

*ESTUDIO DE PSEUDOPÉPTIDOS
β-LACTÁMICOS
CONFORMACIONALMENTE
RESTRINGIDOS. APLICACIÓN AL
DISEÑO DE ANÁLOGOS DEL
NEUROPEPTIDO PLG*

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCION..... | 11 |
| <i>1.1 Péptidos girados y peptidomiméticos.....</i> | <i>11</i> |
| <i>1.1.1 Estructura secundaria y actividad biológica.....</i> | <i>11</i> |
| <i>1.1.2 Péptidos β-girados: estructura y relevancia biológica.....</i> | <i>12</i> |
| <i>1.1.3 Bloqueo conformacional en péptidos: aminoácidos conformacionalmente restringidos y lactamas de Freidinger.....</i> | <i>16</i> |
| <i>1.2 Peptidomiméticos β-lactámicos.....</i> | <i>17</i> |
| <i>1.2.1 Miméticos β-lactámicos: el modelo β-LSAD.....</i> | <i>20</i> |
| <i>1.2.2 Otros péptidos β-lactámicos.....</i> | <i>21</i> |
| <i>1.3 Peptidomiméticos de melanostatina (PLG).....</i> | <i>23</i> |
| <i>1.3.1 PLG como modulador alostérico de receptores dopaminérgico D_2: posible interés en la enfermedad de Parkinson.....</i> | <i>23</i> |
| <i>1.3.2 Interacción PLG-proteína: receptores dopaminérgicos D_2 y ciclo de las proteínas G.....</i> | <i>27</i> |
| <i>1.3.3 Conformación bioactiva de la PLG.....</i> | <i>30</i> |
| <i>1.3.4 Actividad biológica de análogos de PLG.....</i> | <i>32</i> |
| <i>1.3.5 Antecedentes β-lactámicos.....</i> | <i>38</i> |
| <i>1.3.6 Estudios biológicos in vitro e in vivo.....</i> | <i>39</i> |
| 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS..... | 44 |
| <i>2.1 Diseño de pseudopéptidos β-lactámicos multitópicos.....</i> | <i>44</i> |
| <i>2.2 Análisis conformacional de pseudopéptidos β-lactámicos.....</i> | <i>46</i> |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Objetivos..... | 48 |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 55 |
| 3.1 Síntesis de dipéptidos β -lactámicos enantiopuros (scaffolds) del tipo PG-(β -Lactam)-(Aa)-OH..... | 55 |
| 3.1.1 Alquilación de α -alquil- α -amino-N-alcoxicarbonilmetil- β -lactamas..... | 56 |
| 3.1.2 Condensación intramolecular de β -azaalaninas α -sustituídas..... | 60 |
| 3.2 Síntesis y análisis conformacional de peptidomiméticos β -lactámicos..... | 66 |
| 3.2.1 Síntesis de miméticos β -lactámicos Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe y Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH portadores de residuos N- y C- terminales aquirales..... | 67 |
| 3.3 Análisis conformacional de miméticos portadores de residuos N- y C- terminales aquirales: Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe y Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH..... | 72 |
| 3.3.1 Introducción..... | 72 |
| 3.3.2 Análisis conformacional de los modelos Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe..... | 75 |
| 3.3.3 Análisis conformacional de los modelos Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH..... | 91 |
| 3.4 Síntesis de peptidomiméticos β -lactámicos portadores de residuos N- y C- terminales quirales: Boc-Ala*-(β -Lactam)-(Aa)-Ala*-NH ₂ | 102 |
| 3.5 Análisis conformacional de miméticos β -lactámicos portadores de residuos N- y C- terminales quirales: Boc-Ala*-(β -Lactam)-(Aa)-Ala*-NH ₂ | 105 |
| 3.6 Síntesis, análisis conformacional y evaluación biológica de los análogos β -lactámicos de la melanostatina (PLG)..... | 125 |
| 3.6.1 Síntesis de los análogos β -lactámicos de PLG α,α' -tetrasustituídos..... | 126 |

| | | |
|---------|---|------------|
| 3.6.2 | <i>Análisis conformacional de pseudopéptidos β-lactámicos análogos de PLG.....</i> | <i>127</i> |
| 3.6.3 | <i>Evaluación de la actividad alostérica de análogos de PLG mediante estudios de fijación de radioligandos (binding) a receptores dopaminérgicos D₂ y proteínas G acopladas en membranas de caudado humano postmortem.....</i> | <i>147</i> |
| 3.6.3.1 | <i>Experimentos de competición de [³H]espiperona por (+)-butaclamol y de saturación con [³H]espiperona en membranas de caudado humano postmortem.....</i> | <i>148</i> |
| 3.6.3.2 | <i>Experimentos de competición de [³H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem en ausencia de Gpp(NH)p.....</i> | <i>150</i> |
| 3.6.3.3 | <i>Experimentos de competición de [³H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem en presencia de Gpp(NH)p.....</i> | <i>155</i> |
| 4 | CONCLUSIONES..... | 163 |
| 5 | PARTE EXPERIMENTAL..... | 167 |
| 5.1 | <i>Técnicas generales.....</i> | <i>167</i> |
| 5.2 | <i>Síntesis de precursores peptídicos y aminoácidos funcionalizados: síntesis de α-alquilserinatos de metilo enantiopuros.....</i> | <i>169</i> |
| 5.2.1 | <i>Procedimiento general para la alquilación de oxazolidinas.....</i> | <i>170</i> |
| 5.2.2 | <i>Procedimiento general de preparación de ésteres metílicos de α-alquilserinas enantioméricamente puras.....</i> | <i>173</i> |

| | |
|---|-----|
| 5.2.3 Preparación de α -aminoéteres, α -aminoésteres y alaninamidas enantiopuras..... | 176 |
| 5.3 Síntesis de α,α' -dialquil- β -lactamas vía condensación de β -azaalaninas α -sustituídas..... | 181 |
| 5.3.1 Procedimiento general de preparación de β -azaalaninas α -sustituídas... | 181 |
| 5.3.2 Procedimiento general de preparación de α -metil, α -(2-nosilbencenosulfonamido)- α' -alquil- β -lactamas 64..... | 187 |
| 5.4 Síntesis de α,α',α' -trialquil- β -lactamas vía condensación de β -azaalaninas α -sustituídas..... | 193 |
| 5.4.1 Procedimiento general de preparación de 3-alquil-1-[1,1-dialquil-1-(metoxi carbonil)metil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-onas..... | 193 |
| 5.5 Síntesis de peptidomiméticos del tipo Ac-(β -Lactam)-Aa-NHMe..... | 197 |
| 5.5.1 Procedimiento general de preparación de 3-metil-1-[(N-metilcarbamoil)metil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-onas 73..... | 198 |
| 5.5.2 Procedimiento general de preparación de Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe... | 202 |
| 5.6 Síntesis de peptidomiméticos del tipo Boc-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OH..... | 205 |
| 5.6.1 Procedimiento general para la formación de Ns-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OBn..... | 205 |
| 5.6.2 Procedimiento general para la formación de Boc-NH-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OBn..... | 207 |
| 5.6.3 Procedimiento general para la formación de Boc-NH-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OH..... | 209 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.7 | <i>Síntesis de peptidomiméticos de tipo Boc-(β-Lactam)-(Aib)-Aib-OH.....</i> | 210 |
| 5.7.1 | <i>Procedimiento general para la formación de Boc-(β-Lactam)-(Aib)-Aib-OR.....</i> | 211 |
| 5.8 | <i>Síntesis de peptidomiméticos de tipo Boc-(β-Lactam)-(Aib)-Aib-OH.....</i> | 214 |
| 5.8.1 | <i>Procedimiento general para la formación de los derivados Boc-(Ala)-(β-Lactam)-(Aib)-OMe.....</i> | 214 |
| 5.8.2 | <i>Procedimiento general para la formación de los derivados Boc-(Ala)-(β-Lactam)-(Aib)-Ala-NH₂.....</i> | 216 |
| 5.9 | <i>Síntesis de peptidomiméticos β-lactámicos de PLG de tipo Pro-(β-Lactam))-(Aib)-NH₂.....</i> | 220 |
| 5.9.1 | <i>Procedimiento general para la preparación de 3-alkuil-1-[1-(metoxi carbonil)isopropil]-3-L-prolilamido-azetidin-2-onas.....</i> | 220 |
| 5.9.2 | <i>Procedimiento general para la preparación de 3-alkuil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-L-prolilamido-azetidin-2-onas.....</i> | 224 |
| 5.9.3 | <i>Preparación de 3-alkuil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidin-2-onas.....</i> | 228 |
| 5.9.3.1 | <i>Procedimiento general de preparación de 3-alkuil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidin-2-onas.....</i> | 228 |
| 5.9.3.2 | <i>Procedimiento general para la preparación de 3-alkil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]azetidin-2-onas.....</i> | 231 |
| 5.10 | <i>Síntesis de (3R)-(N-L-prolilamino)-2-oxo-1-pirrolidinacetamida (PAOPA)...</i> | 232 |
| 5.11 | <i>Evaluación biológica de análogos de PLG.....</i> | 237 |
| 5.11.1 | <i>Material y métodos.....</i> | 237 |
| 5.11.2 | <i>Metodología.....</i> | 238 |

| | |
|---|------------|
| 5.11.3 Experimentos de fijación de [^3H]espiperona a cerebro humano postmortem..... | 240 |
| 5.11.4 Experimentos de fijación de [^{35}S]GTP γ S a cerebro humano postmortem..... | 242 |
| 5.11.5 Análisis matemático de los datos experimentales..... | 243 |
| 5.11.5.1 Análisis matemático de los ensayos de saturación del radioligando [^3H]espiperona..... | 243 |
| 5.11.5.2 Análisis matemático de los ensayos de competición del radioligando [^3H]espiperona por (-)NPA..... | 244 |
| 5.11.5.3 Análisis matemático de los ensayos de fijación de [^{35}S]GTP γ S estimulada por (-)NPA..... | 245 |
| 5.11.6 Análisis estadístico de los resultados..... | 246 |
| 6 ANEXOS..... | 251 |
| ANEXO A: ^1H -RMN y ^{13}C -RMN..... | 251 |
| ANEXO B: ESPECTROS BIDIMENSIONALES: ROESY/NOESY..... | 270 |
| ANEXO C: Distancias interprotónicas compuestos 46a-f | 283 |
| ANEXO D: Experimentos de estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem..... | 284 |
| ANEXO E: Rayos X..... | 291 |

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCION

Los péptidos y proteínas son compuestos de vital importancia en los organismos vivos. De manera arbitraria, se considera proteína una cadena que contenga un número de aminoácidos mayor de unas 100 unidades. Las proteínas son “instrumentos moleculares” que materializan la transducción de la información genética constituyendo muchos tejidos y dotándolos de funcionalidad. A su vez, las cadenas formadas por menos de 100 aminoácidos se denominan péptidos y son en su mayoría hormonas, neuromoduladores y neurotransmisores. En conjunto, ambas familias de compuestos son responsables de la mayoría de los procesos biológicos que ocurren en organismos superiores dado que numerosas respuestas orgánicas comienzan por una interacción péptido-proteína, proteína-proteína o sacárido-proteína. Tal y como se define en el concepto de reconocimiento molecular, estas interacciones sólo son posibles si ambas partes poseen secuencias de aminoácidos y conformaciones determinadas que permitan exponer de manera complementaria los residuos de los centros activos de la proteína receptora a los del péptido que actúa como ligando.

1.1 *Péptidos girados y peptidomiméticos*

1.1.1 *Estructura secundaria y actividad biológica*

Los péptidos poseen dos niveles estructurales. La estructura primaria describe la secuencia lineal de los aminoácidos que los forman, mientras que la estructura secundaria describe la disposición espacial de los residuos que constituyen la cadena peptídica. Los residuos de los aminoácidos de la cadena pueden presentar entre sí enlaces de hidrógeno y/o interacciones no covalentes. En numerosos casos, la actividad biológica de un péptido procede únicamente de uno o varios segmentos de residuos asociados a una estructura secundaria particular, ya que es ésta la que proporciona la disposición espacial idónea para interactuar con el receptor. Las cadenas peptídicas adoptan diversas estructuras secundarias, y la variación de parámetros tales como el número de aminoácidos consecutivos, los ángulos diedros, etc... son determinantes para definir una conformación. Aunque también existen motivos estructurales especiales y poco frecuentes, de manera

general se puede establecer la siguiente clasificación atendiendo a la disposición espacial de los residuos peptídicos:

Hélice- α : Es un plegamiento periódico del esqueleto peptídico en forma de helicoide dextrógiro estabilizado por enlaces de hidrógeno entre los grupos $(\text{NH})_i$ y $(\text{O}=\text{C})_{i+4}$.

Lámina β : Es un ordenamiento con enlaces de hidrógeno entre los grupos amida y carbonilo de ramas enfrentadas, con los residuos laterales dispuestos en zig-zag a uno y otro lado del plano de las cadenas creando láminas paralelas (en el mismo sentido) o antiparalelas (en sentido opuesto).

Giros: Se trata de secuencias de 3 a 5 residuos que inducen un cambio direccional en la cadena peptídica. Con frecuencia unen hélices o láminas. Se encuentran normalmente en la superficie de las proteínas y es conocida su implicación en los mecanismos de reconocimiento molecular e interacción con receptores gracias a la disposición externa de sus grupos sustituyentes y a la mayor rigidez de sus cadenas peptídicas. Según el número de residuos que contengan entre enlaces de hidrógeno se pueden formar los denominados giros γ , giros β y, con menor frecuencia, giros α .

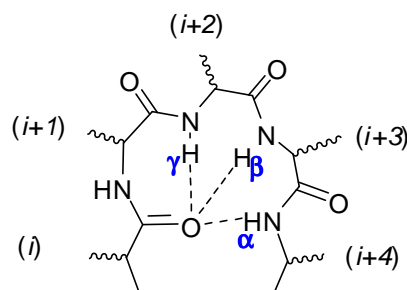


Figura 1: Representación esquemática de los giros de tipo α , β y γ .

1.1.2 Péptidos β -girados: estructura y relevancia biológica

La conformación β -girada de los péptidos es muy frecuente, la más estable, y, además, la más estudiada. Requiere de la presencia de cuatro residuos denominados (i) , $(i+1)$, $(i+2)$ e $(i+3)$ ordenados desde el extremo N-terminal del residuo (i) hasta el extremo C-terminal del $(i+3)$. Los giros β canónicos cumplen los siguientes requerimientos: a) Los residuos centrales $(i+1)$ e $(i+2)$ no presentan una estructura helicoidal. b) La distancia

entre los carbonos $C\alpha$ de los residuos (i) e $(i+3)$ no supera los 7\AA . c) Los cuatro átomos $C\alpha$ de los residuos (i) , $(i+1)$, $(i+2)$ e $(i+3)$ forman un ángulo pseudodiedro μ próximo a 0° . d) En la mayoría de los casos se genera un enlace de hidrógeno estabilizante entre el oxígeno carbonílico del residuo (i) y el protón amídico del residuo $(i+3)$ ¹.

Son muchas las variantes conformacionales que puede adoptar un giro β en función de los valores de los ángulos diedros de $(i+1)$ e $(i+2)$, tal y como se muestra en la *figura 2*. Los giros β más comunes de las proteínas globulares son los de tipo **I**, **II** y **III** (con abundancia del 42, 15 y 18% respectivamente).

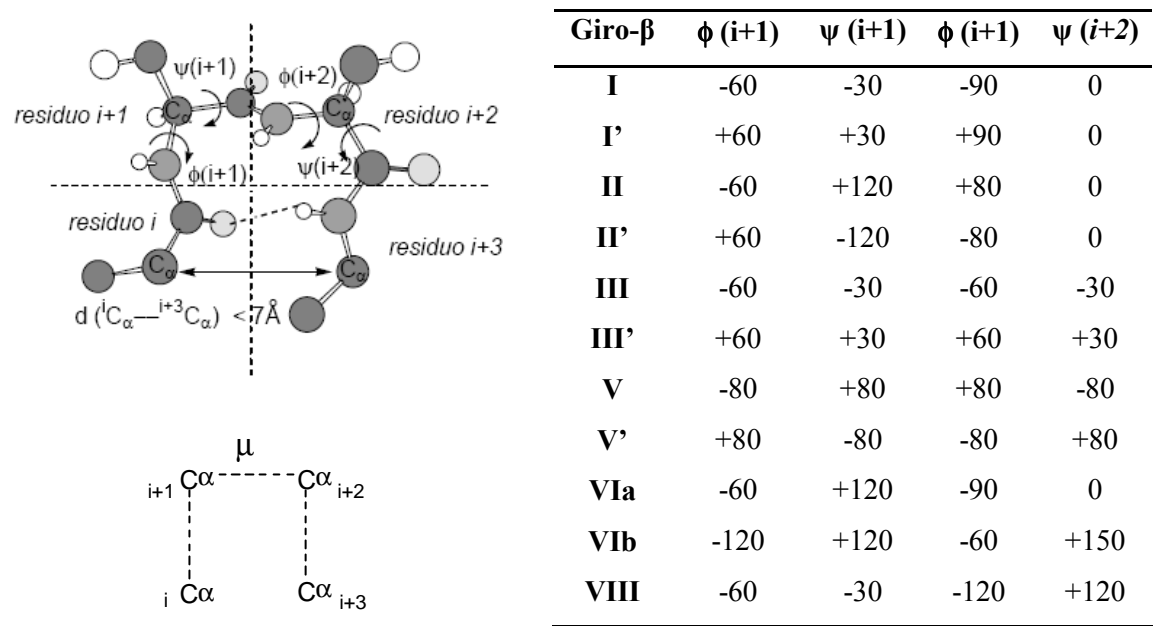
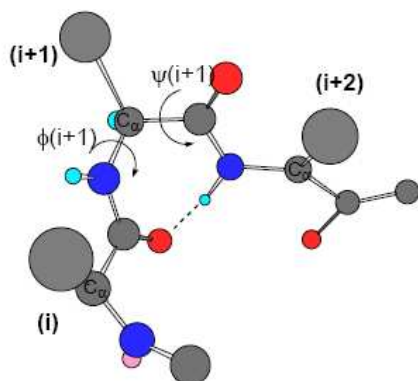


Figura 2: Representación de un giro β y su clasificación en función de los ángulos diedros de los residuos centrales.

Otra conformación interesante, aunque menos común en estructuras peptídicas es el giro γ . Se trata de una cadena de tres aminoácidos formando un pseudociclo de siete átomos. Solo existen dos tipos, denominados giro γ y giro γ inverso, que son definidos por los ángulos diedros del residuo $(i+1)$.

¹ a) Rose, G.D.; Gierasch, L.M.; Smith, J.A. *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C.B.; Edsall, J.T.; Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1985, 37, 1-109. b) Smith, J.A.; Pease, L.G. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, 8, 315-399. c) Rotondi, K.S.; Gierash, L.M. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, 84, 13-22.



| Giro- γ | ϕ (i+1) | ψ (i+1) |
|----------------|--------------|--------------|
| Normal | De +70 a +85 | De -60 a -70 |
| Inverso | De -70 a -85 | De +60 a +70 |

Figura 3: Representación esquemática de un giro γ y los valores de los ángulos que lo definen.

Existe un gran número de péptidos de bajo peso molecular cuya actividad biológica está asociada a una conformación β -girada. Este es el caso de un centenar de ligandos reconocidos por receptores de membrana asociados a proteínas G (GPCRs). En la *tabla 1* se indican algunos de estos ejemplos.

Estos péptidos endógenos actúan de forma muy selectiva como neurotransmisores, neuromoduladores, hormonas, inhibidores enzimáticos, etc.. Una vez cumplida su función, son metabolizados por las proteasas, por lo que no se acumulan en el organismo ni ocasionan problemas de toxicidad. No obstante esta baja estabilidad metabólica (enzimática y química) se convierte en un serio inconveniente a la hora de administrar péptidos exógenos con fines terapéuticos, ya que dificulta su transporte a través de la membrana celular y limita su biodisponibilidad². Por ello, gran parte de la investigación actual en este campo se orienta hacia la preparación de peptidomiméticos, compuestos basados en estructuras peptídicas más o menos modificadas para mejorar la potencia, selectividad y propiedades farmacodinámicas de un péptido nativo bioactivo.

² a) Loffet, A. *J. Peptide Sci.* **2002**, 8, 1-7. b) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. *J. Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, 46, 3-26.

Tabla 1: Residuos γ -girados o β -girados de ligandos peptídicos cuya interacción con GPCRs genera una respuesta biológica.³

| Hormonas | Residuos implicados en el giro | Funcion fisiológica |
|---------------|--------------------------------|---|
| Amilina | F23G24 | Inhibe la secreción de ácidos gástricos, deposición de glicógeno en músculos. |
| Bombesina | W8AVGH12L13 | Control del nivel de glucosa en la sangre |
| Bradiquinina | S6P7F8R9 | Mediador en procesos de inflamación, dolor y control del flujo sanguíneo |
| Calcitonina | N17KFHT21 | Regulador de Calcio. Uso clínico en tratamientos de enfermedades óseas. |
| Galanina | WTLN5, A7GYL10 | Procesos de dolor, apetito, efectos fisiológicos de la insulina, entre otros. |
| α -MSH | H6FRW9 | Pigmentación, función sexual, analgesia, regeneración muscular |
| Neurotensina | R8RPYIL13 | Estimulante de la secreción pancreática. Antipsicótico. |

Muchos peptidomiméticos mantienen los grupos funcionales del péptido nativo en las ramas laterales, alterando los enlaces amídicos para evitar la acción de enzimas sobre ellos⁴. Habitualmente, el diseño del peptidomimético se realiza partiendo de un péptido bioactivo por transformaciones sucesivas a través de estudios de relación estructura-actividad (SAR) y modelización *in silico*. Se pretende así llegar a obtener la misma o una mejorada actividad biológica mediante miméticos que en ocasiones pueden incluso carecer por completo de carácter peptídico. Una de las estrategias más comunes para la preparación de peptidomiméticos consiste en limitar la movilidad conformacional

³ Tyndall, J.D.A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D.P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793-826.

⁴ a) Hruby, V. J.; Balse, P. M. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 945-970. b) Adessi, C.; Soto, C. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 963-968. c) Hummel, G.; Reineke, U.; Reimer, U. *Mol. BioSyst.* **2006**, *2*, 499-508. d) Che, Y.; Brooks, B. R.; Marshall, G. R. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 109-130. e) Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292-296.

utilizando algún elemento restrictivo, normalmente cadenas cíclicas o policíclicas⁵ manteniendo los residuos responsables de la interacción con el centro receptor.

1.1.3 Bloqueo conformacional en péptidos: aminoácidos conformacionalmente restringidos y lactamas de Freidinger.

Los giros- β son los motivos conformacionales más comúnmente imitados en los peptidomiméticos⁶. Aunque el abanico de posibilidades es muy amplio, los elementos de modificación más frecuentes empleados para estabilizar giros- β comprenden, entre otros, a) los α -aminoácidos α,α -disustituídos, tanto de cadena lineal⁷ como cíclicos⁸, b) los sistemas espirocíclicos⁹ y, muy especialmente, c) las lactamas de Freidinger¹⁰.

