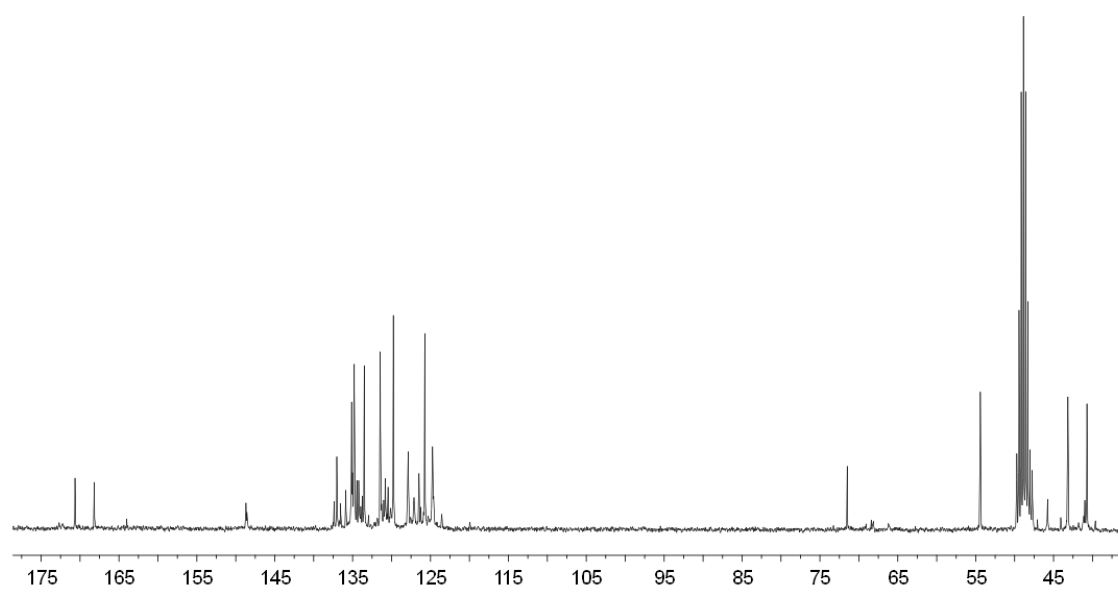
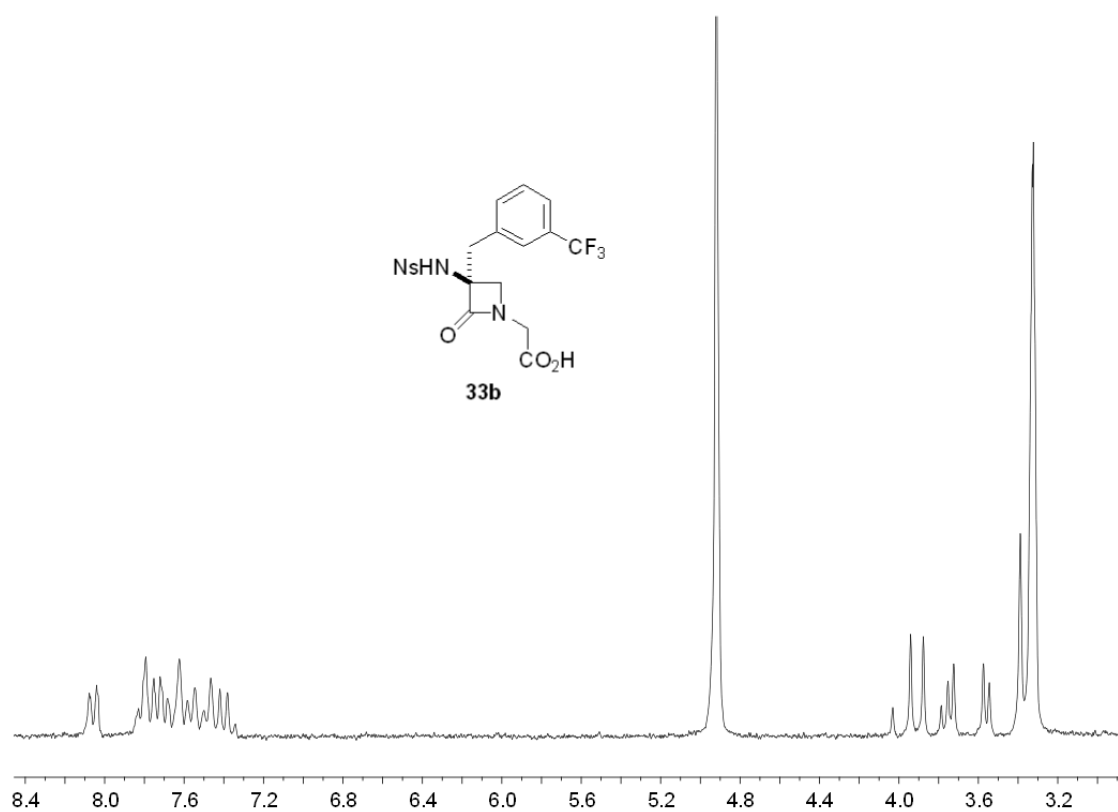




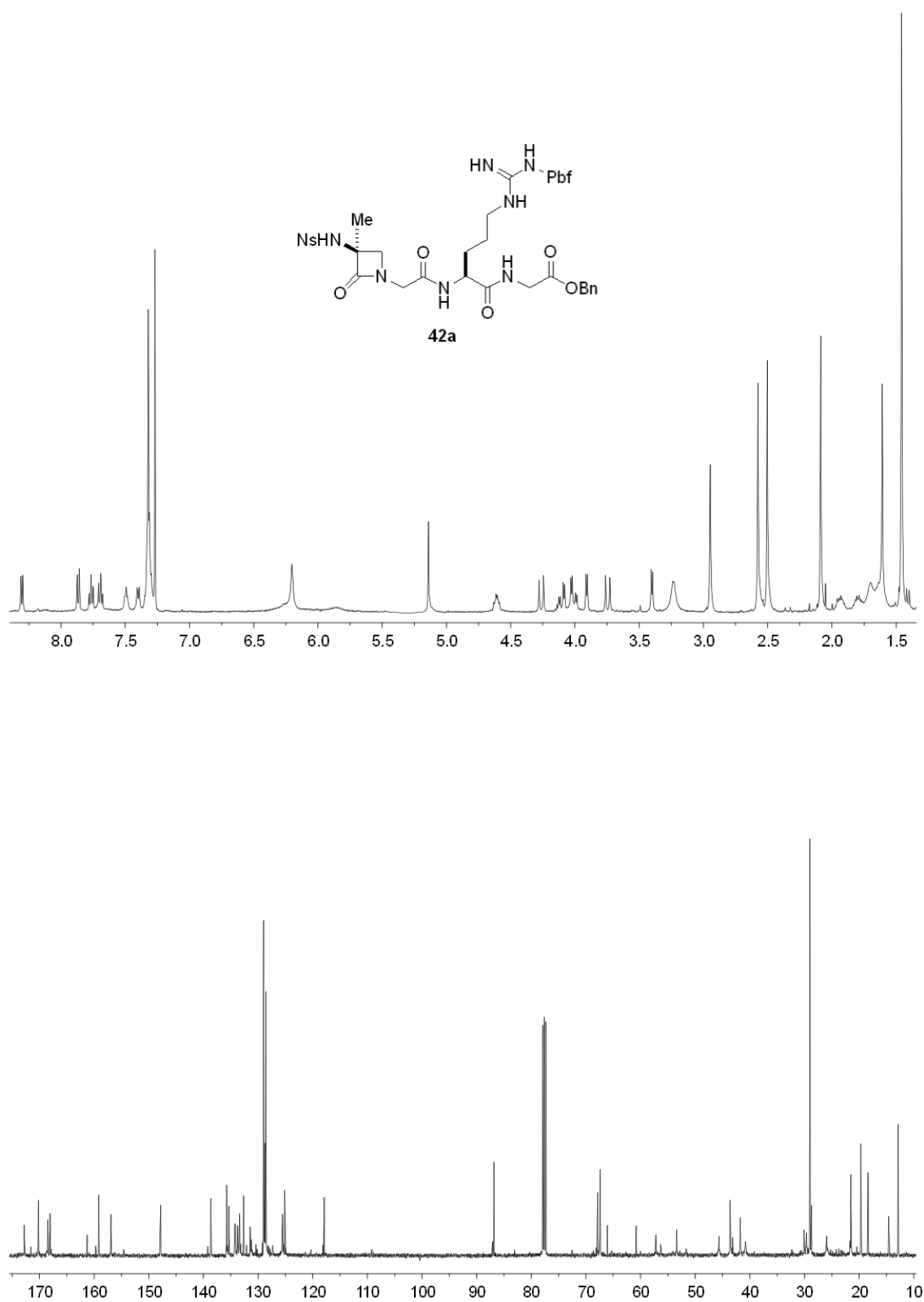


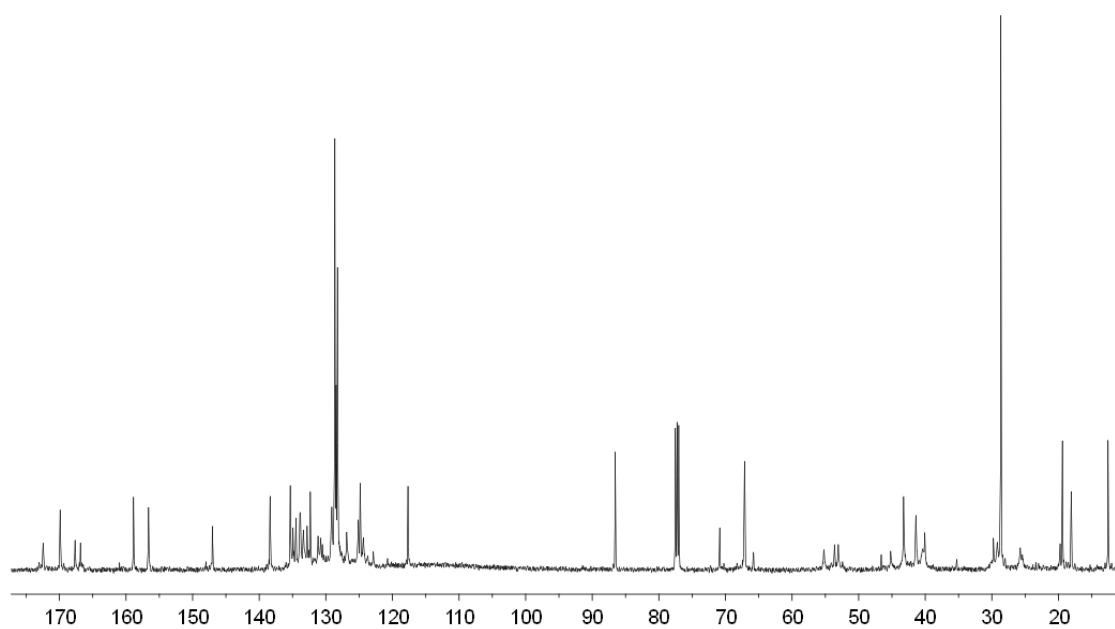
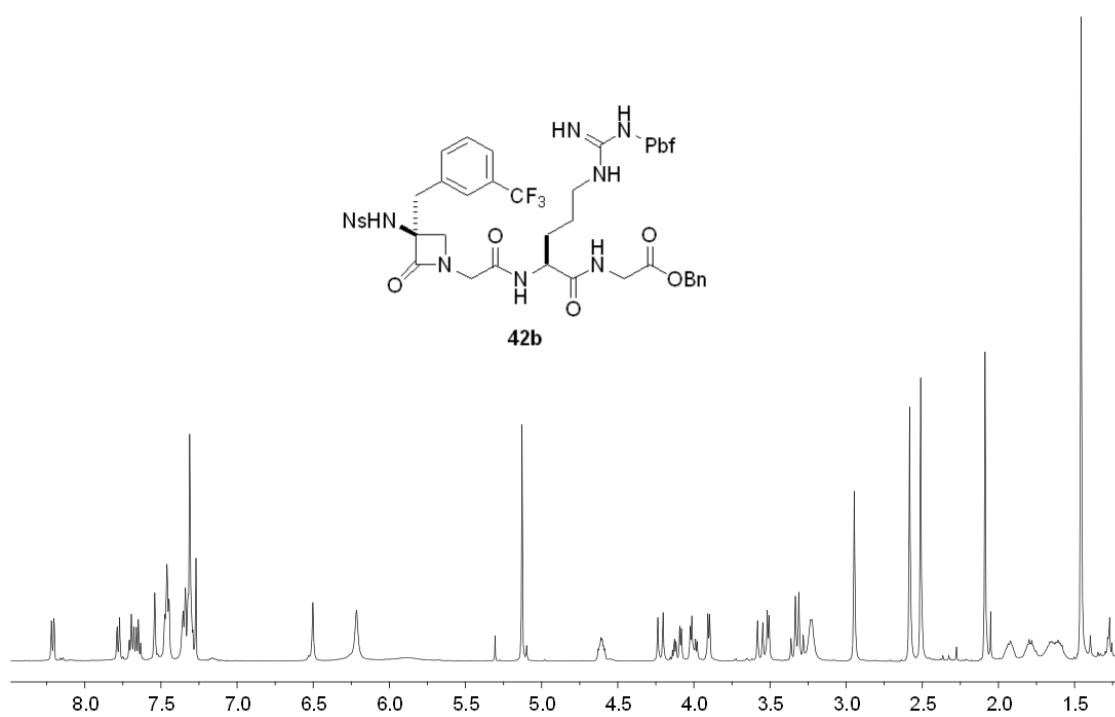
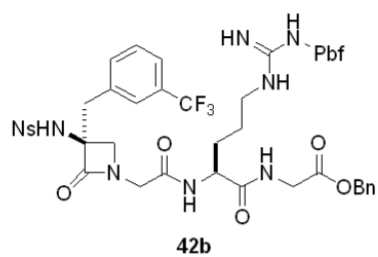


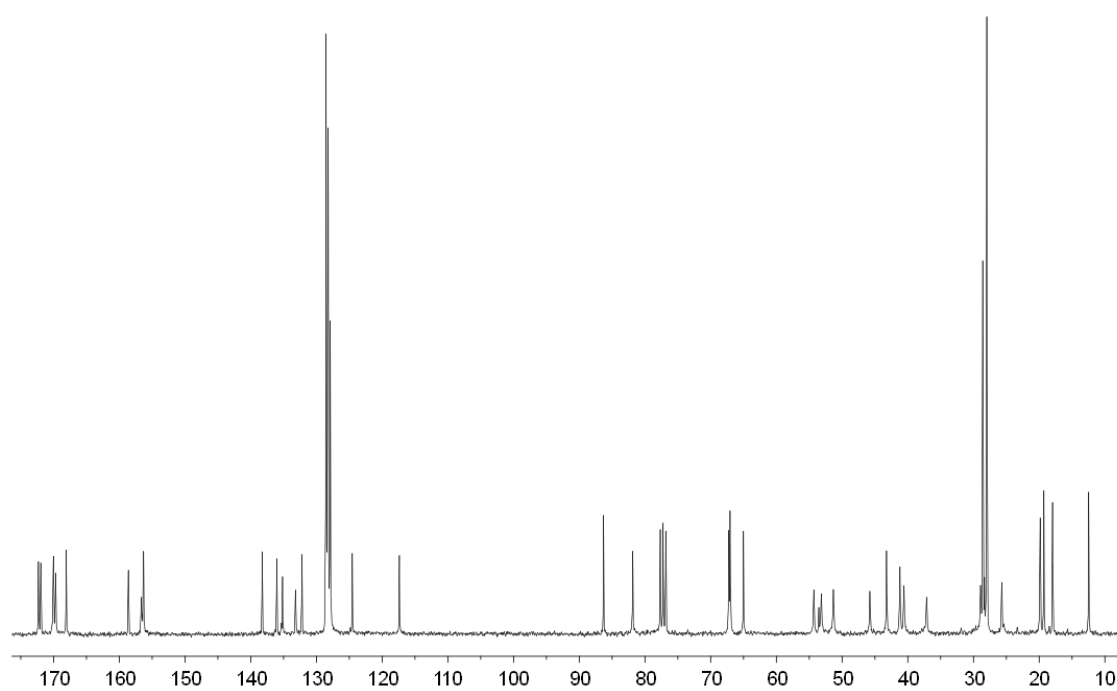
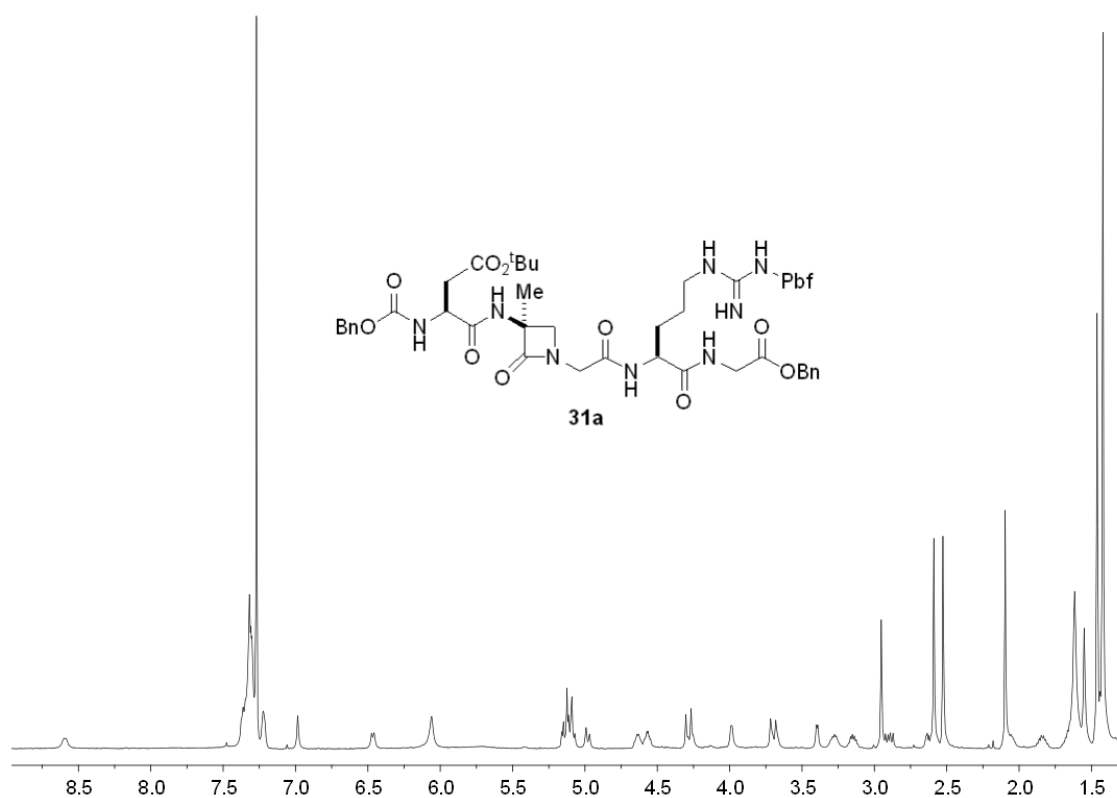


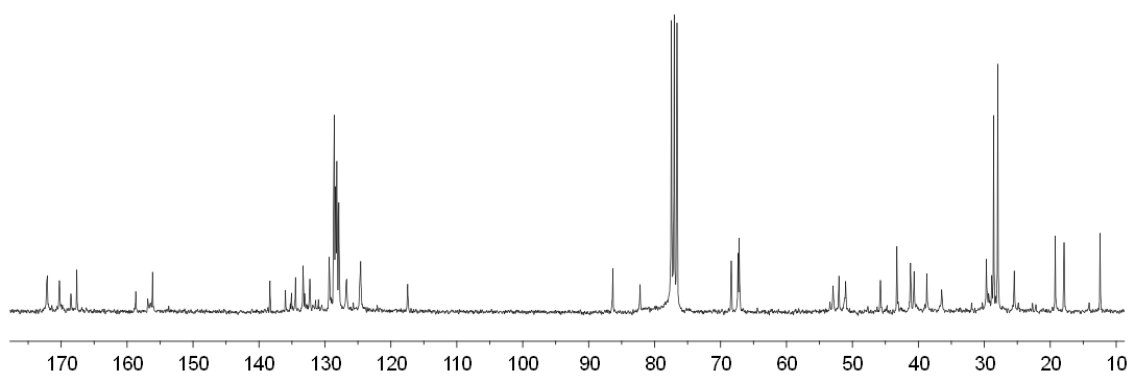
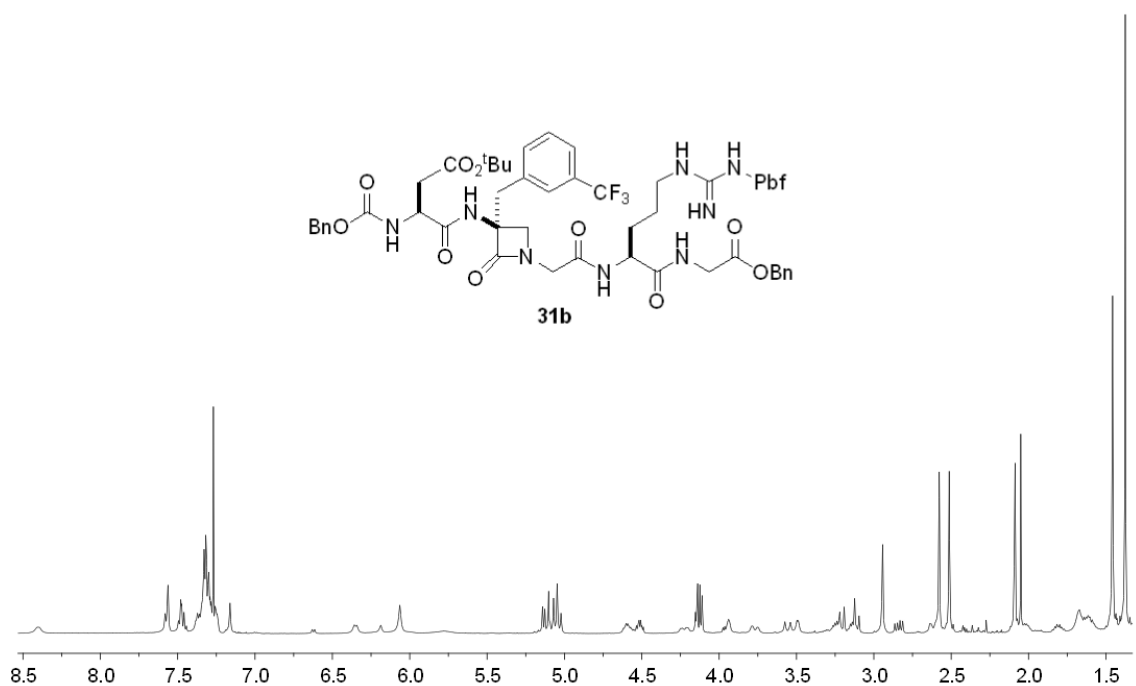
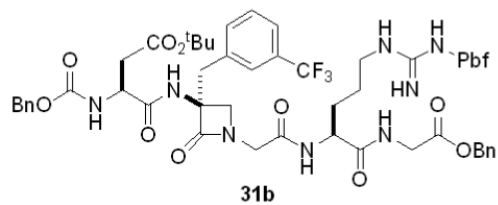


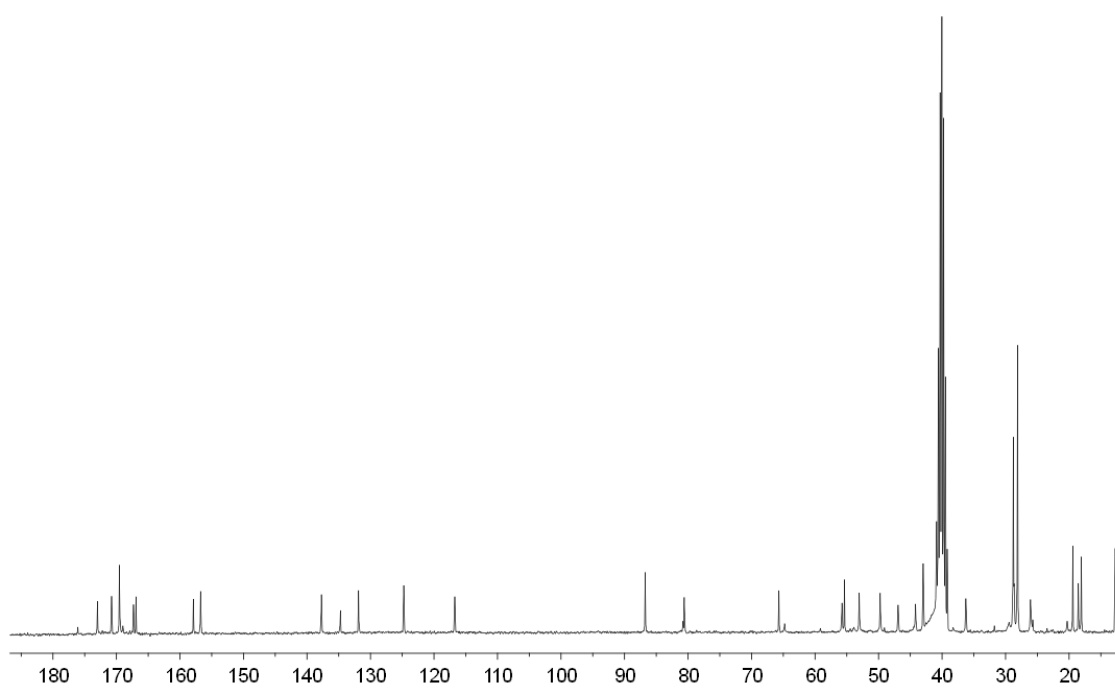
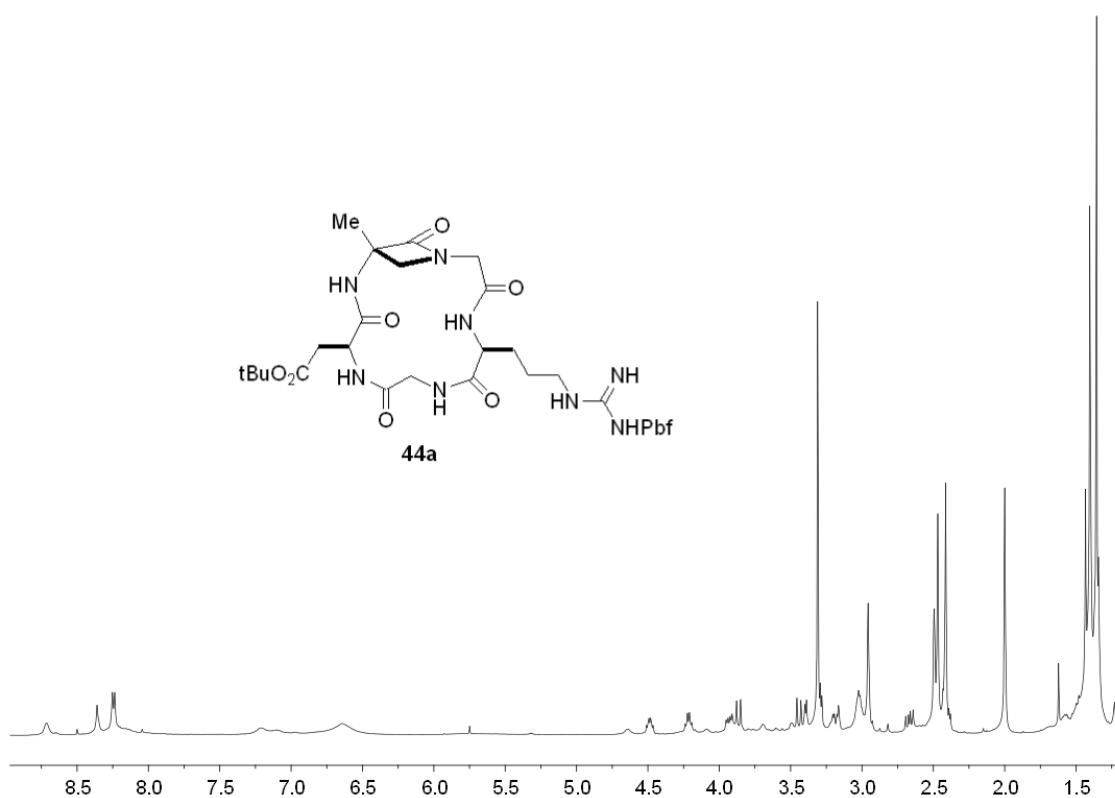
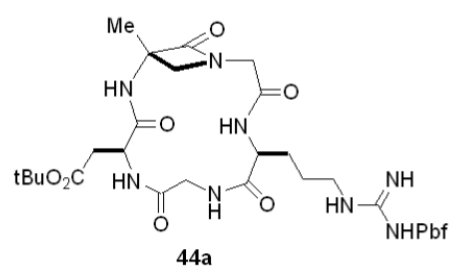