En 1980, Freidinger propuso un modelo de restricción conformacional que implicaba la formación de un puente alquílico interresidual entre el sustituyente R¹ de la posición Ca del residuo ($i+1$) y el átomo de nitrógeno contiguo en el residuo ($i+2$). De esta manera, el sustituyente R¹ modificado pasaba a formar parte de un nuevo residuo pseudopéptido cíclico y se lograba inducir un cambio direccional en la cadena pseudopeptídica.

-
- ⁵ a) Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789-12854. b) Belvisi, L.; Colombo, L.; Manzoni, L.; Potenza, D.; Scolastico, C. *Synlett* **2004**, 1449-1471. c) Cluzeau, J.; Lubell, W. D. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2005**, *80*, 98-150. d) Maison, W.; Prenzel, A. H. G. P. *Synthesis* **2005**, 1031-1048.
- ⁶ a) Souers, A. J.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431-7448. b) McDonald, M.; Aubé, J. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 417-438. c) Burgess, K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826-835. d) Pérez de Vega, M. J.; Martín-Martínez, M.; González-Muñiz, R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 33-62. e) Robinson, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1278-1288.
- ⁷ Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Valle, G.; Cavicchioni, G.; Précigoux, G.; Aubry, A.; Kamphuis, J.; *Biopolymers* **1993**, *33*, 1061-1072.
- ⁸ a) Park, K.-H.; Kurth, M. J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8629-8659. b) Galeazzi, R.; Mobbili, G.; Orena, M. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1799-1829. c) Trabocchi, A.; Scarpi, D.; Guarna, A. *Amino Acids* **2008**, *34*, 1-24. d) Hanessian, S.; Auzzas, L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1241-1251.
- ⁹ a) Alonso, E.; Lopez-Ortiz, F.; del Pozo, C.; Peralta, E.; Macias, A.; Gonzalez, J. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6333-6338. b) Fernandez, M. M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Montenegro, E.; Casamitjana, N.; Kogan, M. J.; Giralt, E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7587-7599. c) Gutiérrez-Rodríguez, M.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Herranz, R.; Cuevas, F.; Polanco, C.; Rodríguez-Campos, I.; Manzanares, I.; Cárdenas, F.; Feliz, M.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5700-5712. d) Bitterman, H.; Böckler, F.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6315-6322. e) Lomlim, L.; Einsiedel, J.; Heinemann, F. W.; Meyer, K.; Gmeiner, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3608-3611.
- ¹⁰ a) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. *Science* **1980**, *210*, 656-658. b) Freidinger, R. M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5553-5566

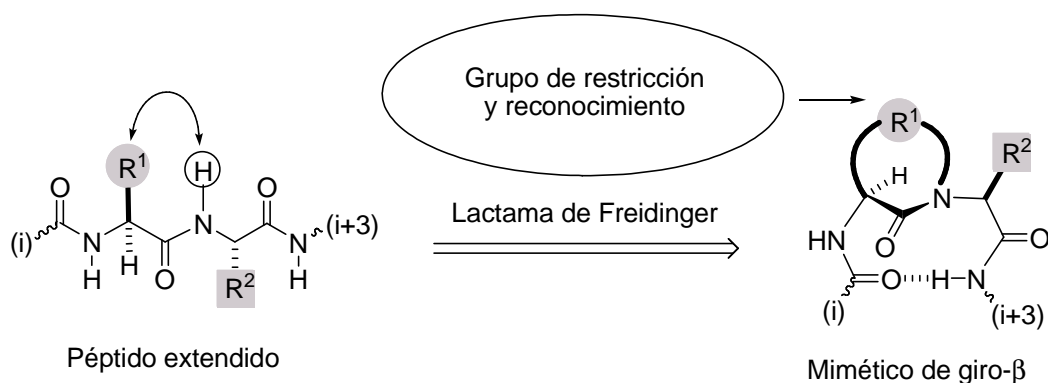


Figura 4: Modelo de Freidinger para inducir cambios direccionales en cadenas peptídicas mediante la formación de una lactama interresidual.

En un trabajo pionero, Freidinger describió la síntesis del primer pseudopéptido cíclico incorporado en una cadena peptídica natural. En la LHRH (hormona estimulante de la liberación de la leutinicina) se substituyó el aminoácido glicina por una γ -lactama (figura 5). El resultado experimental fue un incremento de la bioactividad 9 veces con respecto al péptido nativo.

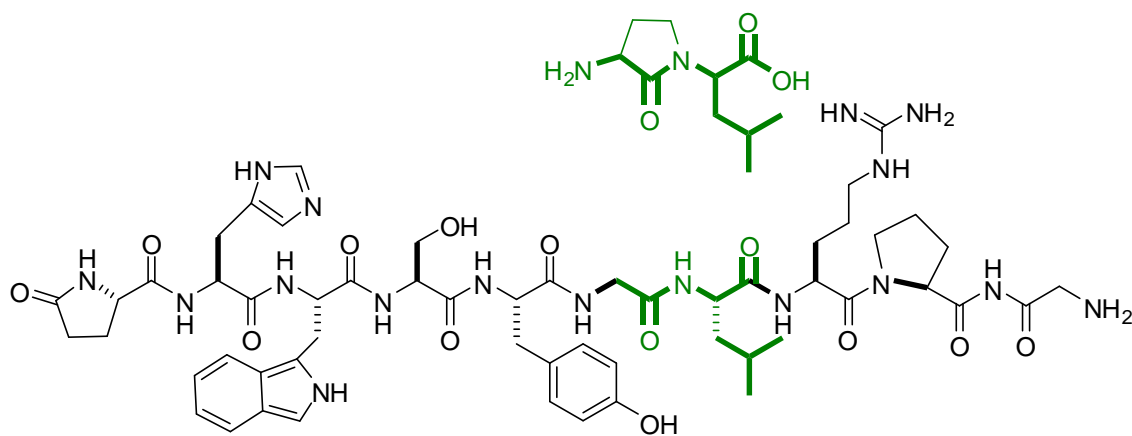


Figura 5: Fragmento de la LHRH sustituida por una lactama de Freidinger.

1.2 Peptidomiméticos β -lactámicos

A pesar de los considerables avances realizados en las tres últimas décadas en el desarrollo de las lactamas de Freidinger como elementos de restricción conformacional,

sus representantes de menor tamaño –las β -lactamas– apenas han sido investigadas para este fin. Curiosamente, los primeros peptidomiméticos naturales conocidos fueron los antibióticos β -lactámicos, cuyo esqueleto de α -amino- β -lactama¹¹ imita la secuencia (D)-Ala-(D)-Ala, un componente esencial de los peptidoglicanos que forman las paredes bacterianas (figura 6).

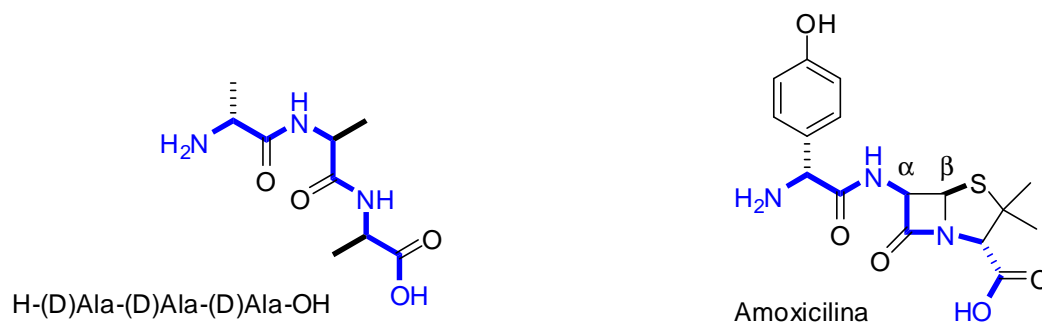


Figura 6: Analogía estructural entre los antibióticos β -lactámicos (p. ej. amoxicilina) y el fragmento D-Ala-D-Ala.

Este antecedente temprano no ha podido evitar que los antibióticos β -lactámicos naturales hayan sido ignorados como peptidomiméticos, probablemente por la inestabilidad química de las β -lactamas monosustituídas en la posición α . En efecto, cuando se intenta aplicar directamente el modelo de Freidinger (figura 4) a estos ciclos relativamente tensionados, cabe esperar que el carbonilo del anillo de azetidin-2-ona pueda abrirse en presencia de los nucleófilos presentes en medios fisiológicos, alterando así su estructura y capacidad de restricción conformacional.

La síntesis¹² y aplicaciones de las β -lactamas están ampliamente documentadas en la bibliografía dada la importancia de estos compuestos como intermedios sintéticos en la preparación de compuestos nitrogenados de relevancia biológica¹³, precursores de aminoácidos sustituidos enantioméricamente puros¹⁴ o por a su función como inhibidores

¹¹ Síntesis de α -amino- β -lactamas: a) Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; García, J.M.; Galarza, R.; Legido, M.; Urchegui, R.; Román, P.; Luque, A.; Server-Carrió, J.; Linden, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2070-2079. b) Van Der Steen, F.H.; Van Kotten, G. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7503-7524.

¹² Para revisiones, ver: a) Gunda, I. Georg "The Organic Chemistry of β -Lactams", VCH Publishers, Inc. **1993** y referencias encontradas en él. b) Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band E 15b; Müller, E.; Bayer, O. Eds.; Thieme: Stuttgart, 1991.

¹³ a) Alcaide, B.; Almendros, P.; Aragoncillo, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4437-4492. c) Ojima, I. *Adv. Asym. Synth.* **1995**, *1*, 95.

¹⁴ a) Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; Ganboa, I. "Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids"; Juaristi, E., Soloshonok, V., Ed.; Wiley-Interscience: New Jersey 2005; Chapter 20, pp 477-495. b) Palomo, C.;

de proteasas de serina (triptasa, citomegalovirus humano, proteasas de HIV...) o de aciltransferasa de colesterol (Ezetimibe®)¹⁵ entre otros.

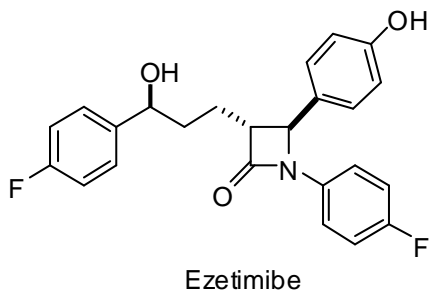
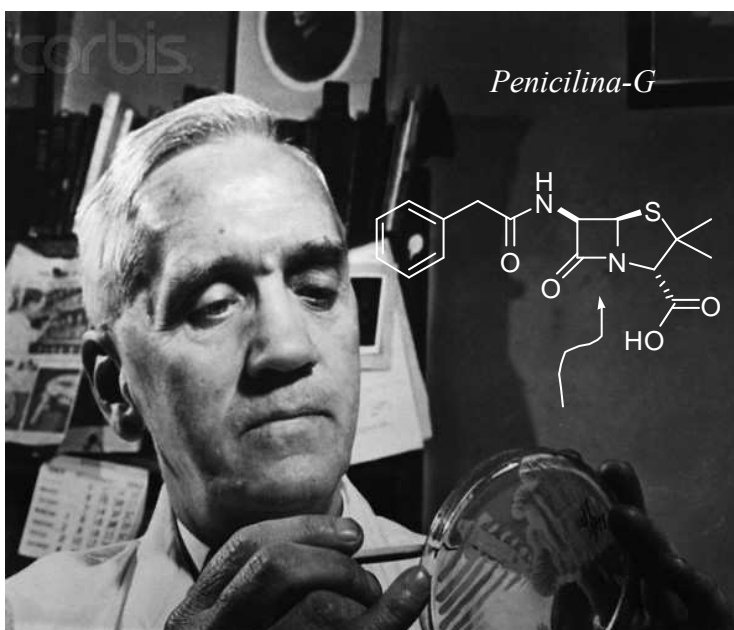


Figura 7: Ezetimibe, inhibidor β -lactámico de absorción de colesterol.

Unos peptidomiméticos particulares: β -Lactamas



“En 1928 Alexander Fleming observó la muerte de bacterias de *Staphylococcus* en un cultivo que había sido contaminado por el hongo *Penicillium notatum*. De él Chan y Florey extrajeron por primera vez en 1940 la Penicilina N y un año más tarde se comprobaría la eficacia de su derivado Penicilina G en el tratamiento de una infección bacteriana en humanos”...este fue el primer paso para conocer la estructura de la penicilina y alterar positivamente el curso de la Medicina.

Aizpurua, J.M.; Ganboa, I.; Oyarbide, M. “Synthesis of β -Amino Acids and Their Derivatives from β -Lactams: Update” Juaristi, E., Ed.; Wiley-VCH: New York 1997; Chapter 14, pp 279-357. c) Forro, E.; Paál, T.; Tasnádi, G.; Fülöp, F. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 917-923.
¹⁵ Kvoerno, L.; Ritter, T.; Perder, M.; Hauser, H.; Carreira, E.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4653-4656.

1.2.1 Miméticos β -lactámicos: el modelo β -LSAD

Como se ha mencionado anteriormente, las lactamas de Freidinger incorporan un puente carbonado R^1 que enlaza la posición α del residuo ($i+1$) con el nitrógeno amídico del residuo ($i+2$), (ver figura 4). De esta manera, en el nuevo ciclo creado recaen las funciones tanto de restricción conformacional como de reconocimiento molecular. Aunque este modelo abre muchas posibilidades para el diseño de peptidomiméticos, presenta el inconveniente de la desaparición o alteración del grupo de reconocimiento R^1 del péptido nativo. Existen muchas variables a tener en cuenta en una interacción ligando-proteína, aunque parece razonable pensar que R^1 debería de variar mínimamente con respecto del péptido nativo. En este sentido, y salvo que se trate de una estructura peptídica no sustituida en dicha posición, el modelo de Freidinger resulta claramente mejorable para diseñar peptidomiméticos más activos, más selectivos y más estables a la degradación enzimática.

En nuestro laboratorio se planteó una aproximación alternativa para dar respuesta al problema anterior. La solución propuesta se basa en el empleo de α -alquil- α -amino- β -lactamas no naturales cuyo grupo carbonilo se halla bloqueado estéricamente por ambas caras y presenta una gran inercia química. Esta aproximación, designada con el acrónimo β -LSAD (β -Lactam Scaffold-Assisted Design) tiene la ventaja de emplear peptidomiméticos que incorporan un grupo de restricción conformacional mínimo que no dificulte el acercamiento al receptor (figura 8). Para ello, se propone una separación de los elementos de reconocimiento, representados por R^1 y R^2 , y de restricción, representado en este caso por un puente metilénico. La eficacia del diseño β -LSAD ya ha sido probada en trabajos anteriores de nuestro laboratorio¹⁶ empleando diversas α -amino- β -lactamas α -alquiladas y no sustituidas en la posición β .

¹⁶ a) Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; Benito, A.; Galarza, R.; Khamrai, U.; Vazquez, J.; De Pascual, B.; Nieto, P.; Linden, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3056-3058, y referencias citadas en él. b) Benito, A. Tesis doctoral, "Nuevos peptidomiméticos β -lactámicos: diseño, síntesis y análisis estructural", UPV-EHU, **2003**. b) Loinaz, I. Tesis doctoral, "Estudio de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares como herramienta para la solubilización y control conformacional de péptidos y compuestos amídicos", UPV-EHU, **2004**. c) Balentova, E. Tesis doctoral, "Ditopic β -Lactam peptidomimetics: Design, Síntesis and Conformational Analysis" Universidad P. Safarik, Kosice, Eslovaquia, **2006**.

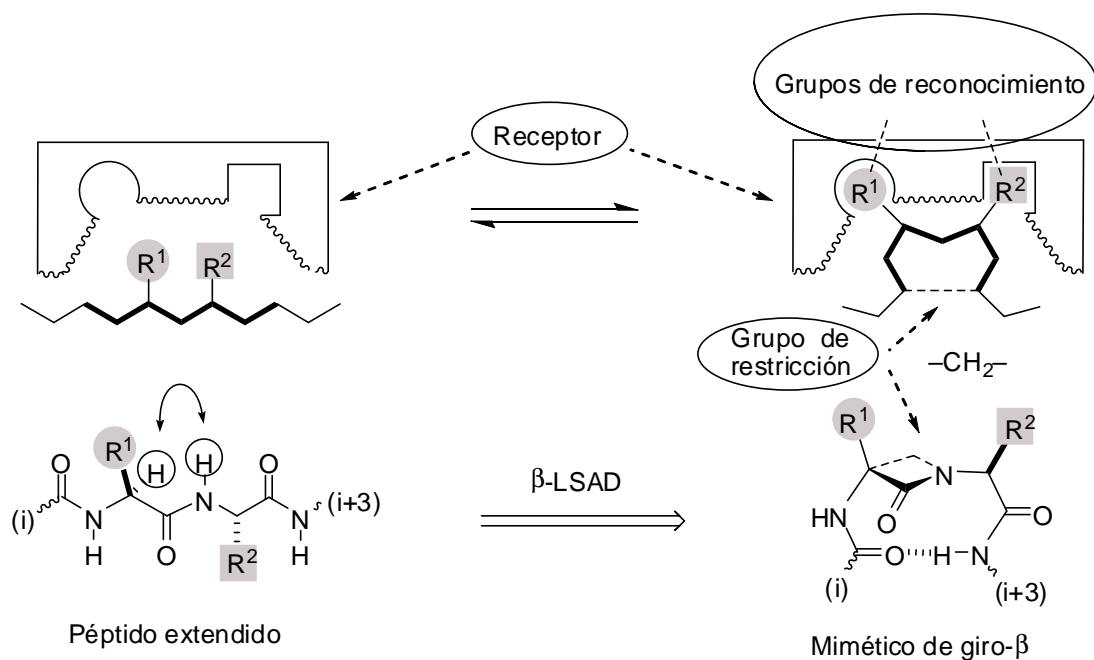


Figura 8: Representación gráfica del modelo β -LSAD. R^1 y R^2 constituyen grupos de reconocimiento molecular. El elemento de restricción lo aporta el grupo metileno del ciclo β -lactámico que, debido a su pequeño tamaño, minimiza las interacciones no deseadas con el receptor.

1.2.2 Otros péptidos β -lactámicos

Posteriormente al trabajo inicial desarrollado por nuestro grupo en esta área^{16a}, algunos grupos de investigación han descrito otros peptidomiméticos β -lactámicos, aunque sin aplicar el concepto de separación de grupos de restricción y reconocimiento o β -LSAD. En este contexto (figura 9), González¹⁷ ha demostrado que ciertas α -espiro- β -lactamas racémicas **1**, obtenidas mediante cicloadición [2+2] de la prolilcetena con iminas del glicinato de metilo, son capaces de formar giros- β estables a temperatura ambiente en CDCl_3 , pero inestables en $\text{DMSO}-d_6$. Por su parte, Podlech¹⁸ ha empleado la cicloadición [2+2] entre cetenas generadas in situ mediante fotólisis de α -diazopéptidos e iminas de α -aminoácidos para preparar peptidomiméticos β -lactámicos enantiopuros conteniendo

¹⁷ a) Alonso, E.; López-Ortiz, F.; Del Pozo, C.; Peralta, E.; Macías, A.; González, J. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6333. b) Alonso, E.; Del Pozo, C.; González, J. *Synlett* **2002**, 69.

¹⁸ a) Linder, M. R.; Podlech, J. *Org. Lett.* **1999**, 1, 869-871. b) Linder, M. R.; Podlech, J. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1849-1851. c) Maier, T. C.; Frey, W. U.; Podlech, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2686-2689. d) Maier, T. C.; Podlech, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4379-4386.

secuencias de α - β - α -tripéptidos **2** que no presentan giros β . Desafortunadamente, al igual que en la aproximación de González, dicho procedimiento no es aplicable a la preparación de las β -lactamas β,β -no sustituidas necesarias para nuestro proyecto. Basak¹⁹ y Malachowski²⁰ han descrito respectivamente las azetidín γ -lactamas **3** y los azaisósteros de cadena extendida **4**, aunque sin aportar información de sus respectivas conformaciones. Respecto a la bioactividad de estos compuestos, González-Muñiz²¹ ha demostrado que los péptidos β -lactámicos **5** con un estereocentro en la posición β del anillo están conformacionalmente bloqueados y actúan como inhibidores covalentes de proteasas de citomegalovirus humano (HCMV) mientras que Imbach²² ha demostrado que el péptido β -lactámico **6** es un potente inhibidor irreversible y selectivo de la proteosoma humana 20S.

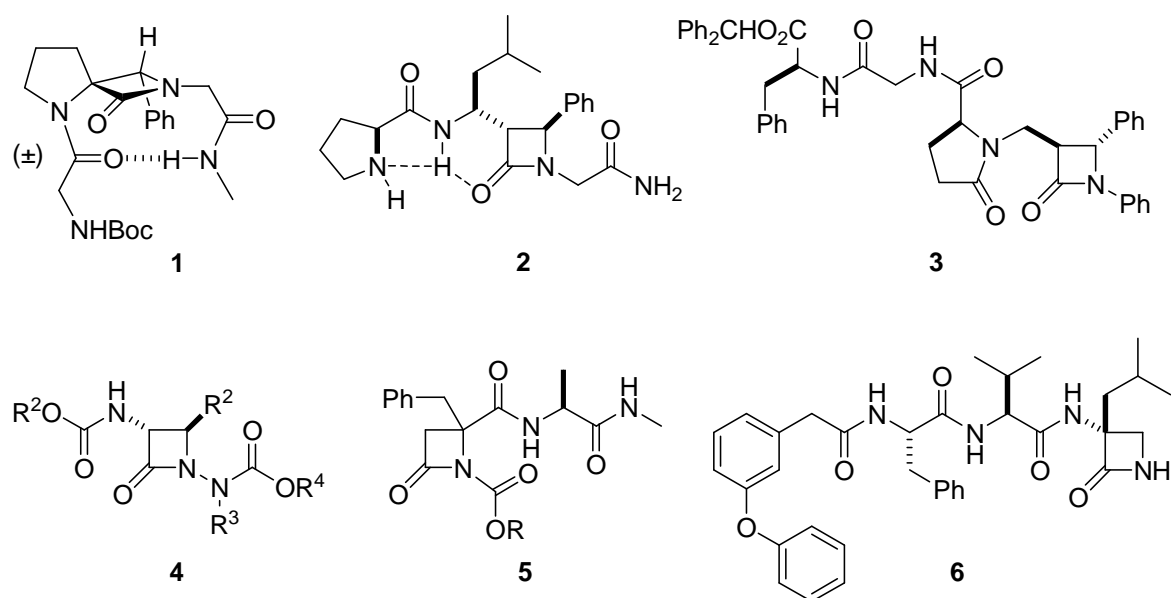


Figura 9: Péptidos β -lactámicos.

¹⁹ Basak, A.; Ghosh, S. C.; Das, A. K.; Bertolasi, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 4050-4052.

²⁰ Malachowski, W. P.; Tie, Ch.; Wang, K.; Broadrup, R. L. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 8962-8969.

²¹ a) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2001**, 43, 3538-3547. b) Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clerq, E.; Balzarini, J.; González-Muñiz, R. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 2612-2621 (y referencias citadas).

²² Imbach, P.; Lang, M.; García-Echeverría, C.; Guagnano, V.; Noorani, M.; Roesel, J.; Bitsch, F.; Rihs, G.; Furet, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 358-362.

1.3 Peptidomiméticos de melanostatina (PLG)

Como se ha indicado anteriormente, muchos péptidos de cadena corta participan en procesos fisiológicos importantes, de ahí que sus peptidomiméticos presenten interés como estructuras-modelo para el desarrollo de nuevos fármacos. Este es el caso de la PLG (prolina-leucina-glicinamida), tripéptido hipotalámico también denominado melanostatina o factor de inhibición de liberación de la hormona estimulante de melanocito (MIF-1). La misma secuencia peptídica se encuentra en el extremo terminal de la hormona oxitocina responsable, entre otras funciones, de las contracciones uterinas durante el parto o la aparición de leche materna posterior al alumbramiento en los mamíferos.

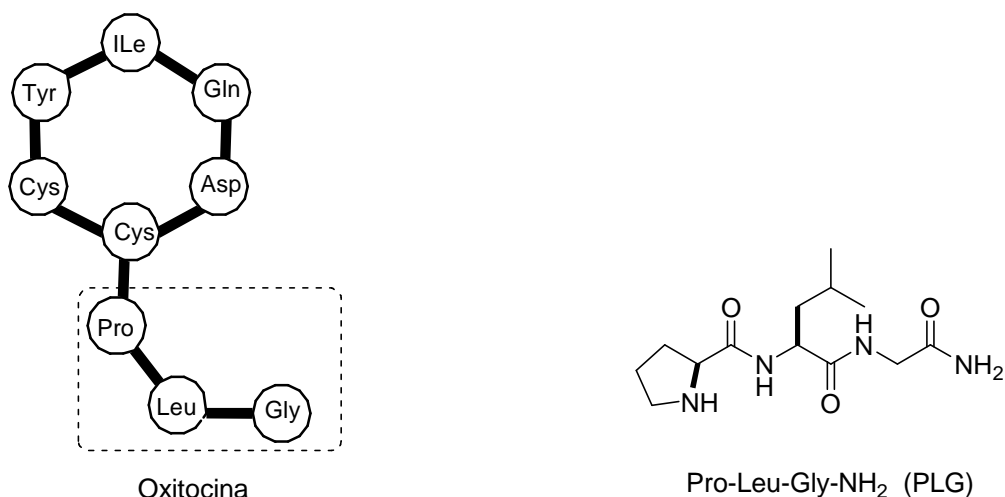


Figura 10: Representaciones de la hormona oxitocina y de la melanostatina.

1.3.1 PLG como modulador alostérico de receptores dopaminérgicos D₂: posible interés en la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del sistema nervioso central (SNC) que comienza, por causas aún desconocidas, con una degeneración de las neuronas dopaminérgicas del tracto nigroestriado, vía que se origina en la sustancia negra y continúa hasta el cuerpo estriado (nucleo caudado y putamen), donde es liberada la dopamina (DA), (ver figura 11).

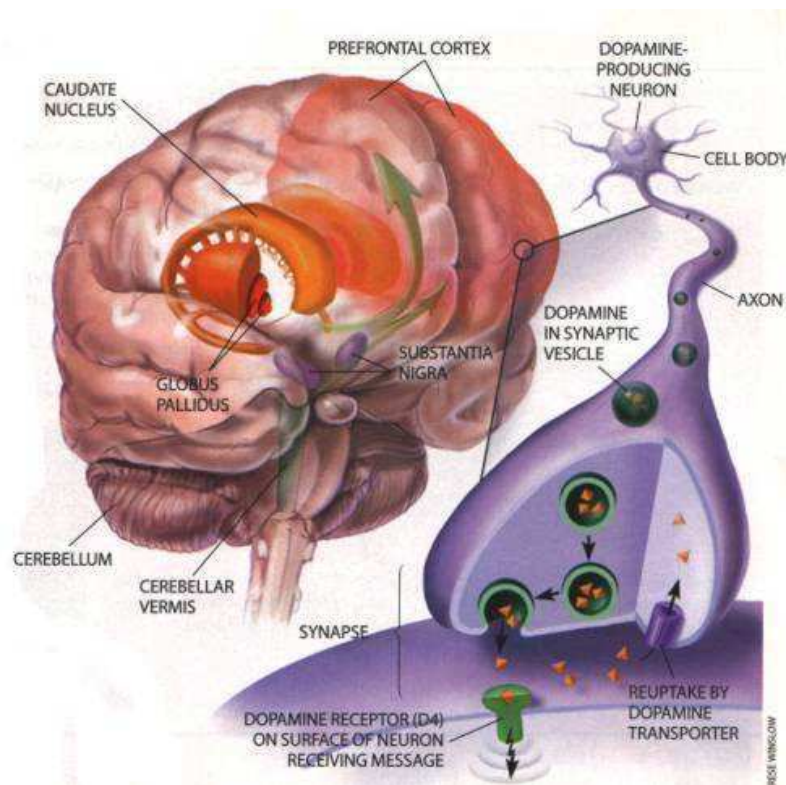


Figura 11: Punto de partida (sustancia negra) y de llegada (cuerpo estriado) de la dopamina en la vía afectada en la enfermedad de Parkinson.

A causa de esta desaparición neuronal, la síntesis y liberación de dopamina disminuye y el nivel de neurotransmisor decrece drásticamente lo que conlleva una menor unión a los receptores dopaminérgicos. Se provoca entonces una falta de respuesta que desencadena en un funcionamiento anormal de la capacidad motora del individuo. La consecuencia directa de la disminución de DA en el cuerpo estriado es un desequilibrio con respecto a la acetilcolina, que sigue manteniendo sus niveles normales. Todo ello provoca una hiperactividad colinérgica y una disfunción motora.

Los principales tratamientos terapéuticos de la enfermedad de Parkinson se basan en la restauración del equilibrio DA/acetilcolina para atenuar los síntomas de la enfermedad. La estrategia fundamenal se basa en la potenciación de la actividad dopaminérgica central, bien directamente (levodopa, agonistas y activadores dopaminérgicos) o indirectamente (inhibidores del metabolismo de la DA). En ciertos estadios de la enfermedad se puede recurrir al bloqueo de la actividad colinérgica mediante fármacos antimuscarínicos.

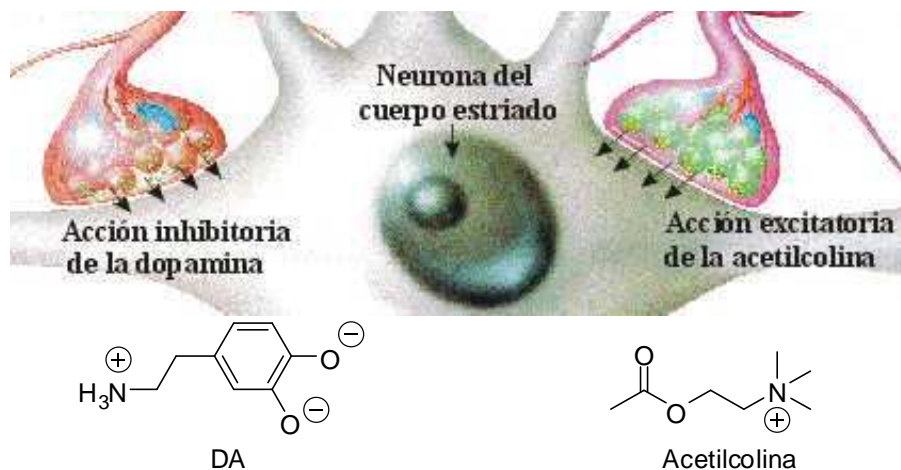


Figura 12: Esquema gráfico de regulación neuronal mediante los neurotransmisores dopamina y acetilcolina.

Actualmente, el fármaco más comúnmente administrado es la levodopa²³, precursor endógeno del neurotransmisor DA (figura 13).

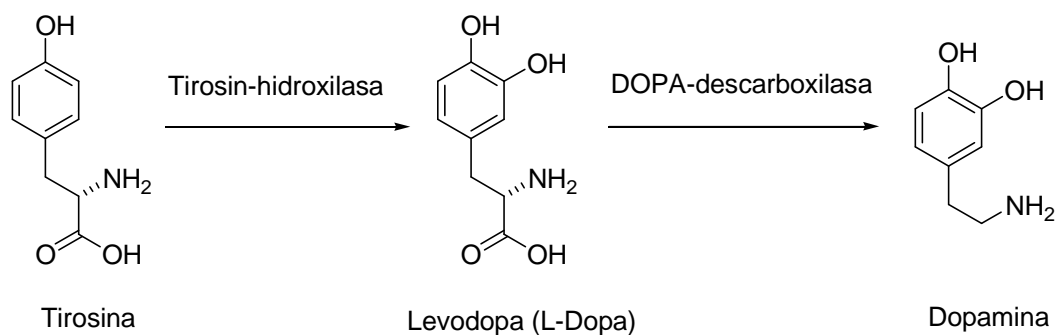


Figura 13: Ruta biosintética de la dopamina en el cerebro.

Sin embargo, la eficacia terapéutica de la levodopa disminuye con el tiempo debido a la progresión natural de la enfermedad y posiblemente también al desarrollo de mecanismos de compensación como la disminución de la actividad de los receptores

²³ La Levodopa es denominada también L-Dopa, haciendo mención a la configuración L(S) del carbono 2 del ácido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico.

dopaminérgicos. Además, la levodopa provoca importantes efectos secundarios de desarrollo lento (2-3 años), como las discinesias (movimientos de agitación involuntarios) o las fluctuaciones en la respuesta antiparkinsoniana (efecto “on-off”).

En el marco de la búsqueda de posibles soluciones, se han llevado a cabo una serie de estudios clínicos con la melanostatina que han mostrado una actividad terapéutica sustancial del tripéptido en trastornos del sistema nervioso central. La PLG fue aislada de estriado bovino por primera vez por Nair²⁴ en 1971. Más tarde, se pudo observar que además de cumplir las funciones anteriormente citadas, ejercía un poder modulador sobre el sistema dopaminérgico^{25,26,27}. La PLG incrementa la afinidad de ligandos agonistas sobre receptores dopaminérgicos de tipo D₂ (D_{2S} y D_{2L}) y D₄, aunque no presenta ninguna acción sobre los otros tipos: D₁, D₃ y D₅. También se ha propuesto que la PLG podría atenuar el efecto del análogo no hidrolizable de la guanidina trifosfato (GTP) denominado Gpp(NH)p en cultivos celulares de neuroblastoma humano transfectado con cADNs²⁸ y membranas de estriado bovino²⁹. Además de estos resultados *in vitro*, este tripéptido ha mostrado ser eficaz como modulador de agonistas en ensayos *in vivo* en modelos de rata lesionada o modificada para presentar síntomas parkinsonianos o de discinesia. A pesar de esto, su eficacia no es alta debido a su corta vida media en el organismo.

1.3.2 Interacción PLG-proteína: receptores dopaminérgicos D₂ y ciclo de las proteínas G

Los receptores dopaminérgicos (D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅) pertenecen al amplio grupo de receptores de la clase II o receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Están constituidos por una cadena polipeptídica que atraviesa la membrana citoplasmática con 7 fragmentos de unos 20-22 aminoácidos cada uno. Este polipéptido mantiene las propiedades características de una hélice α transmembranal, ubicando el grupo carboxilo terminal en el

²⁴ Nair, R.M.G.; Kastin, A.J.; Schally, A.V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *436*, 1376-1381.

²⁵ a) Mishra, R. K.; Chiu, S.; Chiu, P.; Mishra, C. P. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* **1983**, *5*, 203-233. b) Drucker, G.E.; Ritzmann, R.F.; Wichlinski, L.J.; Neg, K.; Gordon, J.H.; Fields, J.Z. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 141-145.

²⁶ Barbeau, A. *Lancet* **1975**, *2*, 683-684.

²⁷ Plotnikoff, N.P.; Kastin, A.J.; Anderson, M.S.; Schally, A.V. *Life Sci.* **1971**, *10*, 1279-1283.

²⁸ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J.M.; Skoblenick, K.; Gupta, S.K.; Pristupa, Z.; Niznik, H.B.; Johnson, R.L.; Fair, V. D.; Mishra, R.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 3, 1228-1236.

²⁹ Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 960-968.

citoplasma (intracelular) y el extremo amino de manera externa a la membrana. Parte de la cadena peptídica se encuentra en un lazo intracelular que constituye la región del receptor a través de la cual éste interacciona con la compleja familia de proteínas G.

Estas proteínas son denominadas así por su interacción con nucleótidos de guanina (GTP/GDP) y se consideran esenciales para la transducción de las señales, ya que a través de ellas se estimula (G_s) o inhibe ($G_{i/o}$) la adenilil ciclasa (AC) o se estimula (G_q) la fosfolipasa C regulándose así los niveles intracelulares de segundos mensajeros como el AMP cíclico o el fosfatidil inositol. Algunos ejemplos de receptores acoplados a proteínas G estimuladoras son los dopaminérgicos D_1 , β -adrenérgicos o histaminérgicos H_2 , mientras que los dopaminérgicos D_2 , los serotoninérgicos 5-HT₁, los α_2 -adrenérgicos o los receptores opioides μ y δ son un ejemplo de receptores acoplados a proteínas G inhibitorias ($G_{i/o}$).

La transmisión de señal entre el receptor activado (unido al agonista) y el efector pasa por el ciclo de activación-inactivación de las proteínas G. A pesar de las diferencias estructurales, todas las proteínas G operan de forma similar. En ausencia de agonista, el dominio intracelular del receptor y la proteína G, en su conformación inactiva, están separados. Cuando un agonista ocupa el receptor, éste sufre un cambio conformacional que le permite unirse transitoriamente a la proteína G, por el cual la subunidad α de esta proteína pierde afinidad por el GDP y gana afinidad por el GTP. La unión a GTP provoca la disociación de las subunidades $\beta\gamma$, dejando libre la subunidad α para que pueda interaccionar con el efector. Tras la interacción de la subunidad α con el efector se activa el dominio GTPasa, que hidroliza el GTP a GDP. Esto provoca la reasociación de la subunidad α con el complejo $\beta\gamma$, con lo que se cierra el ciclo (*figura 14*). Cuando los receptores no están acoplados a proteínas G muestran menor afinidad por los ligandos agonistas (*low affinity state*), mientras que aquellos receptores acoplados, es decir, funcionalmente activos, muestran mayor afinidad (*high affinity state*). Así, el estado de alta afinidad del receptor se corresponde con la formación del complejo ternario agonista-receptor-proteína G.

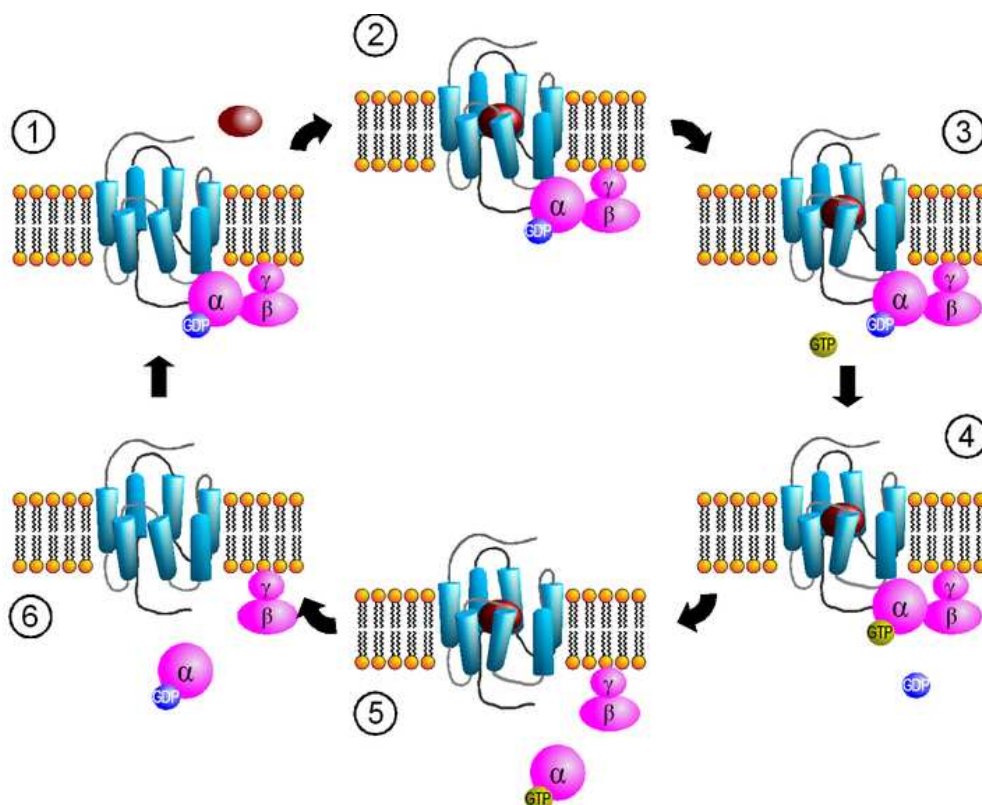


Figura 14: Ciclo de activación de las proteínas G: 1) Receptor en baja afinidad para agonistas. 2) Ligando interaccionando con el receptor. 3) Aproximación de GTP para establecer el intercambio con GDP. 4) Intercambio efectuado: alta afinidad del receptor. 5) Disociación de la subunidad α de la proteína G unida al GTP. 6) Hidrólisis de GTP en la subunidad α (actividad GTPasa) que conlleva su inactivación y reasociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ para reiniciar el ciclo.

Actualmente, es conocido que los GPCRs están implicados en multitud de trastornos debido a mutaciones o polimorfismos en su estructura. De ahí que sean un objetivo primordial para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, es difícil encontrar ligandos selectivos (agonistas o antagonistas) de GPCRs, debido a la semejanza de los centros ortostéricos de los diferentes subtipos de receptores pertenecientes a una misma familia. Una posible solución a este problema es el empleo de moduladores de pequeño tamaño que actúen en otra zona del receptor que no sea el centro ortostérico para provocar un efecto, ya sea activante o inhibitorio, de la respuesta provocada por la unión agonista-receptor. Este efecto se denomina alostérico³⁰. En la figura 15 se muestran

³⁰ Conn, P.J.; Christopoulos, A.; Lindsley, C.W. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41-54.

esquemáticamente los posibles modos de acción del efecto alostérico, que puede incluir una serie de cambios en el centro ortostérico o en las proteínas de su entorno.

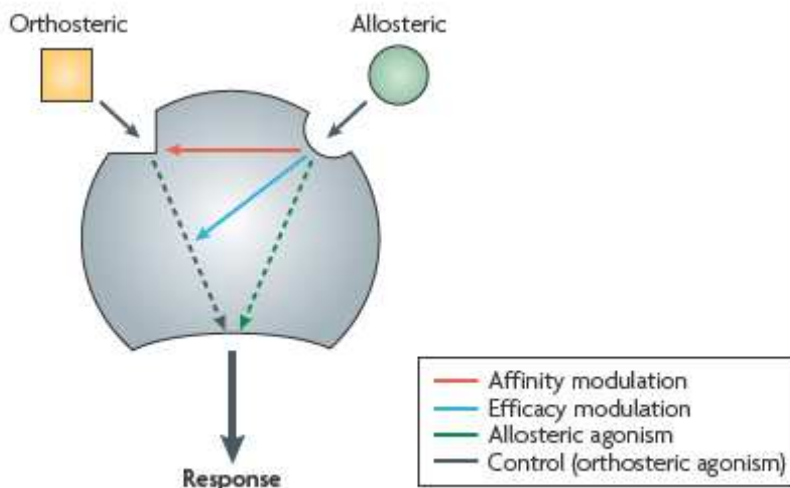


Figura 15: Representación esquemática de los modos de acción del efecto alostérico, (ref 30).

En general, los ligandos alostéricos pueden actuar siguiendo uno o la combinación de varios mecanismos de acción, tal y como se muestra en la *figura 15*. De manera resumida, la unión modulador-receptor altera la respuesta orgánica debido a: a) un cambio conformacional en el centro ortostérico, provocando una mayor o menor afinidad del ligando endógeno, (*flecha roja, figura 15*), b) la alteración de respuestas intracelulares (*flecha azul*). Además, también es conocido que este tipo de moduladores exhiben un agonismo intrínseco aún en ausencia de ligando ortostérico (*flecha verde*).

La PLG y algunos de sus peptidomiméticos aumentan la alta afinidad de los receptores D₂ por ligandos agonistas y, además, provoca un aumento de la proporción de receptores en estado de alta afinidad. El mecanismo modulador por el que se da la estabilización del estado de alta afinidad en el caso de la PLG no ha sido definido hasta el momento, aunque se han propuesto dos posibles vías para explicar este hecho:

1. Una interacción directa con un dominio del receptor diferente al lugar de unión del ligando agonista (efecto alostérico).

2. Un mecanismo indirecto asociado al incremento de la hidrólisis del GTP por parte de la proteína G³¹. Esta última hipótesis es menos probable ya que el efecto modulador no se observa con otros receptores acoplados a proteínas Gi como los adrenérgicos α_2 ³² o los serotoninérgicos 5HT₁³³, ni con receptores acoplados a proteínas Gs como los dopaminérgicos D₁³², sino que parece ser selectivo para los receptores dopaminérgicos D₂.

1.3.3 Conformación bioactiva de la PLG

Aunque existen referencias bibliográficas acerca de la actividad de la PLG que datan de los años 80³⁴, nada se conoce acerca de la conformación bioactiva que adopta al unirse al receptor. Es conocida la conformación del péptido libre en disolución gracias a estudios de RMN en DMSO-d₆³⁵ y dicroísmo circular³⁶. Además, estudios teóricos en el mismo disolvente indican que la conformación de giro β -II se encuentra entre las estructuras de más baja energía, lo que indica una alta flexibilidad del péptido³⁷. También es conocida su disposición espacial en estado sólido (difracción de Rayos X³⁸ y láser Raman³⁹) conteniendo un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno carbonílico de la prolina y el protón amídico *trans* de la glicinamida (*figura 16*).

³¹ Mishra, R.K.; Makman, M.H.; Costain, W.J.; Venugopalan, D.N.; Johnson, R.L. *Neurosci. Lett.* **1999**, 269, 21-24.

³² Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J.M.; Skoblenick, K.; Gupta, S.K.; Pristupa, Z.; Niznik, H.B.; Johnson, R.L.; Fair, V. D.; Mishra, R.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 3, 1228-1236.

³³ Sallés, J. y col, UPV-EHU, resultados no publicados.

³⁴ Johnson, R.L.; Rajakumar, G.; Yu, K.L.; Mishra, R.K. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 2104-2107, y artículos citados.

³⁵ Higashijima, T.; Tasumi, M.; Miyazawa, T.; Miyoshi, M. *Eur. J. Biochem.*, **1978**, 89, 543-566.