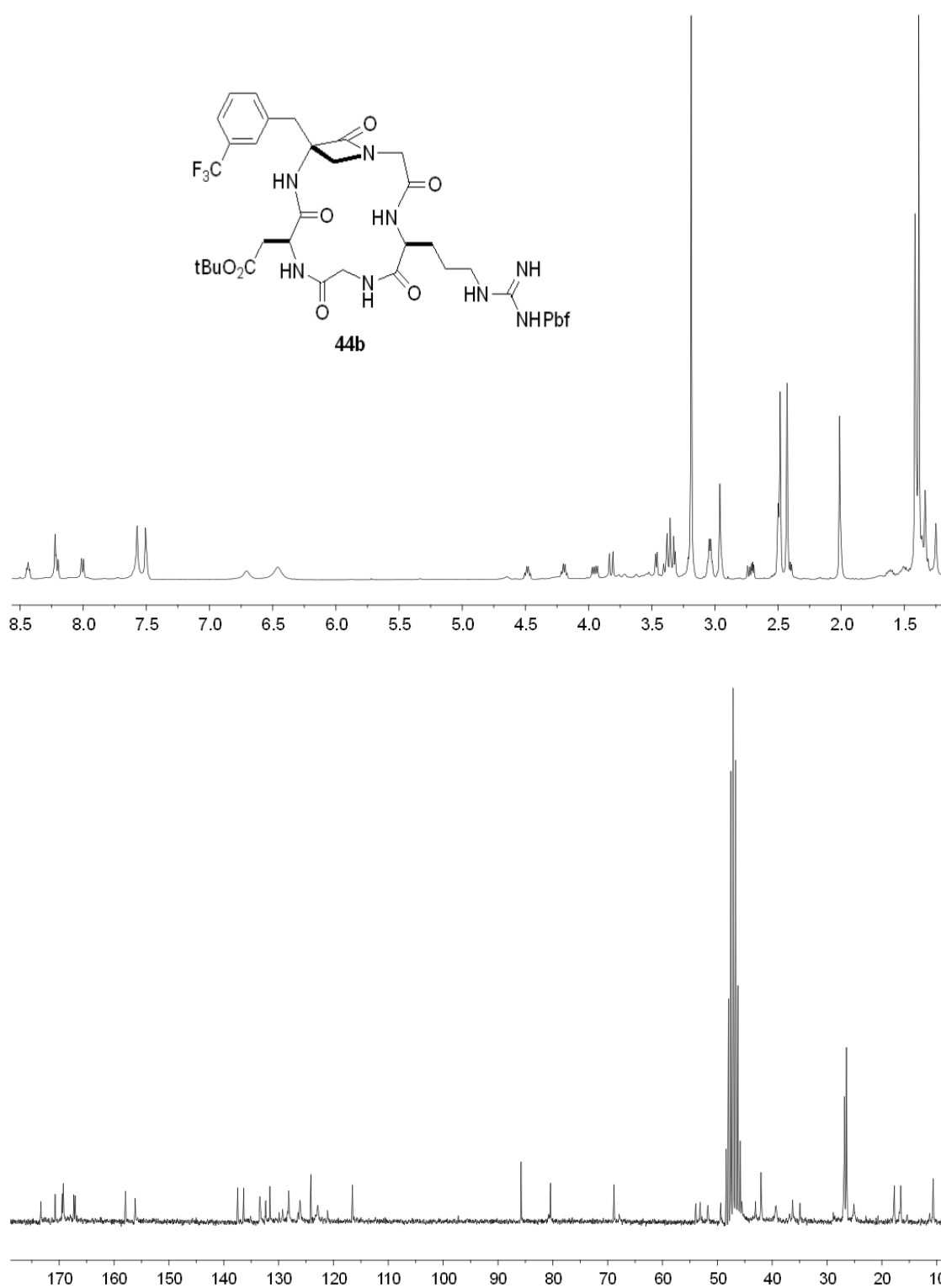


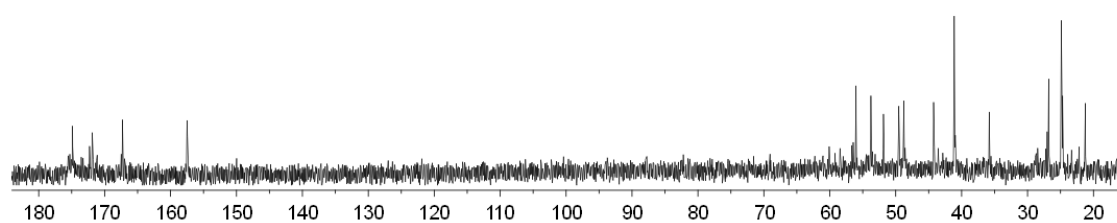
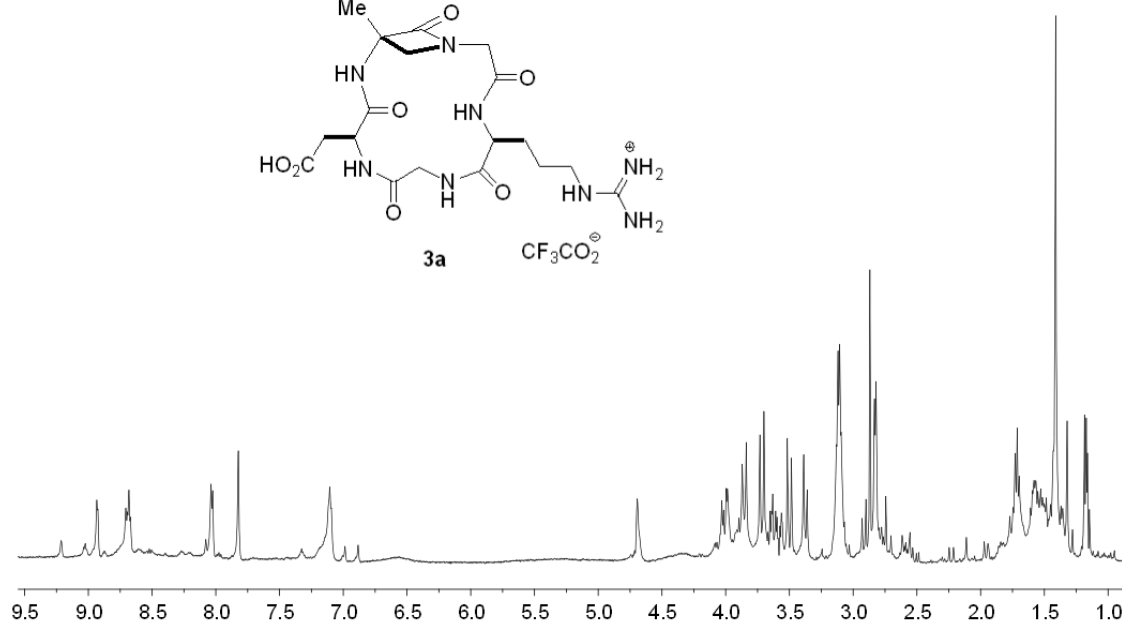
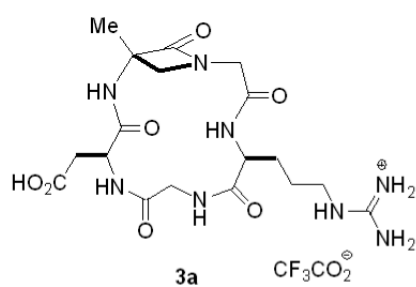


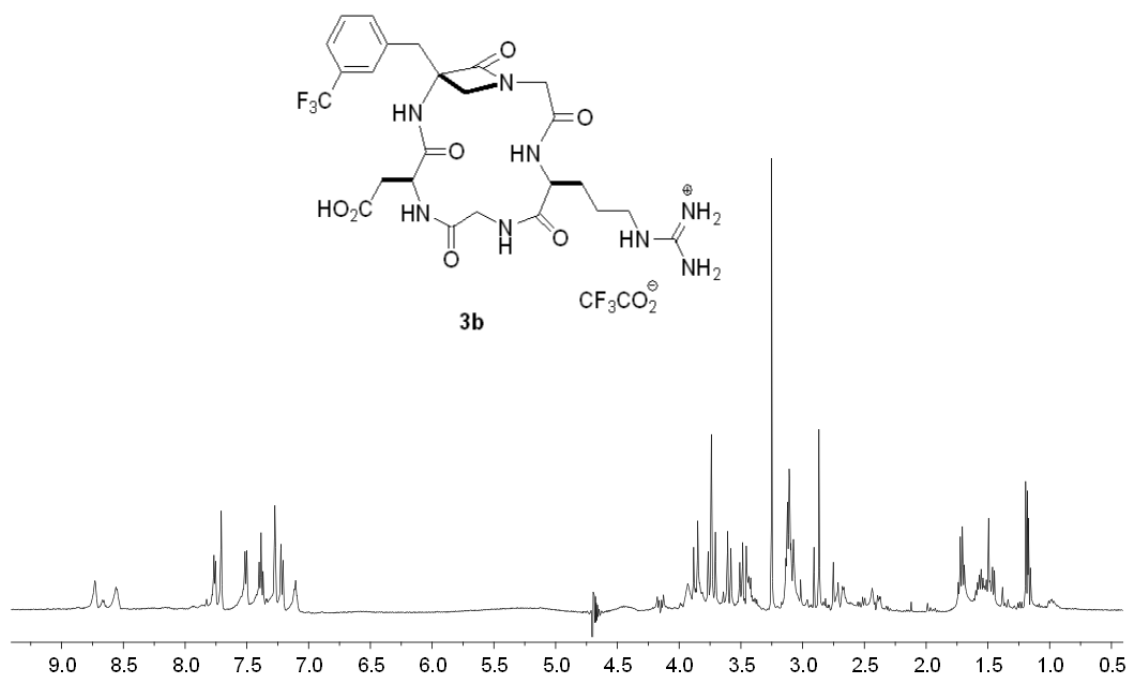




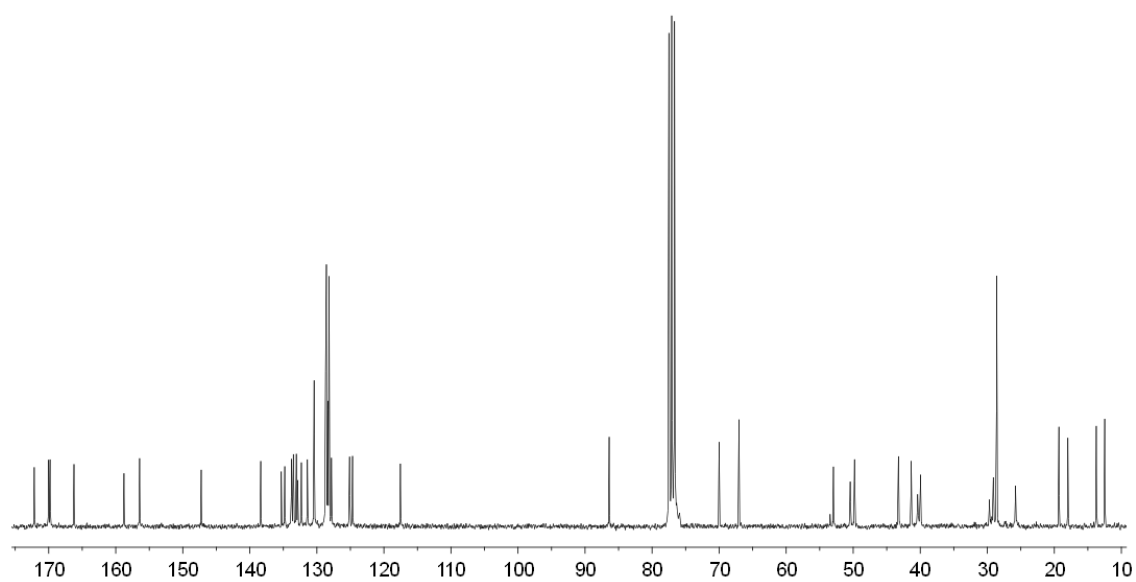
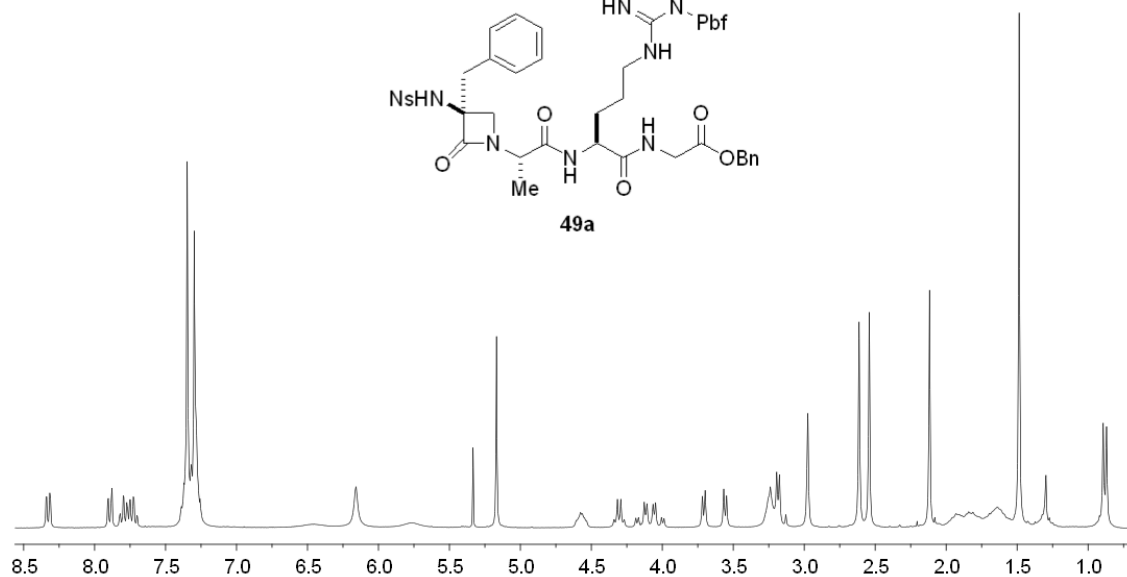
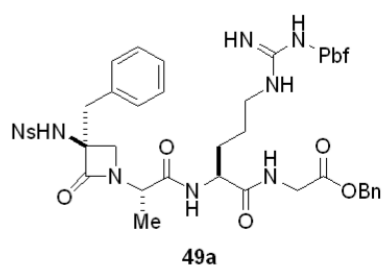


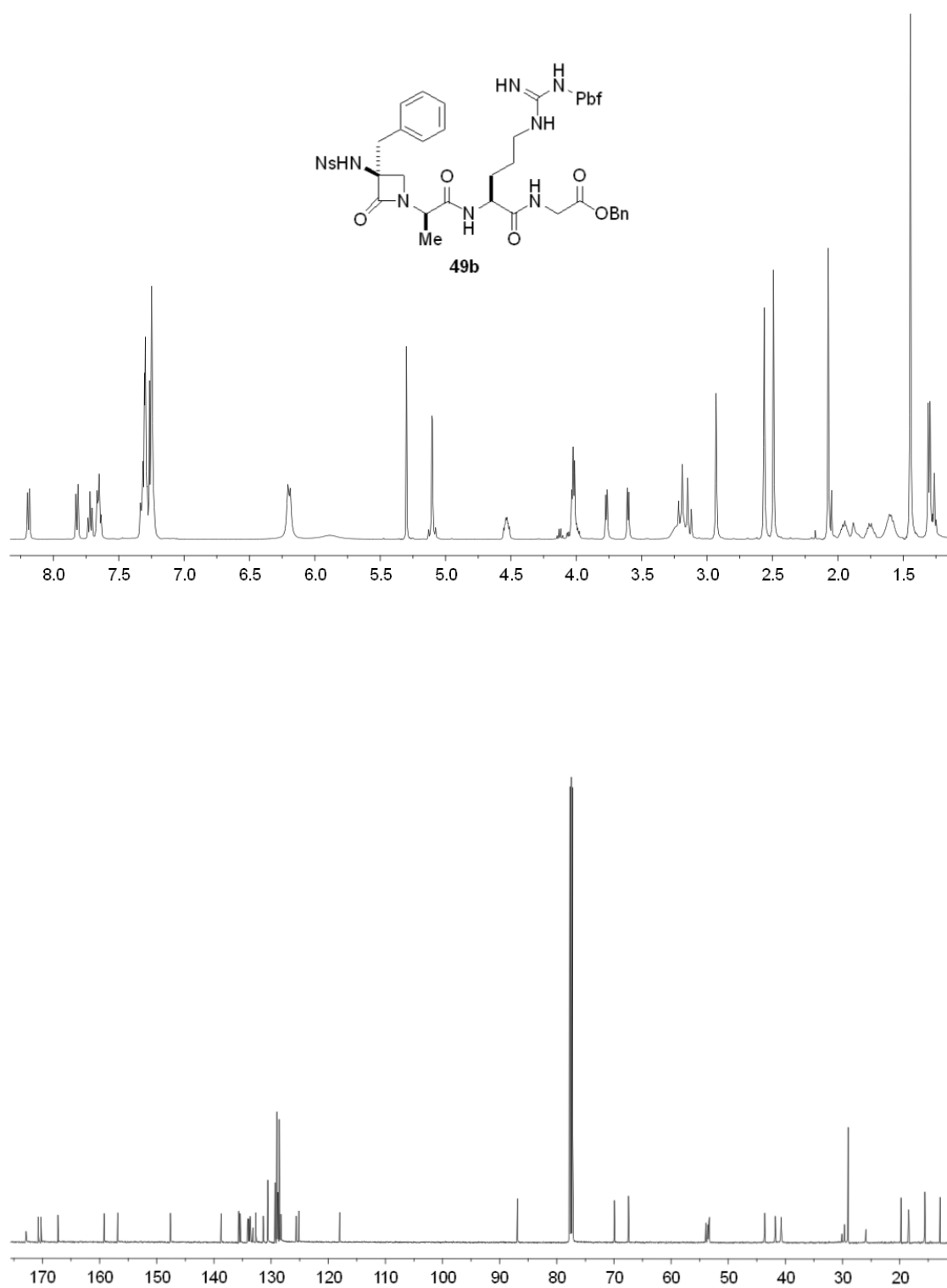


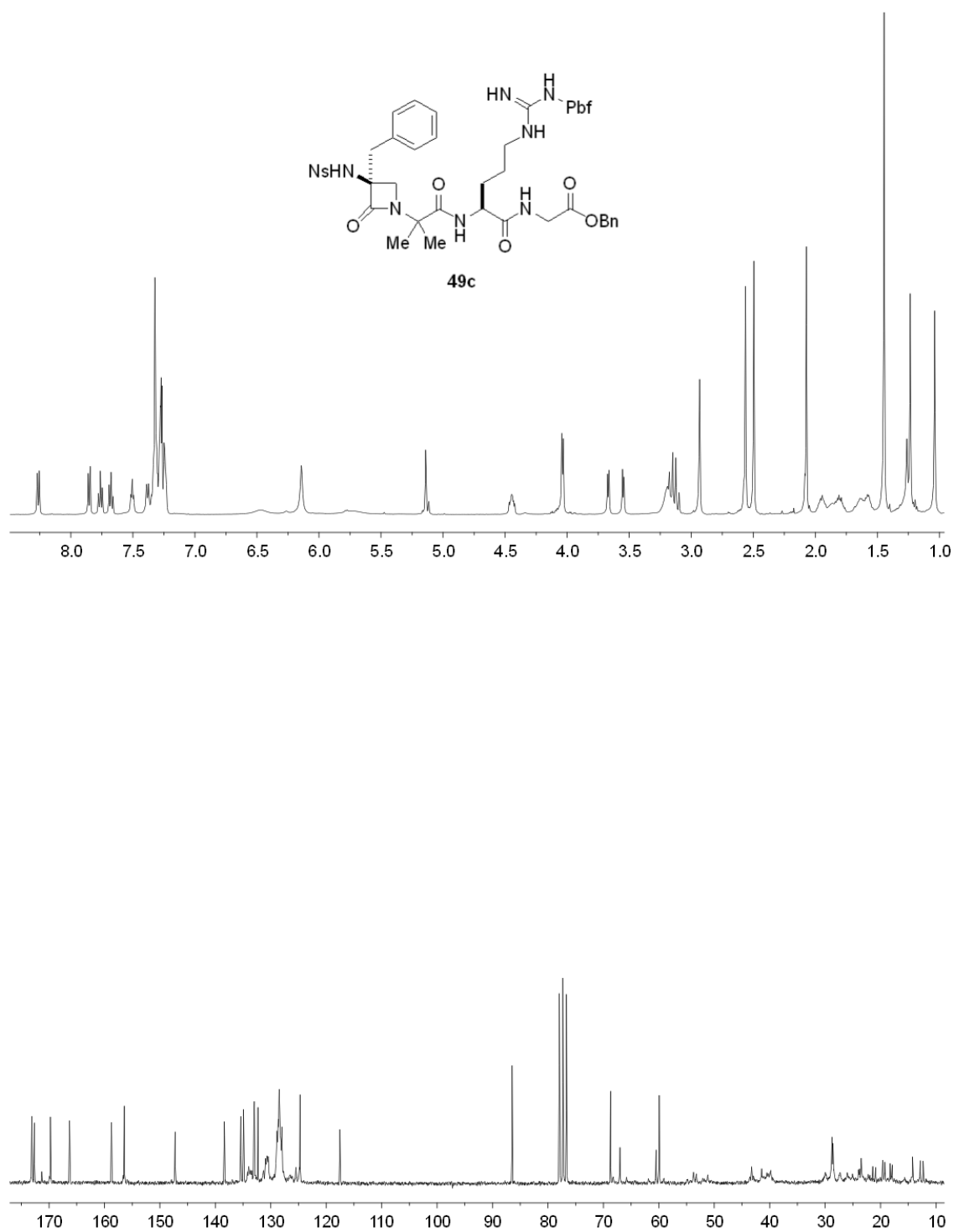


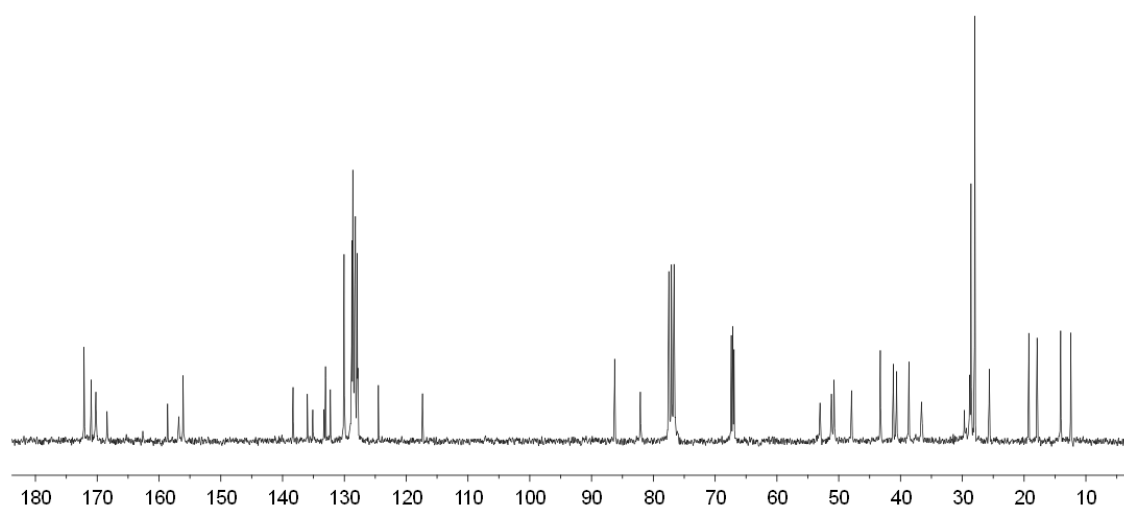
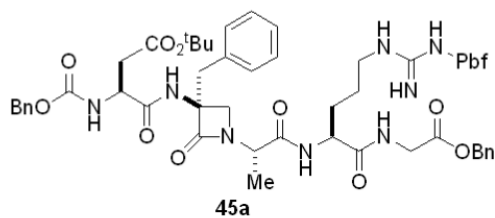