³⁶ Schwarz, R.; Mattice, W.; Morris, A. *Biopolymers* **1979**, 18, 1835-1848

³⁷ Zimmerman, S.S.; Baum, R.; Scheraga, H.A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, 19, 143-152.

³⁸ Reed, L.L.; Johnson, P.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7523-7524.

³⁹ Hsue, T.H.; Chang, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 624, 340-345.

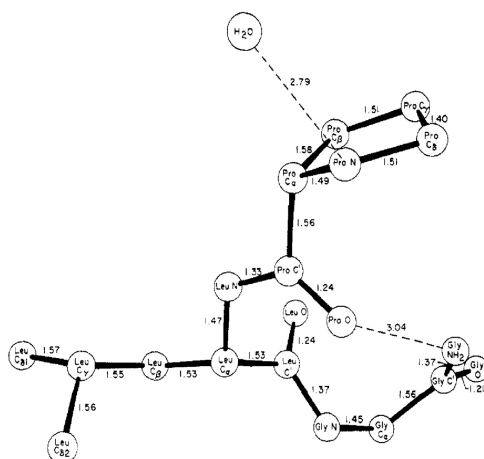


Figura 16: Disposición espacial de PLG-NH₂ en estado sólido obtenida por cristalografía de rayos X.

Este conjunto de resultados indica que, tanto en disolución como en estado sólido, la PLG adopta una conformación β -girada cuando se encuentra libre de interacciones con el receptor. Además, algunos autores han observado otro enlace de hidrógeno adicional entre la amina de la prolina y el protón amídico de la leucina⁴⁰, enlace que restringe el ángulo diedro $\Psi_{(i)}$, tal y como se indica en la figura 17.

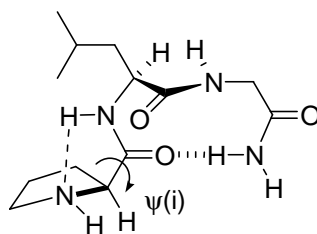


Figura 17: Conformación β -girada de la PLG incluyendo enlaces de hidrógeno intramoleculares estabilizantes. El ángulo diedro Ψ_i es restringido por la interacción entre el protón amídico de la leucina y la amina de la prolina.

La modelización molecular tampoco ha aportado luz al problema de la conformación bioactiva de la PLG. Ello es debido a que hasta la fecha no ha sido posible aislar complejos PLG-receptor D₂ para ser elucidados por difracción de rayos X. En consecuencia, en la actualidad se desconoce la estructura detallada del receptor que

⁴⁰ Valle, G.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Yu, K.L.; Johnson, R.L. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, 33, 181-190

interacciona con la PLG y, por tanto, el mecanismo de acción que desencadena la respuesta neuronal.

1.3.4 Actividad biológica de análogos de PLG

Johnson inició en 1988 el estudio de peptidomiméticos de PLG introduciendo elementos de restricción en diferentes posiciones del tripéptido⁴¹. Como se muestra en la *figura 18*, en las estructuras de los compuestos denominados **8** y **9** dicho autor introdujo una γ -lactama (modelo de Freidinger, *figura 4*) sustituyendo el residuo de leucina central, mientras que en el compuesto **10** se combinó una γ -lactama en el residuo central con una piroglutanamida terminal sustituyendo la prolina. Por último, en el derivado **11** se incluyó un grupo voluminoso en el extremo ($i+3$) para asegurar una conformación extendida, con el objetivo de utilizarlo como referencia de compuesto inactivo.

Estos análogos se sometieron a ensayos *in vitro* para estudiar su efecto sobre la afinidad del agonista de receptores dopaminérgicos D₂, [³H]-ADTN (2-amino-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno). Se comprobó que las estructuras **8a** y **10** incrementaban la fijación del agonista a receptores D₂ de membranas de caudado bovino, siendo el de mayor efecto el compuesto **8a** (pirrolidinilcarbonilamino-2-oxo-pirrolidinacetamida, PAOPA) de configuración *R* en la posición α del anillo de γ -lactama⁴². Puesto que es conocido que una γ -lactama con configuración *S* en posición α es inductora de giros β tipo II' y, por el contrario, su análogo *R* induce un giro β tipo II, se propuso que ésta era la conformación de la PAOPA, aunque ningún estudio experimental de determinación estructural avala esta afirmación.

⁴¹ Kuo-Long, Y.; Rajakumar, G.; Srivastava, L.K.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1430-1436.

⁴² Dolbeare, K.; Pontoriero, G.F.; Gupta, S. K.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 727- 733.

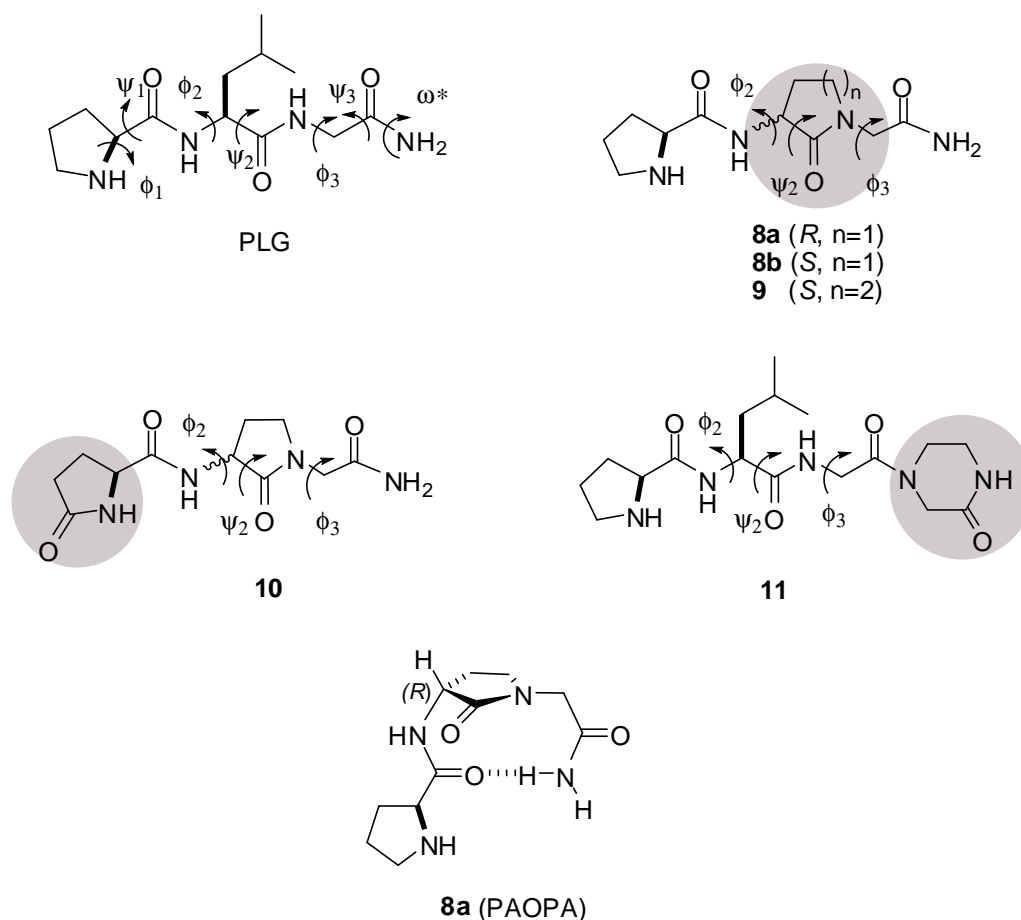


Figura 18: Representación gráfica de algunos análogos de la PLG propuestos por Johnson (**8-11**). Los compuestos **8-10** responden al modelo de Freidinger. Además, el compuesto **10** contiene el ácido piroglutámico mimetizando la prolina. En el derivado **11** el residuo de glicinamida terminal es sustituido por una 2-cetopiperacina.

Tras estos primeros antecedentes, los mismos autores diseñaron varios análogos de PLG con elementos de restricción parcial betágena (compuestos **12-17**, figura 19) y determinaron su actividad⁴³. Desafortunadamente, ninguno de ellos mostró una actividad superior al compuesto **8a** (PAOPA), siendo el mimético **14** el que originó un mayor incremento de afinidad del agonista N-propil-*nor*-apomorfina (NPA) por el receptor D₂. Este hecho parece indicar que la restricción conformacional necesaria para interactuar con el receptor no solamente puede ser ejercida por la posición central del pseudopéptido y pone de manifiesto la importancia del sustituyente del residuo ($i+2$). Además, se constató

⁴³ Baures, P.W.; Ojala, W.H.; Costain, W.J.; Ott, M. C.; Pradham, A.; Gleason, W.B.; Mishra, R. K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3594-3600.

que los miméticos **16** y **17** (X=S) conteniendo en su esqueleto dos prolina consecutivas y, por tanto inductoras de hélice II poliprolina (PPII)⁴⁴, también mostraban un considerable efecto modulador sobre la afinidad de NPA en receptores D₂⁴⁵. En esta misma línea el análogo **17** (X=CH₂) que presenta un giro β-VI⁴⁶ también mostró un incremento de afinidad de la NPA por receptores D₂. Este hecho sugiere que, si bien no es necesaria una conformación especialmente restringida hacia el giro β-II canónico, sí que es conveniente una similitud en la disposición espacial del esqueleto pseudopeptídico. Por último, la configuración del estereocentro en la posición cabeza de puente tiazolínico del diastereómero **17** es importante, ya que la inversión (*R*) a (*S*) provoca un efecto modulador negativo, disminuyendo la afinidad de agonistas por receptores D₂ en estado de alta afinidad.

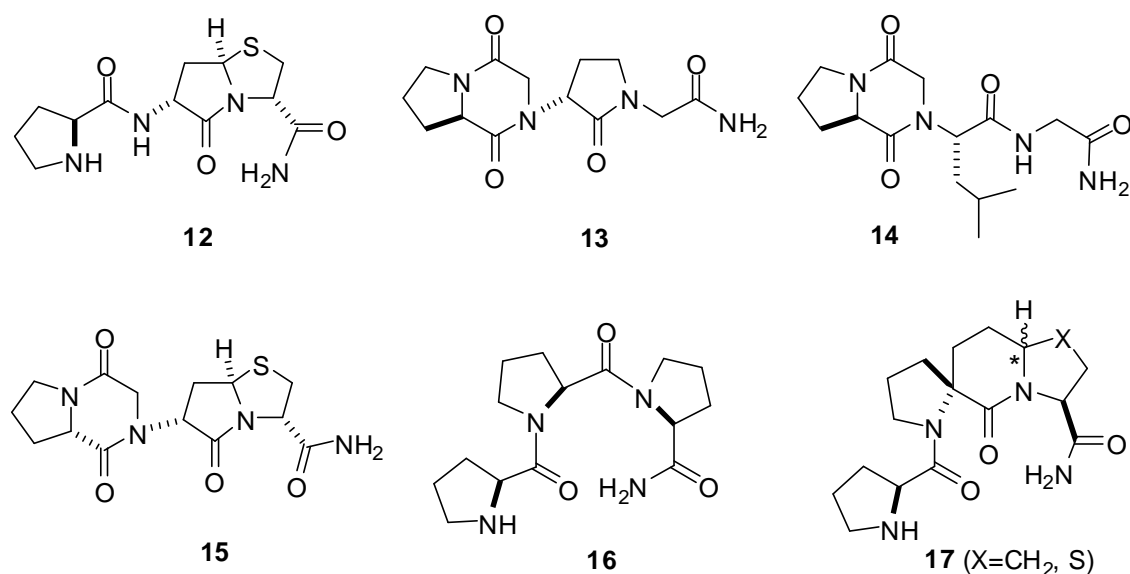


Figura 19: Peptidomiméticos de PLG que incorporan lactamas bicíclicas y poliprolinas como elementos de restricción conformacional.

- ⁴⁴ a) Crespo, L.; Sanclimens, G.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1756-1762.
b) Flemer, S.; Wurthmann, A.; Mamai, A.; Madalengoitia, J.S. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7593-7602.
⁴⁵ Raghavan, B.; Skoblenick, K.J.; Bhagwanth, S.; Argintaru, N.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2043-2051.
⁴⁶ Vartak, A.P.; Skoblenick, K.; Thomas, N.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6725-6729.

En un intento de dilucidar otros factores estructurales que pudieran afectar la actividad biológica de estos compuestos, Gmeiner estudió la importancia del enlace de hidrógeno observado ocasionalmente en la PLG entre los residuos prolina (*i*) y leucina (*i+1*), (ver figura 17). Para ello, sintetizó una serie de análogos con anillos de pirrolidinas mono y dibencilados capaces de bloquear el ángulo ψ_1 haciendo inviable la formación del enlace de hidrógeno. Algunos de estos compuestos mostraron una actividad similar a la de la PLG⁴⁷, lo que permitió concluir que no había una relación directa entre el enlace de hidrógeno intramolecular en esta posición y la actividad de los análogos.

Los análogos γ -lactámicos con un grupo sustituyente R en posición α (análoga al grupo ⁱBu de la leucina en la PLG) también ha sido objeto de estudio, dado que este grupo es considerado agente de reconocimiento para el receptor. Estudios llevados a cabo por el grupo de Johnson con la serie de peptidomiméticos mostrados en la figura 20, indican que a una concentración 100 nM, un sustituyente bencilo (Bn) en posición α del anillo incrementa la actividad reguladora con respecto al grupo butilo (Bu), isobutilo (ⁱBu) e incluso al hidrógeno del mimético PAOPA.

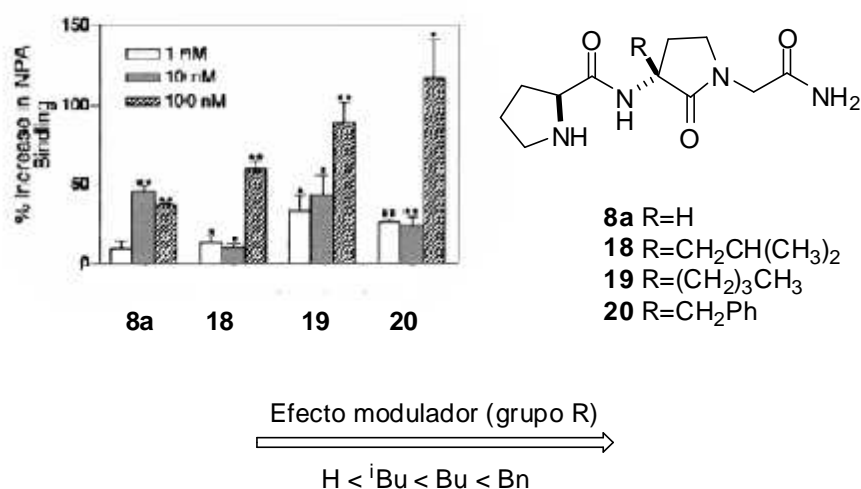


Figura 20: Incremento de la fijación del agonista [³H]-NPA sobre receptores D₂ de caudado bovino a distintas concentraciones de los miméticos análogos de PLG (8a, 18, 19 y 20). El mimético bencilado 20 es el que mayor efecto modulador presenta. (Figura tomada de la ref.42).

⁴⁷ Thomas, C.; Ohnmacht, U.; Níger, M.; Gmeiner, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2885-2890.

En esta serie de experimentos se observa que el incremento de fijación del agonista [³H]-NPA a receptores D₂ de caudado bovino depende de la concentración de mimético añadida (*figura 20*)⁴². Dicho incremento es mayor con el compuesto **20** que posee un grupo bencilo en posición α de la γ -lactama. Este mismo análogo ha sido evaluado *in vivo* en ratas lesionadas⁴⁸, confirmándose que es el modulador más efectivo descrito hasta ese momento. Por todo ello, parece claro que el carácter hidrofóbico del grupo R (en este caso bencilo) es determinante en el proceso de reconocimiento molecular. Si comparamos las moléculas PLG, PAOPA (**8a**) y el derivado **20**, se puede concluir que el papel del grupo ⁱBu de PLG es asumido de alguna manera por el puente etilénico de la γ -lactama en la PAOPA. Por otro lado, el hecho de que la bioactividad del análogo bencilado **20** sea mayor, supone que el efecto modulador es reforzado al introducir un grupo hidrófobo en la posición α con una configuración que expone al sustituyente de manera similar al grupo ⁱBu de la PLG.

Finalmente, se han descrito análogos con esqueletos más complejos utilizando como elementos de restricción residuos centrales de tipo bicíclico, espirocíclico⁴⁹ y glicinas α,α disustituídas⁵⁰. En el caso de los derivados con tiazolidinas bicíclicas (compuestos **21-24**, *figura 21*) se ha observado un incremento en la afinidad de agonistas por receptores D₂ al introducir un grupo hidrófobo R en la posición α del anillo lactámico⁵¹. Cabe resaltar que la preparación de estos pseudopéptidos conlleva síntesis complejas, ya que la introducción estereocontrolada de sustituyentes en los residuos ($i+1$) e ($i+2$) no es trivial. Si bien existe una metodología descrita para la síntesis de monolactamas sustituídas⁵², esta no es aplicable a los biciclos o espirolactamas⁵³.

La comparación de las estructuras y actividades de los peptidomiméticos monocíclicos (compuestos **8a**, **18-20**, *figura 20*) y los bicíclicos (compuestos **21-24**, *figura 21*) muestra resultados claramente diferentes en función del sustituyente R. Ello parece

⁴⁸ Castellano, J.M.; Batrynychuk, J.; Dolbeare, K.; Verma, V.; Mann, A.; Skoblenick, K.; Johnson, R.L.; Mishra, R.K. *Peptides*, **2007**, 28, 2009-2015.

⁴⁹ Khalil, E.M.; Ojala, W.H.; Pradham, A.; Nair, V.D.; Gleason, W.B.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 628-637.

⁵⁰ Evans, M.C.; Pradham, A.; Venkatraman, S.; Ojala, W.H.; Gleason, W.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1441-1447.

⁵¹ Khalil, E.; Pradham, A.; Ojala, W.H.; Gleason, W.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2977-2987.

⁵² Scott, W.L.; Alsina, J.; Kennedy, J.H.; O'Donnell, M.J. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1629-1632.

⁵³ Para más información sobre sustitución en residuos " $i+1$ " e " $i+2$ ": a) Subasinghe, N.L.; Khalil, E.M.; Johnson, R.L. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1317-1320. b) Hinds, M.G.; Robinson, J.A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1447-1449. c) Hinds, M.G.; Welsh, J.H.; Brennend, D.M.; Fisher, J.; Glennie, M.J.; Richards, N.G.J.; Turner, D.L.; Robinson, J.A. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1777-1789.

indicar que los elementos de restricción adicionales (tiazolidina) empleados para bloquear conformaciones beta giradas pueden entorpecer de algún modo el reconocimiento ligando-receptor.

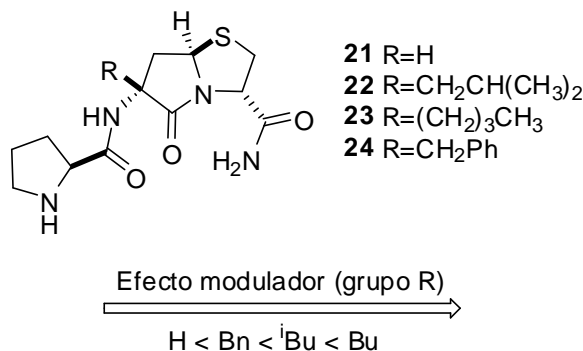


Figura 21: Análogos de PLG conteniendo tiazolidinas bicíclicas (**21-24**) (ref. 51).

Aunque en la bibliografía se da por sentado que los resultados positivos de bioactividad de los miméticos de PLG se pueden atribuir al hecho de introducir elementos que refuercen el carácter betágeno de su cadena peptídica, apenas existen estudios conformacionales que corroboren la presencia de motivos de giro β -II en los miméticos más activos. Los únicos datos experimentales de este hecho fueron aportados por Genin y Johnson en 1992⁵⁴, mediante el análisis conformacional de RMN de los pseudopéptidos espirocíclicos **25** y **26** basado en experimentos de NOE selectivo y medidas de desplazamiento químico del protón amídico terminal en CDCl₃ y DMSO-d₆. Si bien el estudio en CDCl₃ mostró evidencias de la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular, éste no fue observado cuando los ensayos se llevaron a cabo en dimetilsulfóxido. En este trabajo se concluyó que el espirociclo central de los compuestos **25** y **26** (figura 22) era betágeno, aunque un exceso de rigidez conformacional impedía la formación del enlace de hidrógeno estabilizante entre los residuos (*i*) e (*i*+3) en medios coordinantes.

⁵⁴ Genin, M.; Johnson, R.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778-8783.

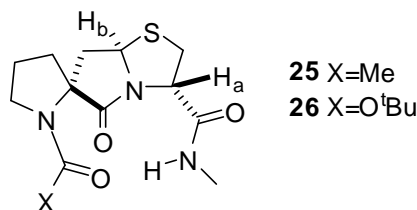


Figura 22: Derivados bicíclicos **25** y **26** sometidos a análisis conformacional de RMN en CDCl₃ y DMSO-d₆.

En resumen, numerosos miméticos de PLG han sido sintetizados introduciendo elementos de restricción conformacional betágena (β -II) para ser sometidos a estudio biológico. Los peptidomiméticos que han presentado hasta el momento una mayor actividad son **8a** (PAOPA) y su derivado sustituido con un grupo bencilo en la posición α de la γ -lactama **20** (figura 23).

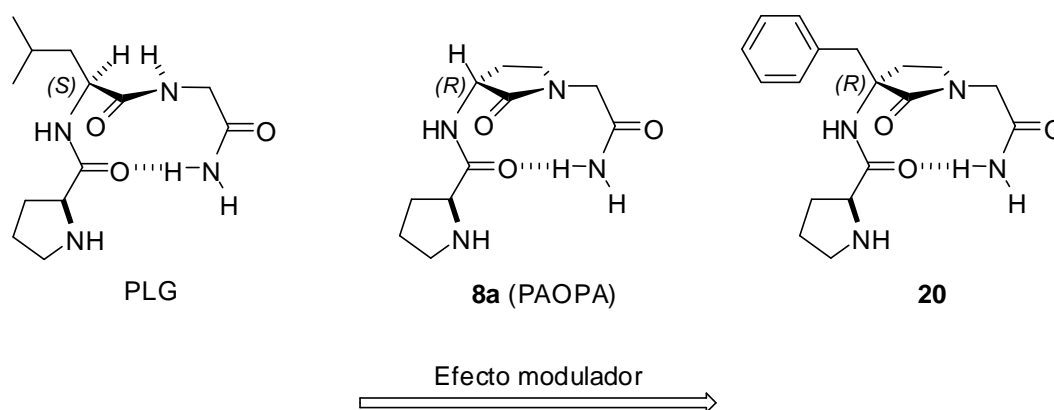


Figura 23: Compuestos análogos de PLG con mayor actividad biológica, por orden de efectividad: PLG < **8a** < **20**.

1.3.5 Antecedentes β -lactámicos

Existen pocas referencias en la bibliografía que describan análogos de PLG conteniendo en su esqueleto una β -lactama. El pionero en este campo fue el grupo de Johnson, que aportó el análogo **27** (figura 24)⁵⁵, seguido del grupo de Podlech⁵⁶, que

⁵⁵ a) Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, 50, 960-968. b) Yu, K.-L.; Rajakumar, G.; Srivastava, L. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1430-1436. c) Sreenivasan, U.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 256-263.

⁵⁶ Maier, T.; Frey, W.U.; Podlech, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2686-2687.

desarrolló una ruta sintética para acceder al análogo **2**. Si bien se asume que los peptidomiméticos **27** y **2** presentan restricción conformacional provocada por el anillo β -lactámico, en ninguno de los dos casos se estudiaron las conformaciones en disolución. Por otro lado, los resultados biológicos tampoco fueron positivos, por lo que no se pudieron establecer relaciones conformación-actividad en ninguno de los dos casos. Posteriormente, en nuestro grupo fue sintetizado el peptidomimético **28**, hasta el momento el análogo estructuralmente más similar a la PLG. En esta ocasión, sí se estudió la disposición espacial del ligando libre mediante análisis conformacional de RMN y DM, demostrando experimentalmente que la β -lactama α,α -disustituída actuaba realmente como un elemento de restricción betágena⁵⁷. Además, este derivado mostró cierto efecto modulador de la fijación de agonistas a receptores dopaminérgicos D₂ en cultivos de neuronas de corteza cerebral de rata.

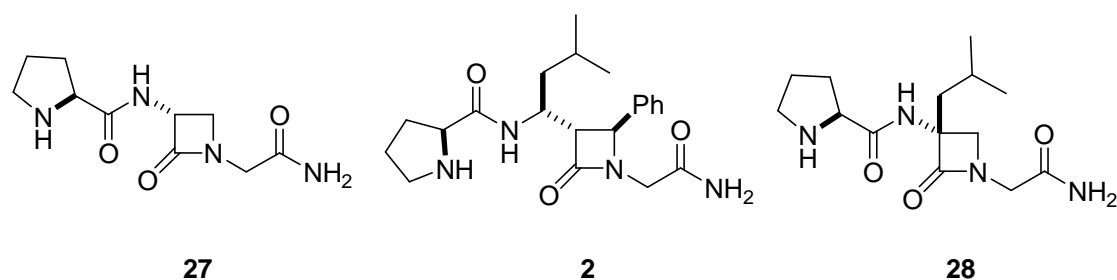


Figura 24: Peptidomiméticos β -lactámicos de PLG.

Estos resultados supusieron el punto de partida para la realización de un estudio más profundo de los peptidomiméticos β -lactámicos como análogos de PLG, tal y como se detallará más adelante.

1.3.6 Estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*

El tipo de ensayo *in vitro* al que se someten los derivados de PLG consiste en experimentos de competición agonista-antagonista por la unión con el receptor. Hasta ahora, el medio sobre el cual se han desarrollado han sido cultivos de neuronas de núcleo

⁵⁷ 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.

caudado bovino⁵⁸, neuroblastomas humanos transfectados con ADN de tejido enriquecido en receptores dopaminérgicos⁵⁹ o membranas de estriado de rata⁴⁴. Sin embargo, hasta la fecha no se han efectuado ensayos de bioactividad con receptores procedentes de membranas de caudado humano, que proporcionarían información más próxima a los ensayos preclínicos en pacientes humanos.

El protocolo experimental es similar en todos los casos, requiriendo de experimentos control en ausencia y en presencia de un modulador. De esta manera, se mide el incremento de afinidad del agonista por los receptores. La PLG y sus miméticos activos modulan esta afinidad de manera dosis-dependiente, como se indica en la *figura 25*⁵⁹. La respuesta es observada mediante un marcaje radiactivo (del agonista o antagonista).

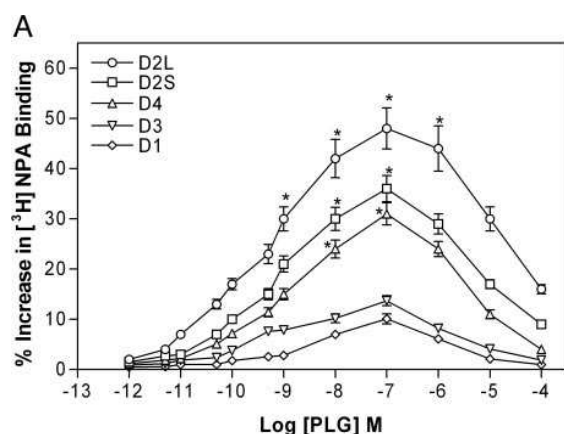


Figura 25: Gráfica dosis-dependiente extraída de la ref. 59. Las diferentes curvas corresponden al incremento de fijación de [³H]-NPA a receptores dopaminérgicos al variar la cantidad de PLG añadida. La concentración de máximo efecto en todos los casos es 100 nM.

Hasta el momento se ha observado mayor fijación de algunos agonistas (NPA, apomorfina, ADTN, L-dopa, o pramipexol) cuando se administran junto con PLG o alguno de sus miméticos. Esto se debe al incremento de afinidad del agonista por el estado de alta afinidad del receptor, previsiblemente por efecto de un cambio estructural en el centro de unión del receptor. También se ha observado un aumento en la proporción de receptores en estado de alta afinidad.

Por otro lado, los experimentos *in vivo* desarrollados en el campo del Parkinson y trastornos relacionados se han basado en la observación de la respuesta ante lesiones del tracto nigroestriado (via dopaminérgica) y la atenuación del VCM (movimiento

⁵⁸ Nickolls, S. A.; Strange, P.G. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 1139-1150.

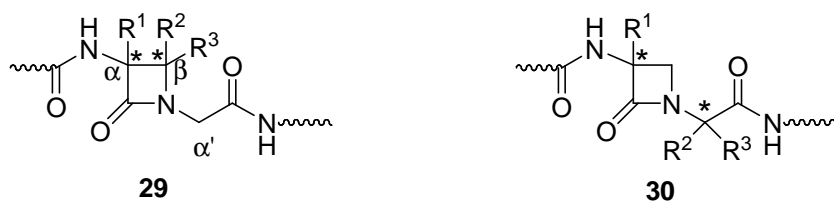
⁵⁹ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J.M.; Skoblenick, K.; Gupta, S.K.; Pristupa, Z.; Niznik, H.B.; Johnson, R.L.; Fair, V. D.; Mishra, R.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228-1236.

masticatorio) al administrar PLG o análogos en presencia de un agonista D_2 a ratas previamente lesionadas.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, muchos de los aspectos relativos a la síntesis y análisis conformacional de los pseudopéptidos β -lactámicos **29** (*figura 26*), formados en torno a núcleos centrales (*scaffolds*) del tipo (β -Lactam)-(Gly), ya habían sido estudiados previamente en nuestro laboratorio. El objeto de dichas investigaciones fue la comprensión de los efectos de estabilización conformacional ejercidos por los sustituyentes de las posiciones α y β del anillo β -lactámico según su naturaleza electrónica, tamaño y disposición espacial. Sin embargo, debido a la ausencia de un método sintético eficiente para acceder a *scaffolds* enantiopuros del tipo (β -Lactam)-(Aa), los pseudopéptidos **30** (*figura 26*) portadores de residuos ($i+2$) sustituidos en la posición α' apenas habían sido estudiados antes del comienzo del presente trabajo.



*Figura 26: Pseudopéptidos β -lactámicos con fragmentos centrales de tipo (β -Lactam)-(Gly) (**29**) y de tipo (β -Lactam)-(Aa) (**30**).*

2.1 Diseño de pseudopéptidos β -lactámicos multitópicos

Los pseudopéptidos del tipo **30** (*figura 26*) pueden constituir una solución interesante al problema de la interacción entre los peptidomiméticos lactámicos de Freidinger y los receptores multitópicos (*figura 27*). En efecto, prácticamente todos los pseudopéptidos lactámicos requieren de uno o varios ciclos en el fragmento de restricción externo al giro (p. ej. **31** ó **32**, *figura 27*) para estabilizar un determinado subtipo de giro β . Sin embargo, la congestión estérica provocada por las cadenas de los ciclos, biciclos o espirociclos lactámicos dificulta a menudo la interacción de los grupos de reconocimiento (R^1 , R^2 , etc...) con el receptor. En este contexto, un diseño “minimalista” que tienda a

reducir al máximo el fragmento de restricción de la lactama resulta particularmente atractivo puesto que puede ayudar a minimizar las interacciones indeseadas entre el mimético y el receptor.

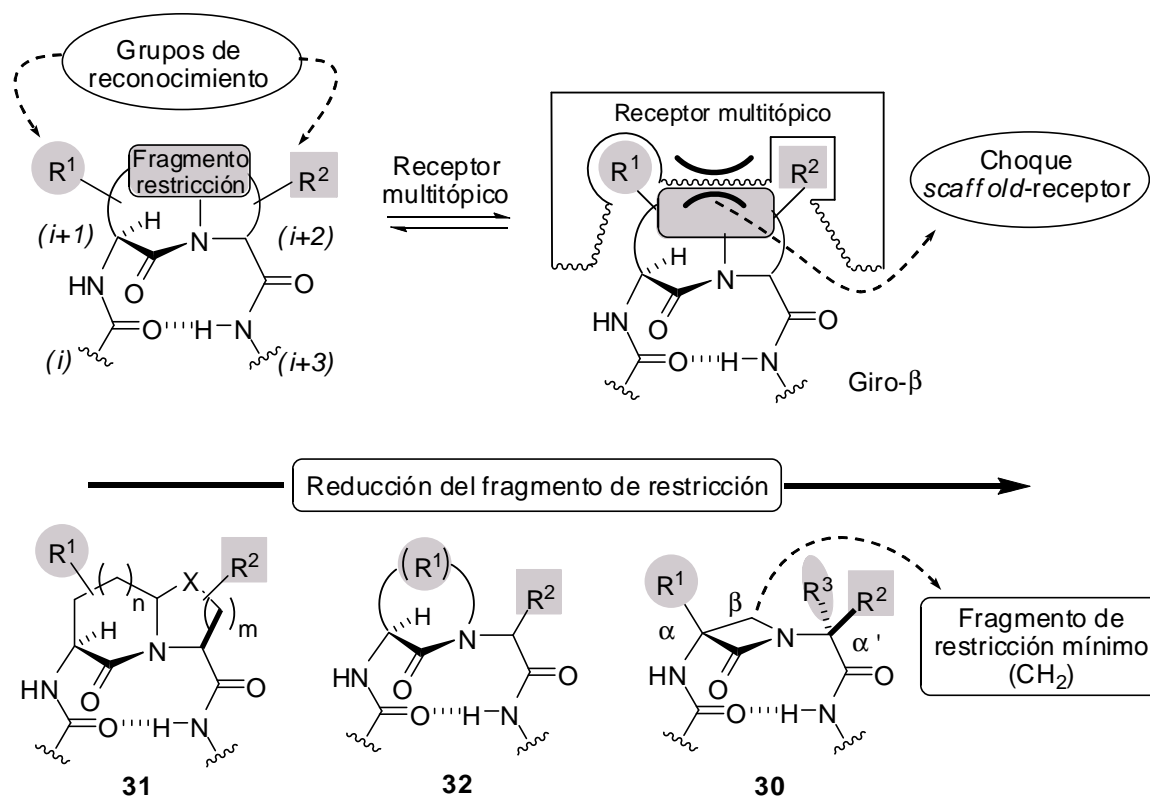


Figura 27: Estrategia de reducción de fragmento de restricción en peptidomiméticos lactámicos. Tipo Freidinger: 31,32; tipo β -lactámico: 33.

Aplicando la aproximación β -LSAD (ver apartado 1.2.1, pág 21) resulta muy sencillo diseñar miméticos β -lactámicos de tipo 30 a partir de los péptidos nativos cuya conformación bioactiva sea β -girada. Al no tener sustituyentes en la posición β del anillo β -lactámico, se puede esperar que la interacción estérica *scaffold*-receptor sea menor que en las lactamas de Freidinger. Además, debido a la inclusión de los grupos R², R³ y a la naturaleza estereogénica de la posición α' , es esperable que los peptidomiméticos (β -Lactam)-(Aa) (30) presenten una diversidad química mucho mayor que los análogos de tipo (β -Lactam)-(Gly) (29). Por último, gracias a que la posición α del anillo β -lactámico se halla tetrasustituida, también resulta razonable suponer que los pseudopéptidos 30 tengan una baja reactividad química y una alta resistencia enzimática, puesto que ambas

caras del carbonilo β -lactámico se hallan estéricamente impedidas por los grupos R^1 y $RCOHN$.

2.2 Análisis conformacional de pseudopéptidos β -lactámicos

La introducción de los grupos R^2 y R^3 en el residuo $(i+2)$ de los miméticos β -lactámicos de tipo **30** debería provocar interacciones estéricas no simétricas con diversos fragmentos del residuo $(i+1)$ que contiene el anillo de azetidín-2-ona. A su vez, ello debería favorecer de manera desigual la estabilización de los diferentes conformeros extendidos, β -girados y γ -girados (*figura 28*). Además, la configuración relativa de los estereocentros α y α' también podría jugar un papel importante sobre las poblaciones relativas de dichos conformeros. Por ello, la principal cuestión que abordamos al comenzar nuestro trabajo fue la de entender las interacciones interresiduales $(i+1)/(i+2)$ que tienen lugar en los pseudopéptidos de tipo **30** y sus consecuencias en el equilibrio conformacional.

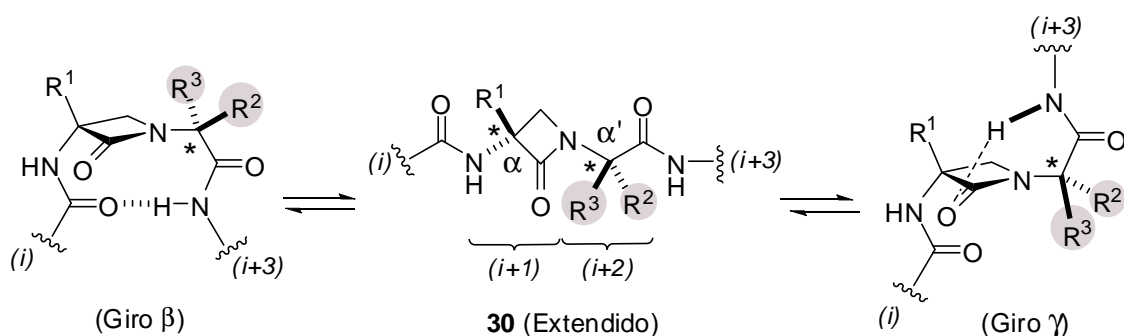


Figura 28: Algunas conformaciones de los pseudopéptidos β -lactámicos con fragmentos centrales de tipo (β -Lactam)-Aa (**30**).

Los pseudopéptidos de tipo **30** contienen los dos átomos $C\alpha$, $C\alpha'$ y el nitrógeno β -lactámico dispuestos de forma lineal (*figura 29*). Por ello, dichos peptidomiméticos son excelentes candidatos para nuclear estructuras secundarias con varios enlaces de hidrógeno interresiduales, tales como horquillas (hairpin) y láminas β paralelas o antiparalelas. Sin embargo, la estabilización de horquillas peptídicas depende en gran medida de la

configuración relativa de (i) e $(i+3)$ cuando estos residuos son quirales. El análisis conformacional en disolución de pseudopéptidos del tipo **33** conteniendo residuos quirales adicionales (i) e $(i+3)$ podría ayudar a establecer qué pares de configuraciones relativas (homoquirales ó heteroquirales) de dichos residuos favorecen la estabilización de estructuras secundarias más complejas que los giros β o γ . Además, para establecer mejor el efecto intrínseco de dichos residuos, sería conveniente estudiar modelos del tipo **33** con un número mínimo de estereocentros y, por lo tanto, simétricamente sustituidos en la posición α' .

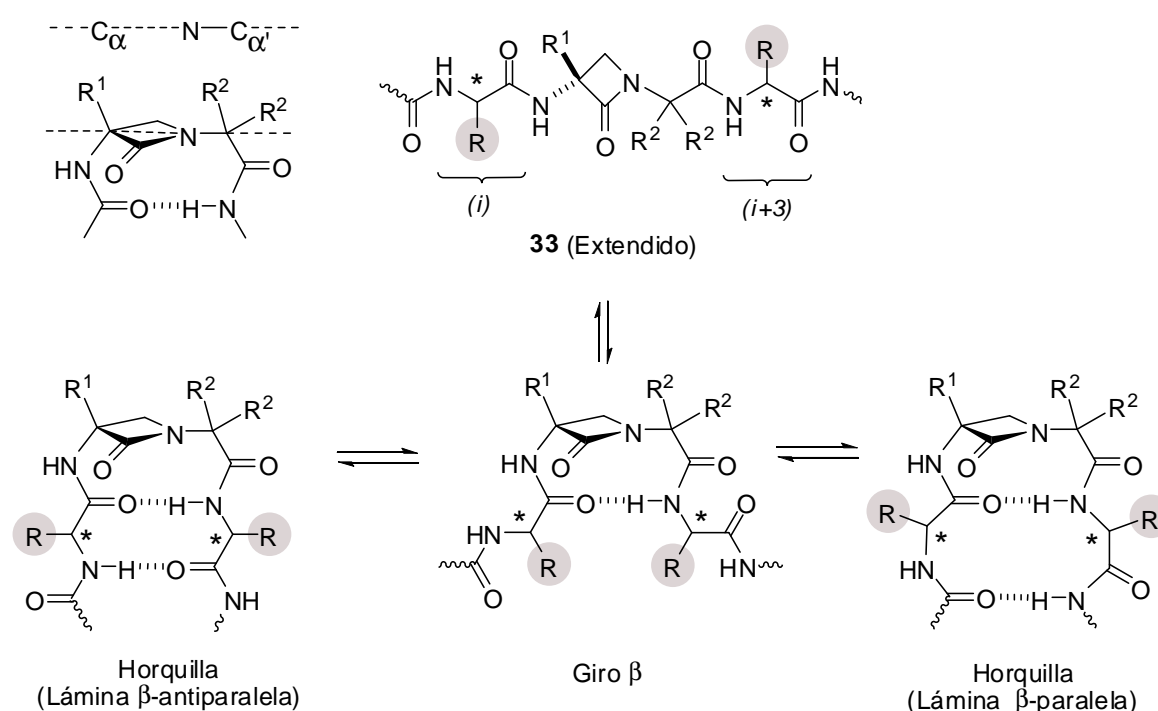


Figura 29: Algunas conformaciones en horquilla (hairpin) de los pseudopéptidos β -lactámicos (**33**) con fragmentos quirales en (i) e $(i+3)$.

Por último, el establecimiento de las correlaciones entre estructura y conformación en los pseudopéptidos β -lactámicos de tipo **30** ó **33**, permitiría aplicar dicha información al diseño de miméticos de PLG y estudiar las relaciones estructura-actividad en su interacción con receptores dopaminérgicos D_2 .

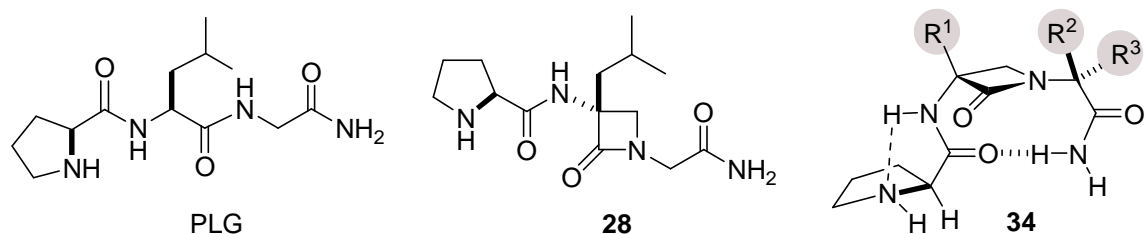


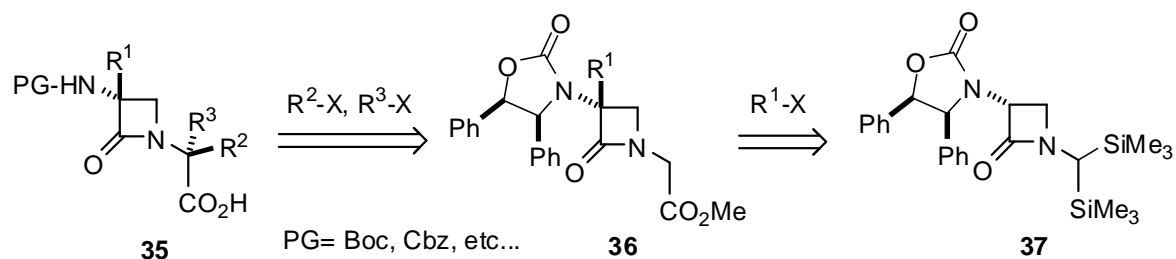
Figura 30: Estructura de la melanostatina o PLG y sus análogos β -lactámicos.

En la *Introducción* se ha mencionado que en nuestro laboratorio ya se exploró este campo sintetizando el análogo β -lactámico de tipo **28**, que muestra cierta capacidad moduladora de fijación de agonistas en cultivos de neuronas dopaminérgicas de rata. Puesto que dicho incremento fue atribuido a la estabilización de una conformación de tipo giro β -II, ahora sería posible preparar quimiotecas de tipo **34** que cumplieran este requisito conformacional. De este modo, realizando los correspondientes ensayos de actividad biológica, podría lograrse un control mucho más preciso de la capacidad neuromoduladora de los nuevos peptidomiméticos β -lactámicos.