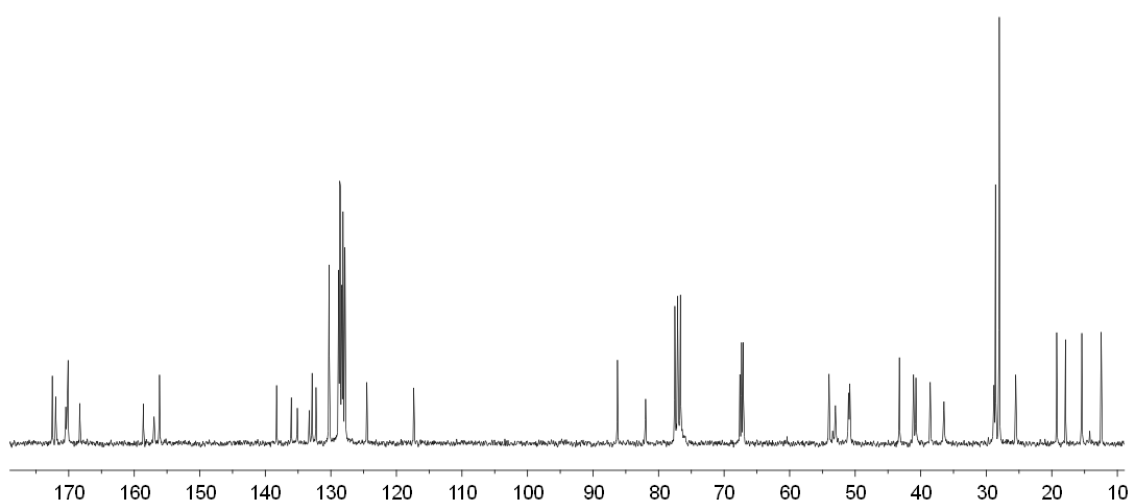
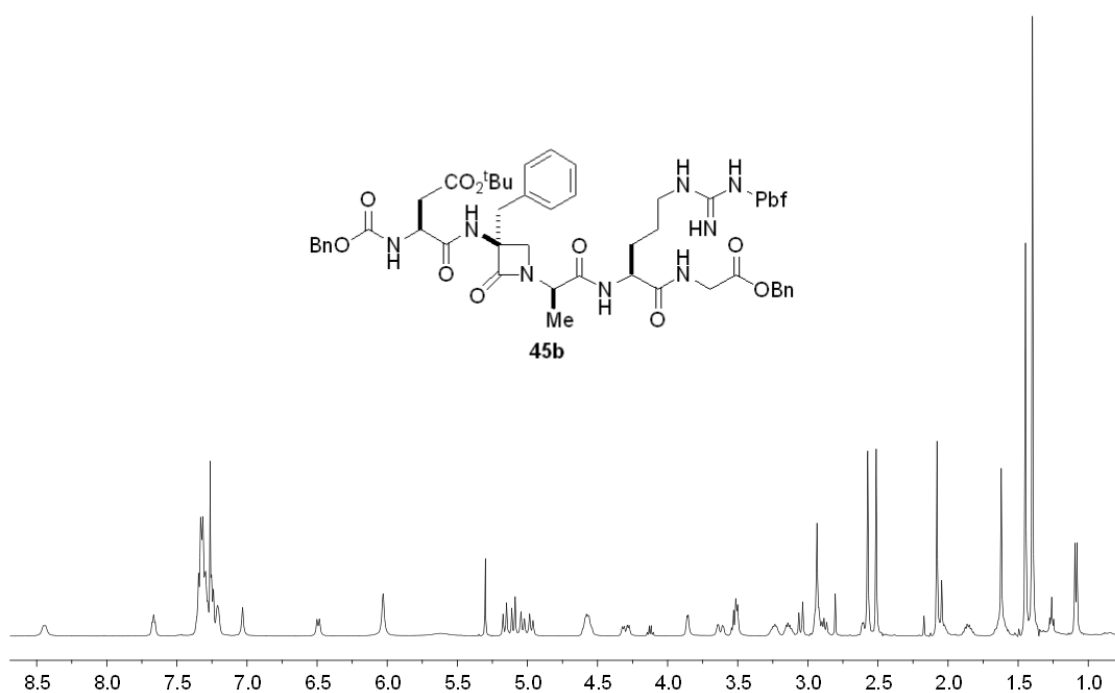
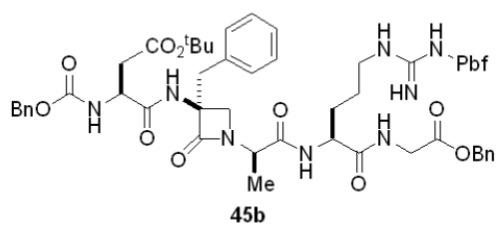


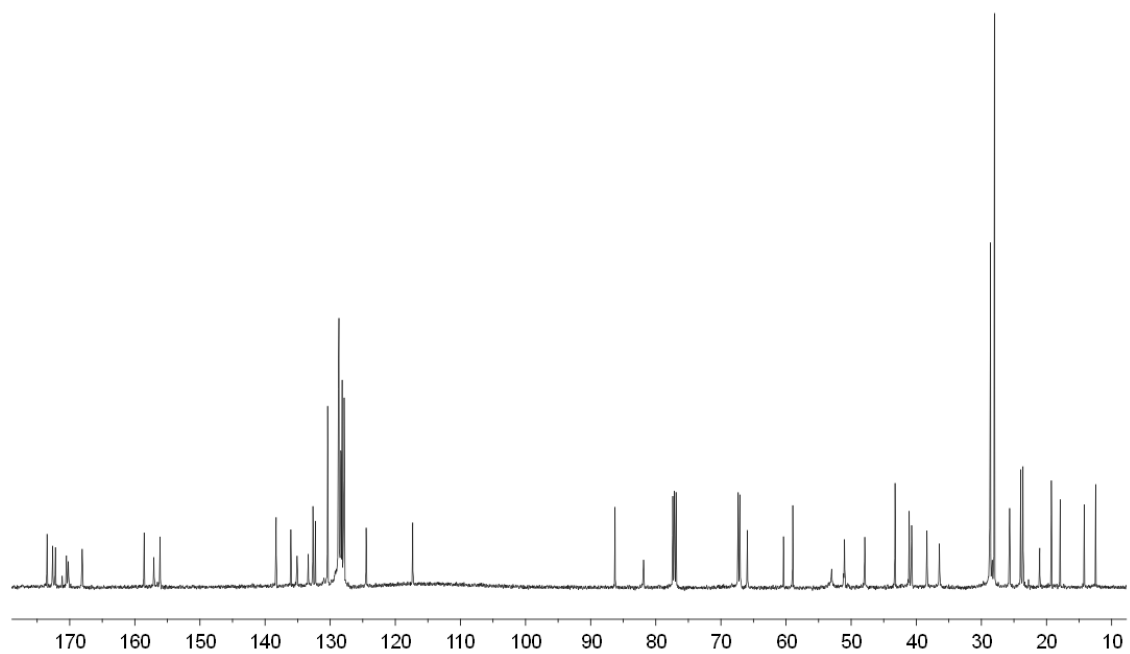
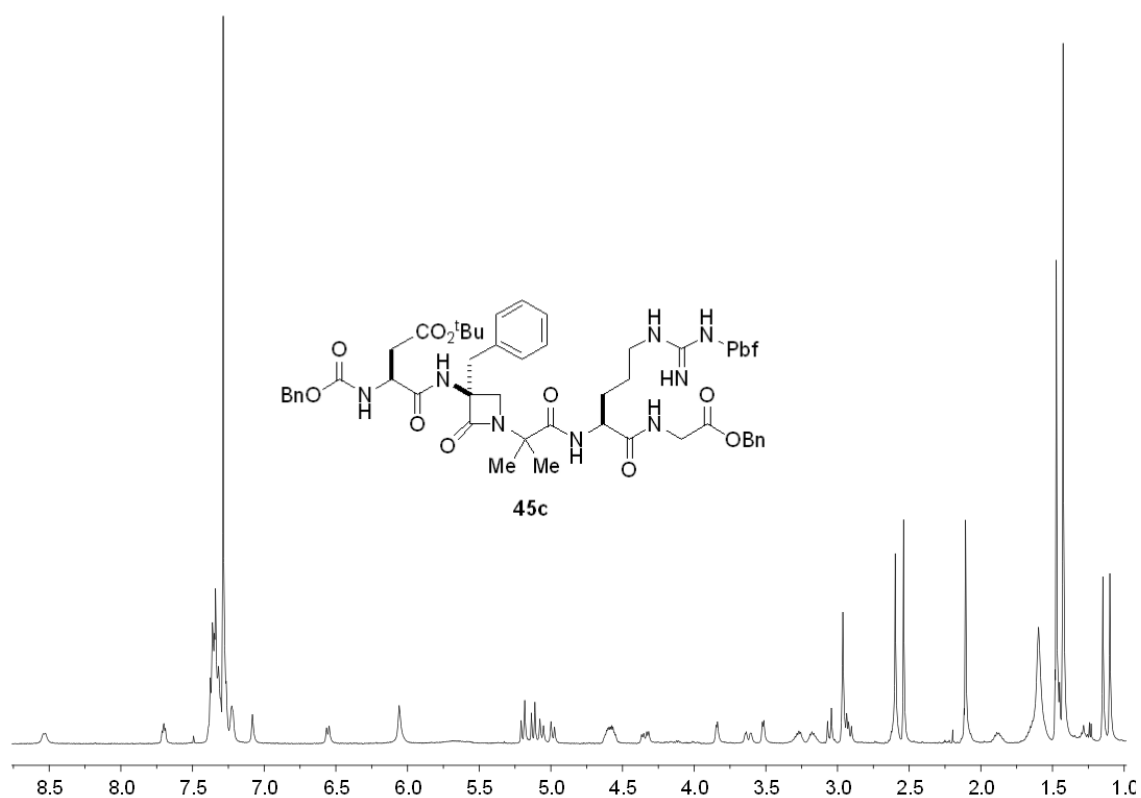


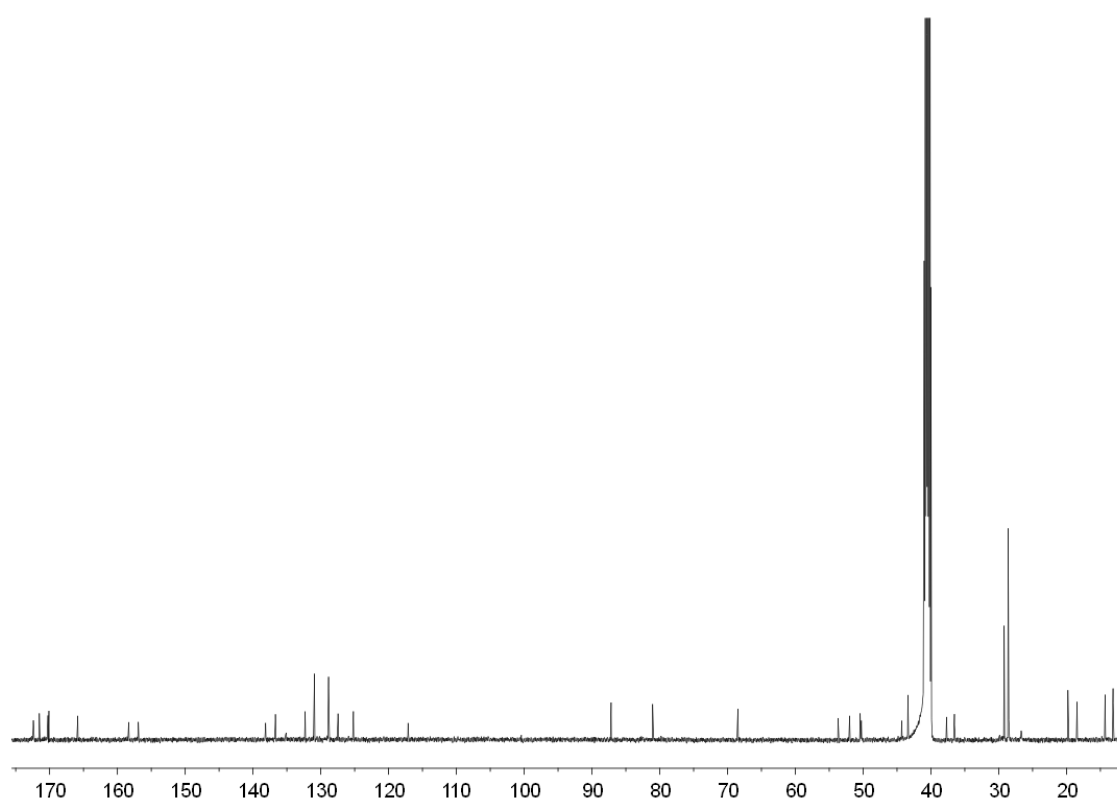
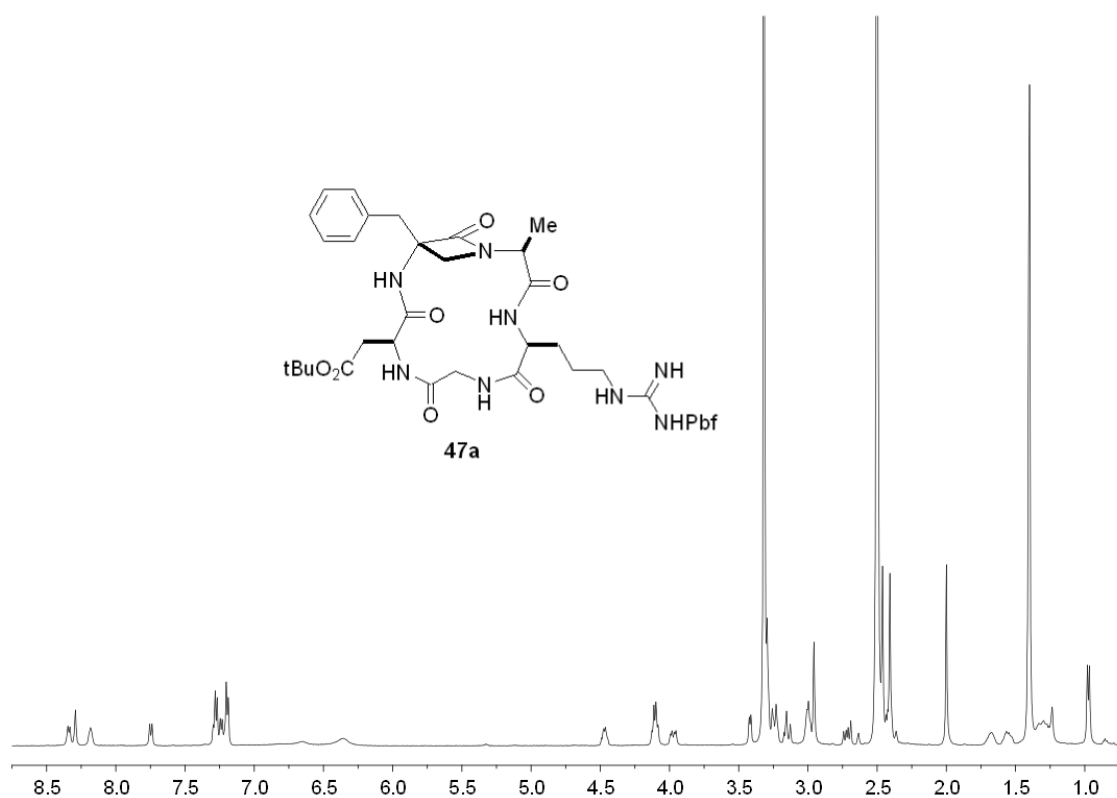
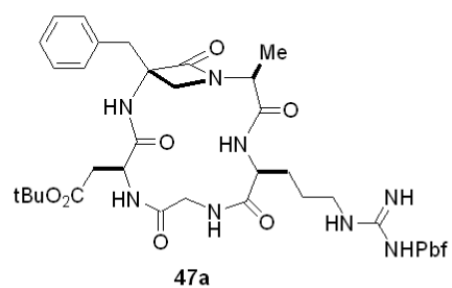


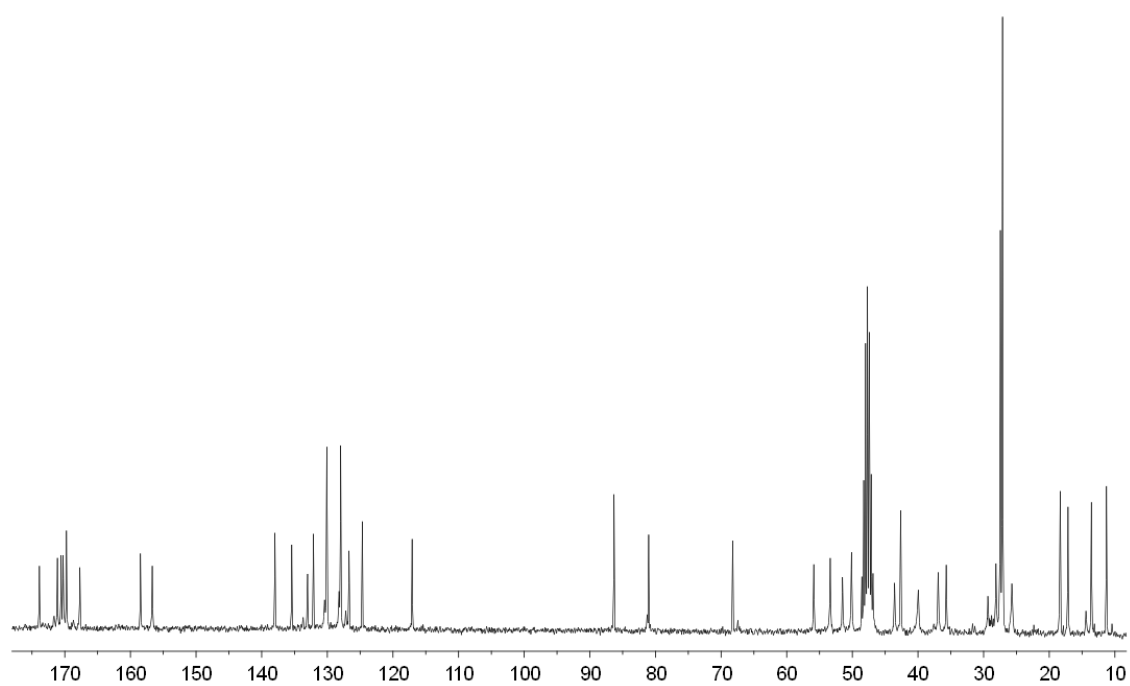
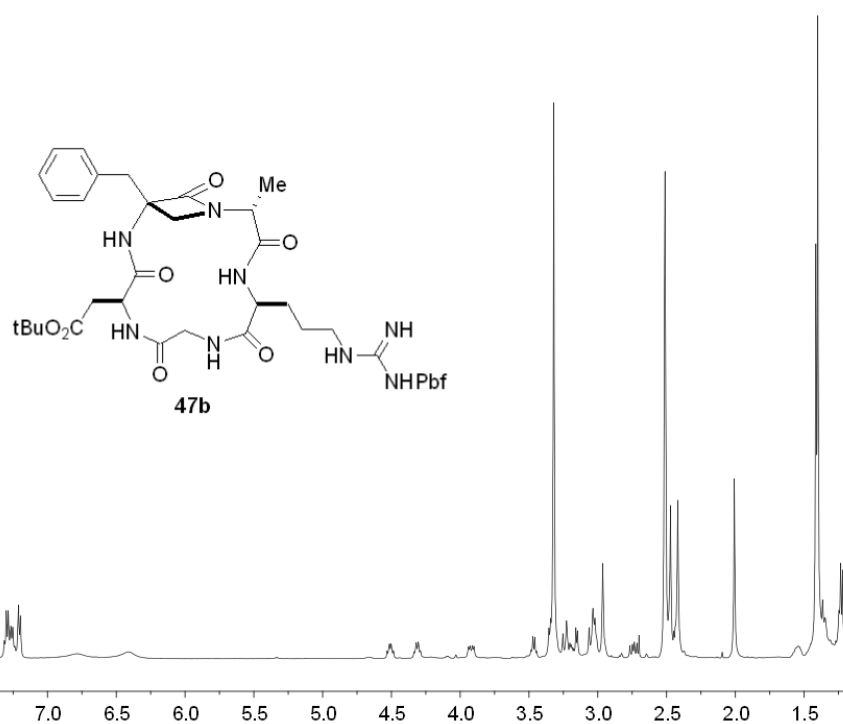




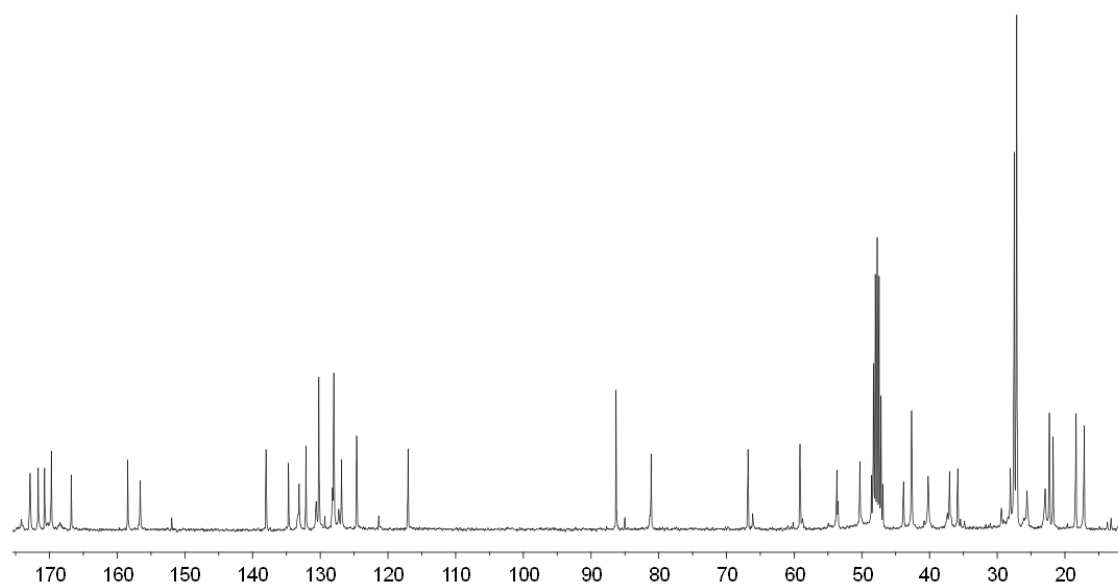
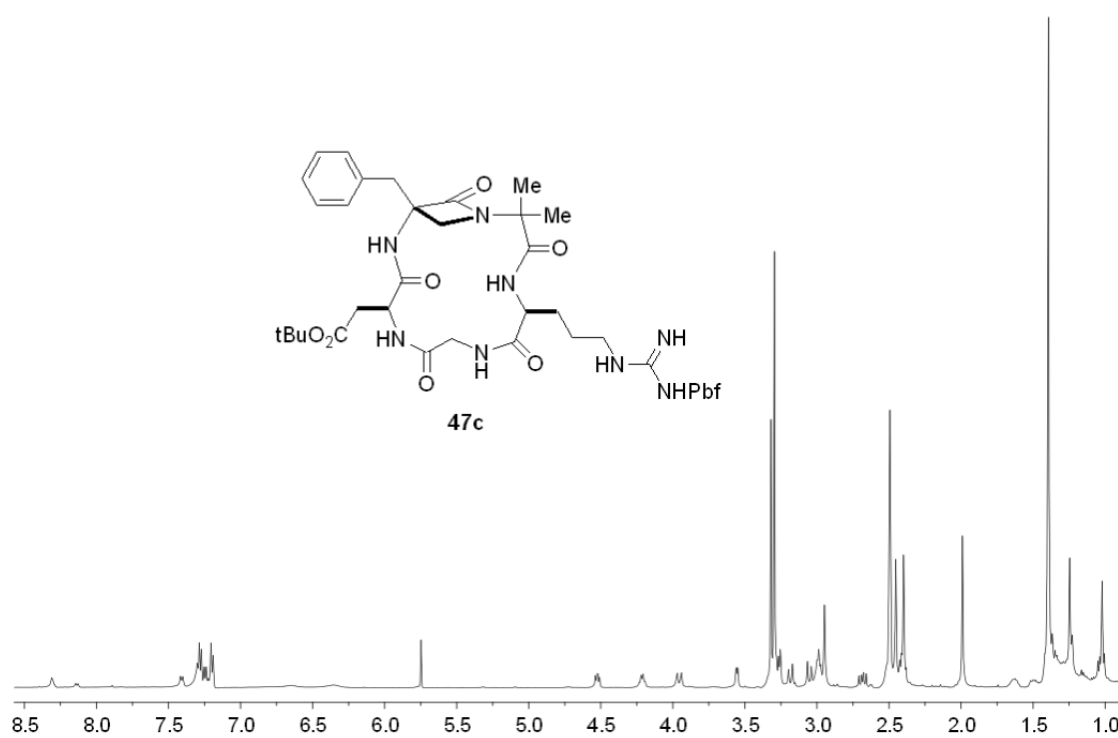


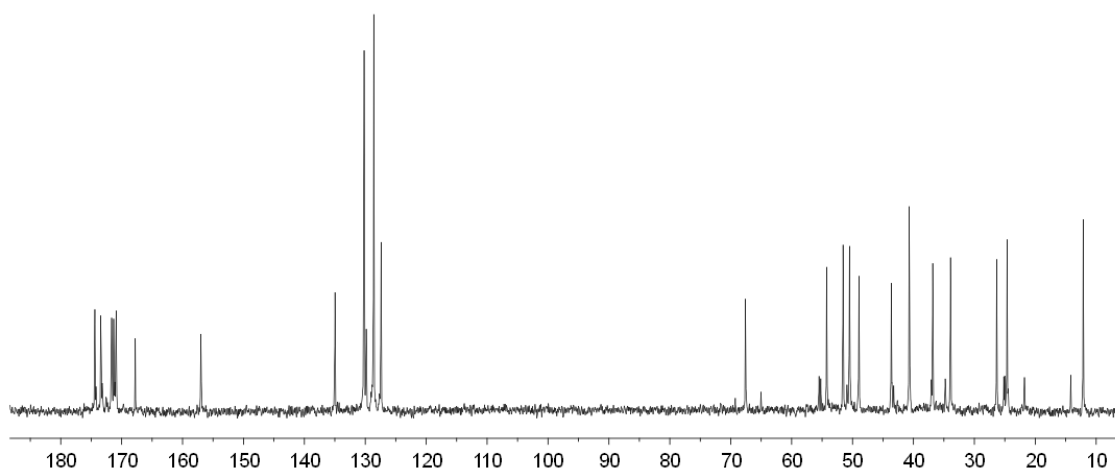
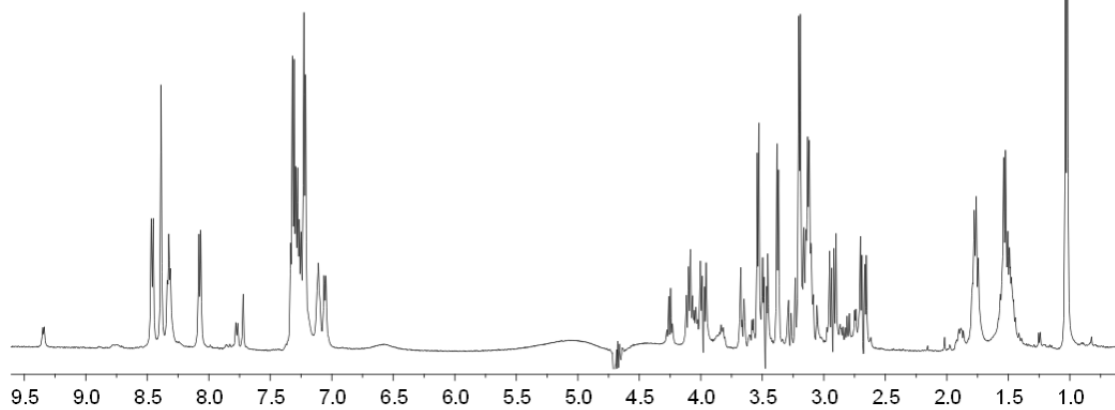
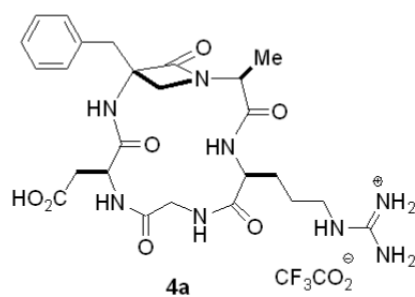