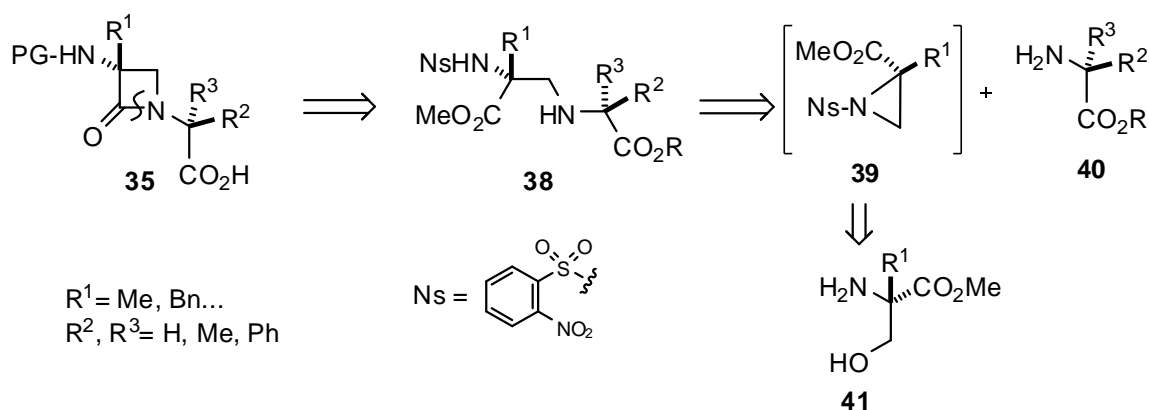
2.3 Objetivos

Para intentar verificar experimentalmente las hipótesis formuladas en este apartado, y continuando los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio para estudiar la síntesis, el comportamiento conformacional y la actividad biológica de los pseudopéptidos β -lactámicos, nos marcamos lo siguientes objetivos:

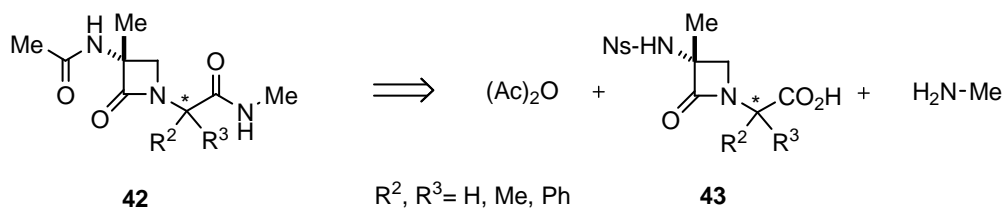
1. Desarrollar un método general para preparar los moldes o *scaffolds* del tipo PG-(β -Lactam)-Aa-OH (**35**) en forma enantiopura. Para ello, nos proponemos investigar dos rutas alternativas:
 - a) La alquilación en la posición α' de los enolatos derivados de las β -lactamas **36**, obtenibles a partir de las N-[bis(trimetilsilil)metil]- β -lactamas **37**.



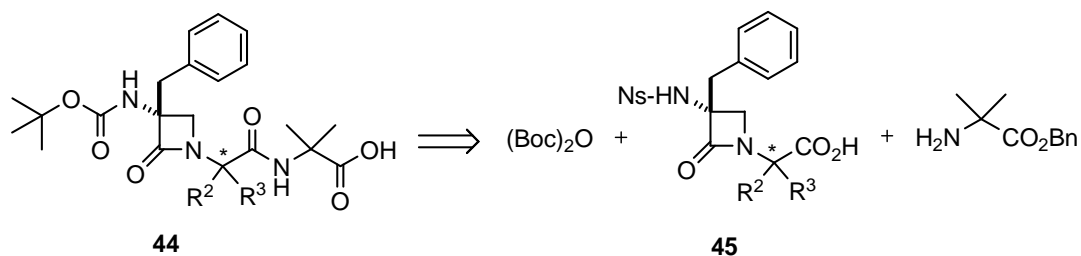
b) La ciclación intramolecular de las N-peptidil- β -azaalaninas **38** obtenidas mediante la apertura con α -aminoésteres **40** de las N-nosil-aziridinas **39**. Estas últimas constituyen formas simultáneamente protegidas y activadas de los serinatos α -sustituidos **41**.



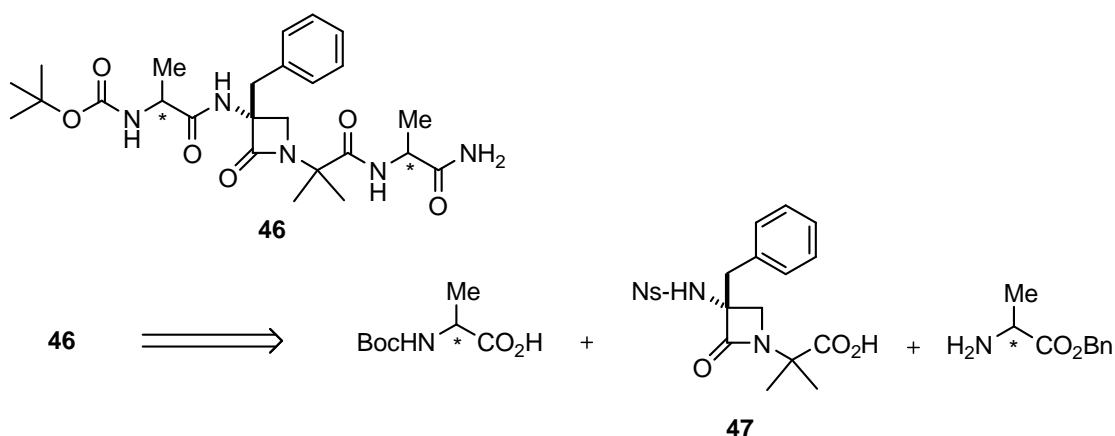
- Preparar tres familias de péptidos β -lactámicos incorporando moldes o *scaffolds* del tipo PG-(β -Lactam)-Aa-OH mediante técnicas de síntesis peptídica en disolución. En primer lugar, se sintetizará la familia de péptidos **42** conteniendo sustituciones mínimas (Me) tanto en el carbono α del anillo β -lactámico como en las posiciones N- y C- terminales.



Siguiendo una metodología similar, se prepararán los miméticos de tipo **44**, poseedores de centros estereogénicos cuaternarios en posición α y de residuos más voluminosos en los extremos (i) e ($i+3$).

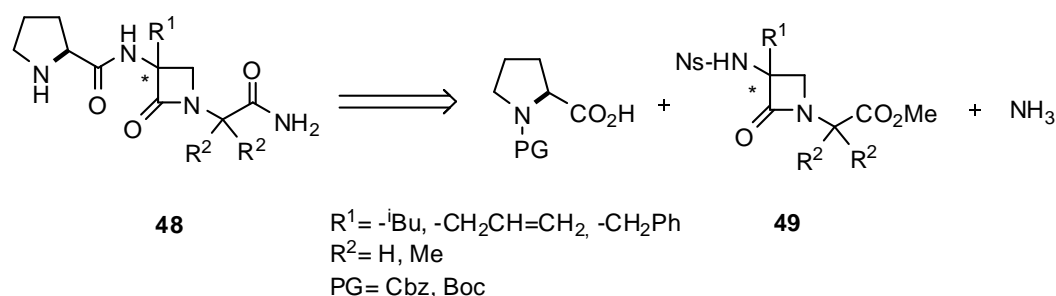


Por último, se propone preparar los cuatro diastereómeros posibles de los miméticos de tipo **46**, que incorporan residuos de alanina en los extremos (i) e ($i+3$).



3. Efectuar el estudio conformacional de los modelos peptídicos **42**, **44** y **46** para establecer los efectos estabilizantes (betágenos, gammágenos, etc...) provocados por la sustitución en α' y la presencia de residuos quirales adicionales. Los estudios se llevarán a cabo empleando técnicas combinadas de Dinámica Molecular y RMN en disolventes altamente coordinantes (DMSO-d_6) para identificar las redes de enlaces de hidrógeno intramoleculares formados. Cuando el acceso a monocristales adecuados lo permita, también se estudiarán dichas conformaciones en estado sólido mediante técnicas de difracción de rayos X.

4. Realizar la síntesis y el análisis conformacional en disolución de los nuevos pseudopéptidos β -lactámicos **48** análogos de la melanostatina (PLG). Su preparación se planteó siguiendo una metodología idéntica a la mencionada más arriba partiendo de los *scaffolds* **49**, amoníaco y (L)-prolina convenientemente protegida en función de la naturaleza química del grupo R^1 . A diferencia de los modelos de pseudopéptidos descritos en los objetivos anteriores, en este caso nos propusimos preparar ambos diastereómeros para cada sustituyente R^1 . De este modo, además de estudiar los motivos conformacionales inducidos por cada combinación de configuraciones relativas, dispondríamos de una mayor variedad de ligandos para la evaluación de su bioactividad.



5. Evaluar la actividad de los ligandos β -lactámicos **48** como moduladores alostéricos de la afinidad del agonista dopaminérgico (–)N-propilnorapomorfina (NPA) por receptores D_2 procedentes de caudado humano mediante experimentos de competición agonista/antagonista utilizando la técnica de “binding” o fijación de ligandos. En dicho estudio se determinarán las constantes de afinidad de la NPA en presencia y en ausencia de PLG y los análogos sintetizados de tipo **48**.

RESULTADOS

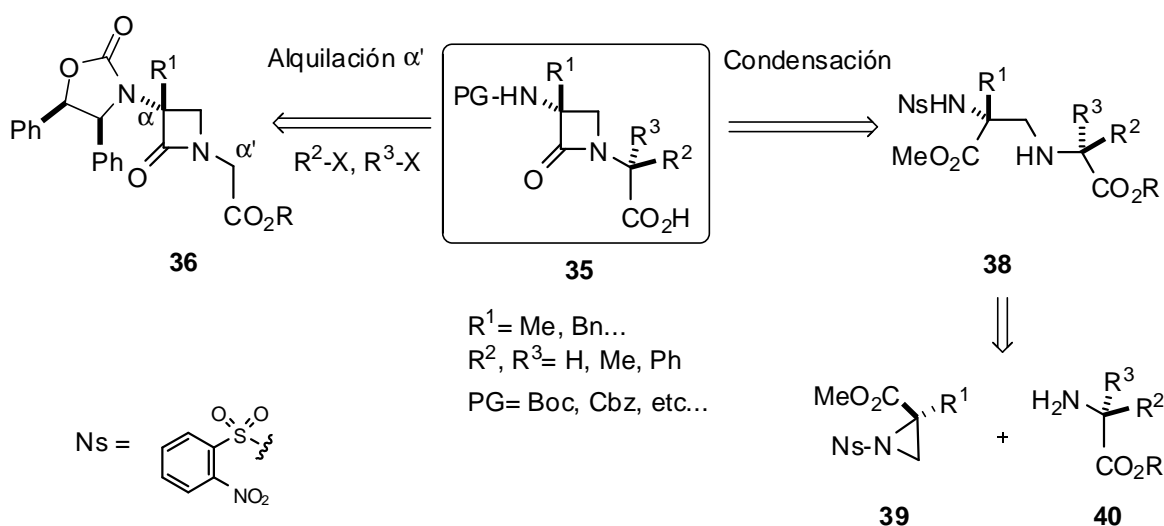
y

DISCUSIÓN

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de dipéptidos β -lactámicos enantiopuros (scaffolds) del tipo PG-(β -Lactam)-(Aa)-OH

El plan de trabajo propuesto para abordar el primer objetivo de la tesis consistió en explorar dos rutas de acceso a los moldes β -lactámicos clave **35**, necesarios para la síntesis de diversos pseudopéptidos β -lactámicos. La primera se basó en la alquilación en α' de las α -alquil- α -amino-N-alcoxycarbonil- β -lactamas **36** y la segunda en la condensación intramolecular de las β -azaalaninas **38**, accesibles a su vez a partir de las aziridinas **39** y los α -aminoésteres **40**.

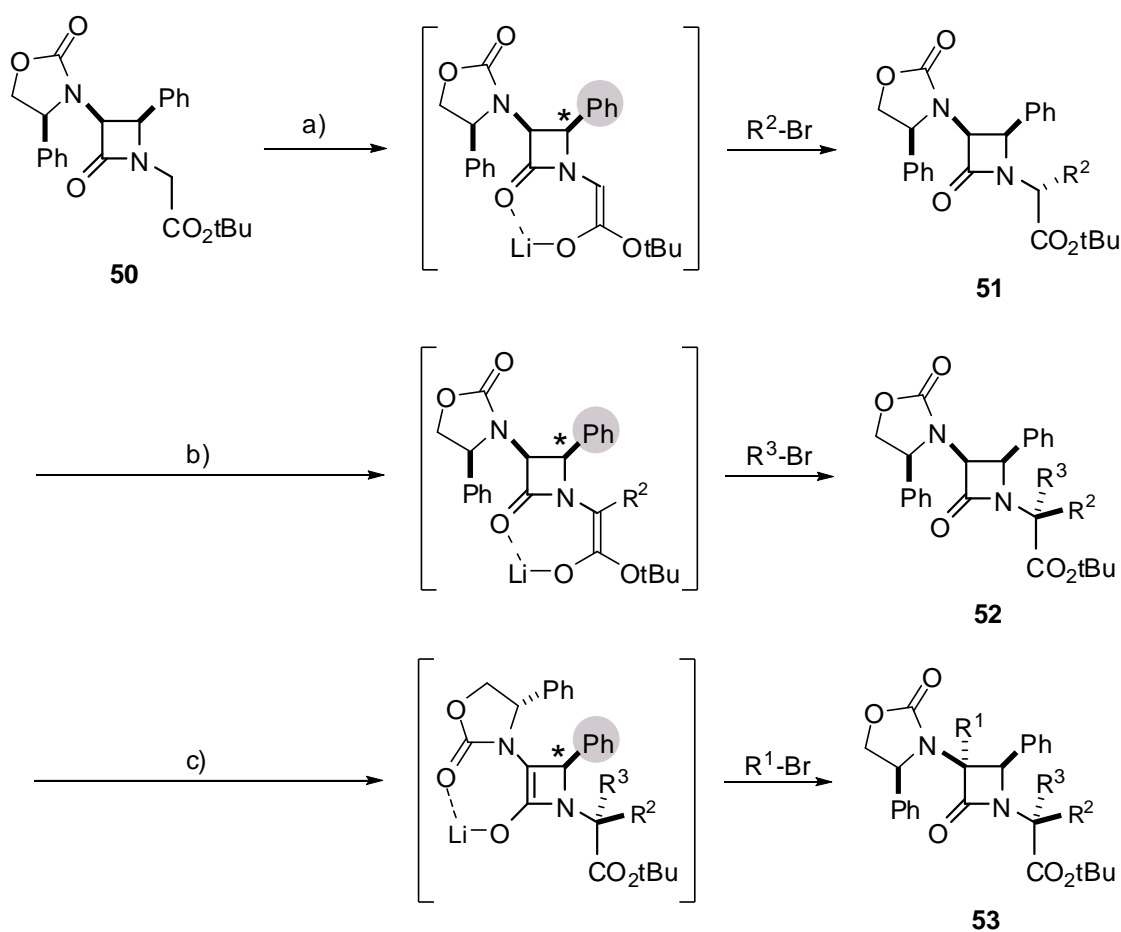


Esquema 1: Rutas sintéticas para la preparación de los moldes β -lactámicos **35**.

En los siguientes apartados de este capítulo se detallan los resultados obtenidos en cada caso, así como las limitaciones y ventajas que presentaron.

3.1.1 Alquilación de α -alquil- α -amino-N-alcoxicarbonilmetil- β -lactamas

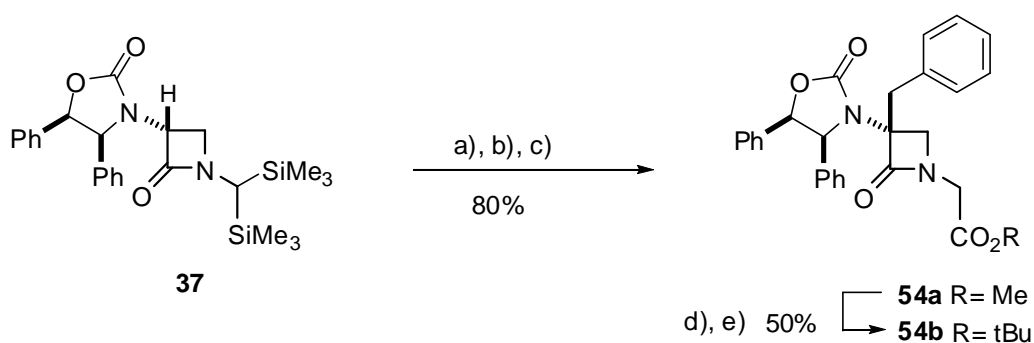
La alquilación estereocontrolada de enolatos de N-[(alcoxicarbonil)metil]- β -lactamas fue desarrollada por Ojima hace casi dos décadas⁶⁰. El procedimiento (*esquema 2*) consiste en una secuencia de alquilación de enolatos en la que el orden de adición de los halogenuros de alquilo determina la posición y la configuración de los centros alquilados.



Esquema 2: Reactivos y condiciones: a) LiHMDS, THF, -78°C , 16h., luego $R^2\text{Br}$, b) LiHMDS, THF, -78°C , 16h., luego $R^3\text{Br}$, c) LiHMDS, THF, -78°C , 16h., luego $R^1\text{Br}$.

⁶⁰ a) Ojima, I.; Komata, T.; Qiu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 770-774. b) Ojima, I. " β -Lactam Synthon Method. Enantiomerically Pure β -Lactams as Synthetic Intermediates" en "The Organic Chemistry of β -Lactams" Ed. G.I. Georg, VCH, New York, **1993**, p. 197-255. c) Ojima, I. *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 28, 383-389.

Aunque se trata de una aproximación muy elegante, presenta una importante limitación, ya que sólo es aplicable a β -lactamas α,β -disustituídas y es el grupo arilo (Ph) de la posición β de la β -lactama el determinante estereoquímico de la inducción asimétrica observada en las tres etapas de alquilación. Puesto que los moldes β -lactámicos de tipo **35** (*esquema 1*) debían carecer de sustitución en la posición β , no resultaba clara la aplicabilidad del método de Ojima para nuestro objetivo. A pesar de esto, se decidió explorar esta ruta. Para ello, se prepararon las N-[(alcoxycarbonil)metil]- β -lactamas **54a-b** siguiendo un procedimiento descrito anteriormente en nuestro laboratorio⁶¹, (*esquema 3*). La secuencia consistió en una bencilación completamente estereocontrolada del enolato de la N-[bis(trimetilsilil)metil]- β -lactama **37**, seguida de la degradación oxidativa del grupo sililado con nitrato de cerio (IV) y amonio y posterior N-alquilación de la NH- β -lactama intermedia con bromoacetato de metilo en presencia de carbonato de cesio. De este modo, la β -lactama **54a** se pudo obtener con un rendimiento global del 80%. Posteriormente, se preparó el éster *terc*-butilico **54b** vía saponificación y posterior esterificación con *terc*-butanol de la N-[(metoxycarbonil)metil]- β -lactama **54a**.

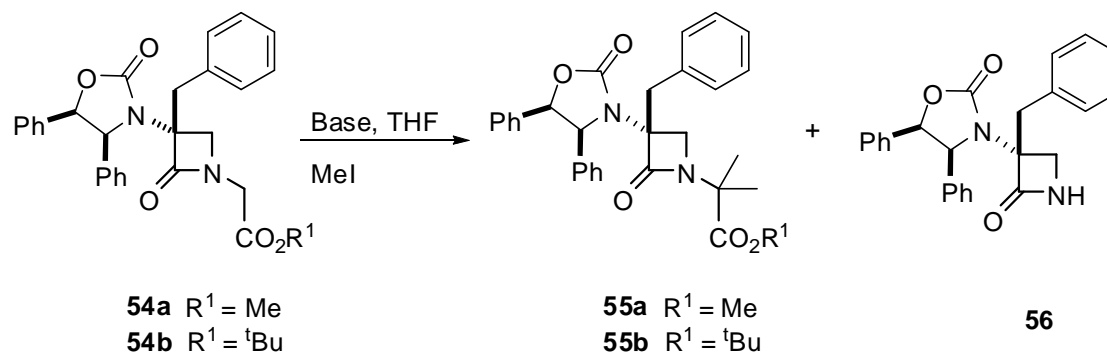


Esquema 3: Reactivos y condiciones: a) LDA (1.2 eq.), THF, -78°C, 30 min., luego BrBn (5 eq.), -78°C-t.a., 16h., b) CAN (5 eq.), H₂O, 0°C, luego t.a., 1h., c) BrCH₂CO₂Me (1.4 eq), Cs₂CO₃ (1.1 eq.), MeCN, 85°C, 90 min., d) LiOH.H₂O (10 eq.), MeOH/H₂O, t.a., 1h., e) PhOP(O)Cl₂ (1.2 eq.), Et₃N (4 eq.), ^tBuOH (1.1 eq.), CH₂Cl₂, t.a., 16h.

⁶¹ Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; Ganboa, I.; Benito, A.; Cuervo, L.; Fratila, R.M.; Jiménez, A.; Loinaz, I.; Miranda, J.I.; Pytlewska, K.; Micle, A.; Linden, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4443-4446.

Una vez preparados los ésteres β -lactámicos **54a** y **54b** se pasó a estudiar la metilación de sus enolatos en condiciones similares a las de Ojima empleando yoduro de metilo como electrófilo, THF como disolvente y diferentes bases (*ver tabla 2*).

Tabla 2: Ensayos de metilación de los ésteres β -lactámicos **54a-b**.

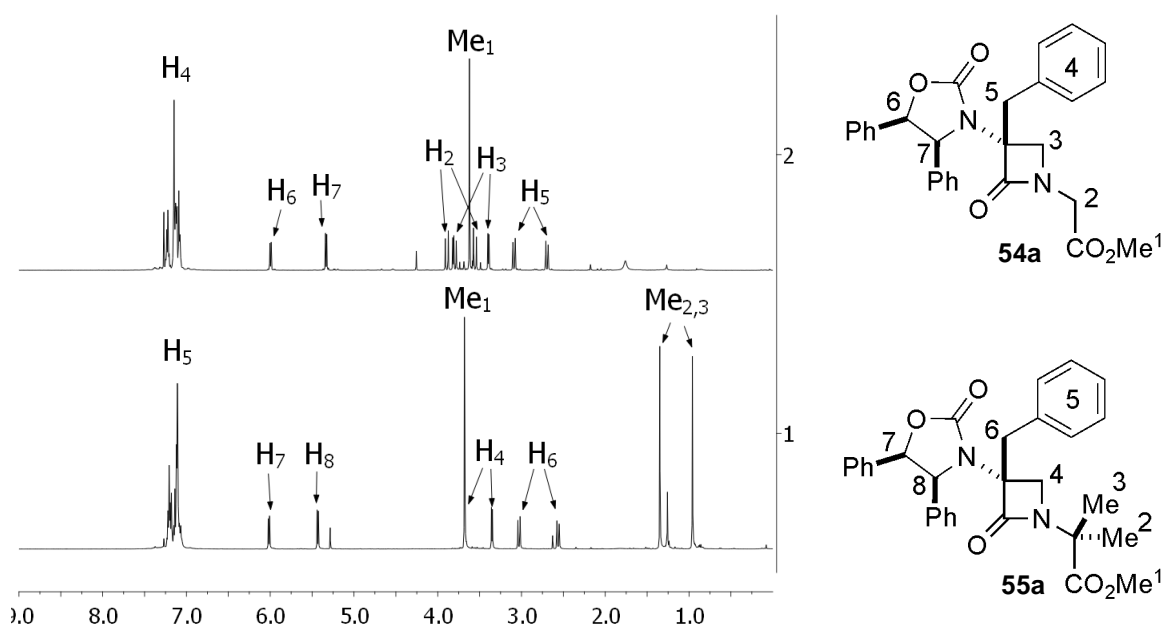


| | Sustrato | Base ^a | T ^a (°C) | t (h) | Conversión ^b | Rdto(%) | Producto |
|---|------------|-------------------|---------------------|-------|-------------------------|-------------|----------------|
| 1 | 54a | LDA | -78 | 0.5 | 0 | 0 | 54a |
| 2 | 54a | LDA | -78-t.a | 1 | 0 | 0 | 54a |
| 3 | 54a | LDA | -78-t.a | 5 | 100 | 0 | Descomposición |
| 4 | 54a | NaH | -78 | 0.5 | 0 | 0 | 54a |
| 5 | 54a | LiHMDS | -78 | 0.5 | 100 | 50 | 55a |
| 6 | 54a | LiHMDS | -78 | 2 | 100 | 50 (mezcla) | 55a, 56 |
| 7 | 54a | LiHMDS | -78 | 16 | 100 | N.d | 56 |
| 8 | 54a | LiHMDS | -78-0 | 1 | 100 | 50 | 56 |
| 9 | 54b | LiHMDS | -78 | 3 | 0 | 0 | 55b |

^a Las cantidades de base adicionadas fueron de 1.2 eq. (entradas 1-4), y 3 eq. (entradas 5-9). ^b Según el análisis de ¹H RMN (500MHz), (*ver figura 31*).