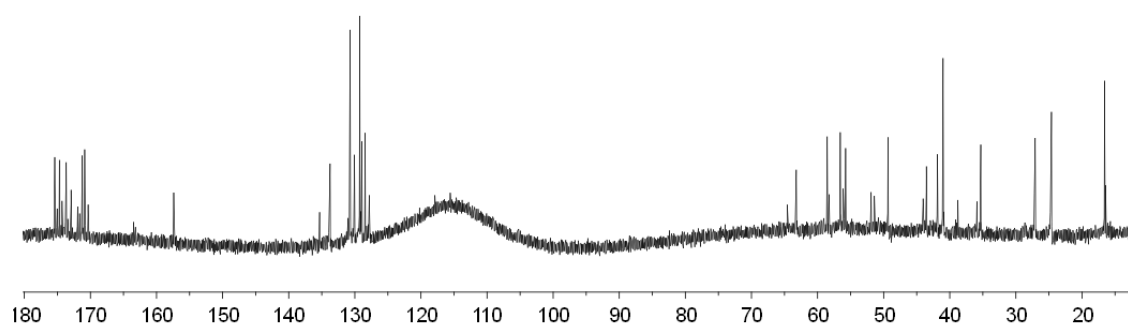
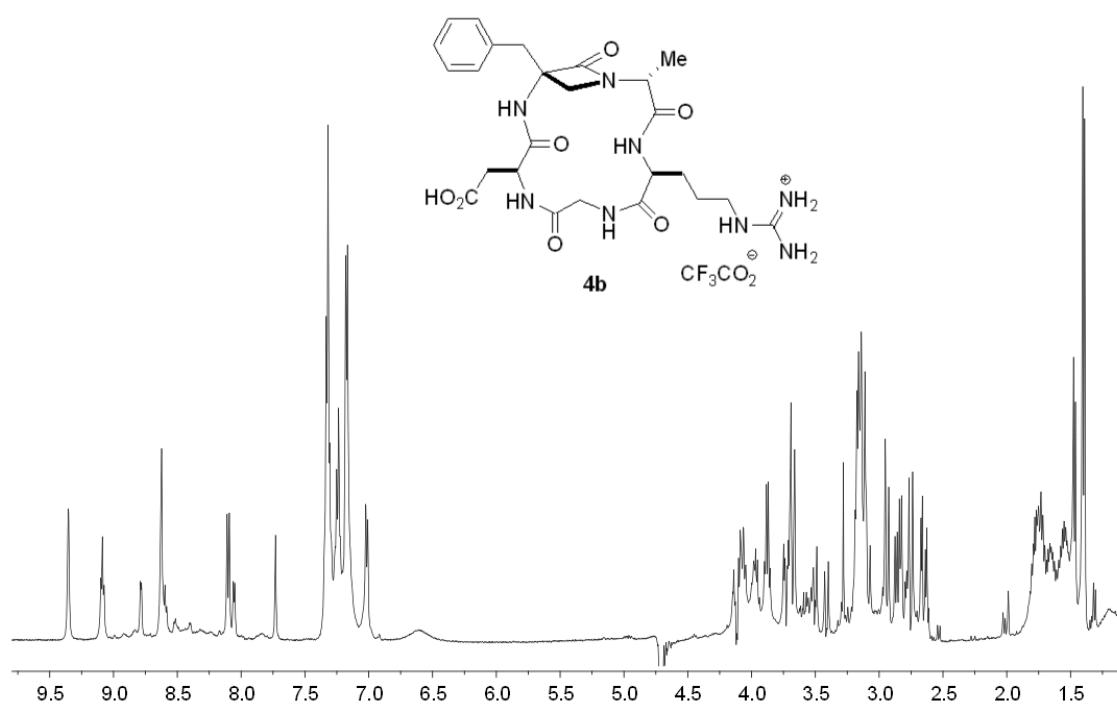


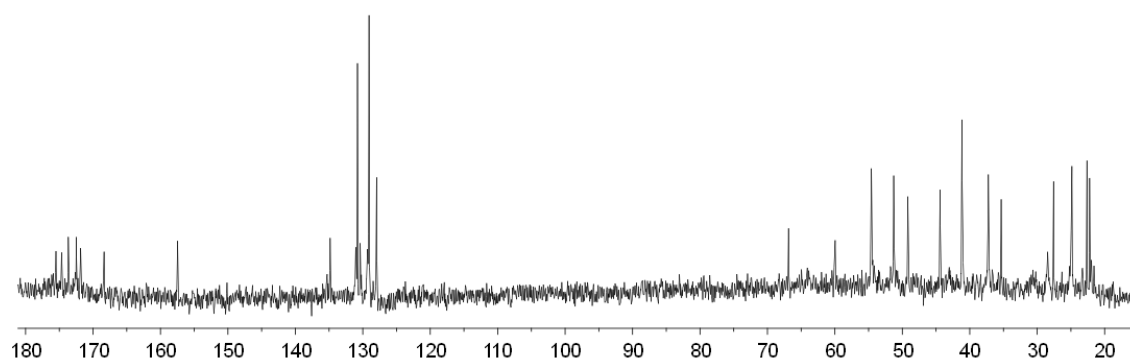
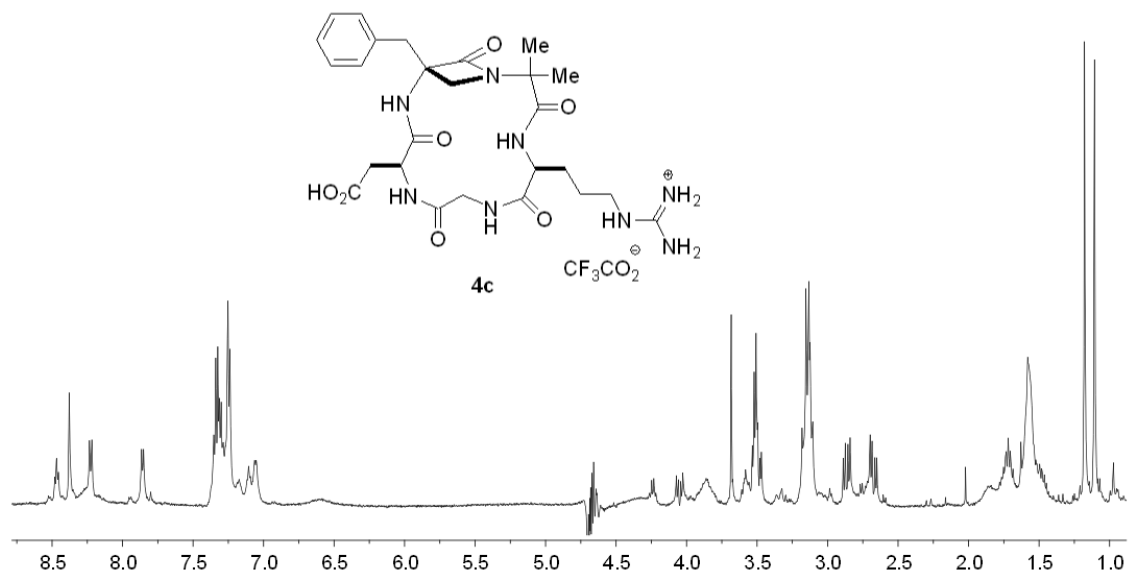


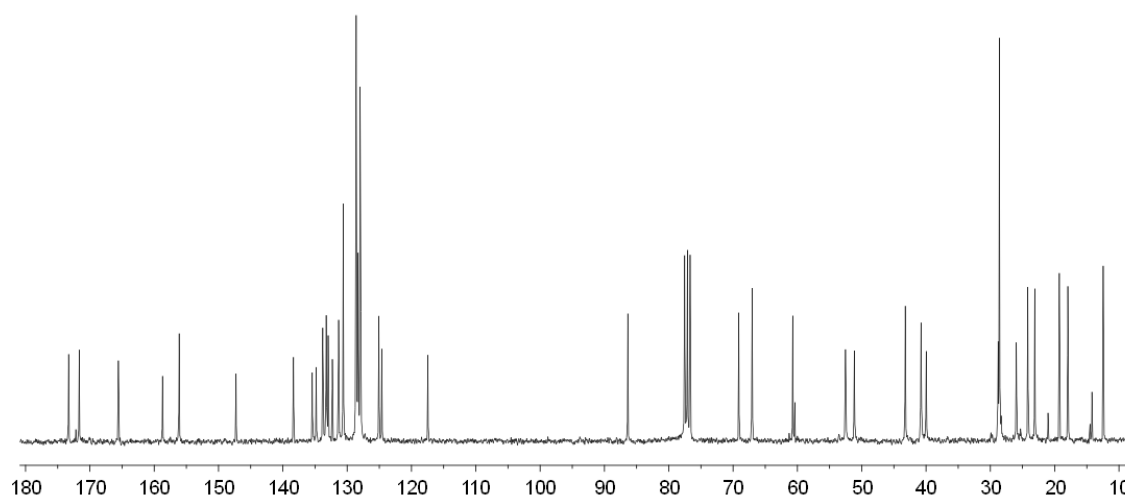
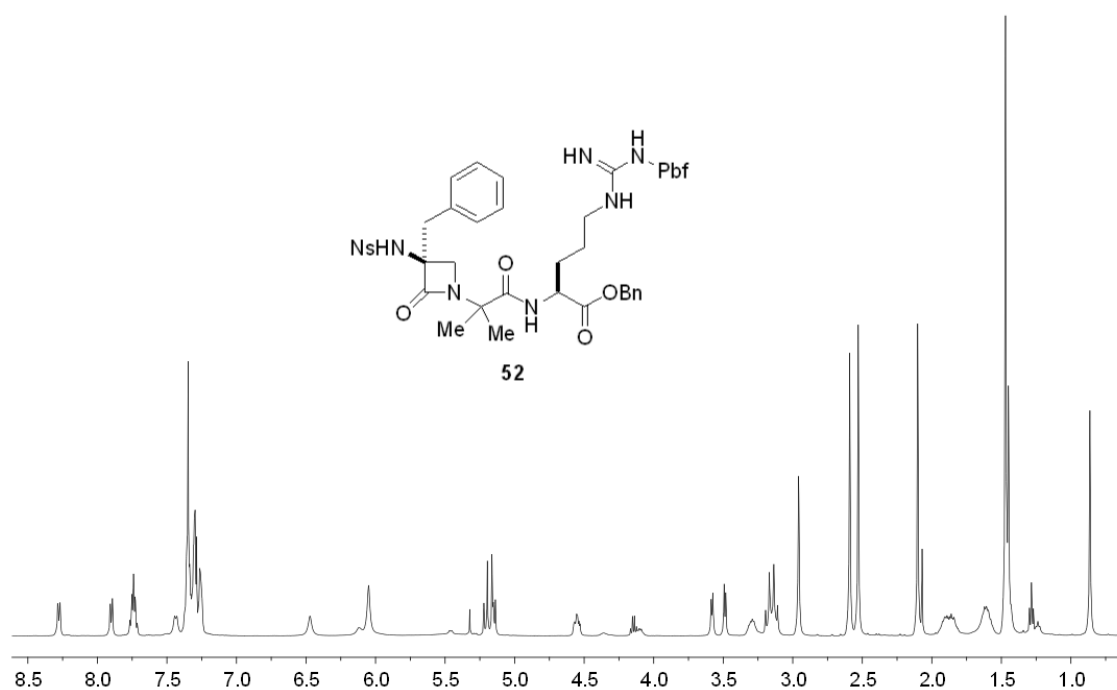


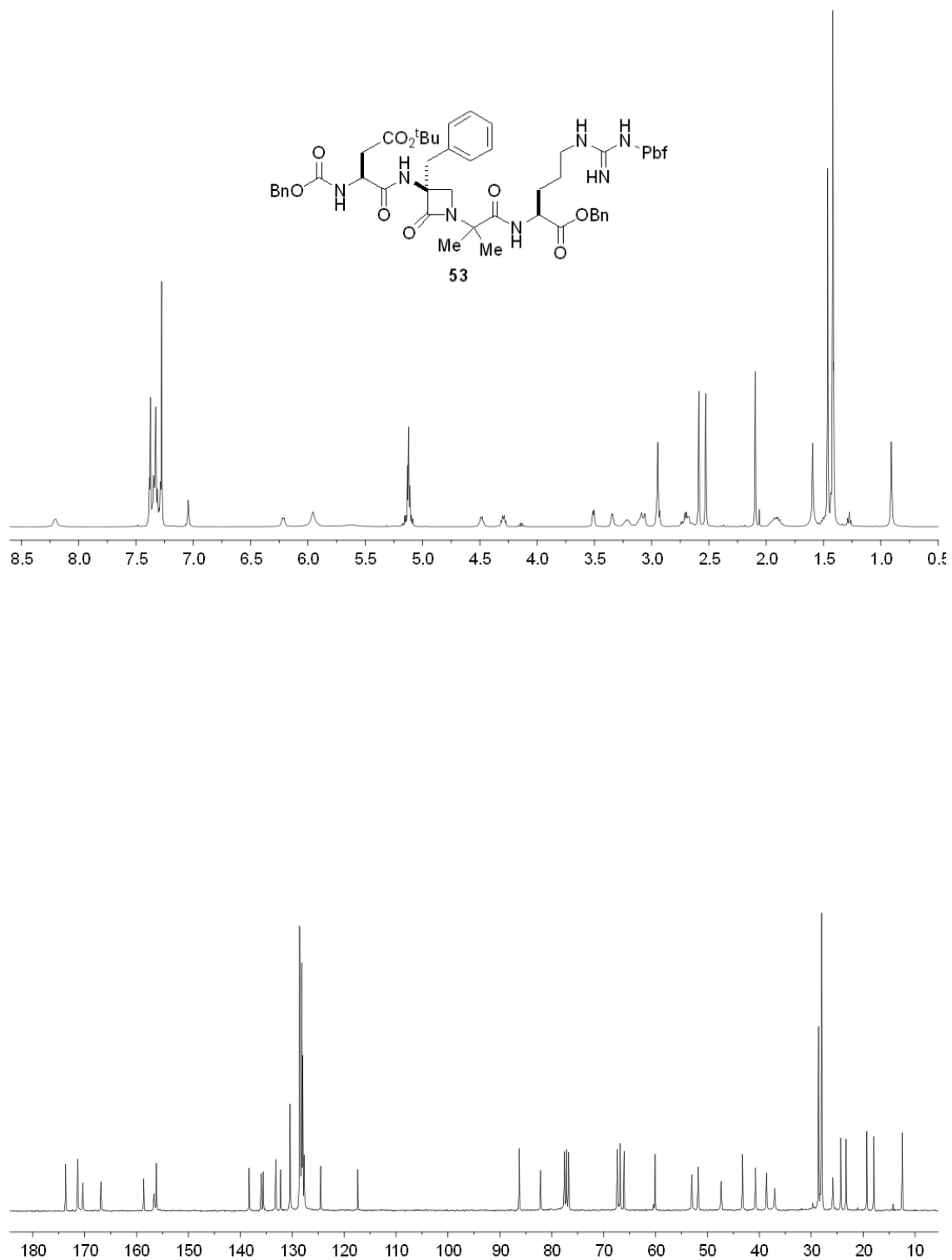


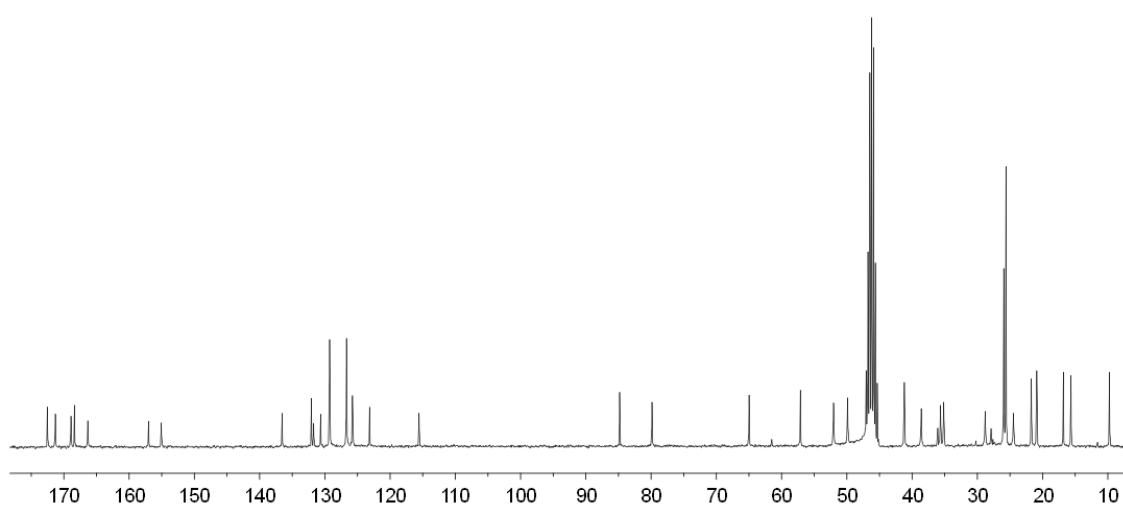
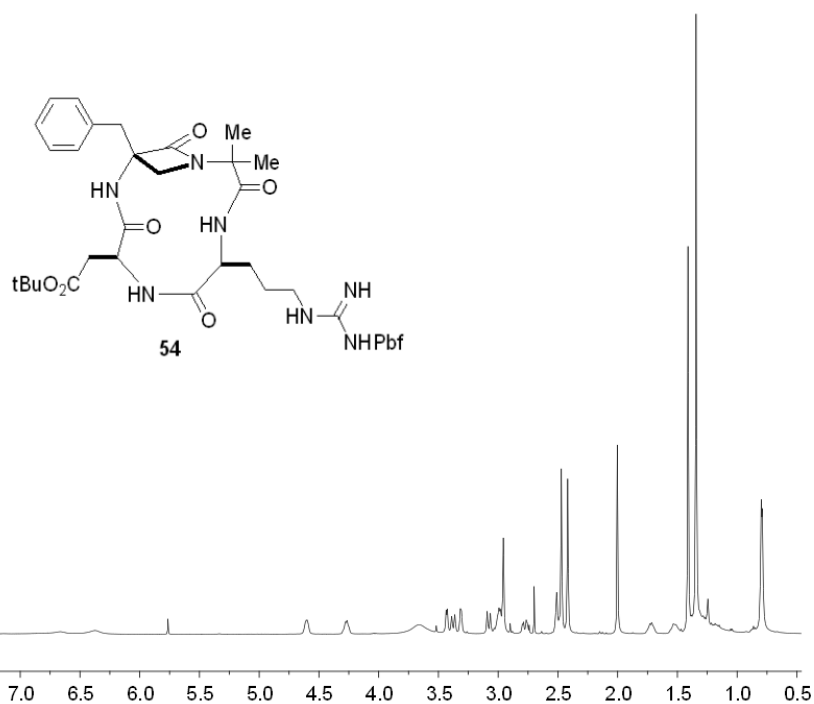


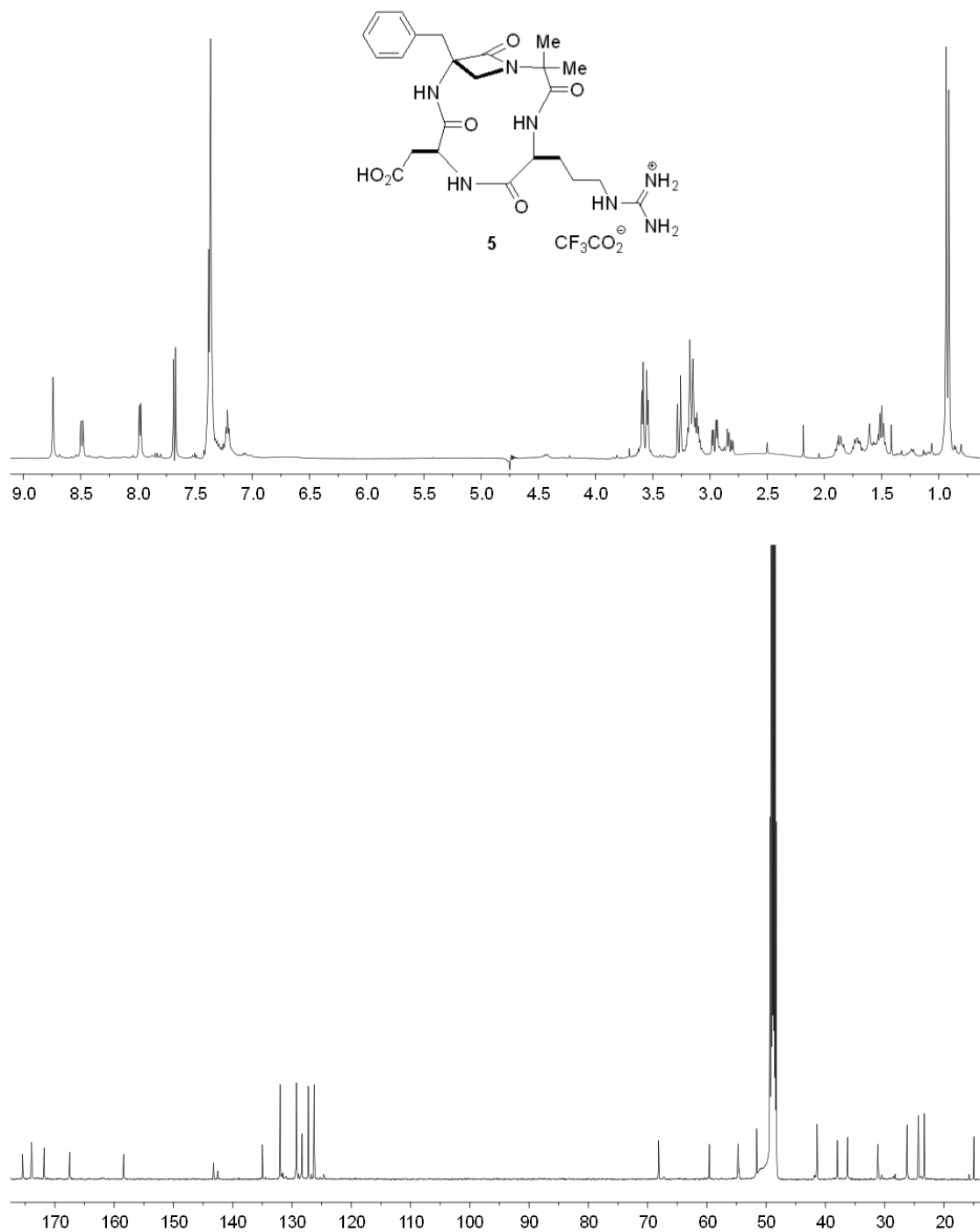




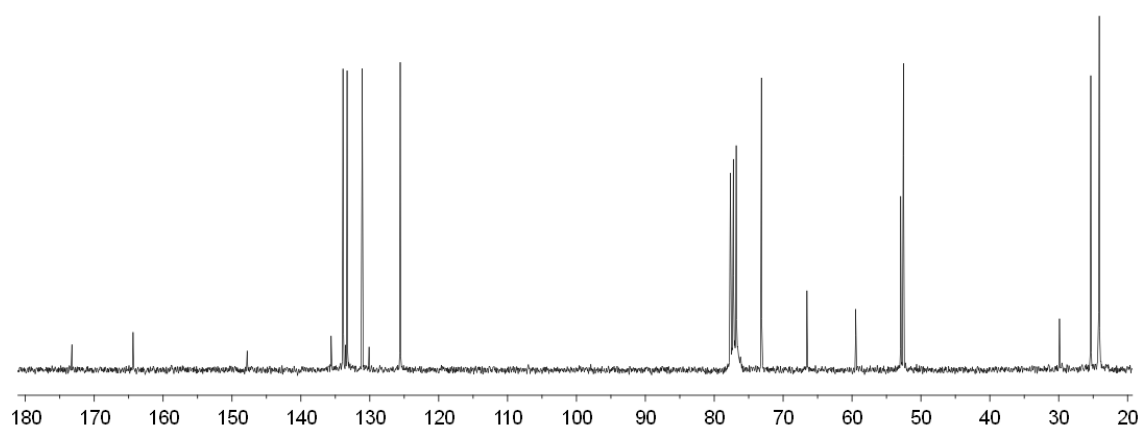
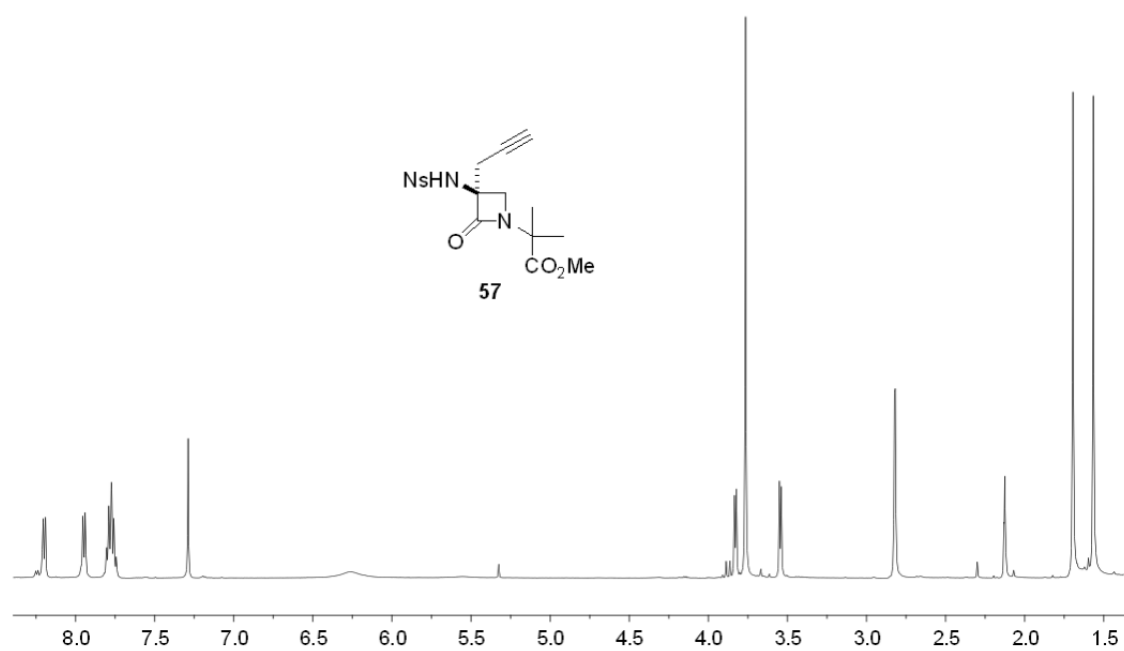