Los primeros ensayos se llevaron a cabo con el éster metílico **54a**, empleando LDA como base. Tal y como se muestra en las *entradas 1-2*, no se observó conversión alguna del producto de partida a -78°C y tiempos cortos de reacción. El incremento en la temperatura y tiempo de reacción provocaron únicamente la degradación de **54a**, según se

dedujo de los análisis de ^1H RMN. Por otro lado, los ensayos con hidruro sódico tampoco condujeron a una conversión apreciable. Posteriormente, se estudió la reacción utilizando como base el bistrimetilsililamiduro de litio (LiHMDS, *entradas 5-9*). En esta caso se obtuvo el producto doblemente metilado en posición α' tras 30 minutos de reacción a -78°C (*entrada 5*). La posterior purificación del crudo obtenido mediante columna cromatográfica dio lugar al producto **55a** cuyo espectro se muestra en la *figura 31*.



*Figura 31: Espectros ^1H -RMN de los compuestos **54a** y **55a** registrados a 500MHz.*

Los dos singletes observados a 1.0 y 1.5 MHz en el espectro de **55a** muestran inequívocamente la incorporación de dos grupos metilo al Ca' , que se contrapone a la desaparición de los dos dobletes correspondientes a los protones H_2 de **54a** (*figura 31*). En posteriores ensayos con la misma base (LiHMDS) aumentando el tiempo de reacción y elevando la temperatura hasta 0°C , se apreció la aparición de un nuevo producto **56** (*entrada 6-8*), hasta ser el único observado (*entradas 7-8*). Por último, los ensayos de alquilación de **54b** en las condiciones óptimas encontradas para su homólogo **54a** no dieron los resultados esperados, recuperándose la totalidad del producto de partida.

En resumen, las condiciones descritas por Ojima⁶⁰ para la alquilación de enolatos de N-[(alcoxycarbonil)metil]- β -lactamas no fueron aplicables a la alquilación estereocontrolada de β -lactamas no sustituidas en la posición β , y la obtención por esta vía del producto dimetilado **55a** presentó una baja reproducibilidad. Por esas razones se desechó esta vía para preparar moldes β -lactámicos de dipéptidos y se optó por estudiar más profundamente la condensación intramolecular de β -aminoésteres.

3.1.2 Condensación intramolecular de β -azaalaninas α -sustituídas

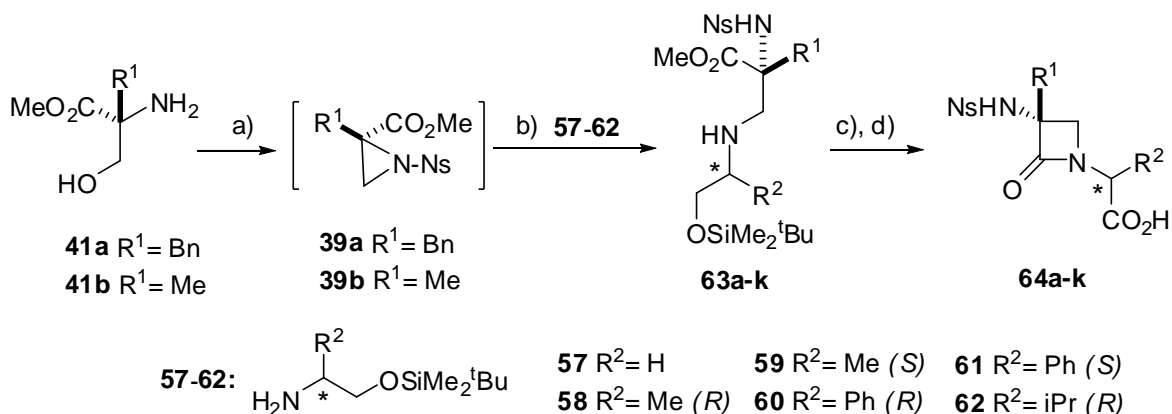
Durante la realización de su tesis doctoral, E. Balentová puso a punto en nuestro laboratorio una metodología para preparar α,α' -dialquil- β -lactamas a partir de β -azaalaninas por ciclación con bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHMDS)⁶². También desarrolló un método para preparar β -azaalaninas α -sustituídas mediante la apertura de N-nosil-aziridinas con β -aminoalcoholes *O-terc*-butildimetilsililados. Este trabajo supuso el punto de partida para la preparación por nuestra parte de nuevos moldes β -lactámicos α' -monosustituídos (**64a-k**, ver *tabla 3*).

En primer lugar, se prepararon en forma enantiopura los serinatos α -sustituídos **41** a partir de la D-serina siguiendo el procedimiento de α -alquilación de aminoácidos descrito por Seebach⁶³. La posterior formación de las aziridinas **39** se llevó a cabo por calentamiento de los alquil-serinatos con dos equivalentes de cloruro de *orto*-nosilo y bicarbonato potásico en acetonitrilo. La reacción transcurrió de forma muy limpia cuando se empleó dicha base (KHCO₃), pero dio lugar a reacciones incompletas o subproductos cuando se emplearon otras bases inorgánicas (carbonato potásico, carbonato sódico, bicarbonato sódico), u orgánicas (triethylamina, diisopropyletilamina, piridina, etc...). Por su parte, el grupo nosilo resultó ser el agente protector-activante óptimo tanto para la formación como para la posterior apertura de las aziridinas estudiadas, ya que otros grupos, tales como tosilo, *terc*butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz), etc.. resultaron ser ineficientes. Ninguna de las aziridinas preparadas fue aislada, haciéndose reaccionar in situ con las aminas **57-62**.

⁶² Para una mayor información sobre el estudio de esta metodología, ver Tesis Doctoral E. Balentova, Universidad P. Safarik, Kosice, Eslovaquia, **2006**.

⁶³ Seebach, D.; Aebi, J.D.; Gander-Coquoz, M.; Nael, R. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1194-1216.

Tabla 3: Síntesis de α,α' -dialquil- β -lactamas a partir de α -alquil-serinatos de metilo.



Reactivos y condiciones: a) *o*-NsCl (2.1 eq.), KHCO_3 (5eq.), MeCN, reflujo, 16h., b) **57-62** (1.5 eq.), KHCO_3 (1 eq.), MeCN, t.a., 12h., c) LiHMDS (2.5 eq.), THF, t.a., 12h., d) HF (1.2 eq.), t.a., 1h., después $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (2eq.), acetona, 0°C , 2h., o d') BAIB (2.2 eq.), TEMPO (0.5 eq.), acetona/ H_2O 1:1, t.a., 3h.

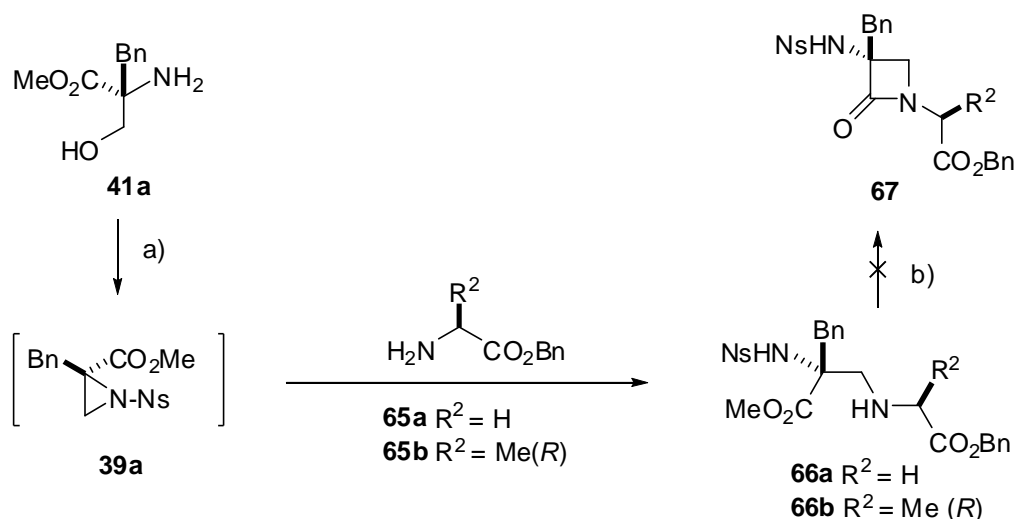
| n | R^1 | R^2 | Amina | β -Azaalanina | Rdto(%) ^a | β -Lactama | Rdto(%) ^a |
|----|-------|--------------------|-----------|---------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| 1 | Bn | H | 57 | 63a | 64 | 64a | 80 ^b |
| 2 | Me | H | 57 | 63b | 70 | 64b | 75 ^c |
| 3 | Me | Me(R) | 58 | 63c | 70 | 64c | 87 ^b |
| 4 | Me | Me(S) | 59 | 63d | 83 | 64d | 88 ^b |
| 5 | Me | Ph(R) | 60 | 63e | 79 | 64e | 55 ^c |
| 6 | Me | Ph(S) | 61 | 63f | 84 | 64f | 58 ^c |
| 7 | Bn | Me(R) | 58 | 63g | 50 | 64g | 91 ^b |
| 8 | Bn | Me(S) | 59 | 63h | 50 | 64h | 90 ^b |
| 9 | Bn | Ph(R) | 60 | 63i | 46 | 64i | 77 ^b |
| 10 | Bn | Ph(S) | 61 | 63j | 50 | 64j | 74 ^b |
| 11 | Me | ⁱ Pr(R) | 62 | 63k | 45 | 64k | 89 ^b |

^a Rendimientos globales a partir de los serinatos **41**; ^b Método de oxidación de *N*-hidroxietil- β -lactama: Reactivo de Jones, acetona; ^c Método de oxidación de *N*-hidroxietil- β -lactama: BAIB, TEMPO, acetona/ H_2O

Los β -aminoalcoholes protegidos con el grupo *tert*-butildimetilsililo (**57-62**) se prepararon fácilmente a partir de los correspondientes α -aminoácidos mediante reducción con borohidruro de litio y clorotrimetilsilano seguida de O-sililación con *tert*-

butildimetilclorosilano según el procedimiento de Giannis⁶⁴. La reacción de **57-62** con las aziridinas **39a-b** condujo a las β -azaalaninas **63a-k** con rendimientos globales a partir de los serinatos **41** que oscilaron entre el 45 y el 84%. La ciclación de los β -aminoésteres **63a-k** se llevó a cabo por tratamiento con bis(trimetilsilil)amiduro de litio en THF a temperatura ambiente, proporcionando las N-(2-sililoxietil)- β -lactamas intermedias de modo prácticamente cuantitativo. Los crudos de dichas β -lactamas fueron desililados con ácido fluorhídrico diluido y los alcoholes resultantes oxidados a las N-carboximetil- β -lactamas **64a-k** con rendimientos globales comprendidos entre el 55 y el 89%.

Inicialmente, se había pensado en llevar a cabo la apertura de las aziridinas **39** con los correspondientes α -aminoésteres **65a** y **65b** en lugar de los β -aminoalcoholes sililados **57-62** para formar así directamente las β -lactamas α' -monosustituídas **67** (esquema 4).



Esquema 4: Reactivos y condiciones: a) *o*-NsCl (2.1 eq.), KHCO₃ (5eq.), MeCN, reflujo, 16h., luego **65** (1.5 eq.), MeCN, t.a., 12h., b) LiHMDS (2.5 eq.), THF, t.a., 12h

Sin embargo, se comprobó que, aunque la apertura de la aziridina **39a** con glicinato o alaninato de bencilo transcurría con buenos rendimientos (70-73%), los ensayos para la ciclación de los β -aminoésteres lineales⁶⁵ **66a-b** a las β -lactamas **67** en presencia de bases

⁶⁴ a) Giannis, A.; Sandhoff, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1989**, 28, 218-220. b) Steinig, A.G.; Spero, D.M. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2406-2410.

⁶⁵ Para métodos de ciclación de β -aminoésteres a 2-azetidionas ver: a) Backes, J. In Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band E16b; Müller, E.; Bayer, O.; Eds.; Thieme: Stuttgart, **1991**, pp 97-101. b) Vicario, J.L.; Badia, D.; Carrillo, L. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 9030-9032.

como LiHMDS o LDA conducían únicamente a la recuperación del producto de partida acompañado de productos de descomposición. Los intentos fallidos de la ciclación **66** → **67** fueron atribuidos a la acidez del protón de la posición C α' de las N-peptidil- β -azaalaninas **66** que impedía la abstracción del protón amínico implicado en el proceso de ciclación hacia la β -lactama. Por ello, al abordar por primera vez la formación de los análogos α',α' -disustituídos **70** (*tabla 4*), se pensó en una condensación similar utilizando aminoésteres α',α' -disustituídos no enolizables.

En efecto, tal y como se muestra en la *tabla 4*, los aminoésteres α,α -disustituídos **68-69** reaccionaron con las aziridinas **39** a 40°C en acetonitrilo para proporcionar los ésteres metílicos de las β -azaalaninas **70a-g** con rendimientos globales de moderados a buenos. Una vez purificados, dichas β -azaalaninas fueron cicladas en condiciones suaves (0°C, 1h) con LiHMDS en THF dando lugar a las β -lactamas α,α',α' -trisustituídas **71a-g** con rendimientos prácticamente cuantitativos. Tanto las reacciones de apertura de aziridinas como las de formación de β -lactamas se siguieron mediante el análisis de ^1H RMN de alícuotas tomadas a diferentes tiempos de reacción.

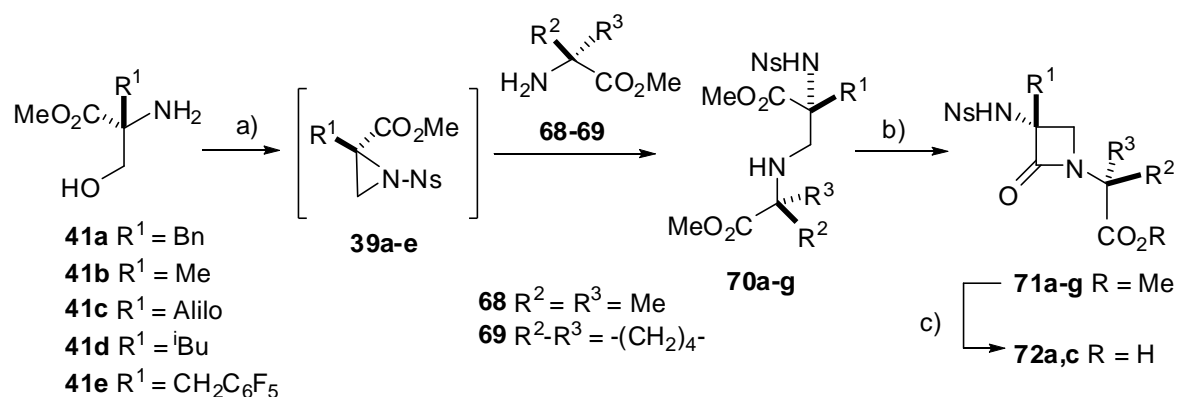
Es preciso resaltar la considerable congestión estérica provocada por la tetrasustitución en los carbonos adyacentes a los centros reactivos de la aziridina y del β -aminoéster. A pesar de ello, tanto las reacciones de apertura del anillo de aziridina como la formación de la β -lactama transcurrieron eficientemente en todos los ejemplos estudiados, aunque la primera etapa requirió de un leve calentamiento (40°C) que no fue preciso en el caso de los β -aminoalcoholes sililados **57-62** (*ver tabla 3*). Finalmente, los ésteres **71a** y **71c** fueron sometidos a saponificación con hidróxido de litio para proporcionar los ácidos libres **72a** y **72c**, listos para ser sometidos a acoplamiento peptídico por la posición C-terminal.

Los resultados obtenidos en este apartado supusieron la consecución completa del primero de los objetivos de la presente tesis. También se estableció una de las rutas más cortas y eficientes para la síntesis completamente estereocontrolada de miméticos de dipéptidos conteniendo simultáneamente un elemento de restricción de tamaño mínimo -CH₂- y varios grupos de reconocimiento (R¹, R², R³, *ver esquema 1*).

En los siguientes apartados se describirá la síntesis de diversas familias de pseudopéptidos β -lactámicos preparados a partir de las familias **64** y **71** y se estudiará su

comportamiento conformacional en disolución, así como la estructura en estado sólido de algunos de ellos.

Tabla 4: Síntesis de α,α',α' -trialquil- β -lactamas a partir de α -alquil-serinatos de metilo.



Reactivos y condiciones: a) *o*-NsCl (2.1 eq.), KHCO_3 (5eq.), MeCN, reflujo, 16h., luego **68-69** (1.5 eq.), KHCO_3 (1 eq.), MeCN, 40°C, 24h., b) LiHMDs (2.5 eq.), THF, 0°C, 1h., c) LiOH.H₂O (10 eq.), MeOH/H₂O, t.a., 1h.

| n | R ¹ | R ² | R ³ | β -Lactama | Rdto(%) ^a |
|---|---|---------------------|----------------|------------------|------------------------------------|
| 1 | Bn | Me | Me | 71a | 70 (72a , 90) ^b |
| 2 | Bn | $-(\text{CH}_2)_4-$ | | 71b | 51 |
| 3 | Me | Me | Me | 71c | 65 (72c , 93) ^b |
| 4 | Me | $-(\text{CH}_2)_4-$ | | 71d | 59 |
| 5 | Alilo | Me | Me | 71e | 40 |
| 6 | ⁱ Bu | Me | Me | 71f | 45 |
| 7 | CH ₂ C ₆ F ₅ | Me | Me | 71g | 40 |

^a Rendimientos globales a partir de los α -alquilserinatos. ^b Rendimiento de la saponificación al ácido libre (**71**→**72**).

En la *figura 32* se muestran los espectros ¹H RMN (200MHz, CDCl₃) de los crudos de reacción de la aziridina **39a**, β -azaalanina **70a** y la β -lactama **71a**, indicándose las asignaciones de los protones más significativos en cada caso.

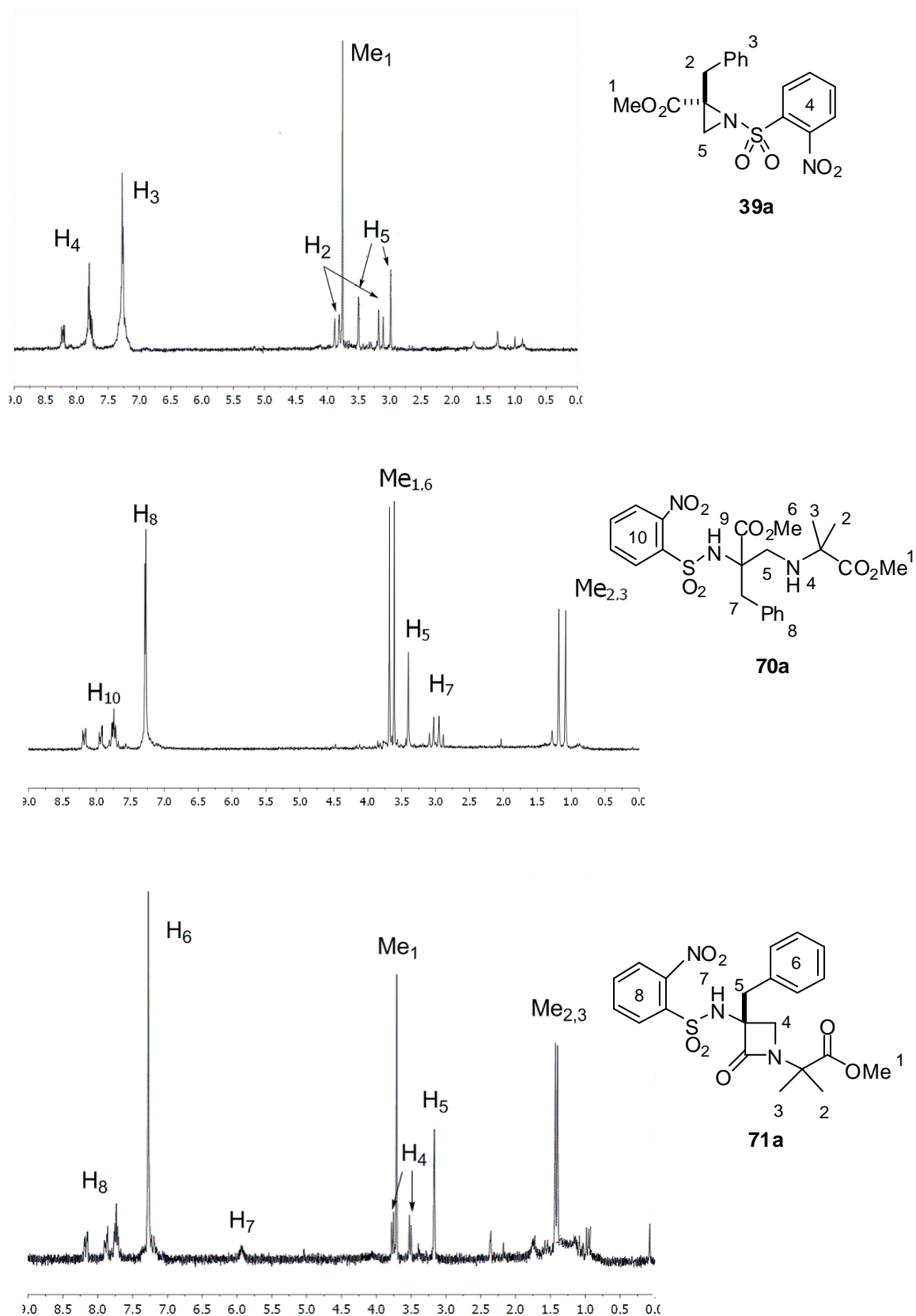


Figura 32: Espectros ¹H RMN (200MHz, CDCl₃) de los crudos de los compuestos 39a, 70a y 71a.