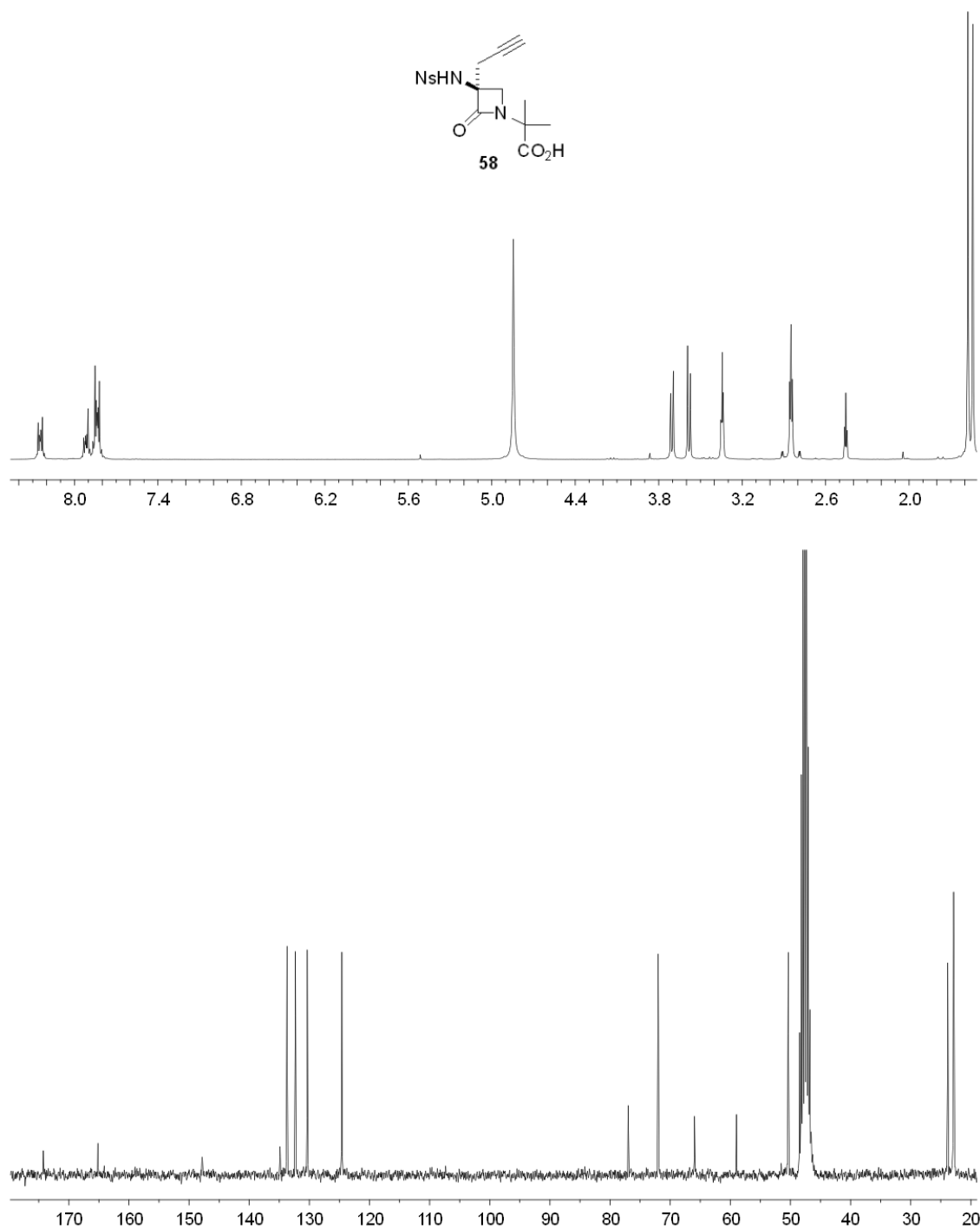


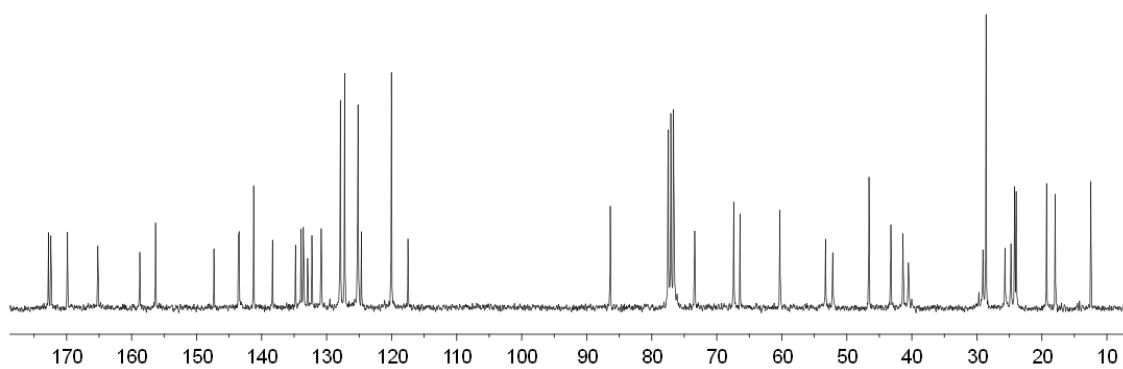
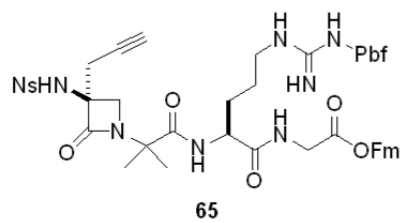


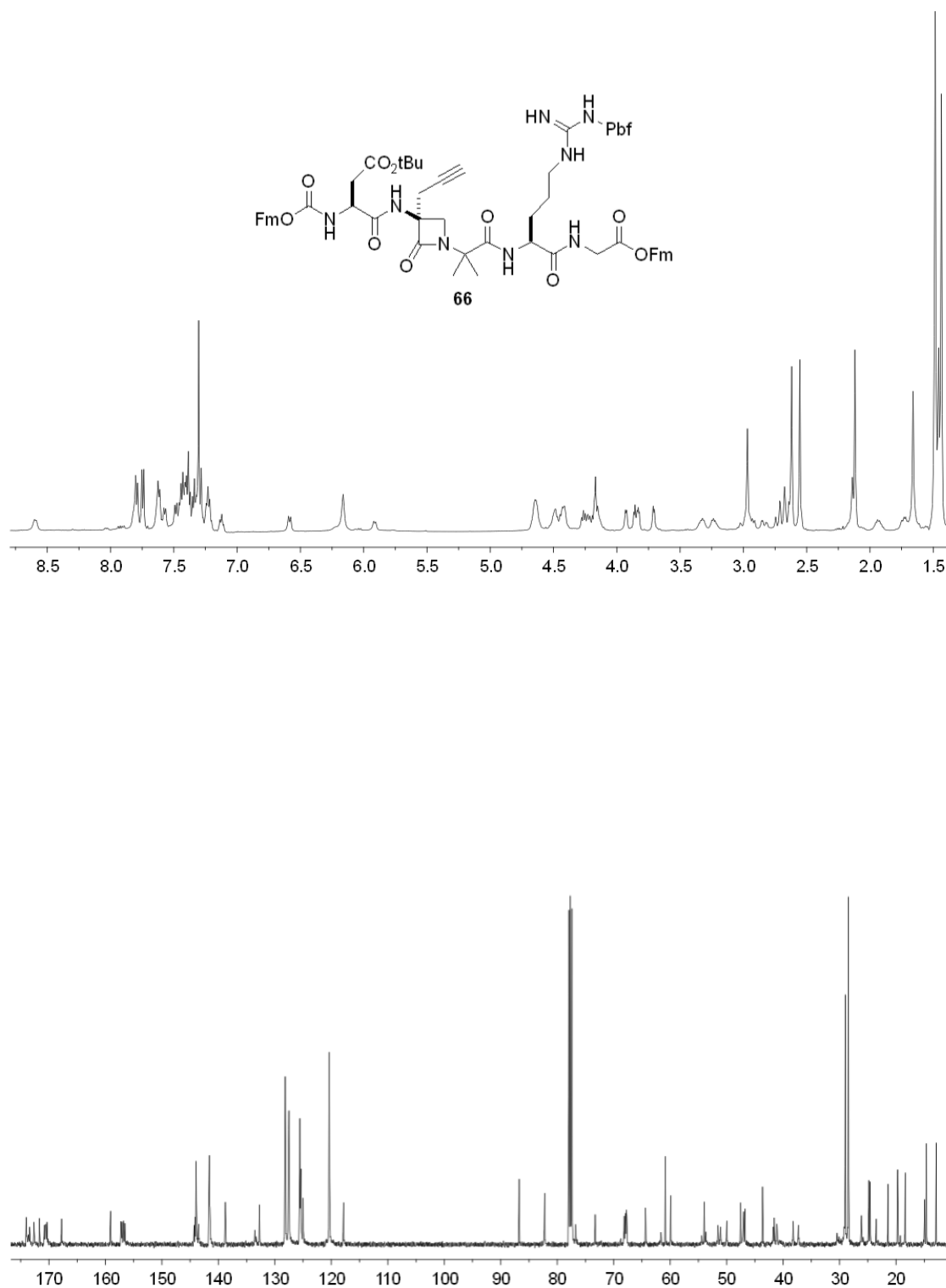


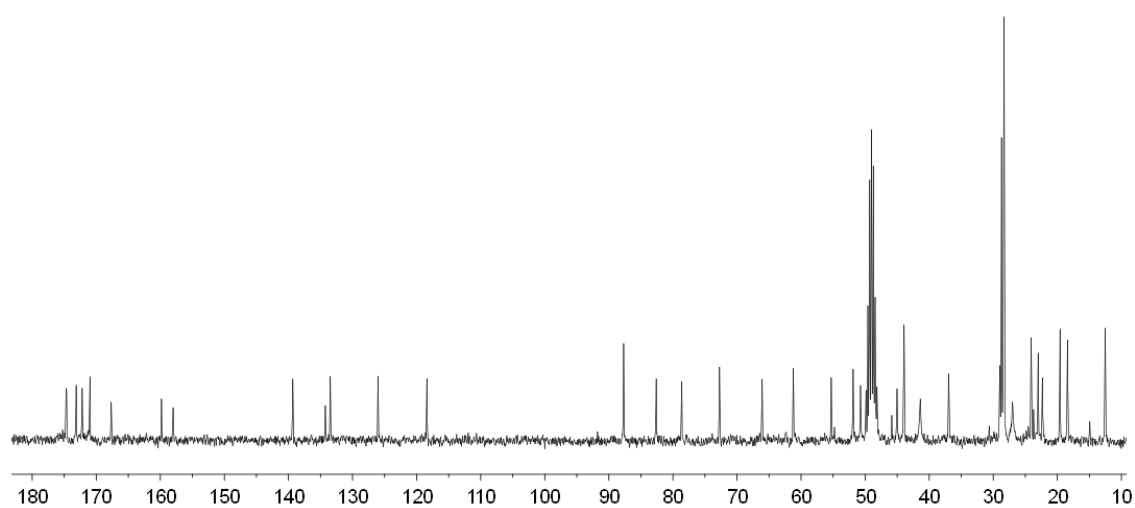
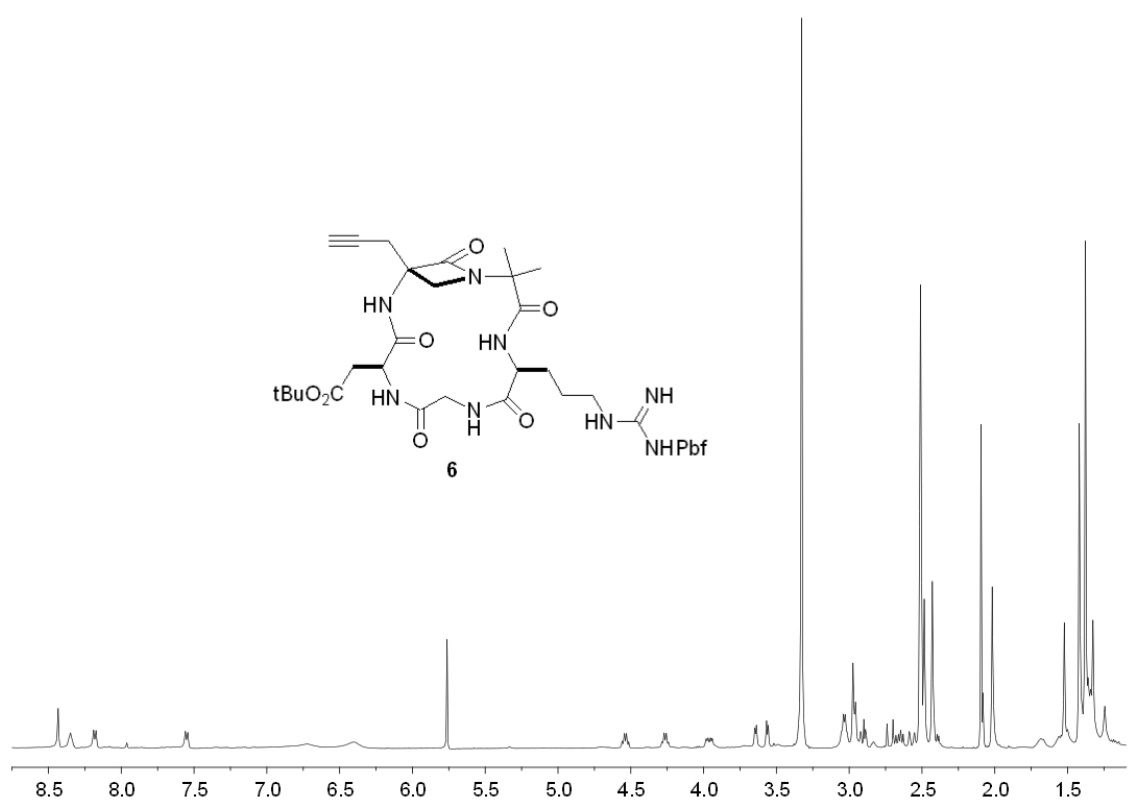


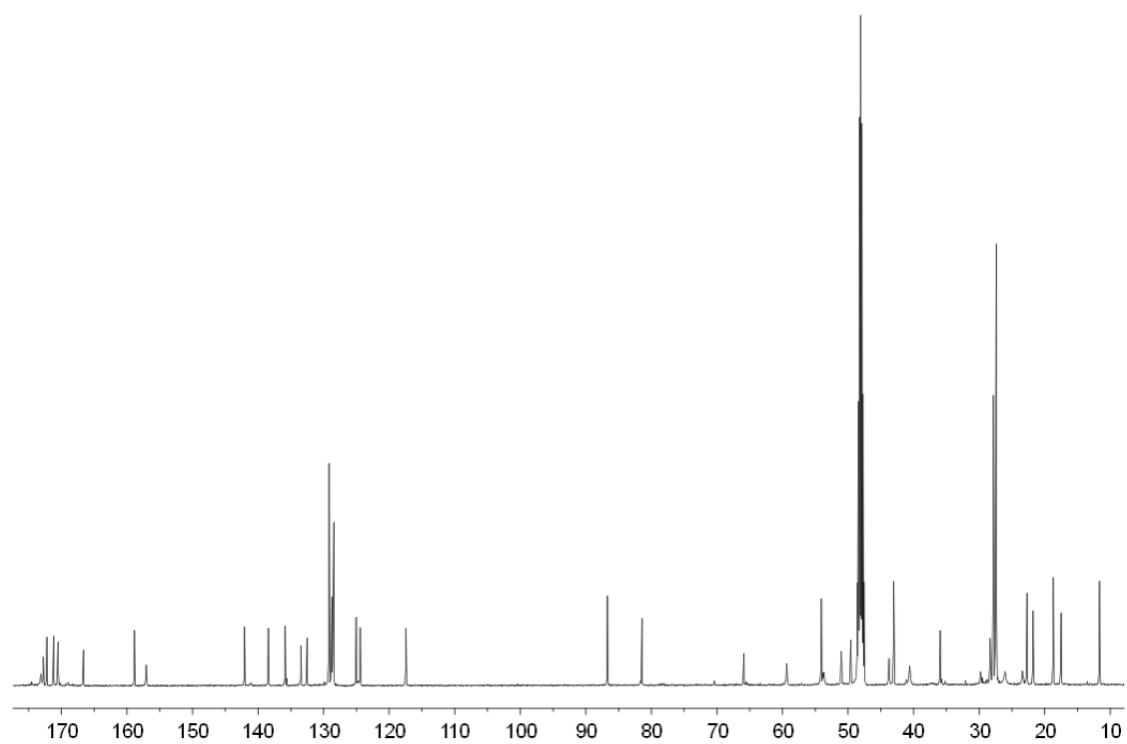
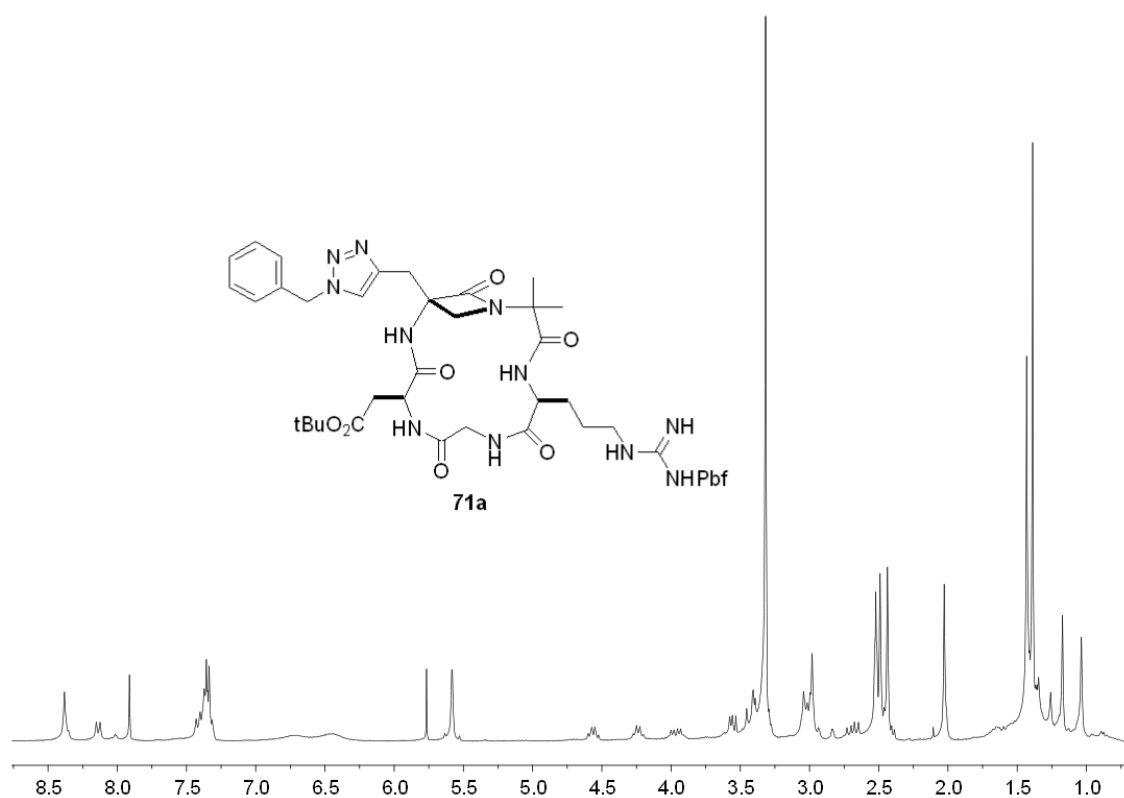


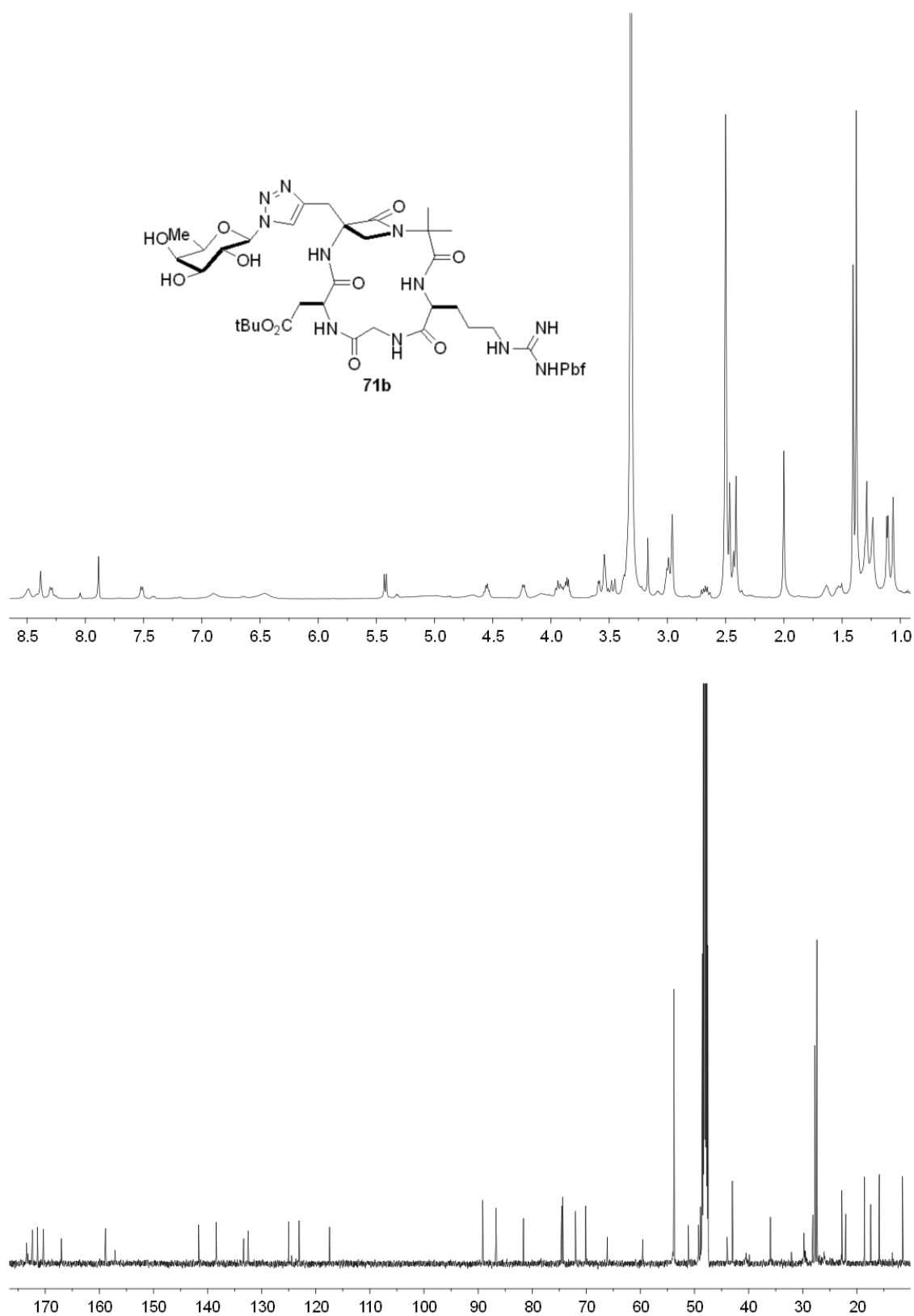


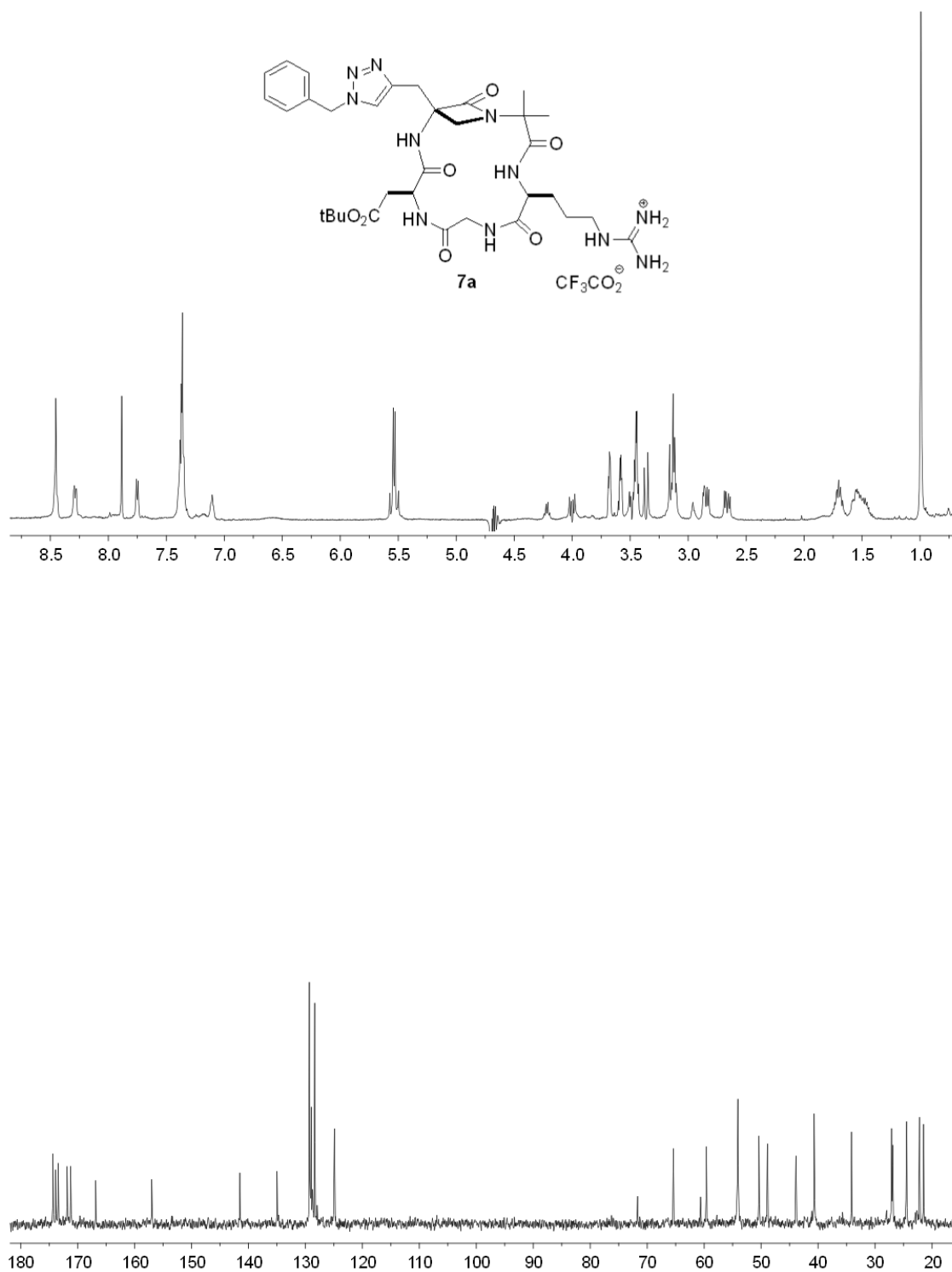




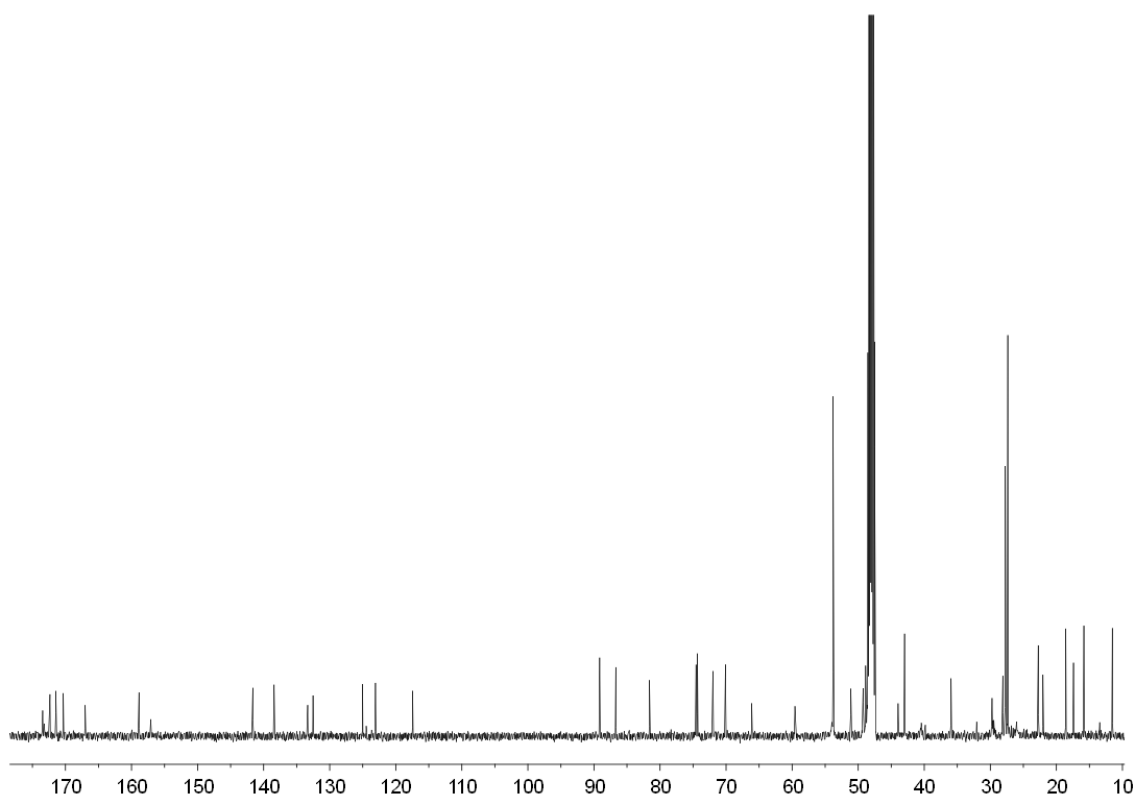
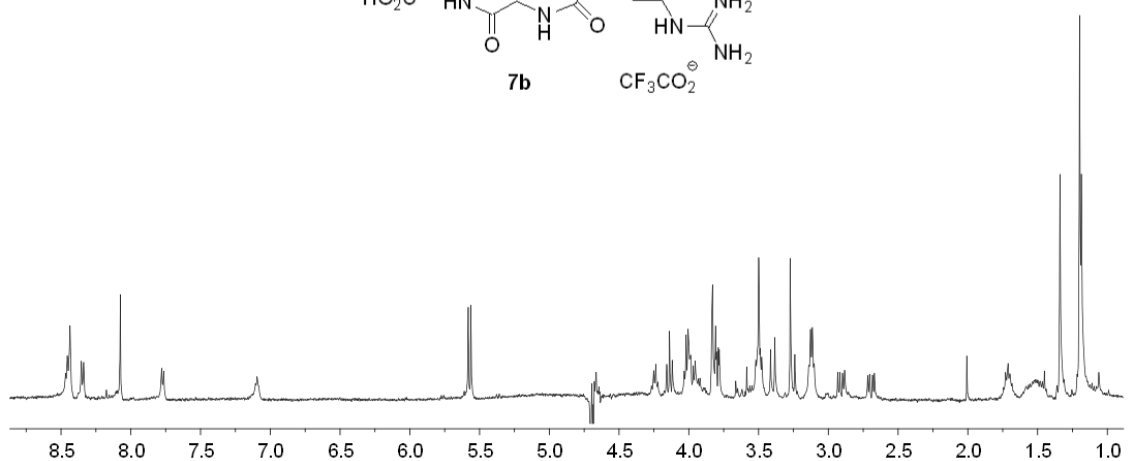
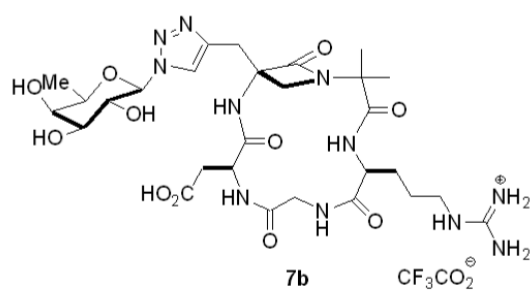






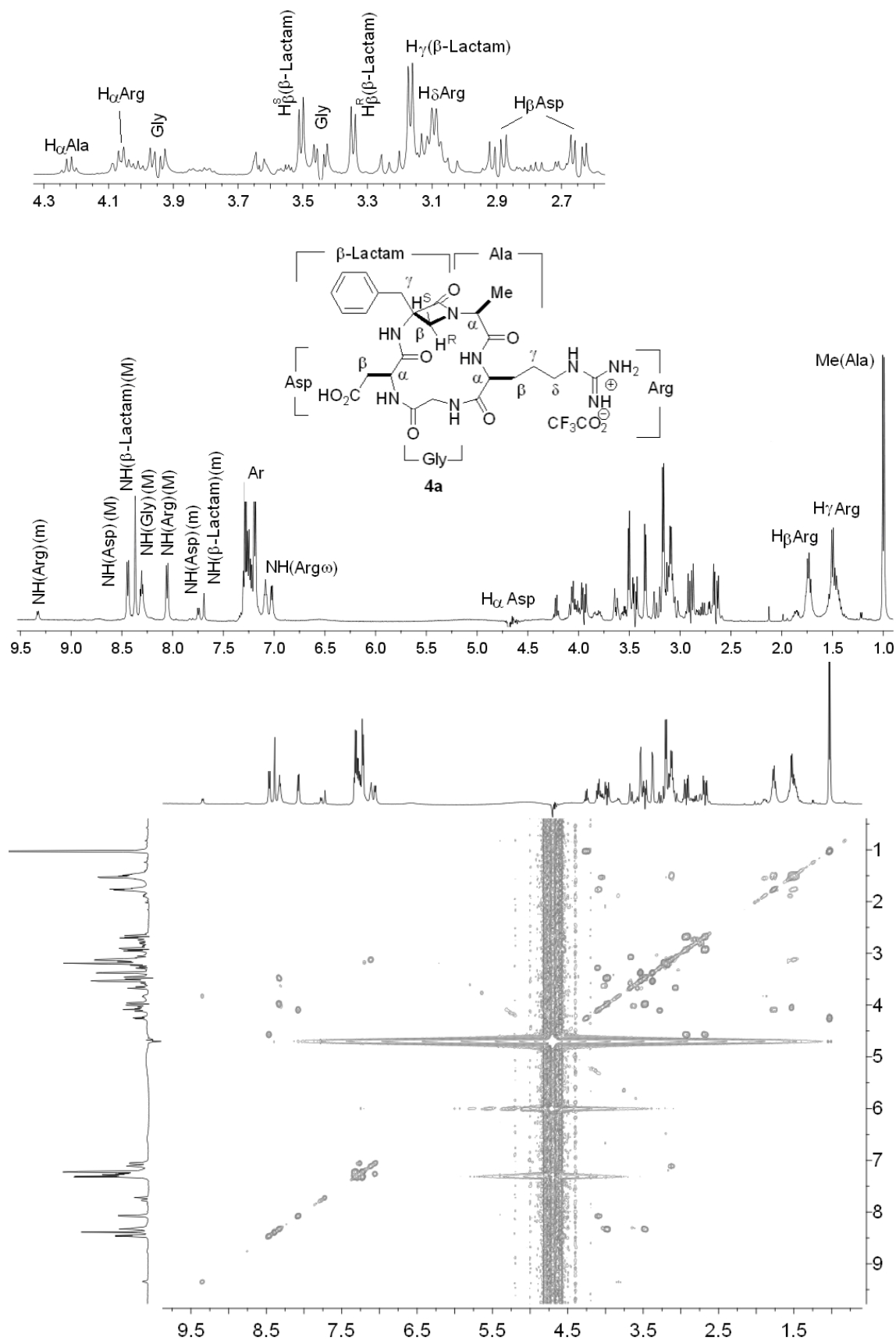


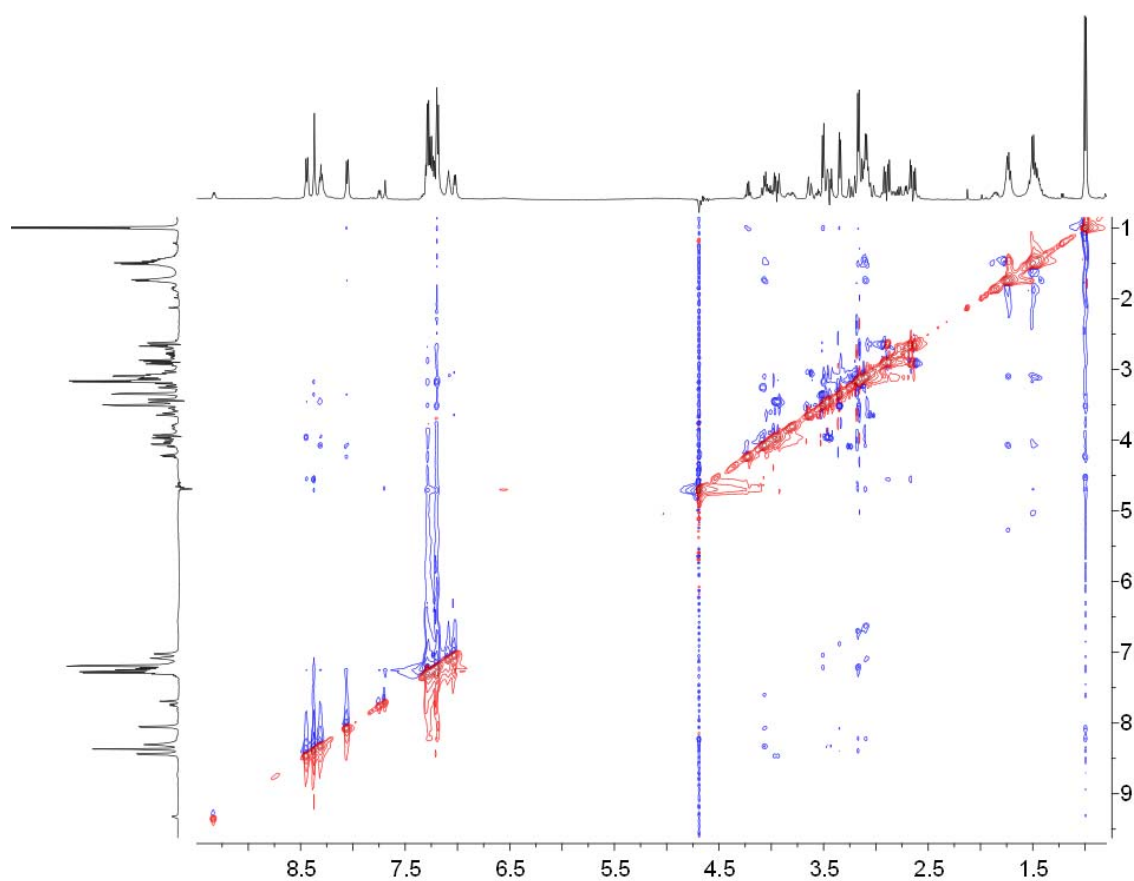




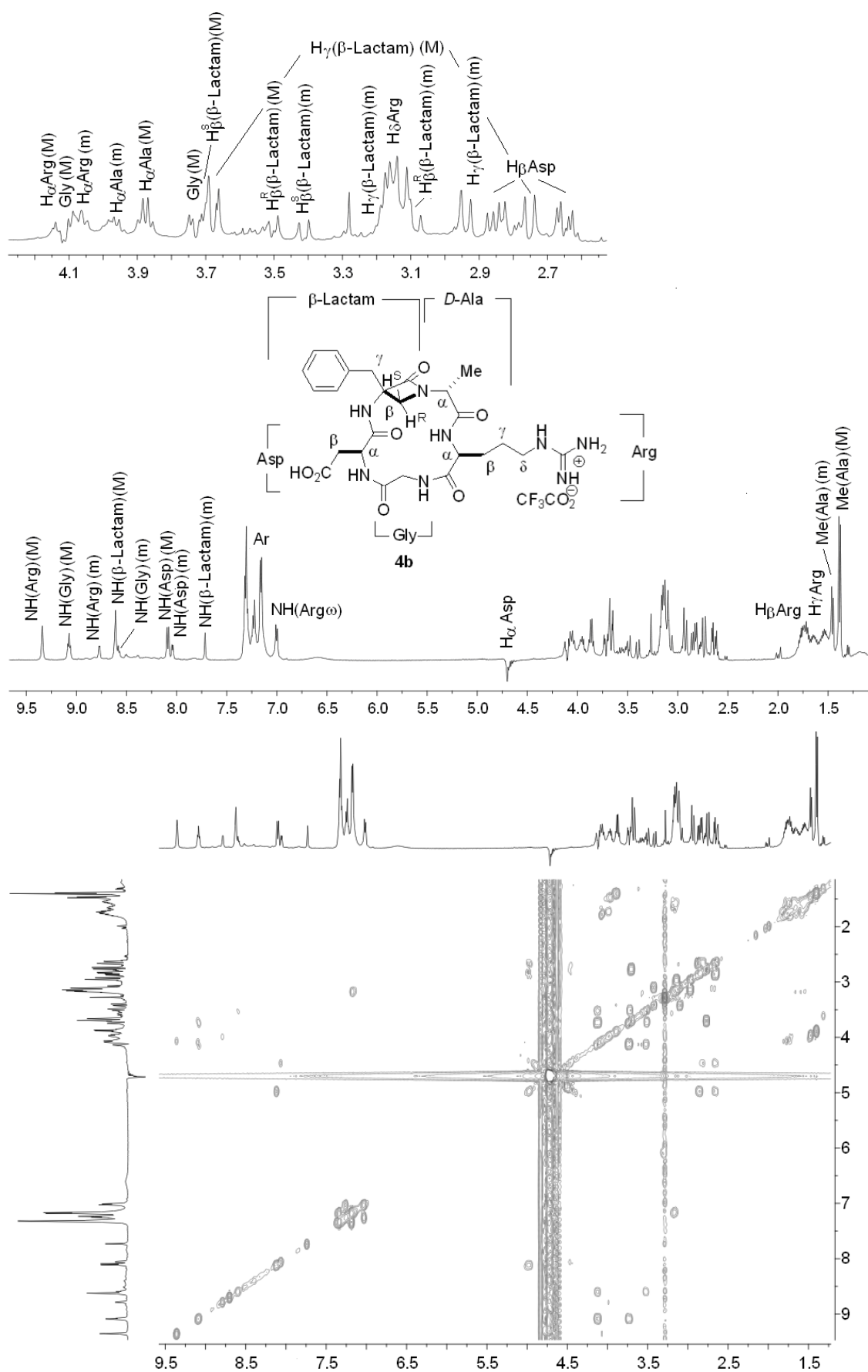
## 5.2. Asignación ciclos 4a-c y 5 y espectros bidimensionales: ROESY/NOESY

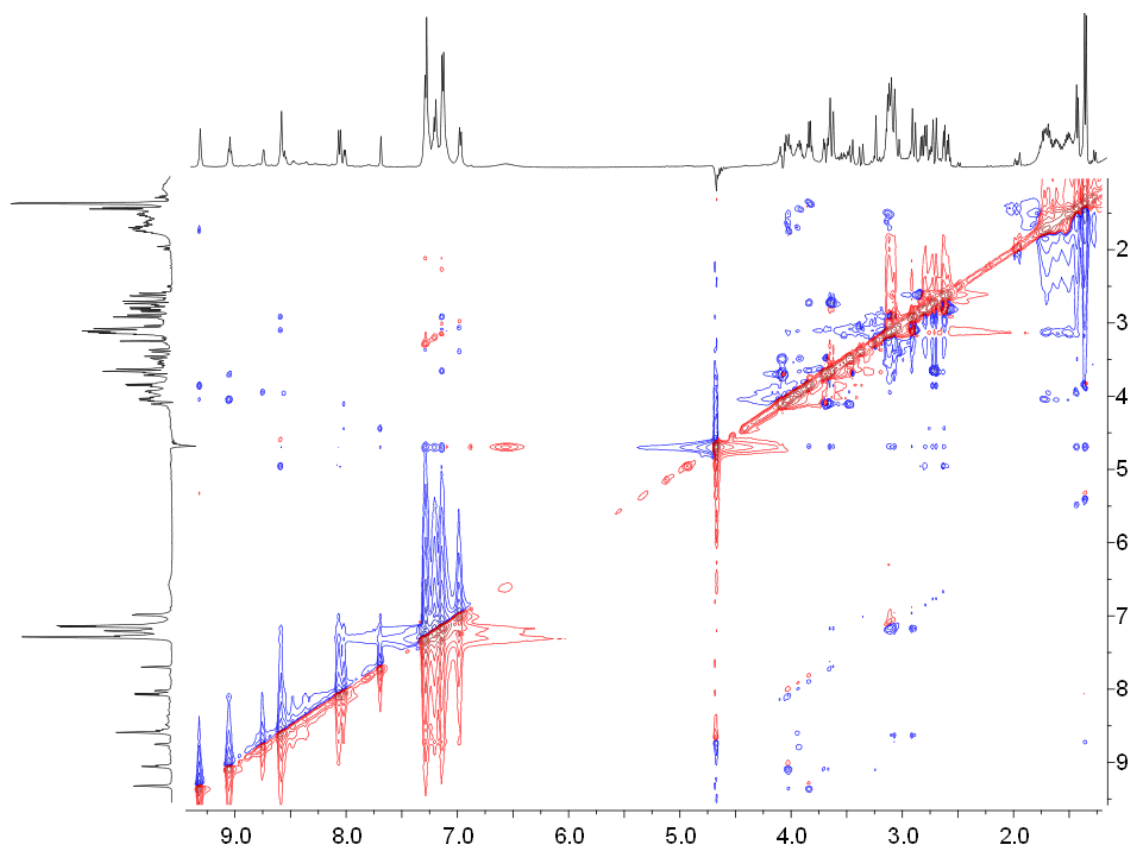
### 5.2.1. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-Arg-Gly-Asp] 4a



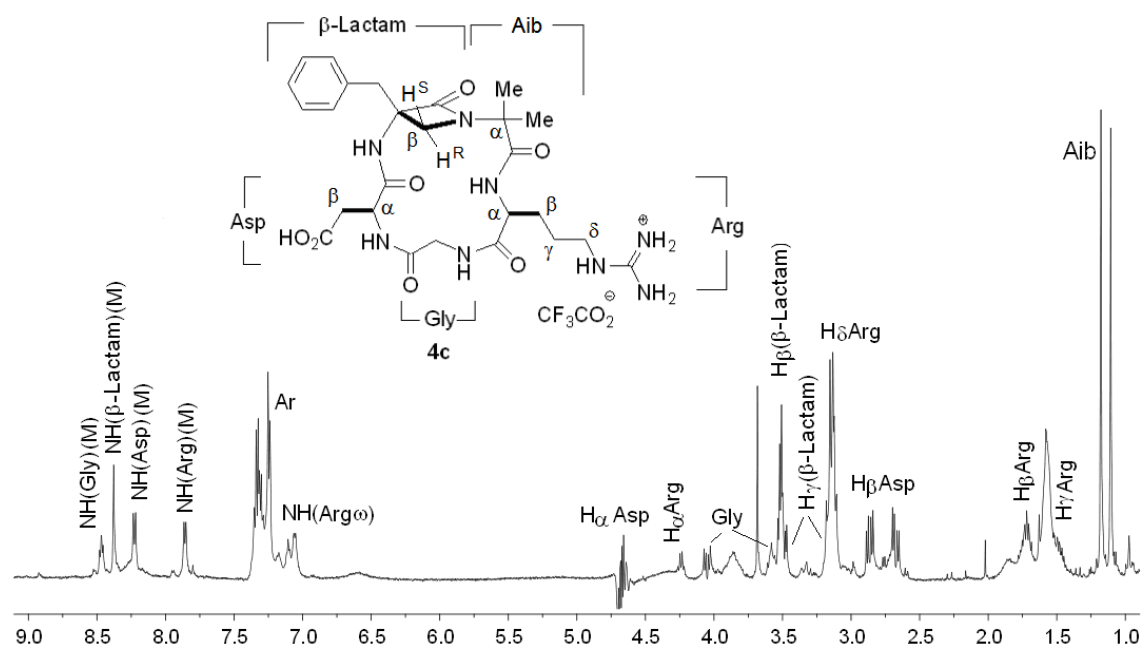


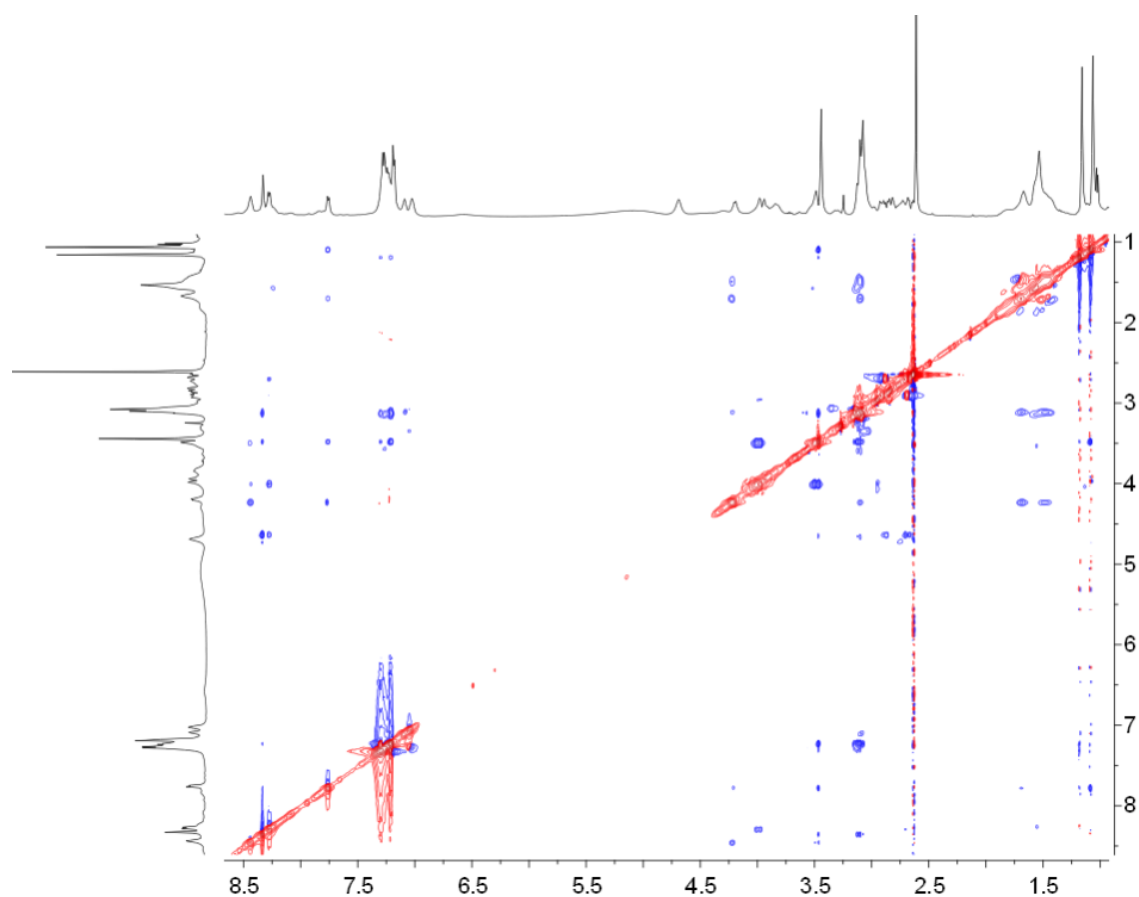
### 5.2.2. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-(D)-Ala-Arg-Gly-Asp] 4b:



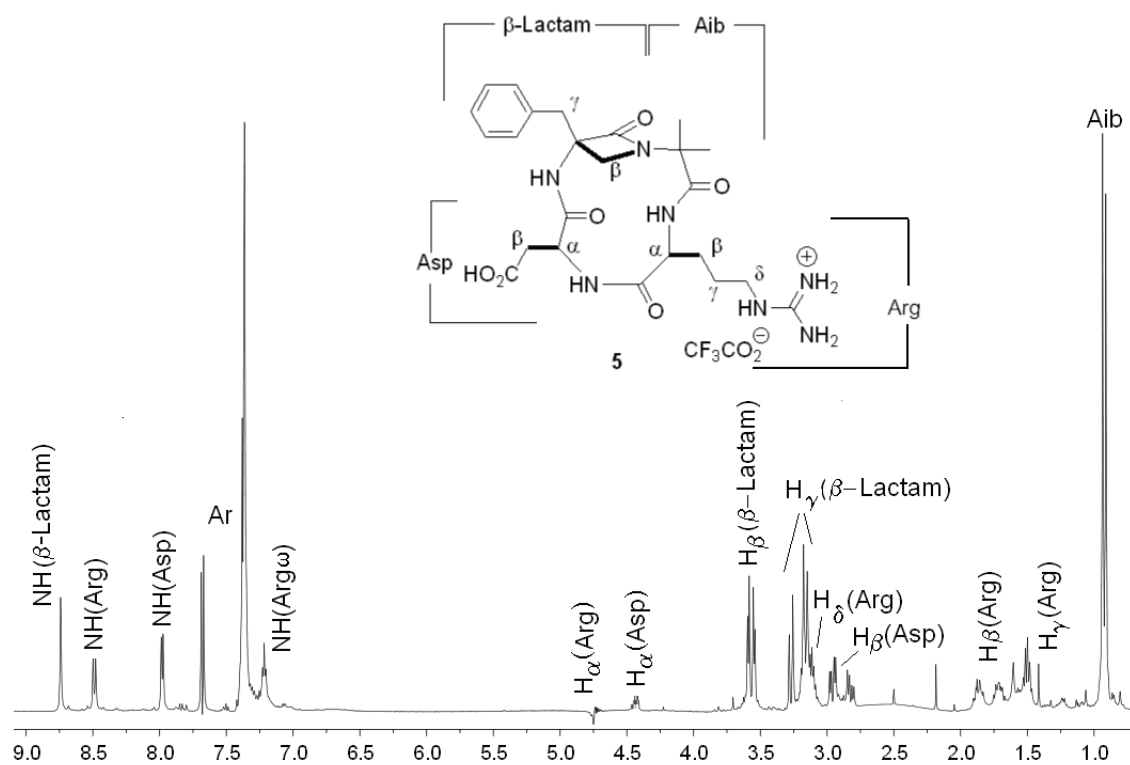


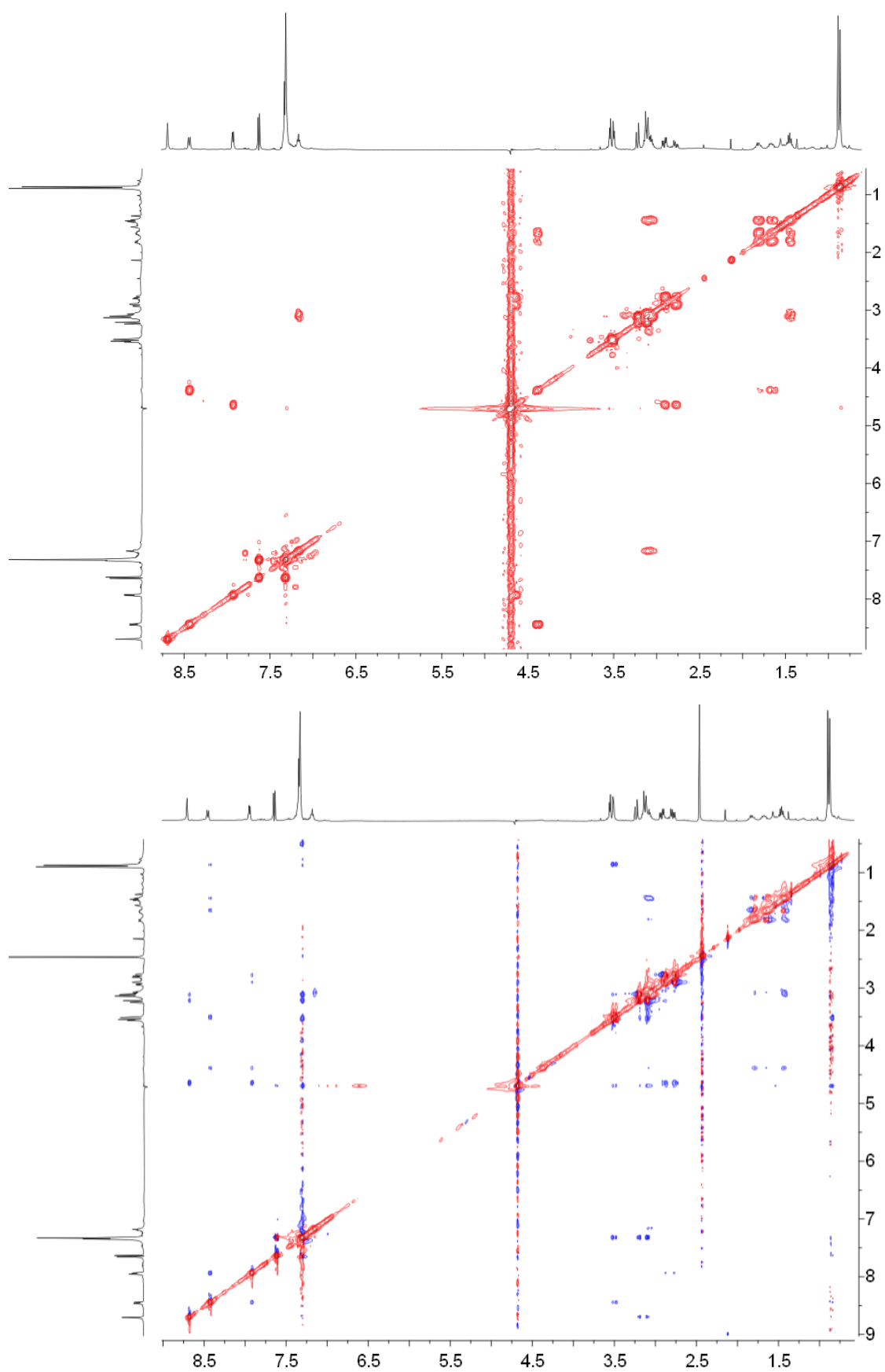
### 5.2.3. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Gly-Asp] 4c:





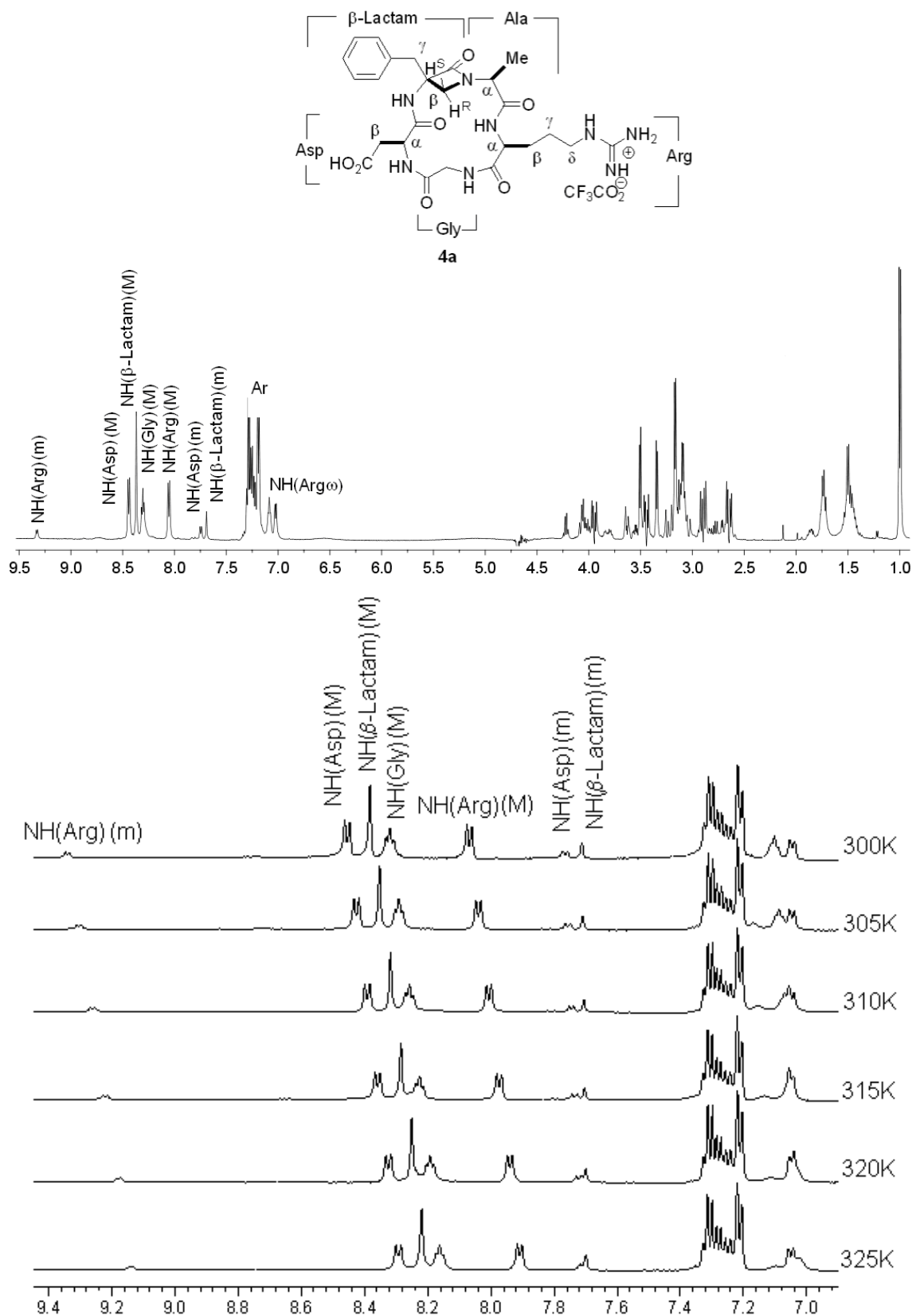
#### 5.2.4. Ciclotetrapéptido *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Asp] 5:



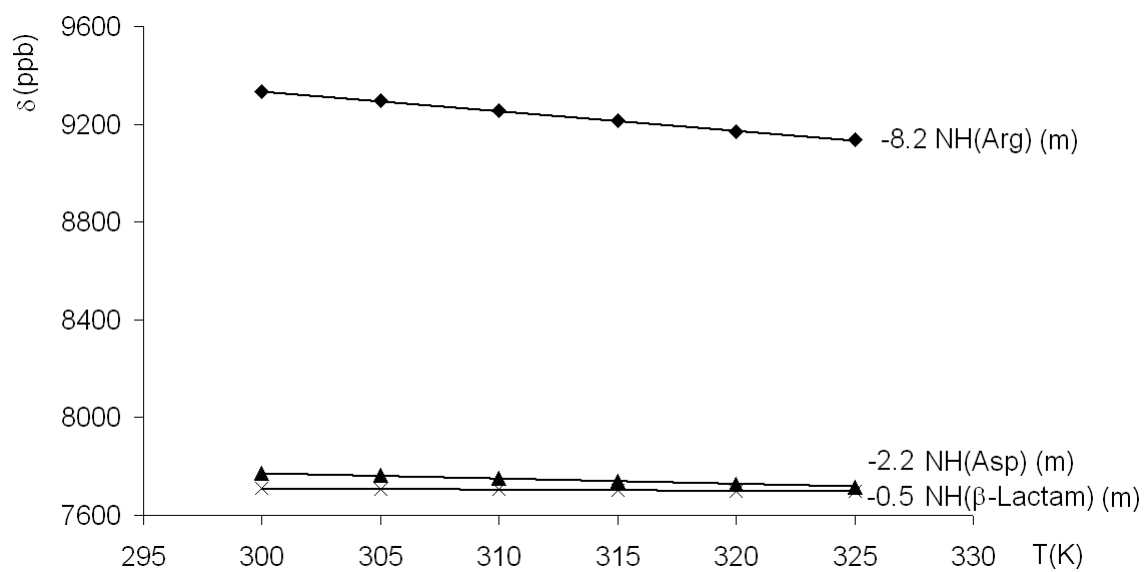
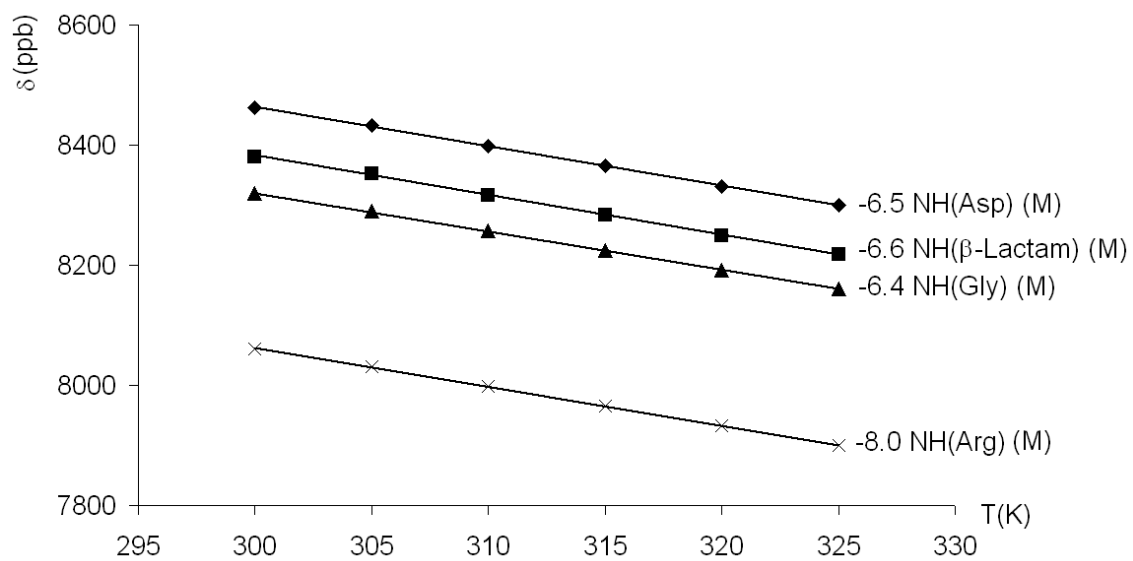


### 5.3. Derivas térmicas ciclos 4a-c y 5:

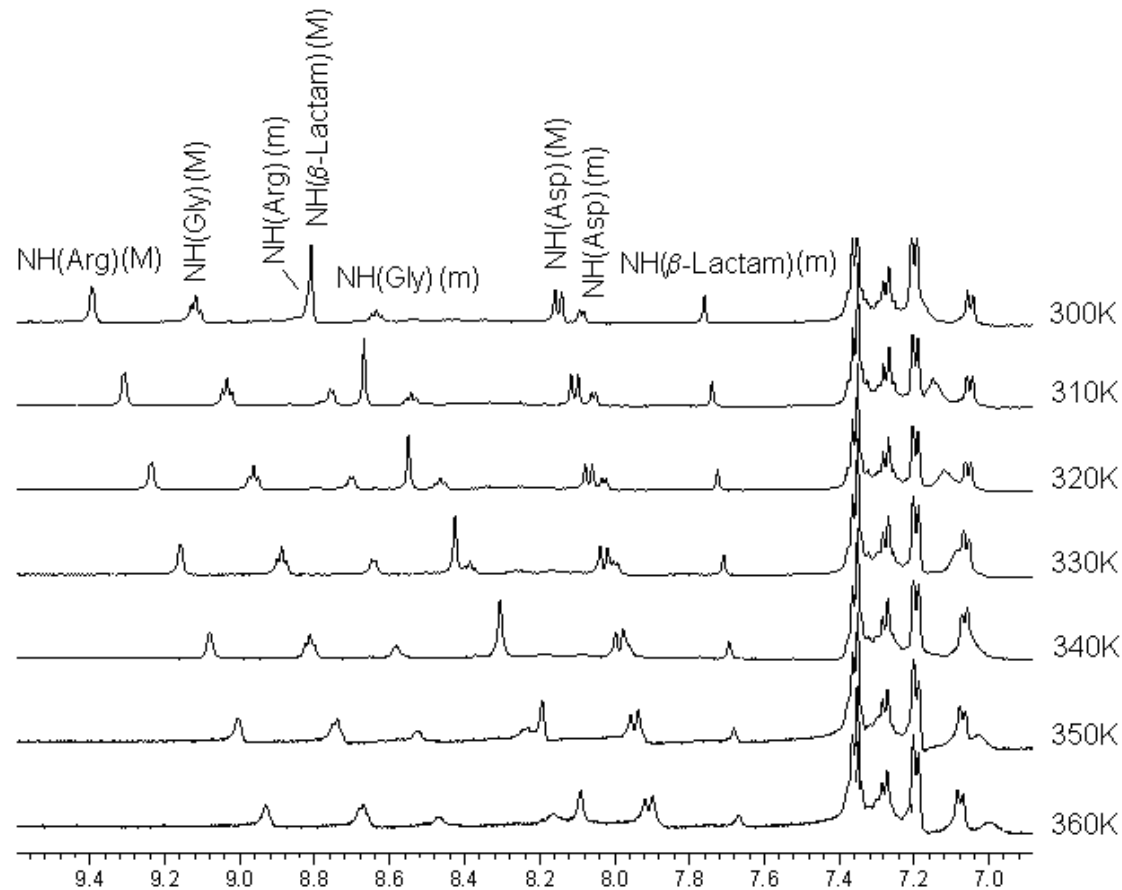
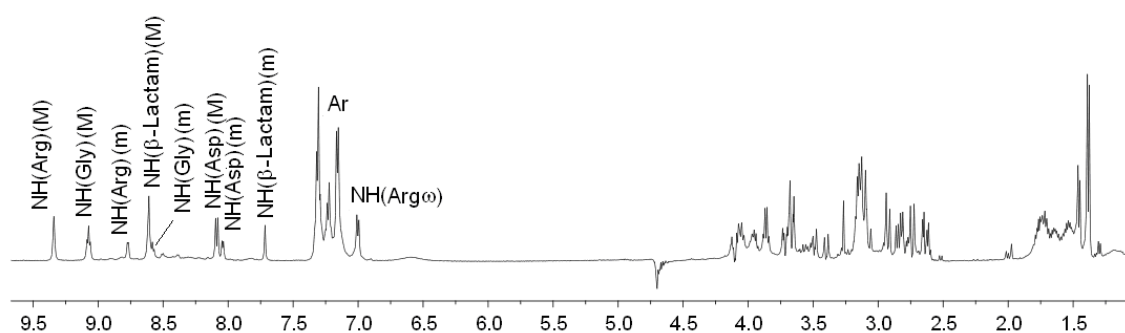
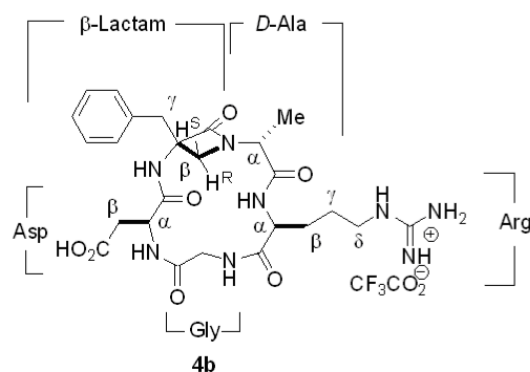
#### 5.3.1. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Ala-Arg-Gly-Asp] 4a:

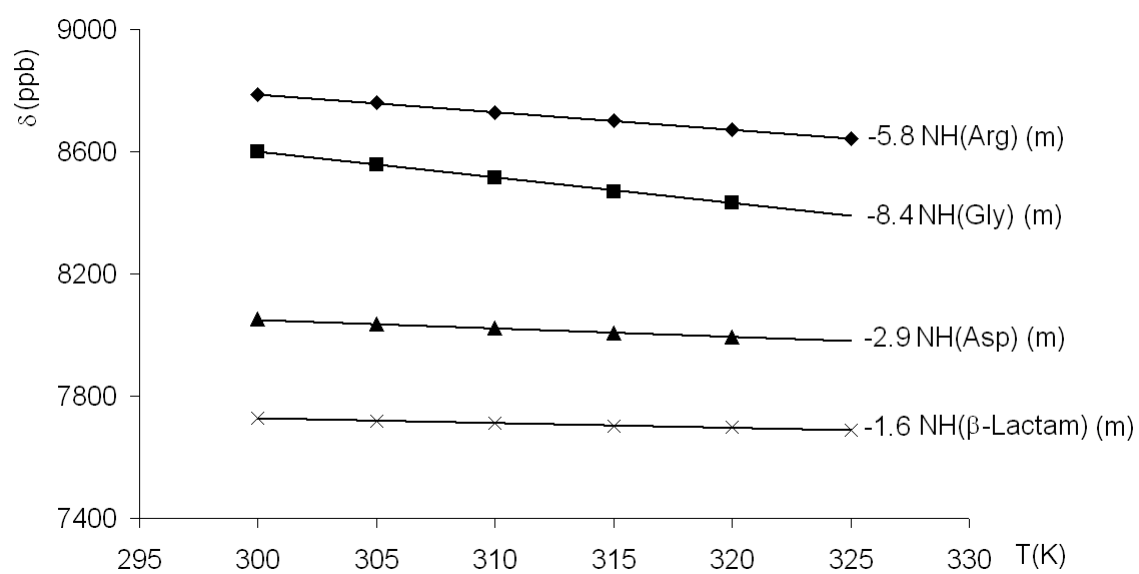
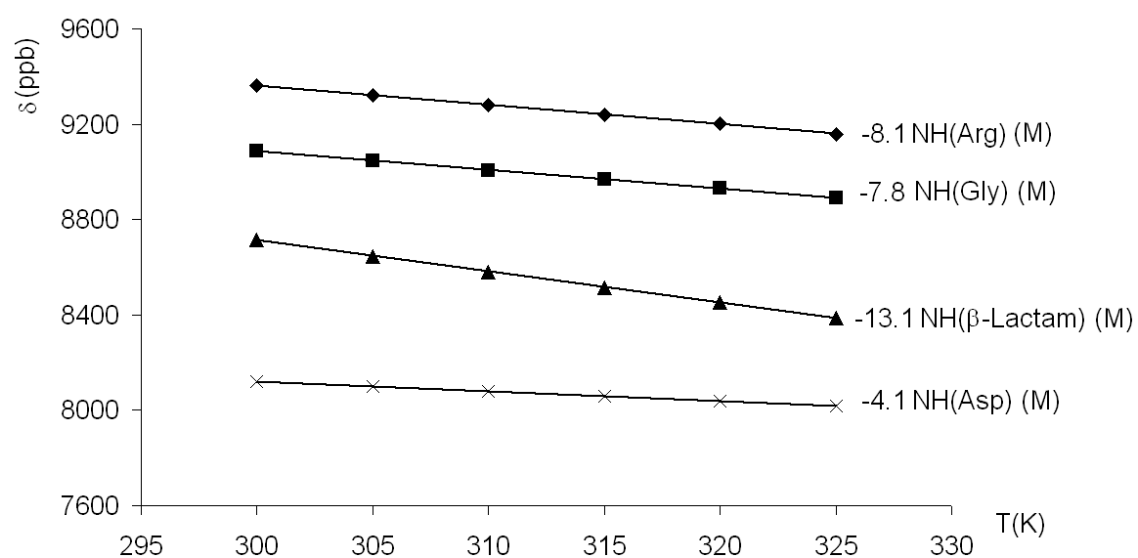




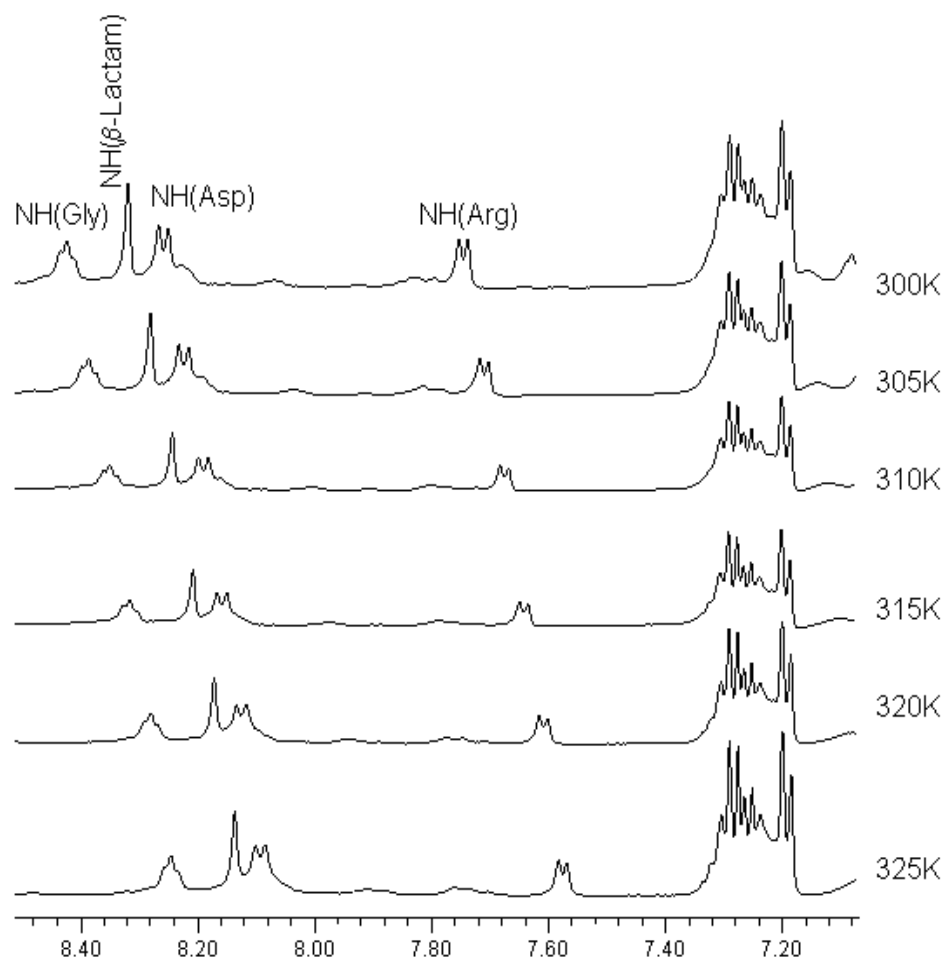
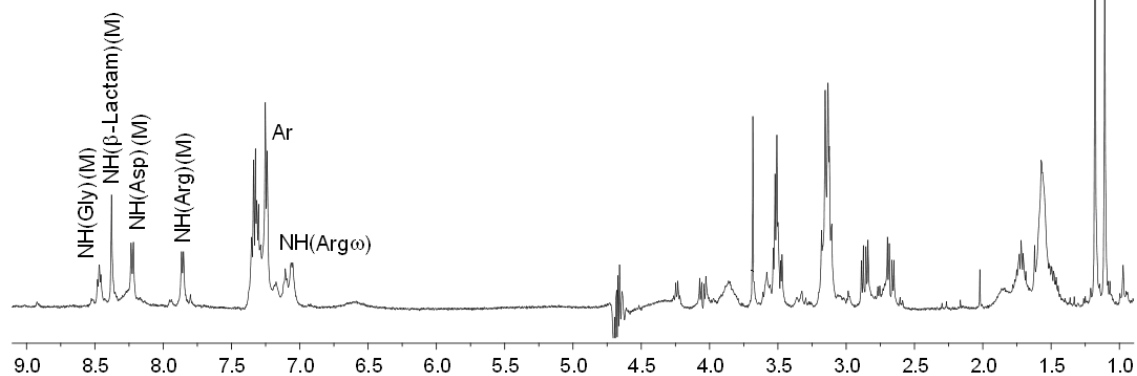
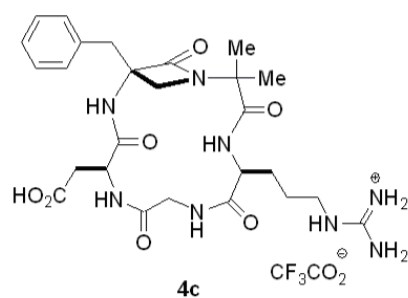


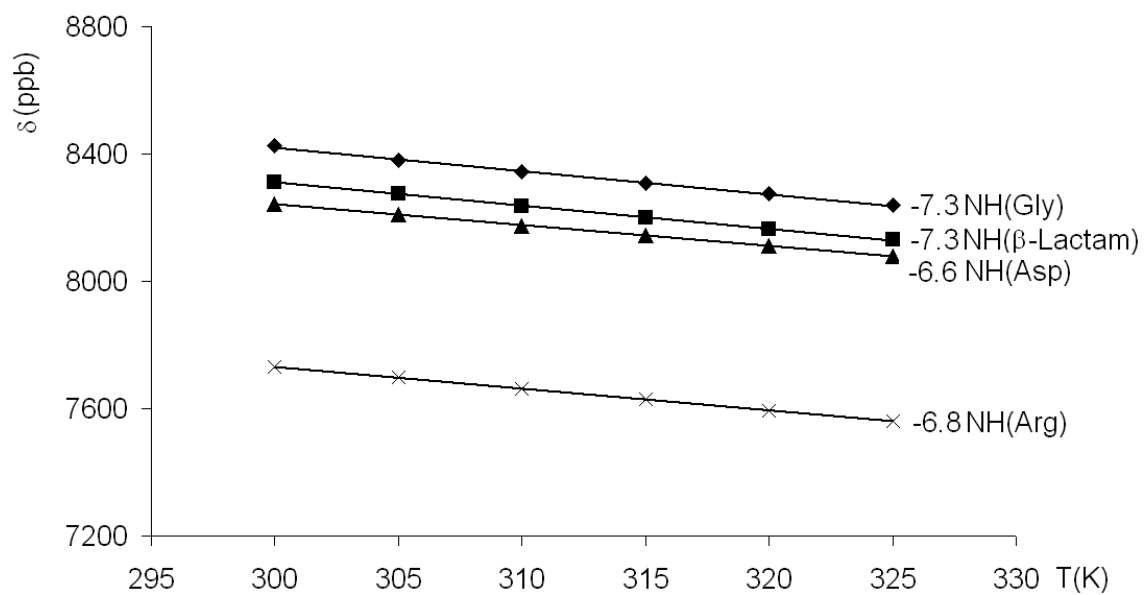
### 5.3.2. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-D-Ala-Arg-Gly-Asp] 4b:



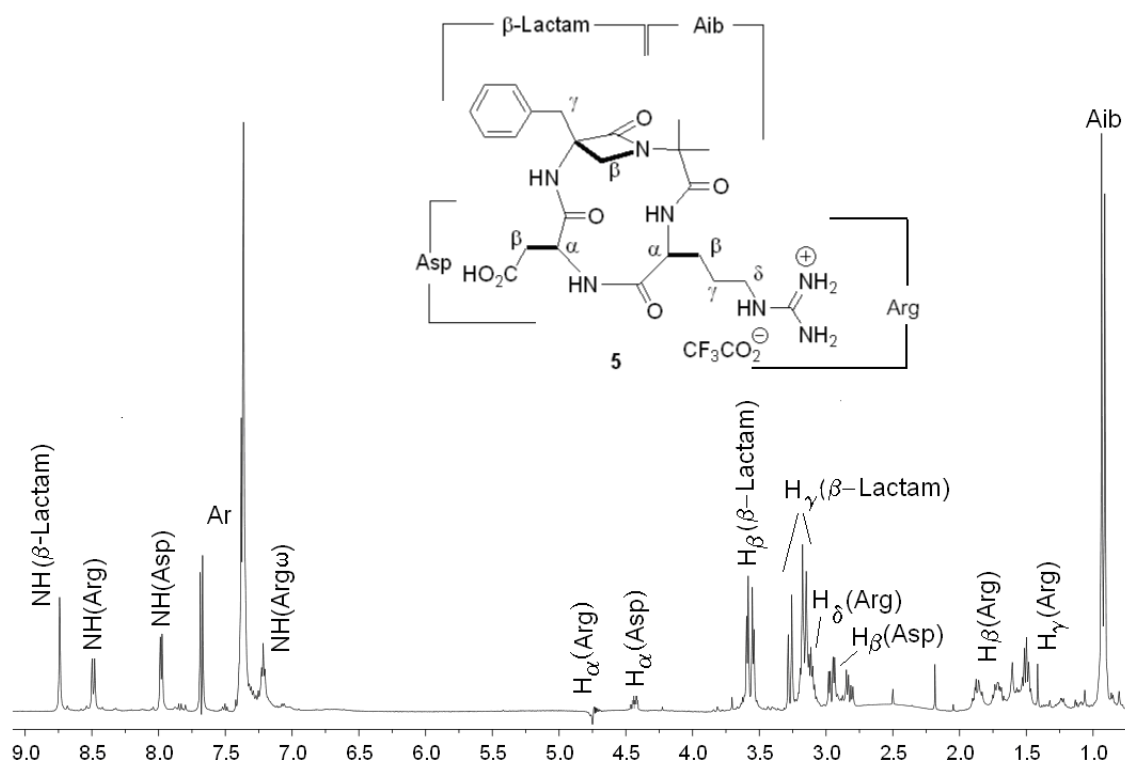


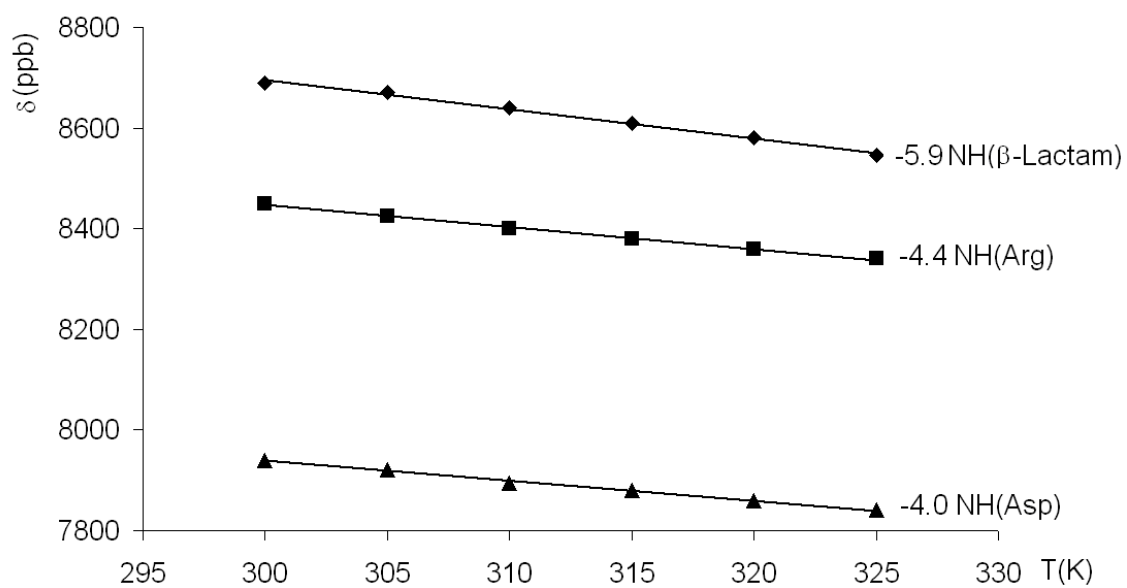
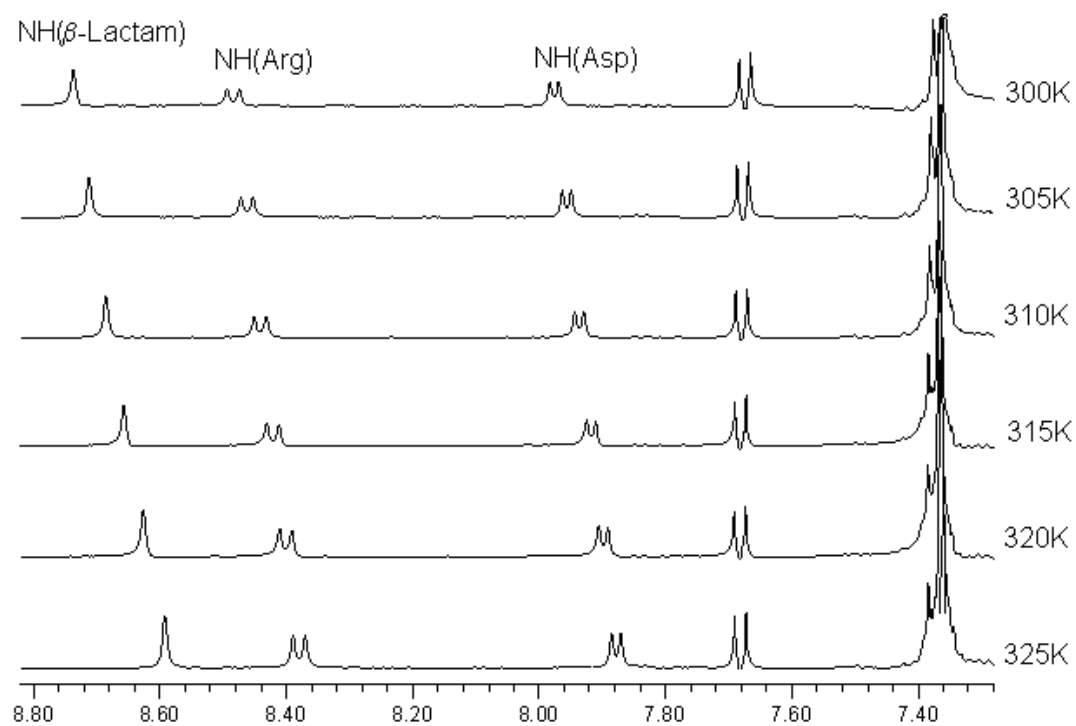
### 5.3.3. *ciclo*-[ $\beta$ -Lactam(Bn)-Aib-Arg-Gly-Asp] 4c:





#### 5.3.4. *ciclo*-[β-Lactam(Bn)-Aib-Arg-Asp] 5:





## **6. PUBLICACIONES**





# Synthesis of $\beta$ -Lactam Scaffolds for Ditopic Peptidomimetics

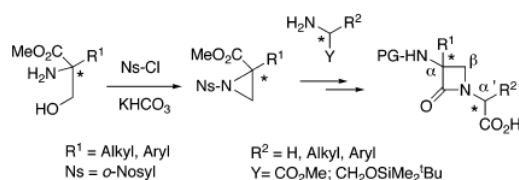
Claudio Palomo,\* Jesus M. Aizpurua,\* Eva Balentová, Azucena Jimenez, Joseba Oyarbide, Raluca M. Fratila, and José Ignacio Miranda

Departamento de Química Orgánica-I, Universidad del País Vasco,  
Facultad de Química, Apdo 1072, 20080 San Sebastián, Spain

jesusmaria.aizpurua@ehu.es

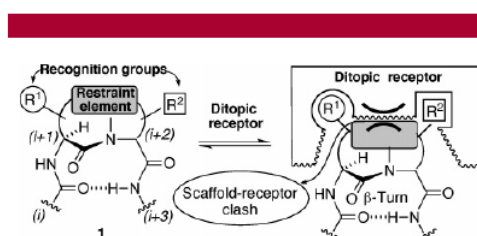
Received October 25, 2006

## ABSTRACT



Ring opening of  $\alpha$ -substituted- $\alpha$ -methoxycarbonyl-*N*-nosylaziridines provides a practical access to enantiopure  $\alpha,\alpha'$ -disubstituted  $\beta$ -lactam scaffolds, novel types of ditopic reverse turn surrogates. The procedure is general, short, and high yielding and starts from handy  $\alpha$ -substituted serinates and  $\alpha$ -amino acid derivatives.

Since their introduction by Freidinger,<sup>1</sup> externally scaffolded lactam peptides **1** (Figure 1) are among the most efficient



**Figure 1.** Scaffold/ditopic receptor interaction in  $\beta$ -turn lactam peptidomimetics: a bulky restraint element may preclude efficient recognition of  $R^1$  and  $R^2$  groups.

and popular  $\beta$ -turn mimics.<sup>2</sup> They present two major advantages over cyclic peptides or internally scaffolded peptidomimetics: (a) recognition by receptors can be tuned

owing to the flexibility of the  $\text{C}=\text{O} \cdots \text{HN}$  hydrogen bond, and (b) incorporation of the  $\beta$ -turn surrogate ( $i+1$ )–( $i+2$ ) segment into the peptide chain is not compromised by macrocyclization reactions.

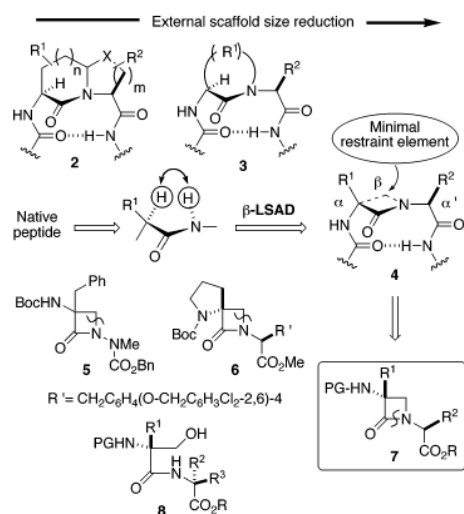
The design of lactam peptidomimetics presents, however, an important limitation. As the restraint element (cycle) and recognition groups ( $R^1$ ,  $R^2$ ) are usually crammed in the scaffold, it is very difficult to devise lactam structures free from undesired interactions with the receptor, especially for ditopic<sup>3</sup> ones.

Most of the lactam peptidomimetics used routinely as  $\beta$ -turn surrogates (Figure 2) require one or two cycles to correctly overlay the dihedral angles of the  $\beta$ -genic ( $i+1$ )–( $i+2$ ) residues to a particular  $\beta$ -turn type (e.g., Nagai's bicyclic lactams **2** or Freidinger's lactams **3**). Hence, the

(1) (a) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brookas, J. R.; Saperstein, R. *Science* **1980**, *210*, 656–658. (b) Freidinger, R. M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5553–5566.

(2) For reviews, see: (a) Souers, A. J.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431–7448. (b) Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789–12854. (c) Kahn, M.; Eguchi, M. *Synthesis of Peptides Incorporating  $\beta$ -Turn Inducers and Mimetics*. In *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry*; Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C., Eds.; Thieme: Stuttgart, New York, 2003; Vol. E22c, pp 695–740 and references therein.

(3) *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Lehn, J.-M., Atwood, J. L., Davies, J. E. D., MacNicol, D. D., Vögtle, F., Eds.; Pergamon: Oxford, 1996.



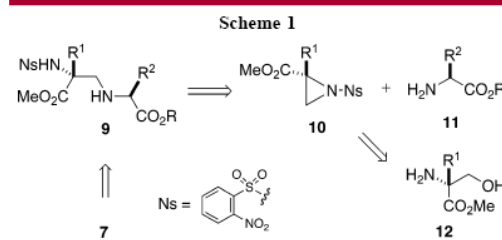
**Figure 2.**  $\beta$ -Lactam scaffold-assisted design ( $\beta$ -LSAD): formal insertion in the native peptide of a carbon atom ( $\text{C}\alpha\text{-H} + \text{H-N} \rightarrow \text{CH}_2$ ) provides the minimal pseudopeptide **4** required to accommodate a  $\beta$ -turn conformation. PG: protecting group.

design of “minimal” lactam peptidomimetics incorporating restraint elements as small as possible becomes highly attractive. Within this endeavor, we have undertaken the development of pseudopeptides **4** by applying a “ $\beta$ -lactam scaffold-assisted design” ( $\beta$ -LSAD). Mimetics resulting from such an approach differ only in one single carbon atom from the native peptides and are characterized by (a) an  $(i + 1)$  residue consisting of an  $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactam ring unsubstituted at position  $\beta$  and (b) a linear disposition of the  $\text{C}\alpha$ , N, and  $\text{C}\alpha'$  atoms.<sup>4</sup>

Although the synthesis of scaffolds for *monotopic*  $\beta$ -lactam pseudopeptides **4** ( $\text{R}^2 = \text{H}$ ) is known,<sup>4,5</sup> no general method exists to prepare the *ditopic*  $\beta$ -lactam counterparts required for the full development of  $\beta$ -LSAD.<sup>6</sup> Only the syntheses of the racemic azapeptidomimetic  $\beta$ -lactam **5**<sup>7</sup> and the proline-

derived  $\beta$ -lactam scaffold **6**<sup>8</sup> have been reported. In both instances, a Mitsunobu-type N1–C4 cyclization was the key step to form the 2-azetidinone ring from  $\alpha$ -substituted serine dipeptides **8**. Unfortunately, the general applicability of such intermediates to the synthesis of  $\beta$ -lactam scaffolds **7** is drastically limited by the low acidity of the amide moiety and the steric hindrance of substituents nearby.<sup>9</sup>

Herein, we report a general preparation of enantiopure ditopic  $\beta$ -lactam scaffolds **7** by means of an alternative N1–C2 ester–amine cyclization strategy (Scheme 1). Our



synthetic plan employed  $\beta$ -N-peptidyl-azaserinates **9** as  $\beta$ -lactam ring precursors and involved the reaction of  $\alpha$ -amino esters **11**<sup>10</sup> with *N*-(*o*-nosyl)-aziridines **10**,<sup>11</sup> which acted as N-protected, O-activated equivalents of  $\alpha$ -substituted serinates **12**.<sup>12</sup>

Nosylation of methyl  $\alpha$ -benzylserinate **15** under standard conditions (*o*-Ns-Cl, Et<sub>3</sub>N, DMAP catalyst) proved surprisingly troublesome (Scheme 2), yielding the expected N-monoprotected product in less than 25% yield. Changing to inorganic bases ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) also led to the formation of the same product along with the unexpected oxazolidin-2-one **16**, incorporating a carbamate carbonyl group from potassium carbonate. Gratifyingly, we found that  $\alpha$ -substituted methyl serinates (**15** and **17**) or their peptides (**18**) were cleanly

(7) Broadrup, R. L.; Wang, B.; Malachowski, W. P. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10277–10284.

(8) (a) Bittermann, H.; Gmeiner, P. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 97–102. (b) Bittermann, H.; Böckler, F.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P. *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 6315–6322.

(9) For instance, in our hands, dipeptide CHO-(D)-Ser( $\alpha$ Bn)-GlyOBn failed repeatedly to cyclize to the corresponding  $\beta$ -lactam **7** (PG = CHO;  $\text{R}^1 = \text{Bn}$ ;  $\text{R}^2 = \text{H}$ , R = Bn) under several Mitsunobu conditions, including those reported in refs 7 and 8.

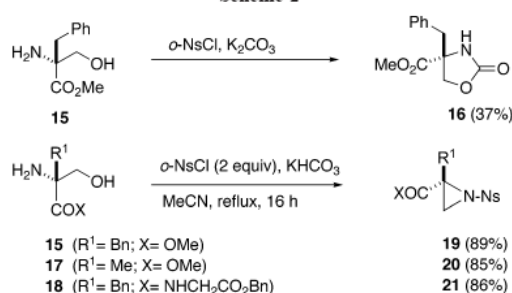
(10) Alternative access to  $\beta$ -N-peptidyl-azaserinates **9** was also explored from  $\alpha$ -amino esters (including unhindered benzyl glycinate) and  $\alpha$ -substituted serines with the hydroxy group activated as *O*-mesylate **13** and lactone **14**, but all attempts to prepare the desired  $\alpha,\beta$ -diamino esters met with failure.



(11) Monographs on the reactivity of aziridines: (a) Tanner, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 599–619. (b) Pearson, W. H.; Lian, B. W.; Bergmeier, S. C. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Padwa, A., Ed.; Pergamon: New York, 1996; Vol. 1A, p 1–60. (c) Atkinson, R. S. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1519–1559. (d) Osborn, H. M. I.; Sweeney, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1693–1715.

(12) Available from (D)-serine. See: Seebach, D.; Aebi, J. D.; Gander-Coquoz, M.; Naef, R. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1194–1216.

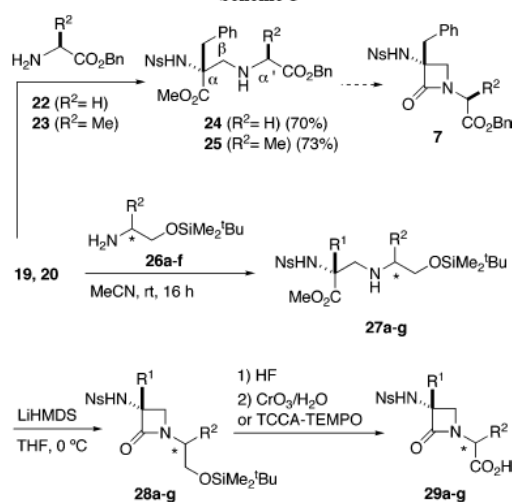
Scheme 2



transformed into the corresponding *N*-nosyl aziridines by treatment with 2 equiv of *o*-Ns-Cl and excess KHCO<sub>3</sub> in acetonitrile at reflux. This reaction avoids cumbersome *N*- or *O*-monoprotections required for conventional stepwise transformation of  $\alpha,\beta$ -aminoalcohols into *N*-sulfonylaziridines<sup>13</sup> and enables further in situ ring-opening reactions of the products, vide infra.

Reaction of benzyl glycinate **22** and benzyl alaninate **23** with *N*-nosylaziridine **19** (Scheme 3) led to a clean and

Scheme 3



completely  $\beta$ -regioselective ring-opening reaction to form the  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -*N*-peptidyl-azaserines **24** and **25** in good yields.<sup>14</sup> These compounds might be converted into **7** after

(13) For a related one-pot tosylation/aziridination of  $\alpha,\beta$ -aminoalcohols, see: Bieber, L. W.; de Aratijo, M. C. F. *Molecules* **2002**, *7*, 902–906.

(14) To the best of our knowledge, these examples represent the first general preparation of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -*N*-peptidyl-azaserines in enantiopure form. For stereocontrolled synthesis of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -*N*-alkyl-azaserines, see: (a) Pfammatter, E.; Seebach, D. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 1323–1336. (b) Burgaud, B. G. M.; Horwell, D. C.; Padova, A.; Pritchard, M. C. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13035–13050.

previous hydrolysis to the corresponding  $\beta$ -amino acids, followed by cyclodehydration.<sup>15</sup> However, all attempts to hydrolyze the methoxycarbonyl group were thwarted by previous debenzoylation or decomposition. Alternative intramolecular base-promoted direct ester–amine condensation of **24** and **25** to **7** also proved impracticable.<sup>16</sup> These behaviors were attributed primarily to the sterical shielding around the CO<sub>2</sub>Me group and also to the latent acidity of the  $\alpha'$  proton. To cancel this later effect,  $\beta$ -aminoalcohol silyl ethers **26**<sup>17</sup> were investigated as nonenolizable surrogates of  $\alpha$ -amino esters **22** and **23**.

As shown in Table 1, aziridines **19** and **20** give a smooth ring-opening reaction with amines **26** to the corresponding

**Table 1.** Synthesis of  $\beta$ -Lactam Scaffolds **29** from Aziridines **19** and **20**

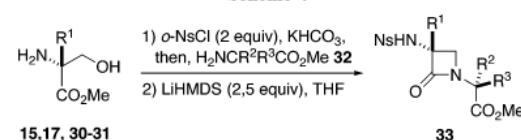
entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	product	yield (%) <sup>a</sup>	product	yield (%) <sup>c</sup>
1	CH <sub>2</sub> Ph	H	<b>27a</b>	72 (75) <sup>b</sup>	<b>29a</b>	62 (81) <sup>d</sup>
2	CH <sub>2</sub> Ph	Me, (S) <sup>*</sup>	<b>27b</b>	56 (67) <sup>b</sup>	<b>29b</b>	82
3	CH <sub>2</sub> Ph	Me, (R) <sup>*</sup>	<b>27c</b>	56 (65) <sup>b</sup>	<b>29c</b>	81
4	CH <sub>2</sub> Ph	Ph, (S) <sup>*</sup>	<b>27d</b>	52	<b>29d</b>	60
5	CH <sub>2</sub> Ph	Ph, (R) <sup>*</sup>	<b>27e</b>	56	<b>29e</b>	50
6	Me	H	<b>27f</b>	– (66) <sup>b</sup>	<b>29f</b>	– (74) <sup>d</sup>
7	Me	<sup>i</sup> Pr, (R) <sup>*</sup>	<b>27g</b>	53	<b>29g</b>	78

<sup>a</sup> Yield of pure isolated products. <sup>b</sup> Overall yields of **27** from  $\alpha$ -alkyl serinates **15** and **17** by in situ ring opening of intermediate aziridines **19** and **20** with  $\beta$ -aminoalcohol silyl ethers **26**. <sup>c</sup> Overall yields of the pure products for transformation **27**→**29**. <sup>d</sup> Oxidation step conducted using the TCCA/TEMPO reagent.

$\alpha,\beta$ -diamino esters **27**, but in contrast to their enolizable counterparts **24** and **25**, cyclization of **27**→**28** was now conducted in virtually quantitative yields (90–98%) upon treatment with LiHMDS.<sup>18</sup> Finally, the C-terminal carboxylic group was restored after desilylation by oxidation with Jones' reagent or the trichloroisocyanuric acid/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy system (TCCA/TEMPO).<sup>19</sup> The method was applicable both to ditopic and to monotopic  $\beta$ -lactam scaffolds (see entries 1 and 6 in Table 1). Furthermore, isolation of aziridines was not necessary to prepare  $\beta$ -*N*-substituted azaserines **27**. Indeed, slightly higher overall yields were attained when *N*-nosyl aziridines obtained from methyl serinates **15** and **17** were immediately opened in situ with  $\beta$ -aminoalcohol silyl ethers (entries 1–3 and 6).

Importantly, the method could also be extended to the synthesis of  $\alpha,\alpha',\alpha''$ -trisubstituted  $\beta$ -lactam scaffolds (Scheme 4, Table 2). We found that ring-opening reaction of *N*-*o*-nosylaziridines generated in situ from  $\alpha$ -substituted methyl

Scheme 4



**Table 2.** Synthesis of  $\beta$ -Lactam Scaffolds **33** from  $\alpha$ -Substituted Serines **15**, **17**, **30**, and **31**

entry	serine	R <sup>1</sup>	product	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	yield (%) <sup>a</sup>
1	<b>15</b>	CH <sub>2</sub> Ph	<b>33a</b>	Me	Me	70
2	<b>15</b>	CH <sub>2</sub> Ph	<b>33b</b>	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> —		51
3	<b>17</b>	Me	<b>33c</b>	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> —		59
4	<b>30</b>	<sup>t</sup> Bu	<b>33d</b>	Me	Me	45
5	<b>31</b>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	<b>33e</b>	Me	Me	40

<sup>a</sup> Overall nonoptimized yields of pure isolated products **33** from  $\alpha$ -alkyl serines. One equivalent of  $\alpha$ -amino ester was used in all examples.

serines **15**, **17**, **30**, and **31** with the  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino esters<sup>20</sup> **32** afforded the corresponding  $\alpha,\beta$ -diamino esters in a one-pot operation. Treatment of these intermediates with LiHMDS resulted in clean cyclization to provide the corresponding  $\beta$ -lactams **33** in fair to good overall yields. These results confirm the striking effect of the lack of  $\alpha'$  acidic protons on the reaction and represent one of the shortest and more efficient routes to prepare highly hindered  $\beta$ -lactam peptidomimetics.

Finally, coupling reactions involving orthogonal deprotection reactions at the N- and C-termini of the  $\beta$ -lactam dipeptides **29e** and **33a** were performed to illustrate the easy incorporation of the  $\beta$ -lactam scaffolds prepared into pseudopeptides (Scheme 5). After screening, *N*-ethoxycar-

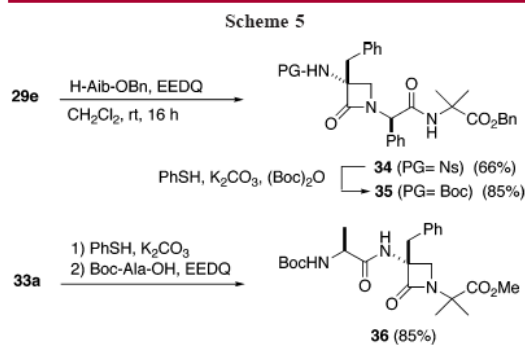
esters (e.g., H-Aib-OBn) without significant epimerization at the phenylglycine residue.<sup>22</sup> On the other hand, standard N-debenzylation with thiophenol and simultaneous reprotection with the Boc group was achieved in high yield.<sup>23</sup> Conversely, inversion of the nosyl cleavage/peptide coupling sequence in **33a** permitted an efficient and epimerization-free elaboration of the highly hindered  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactam group (e.g., with Boc-Ala-H), providing the pseudopeptide **36** in high yield.

In conclusion, a short, practical, and epimerization-free procedure to obtain mono- and ditopic  $\beta$ -lactam scaffolds has been developed, paving the way for the full application of the  $\beta$ -LSAD concept. Several families of  $\beta$ -lactam pseudopeptides resulting from this approach have been prepared in our laboratory, and evaluation of their conformational and biological behavior is underway.

**Acknowledgment.** We thank the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, Spain) (Project: CTQ2006-13891/BQU), UPV/EHU, and Gobierno Vasco (ETORTEK-BiomaGUNE IE-05/143) for financial support and SGiker UPV/EHU for NMR facilities. Grants from MEC to J.O. and from the European Commission (Marie Curie HMPT-CT-2000-00173) to E.B. are acknowledged.

**Supporting Information Available:** Preparation procedures and physical and spectroscopic data for compounds **13**–**36**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL0626241



bonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)<sup>21</sup> was found to be the dehydration reagent of choice to couple the carboxylic function of **29e** to sterically demanding  $\alpha$ -amino

(15) For a related carboxylic acid–amine cyclization on  $\alpha$ -unsubstituted  $\beta$ -N-peptidyl azaserines, see ref 6a.

(16) A survey of procedures to obtain 2-azetidinones by cyclization of  $\beta$ -amino esters: Backes, J. In *Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band E16b*; Müller, E., Bayer, O., Eds.; Thieme: Stuttgart, 1991; pp 97–101.

(17)  $\beta$ -Aminoalcohol *tert*-butyldimethylsilyl ethers **26** were prepared in 75–95% overall yields from the corresponding  $\alpha$ -amino acids. See Supporting Information for details.

(18) Gennari, C.; Venturini, I.; Gilson, G.; Schimperna, G. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 227–230.

(19) De Luca, L.; Giacomelli, G.; Masala, S.; Porcheddu, A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4999–5001.

(20) For some reviews on the preparation of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino esters, see: (a) Ohfun, Y.; Shinada, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5127–5143. (b) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3517–3599.

(21) (a) Kiso, Y.; Yajima, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 942–943. (b) Kiso, Y.; Kai, Y.; Yajima, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, *21*, 2570–2510.

(22) Phenylglycine derivatives are prone to loss of configurational integrity under basic conditions. When transformation **29e**→**34** was tried with EDC/HOBT/Et<sub>3</sub>N (“water-soluble carbodiimide method”), complete epimerization was observed at the  $\alpha'$  position.

(23) Maligres, P. E.; See, M. M.; Askin, D.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5253–5256.