3.2 Síntesis y análisis conformacional de peptidomiméticos β -lactámicos

Como se ha indicado en el apartado *Hipótesis y objetivos*, en nuestro laboratorio se habían investigado anteriormente las relaciones estructura-conformación de los miméticos β -lactámicos α,β -sustituídos del tipo **29** (ver figura 33). Estudios basados en análisis por RMN, DM y rayos X habían mostrado claras evidencias del efecto fuertemente betágeno de los anillos β -lactámicos α -monosustituídos y α,β -disustituídos cuando ocupan la posición ($i+1$) de estos pseudopéptidos con un resto ($i+2$) de glicina (figura 33). Ahora, aprovechando la ruta sintética desarrollada en el apartado 3.1 para preparar nuevos moldes β -lactámicos decidimos sintetizar los pseudopéptidos **30** (figura 33) y explorar su comportamiento conformacional. De esta manera, no sólo se podría hacer patente el efecto de la configuración del estereocentro Ca' en el residuo ($i+2$), sino también las consecuencias de una posible interacción estérica entre los sustituyentes de las posiciones Ca en ($i+1$) y Ca' en ($i+2$).

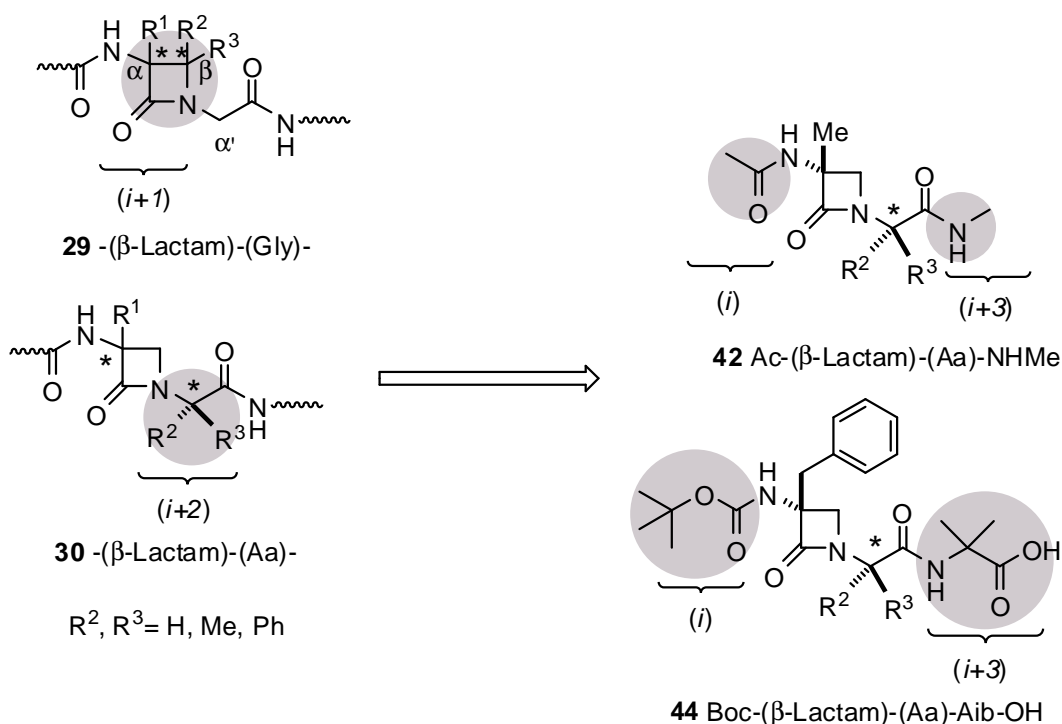


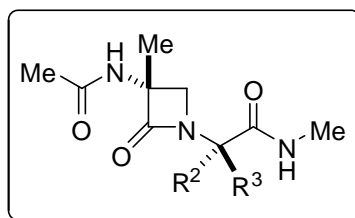
Figura 33: Modelos propuestos para el estudio conformacional de peptidomiméticos β -lactámicos con residuos ($i+2$) quirales (**30**) y residuos (i) e ($i+3$) aquirales (**42,44**).

Para evitar interacciones más complejas con los residuos terminales, se diseñaron modelos modificados en los residuos (i) e ($i+3$) con fragmentos aquirales de diferente volumen. En concreto, la familia de pseudopéptidos **42** fue propuesta por tener sustituciones mínimas (Me) tanto en el C α del anillo β -lactámico como en las posiciones N- y C- terminales. En el caso de los pseudopéptidos **44** los grupos (Bn, Boc, Aib) fueron seleccionados por presentar un volumen mayor y cierta capacidad aceptora/dadora a la hora de formar enlaces de hidrógeno.

Seguidamente se describen los detalles de la síntesis de los peptidomiméticos-modelo del tipo **42** y **44** para, en un apartado posterior, llevar a cabo su análisis conformacional.

3.2.1 Síntesis de miméticos β -lactámicos *Ac-(β -lactam)-(Aa)-NHMe y Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH portadores de residuos N- y C- terminales aquirales*

En la *tabla 5* se muestra la síntesis de peptidomiméticos de cadena corta con esqueleto *Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe* **42** a partir de los moldes ditópicos **64b-f** y **72c**.



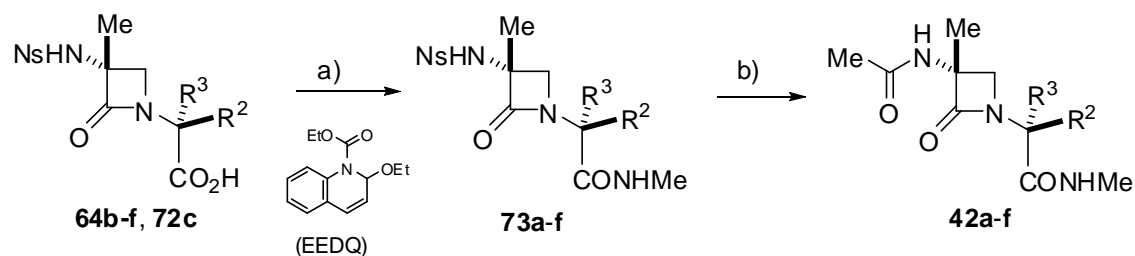
42

La transformación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera de ellas se formaron las N-metilacetamidas **73a-f** a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos β -lactámicos. Para el caso de los derivados no sustituidos o monosustituidos en α' (*entradas 1-5*), la reacción se llevó a cabo mediante activación del grupo carboxilo con cloroformiato de isobutilo (IBCF) y N-metilmorfolina (NMM), seguida de reacción con metilamina. De este modo se obtuvieron las amidas deseadas con rendimientos que oscilaron entre el 58 y el 85%. Sin embargo, para la formación del derivado α', α' -disustituído **73f** (*entrada 6*), la transformación se llevó a cabo empleando la N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina

(EEDQ) como agente activante. Este reactivo está particularmente indicado para el acoplamiento peptídico entre aminoácidos impedidos⁶⁶.

La segunda etapa consistió en reemplazar el grupo nosilo de los compuestos **73** por el acetilo de los productos finales **42**. Para ello se aplicó una variante *one-pot* del método de Maligres⁶⁷ que consistió en la desnosilación de nosilamidas con tiofenol y carbonato potásico, seguida de adición de un exceso de anhídrido acético al crudo de reacción. Aunque como subproducto de la reacción de desprotección se forma 2-tiofenilnitrobenceno, éste no interfirió la acetilación posterior y los productos finales se obtuvieron con rendimientos del 72 al 94% tras purificación cromatográfica.

Tabla 5: Síntesis de (3-acetamido-3-metil-2-oxoazetidín-1-il)-N-metilacetamidas **42a-f** a partir de los moldes β-lactámicos ditópicos **64b-f** y **72c**



Reactivos y condiciones. Para **64b-f**: a) MeNH_2 (ac.), NMM, IBCF, THF, -20 , $48'$. Para **72c**: a) MeNH_2 (2M THF), EEDQ, CH_2Cl_2 , $-12 \rightarrow t.a.$, 16h. b) PhSH , K_2CO_3 , Ac_2O , MeCN seco, 16h.

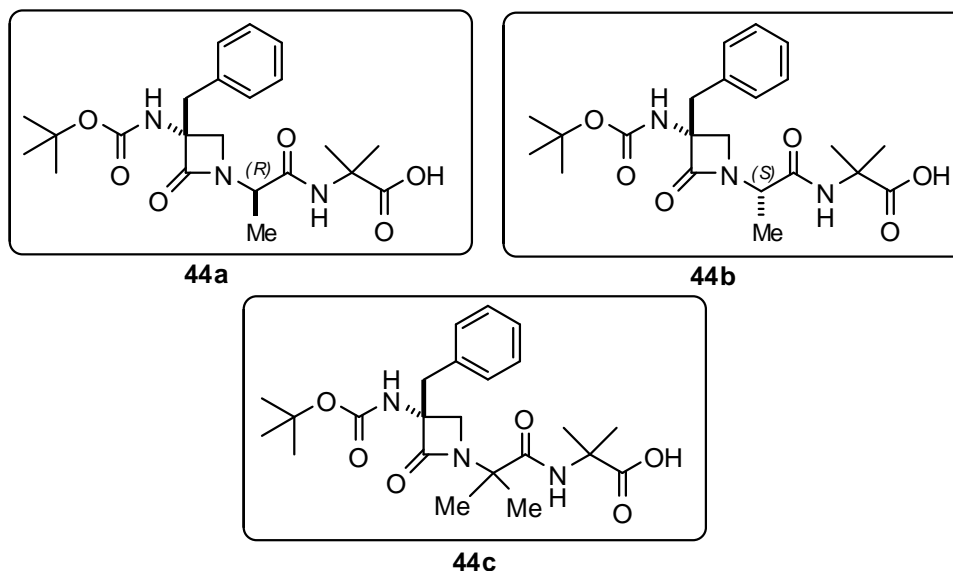
| n | R ² | R ³ | Config. α' | Prod. | Rdto(%) | Prod. | Rdto(%) |
|---|----------------|----------------|------------|-------------------------|---------|------------|---------|
| 1 | H | H | --- | 73a | 80 | 42a | 84 |
| 2 | H | Me | (R) | 73b | 58 | 42b | 72 |
| 3 | Me | H | (S) | 73c | 59 | 42c | 81 |
| 4 | H | Ph | (R) | 73d | 78 | 42d | 89 |
| 5 | Ph | H | (S) | 73e | 85 | 42e | 94 |
| 6 | Me | Me | --- | 73f ^a | 75 | 42f | 82 |

^a Reacción llevada a cabo utilizando el reactivo de acoplamiento EEDQ

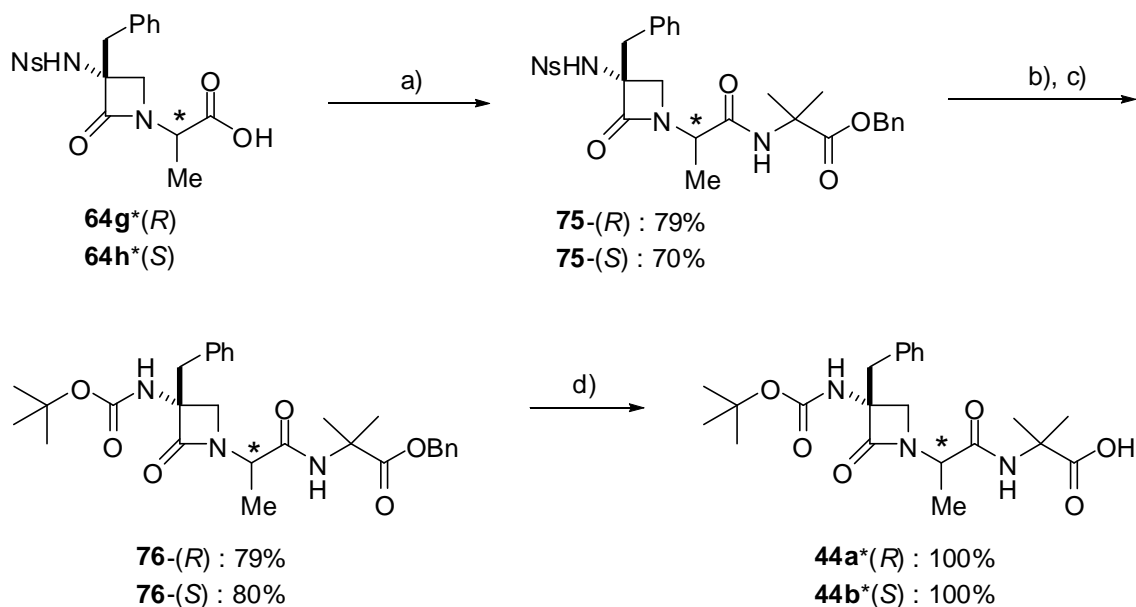
⁶⁶ a) Sipos, F.; Gaston, D.W. *Synthesis* **1971**, 321-322. b) Chan, T.Y.; Chen, A.; Allason, N.; Chen, R.; Liu, D.; Sofia, M.J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8097-8100.

⁶⁷ Maligres, P.E.; See, M.M.; Askin, D.; Reider, P.J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5253-5256.

A continuación se prepararon los modelos β -lactámicos de tipo Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH **44** mostrados en la siguiente figura,



En primer lugar, se procedió a la síntesis del par de diastereómeros **44a,b**. Para ello (*esquema 5*) las N-carboximetil- β -lactamas diastereómeras **64** fueron sometidas a acoplamiento peptídico con el éster bencílico del ácido α -aminoisobutírico (H-Aib-OBn) **74** empleando EEDQ como agente deshidratante. Ello proporcionó los pseudopéptidos **75-(R)** y **75-(S)** con rendimientos del 79% y 70% respectivamente. Posteriormente, éstos se sometieron a desnosilación con tiofenol/ K_2CO_3 para proporcionar las correspondientes α -amino- β -lactamas libres que fueron aisladas previamente a su reacción con el dicarbonato de *di-tert*-butilo conduciendo a la formación de los N-Boc-derivados **76** con buenos rendimientos. Es preciso señalar que aunque se intentaron combinar estas dos reacciones en una transformación *one-pot*, ello no fue viable bajo condiciones similares a las empleadas anteriormente para la transformación de las N-nosilamido- β -lactamas **42**. Finalmente, tras una hidrogenación catalítica a presión atmosférica se obtuvieron los productos deseados **44a-b** con rendimientos cuantitativos.

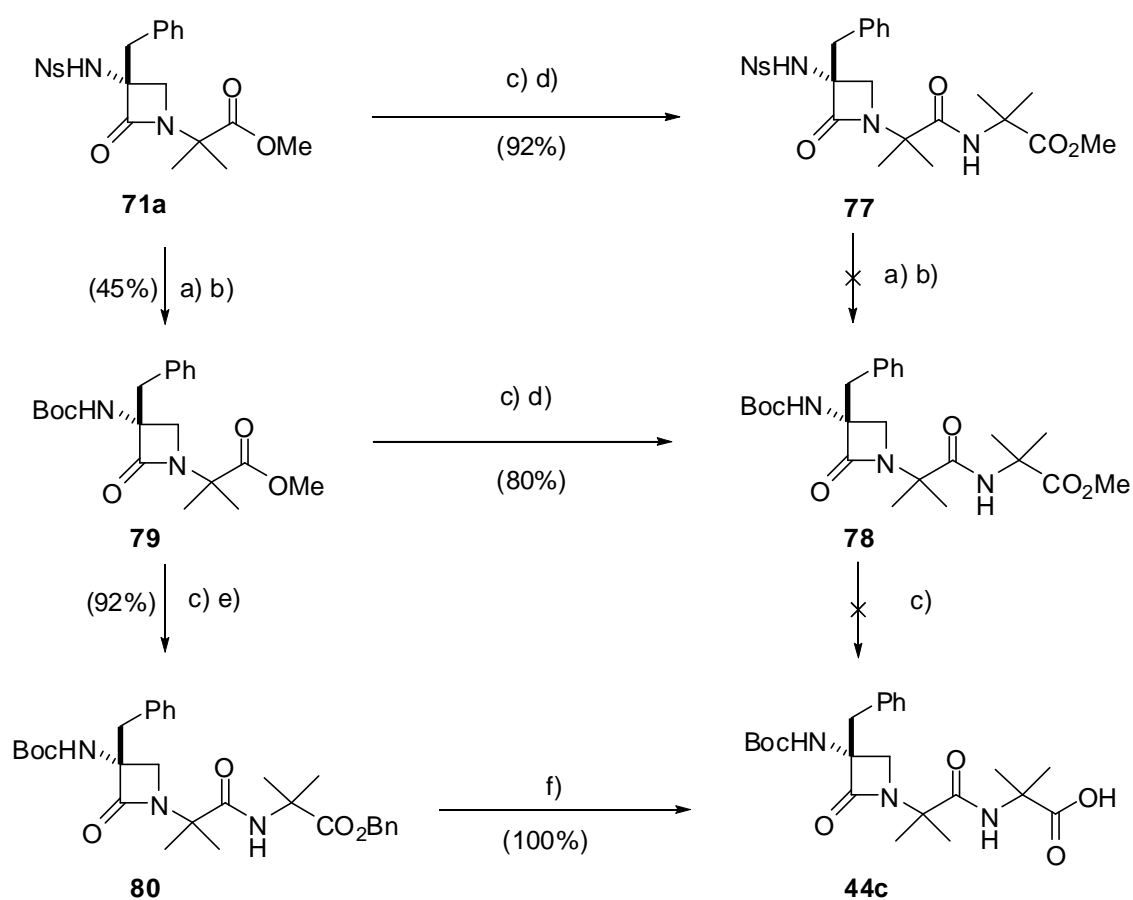


Esquema 5. Reactivos y condiciones: a) *H*-Aib-OBn (**74**), (2 eq.), EEDQ (1,7 eq.), CH₂Cl₂, -12°→t.a., 16h., b) PhSH (5 eq.), K₂CO₃ (4 eq.), MeCN, t.a., 2h., c) (Boc)₂O, MeCN, t.a., 16h., d) H₂, Pd/C, MeOH, t.a., 1h.

Por último, se estudió la síntesis del compuesto **44c** disustituído en la posición α' del residuo (*i*+2), (esquema 6). En primer lugar, se ensayó la misma secuencia sintética empleada para la preparación de los compuestos **44a** y **44b**. Para ello se llevó a cabo la saponificación y el acoplamiento peptídico de la β -lactama **71a** con el éster metílico del ácido α -aminoisobutírico **68** para obtener el tripéptido nosilado **77** con un rendimiento del 92%. Desafortunadamente, no se logró completar la etapa siguiente (**77**→**78**) ni obtener el Boc-derivado deseado ya que, aunque fue posible aislar la α -amino- β -lactama intermedia tras la desnosilación, su posterior reacción con el dicarbonato de *tert*-butilo no proporcionó el compuesto **78**, a pesar de intentar la reacción bajo diferentes condiciones.

En consecuencia, se planteó una ruta alternativa a través de la α -*tert*-butoxicarbonilamino- β -lactama **79**, obtenida mediante la sustitución inicial del grupo nosilo por el grupo *tert*-butoxicarbonilamino en la N-nosil- β -lactama **71a**. Este intermedio se sometió a saponificación (LiOH/MeOH) para dar lugar al ácido carboxílico terminal que tras acoplamiento con *H*-Aib-OMe (**68**) en presencia de EEDQ proporcionó el compuesto **78**. La transformación del éster metílico al correspondiente grupo ácido para obtener el producto final **44c** se ensayó por saponificación con hidróxido de litio. El espectro del crudo acidificado mostró el producto esperado, pero, sorprendentemente, tras la

purificación por cromatografía de sílice, se observó la formación parcial del producto de partida. En nuevos ensayos, se confirmó la reversibilidad de la esterificación causada por el empleo (inevitable) de metanol como eluyente de la cromatografía. Para solventar este inconveniente, se sustituyó el éster metílico H-Aib-OMe **68** por su análogo bencílico H-Aib-OBn **74** y se preparó el compuesto **80** de modo idéntico al descrito anteriormente, con un rendimiento del 40 % desde el molde inicial **71a**. Por último, la hidrogenación catalítica de **80** proporcionó de manera cuantitativa el producto **44c**, que no necesitó de posterior purificación.

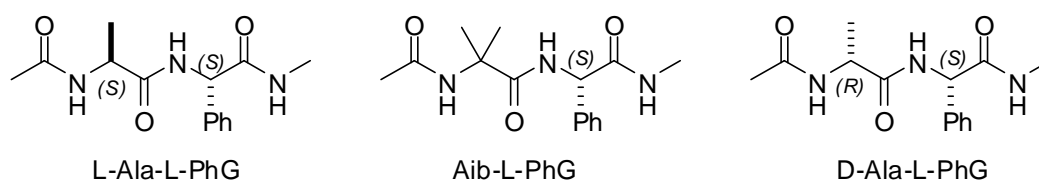


Esquema 6: Reactivos y condiciones a) PhSH (5 eq.), K₂CO₃ (4 eq.), MeCN, t.a., 2h., b) (Boc)₂O, MeCN, t.a., 16h., c) LiOH.H₂O (10 eq.), MeOH/H₂O, t.a., 1h., d) H-Aib-OMe **68** (2 eq.), EEDQ (2eq), CH₂Cl₂, -12°C→t.a, 16h., e) H-Aib-OBn **74** (2 eq.), EEDQ (2eq), CH₂Cl₂, -12°C→t.a, 16h., f) H₂, Pd/C, MeOH, t.a., 1h.

3.3 Análisis conformacional de miméticos portadores de residuos N- y C- terminales aquirales: Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe y Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH

3.3.1 Introducción

La influencia de la configuración relativa de los aminoácidos sobre la conformación en péptidos cortos ha sido mencionada en la parte introductoria de la presente memoria. La gran mayoría de los estudios relativos a este fenómeno han consistido en el análisis teórico de di-, tri- y tetrapéptidos⁶⁸ en combinación con observaciones experimentales extraídas de experimentos de RMN y DC realizados en disolución⁶⁹. Recientemente, Mons⁷⁰ ha publicado un estudio teórico-experimental describiendo el comportamiento conformacional de los siguientes dipéptidos de tipo Ac-(Aa)-PhG-NHMe en ausencia de disolventes.



Tal y como se muestra en la *figura 34*, los péptidos en cuestión adoptan conformaciones de tipo giro β -I o giro- β -II' en función de la configuración y grado de sustitución del residuo ($i+1$) que precede a la fenilglicina. Dicho autor ha aplicado técnicas de espectroscopía láser (IR-UV) a muestras en estado gaseoso y ha determinado la prevalencia de un giro β -I (*figura 34*) en la secuencia homoquiral del dipéptido Ac-L-Ala-L-PhG-NHMe ("L-L"), mientras que su homólogo heteroquiral Ac-D-Ala-L-PhG-NHMe ("D-L") muestra preferentemente un giro β -II'. Sin embargo, en el péptido análogo conteniendo un residuo Aib α,α -disustituído (Ac-Aib-L-Phe-NHMe) prevalece el giro β -I frente al giro β -II', aunque con una escasa diferencia de estabilidad entre ambos. Para este último dipéptido una conformación de doble giro γ (C_7-C_7) resulta ser la más inestable.

⁶⁸ Perczel, A.; Jakli, I.; McAllister, M.A.; Csizmadia, I.G. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 2551.

⁶⁹ Motta, A.; Reches, M.; Pappalardo, L.; Andreotti, G.; Gazit, E. *Biochemistry* **2005**, 44, 14170-14178.

⁷⁰ Brenner, V.; Piuze, F.; Dimicoli, I.; Tardivel, B.; Mons, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2463-2466.

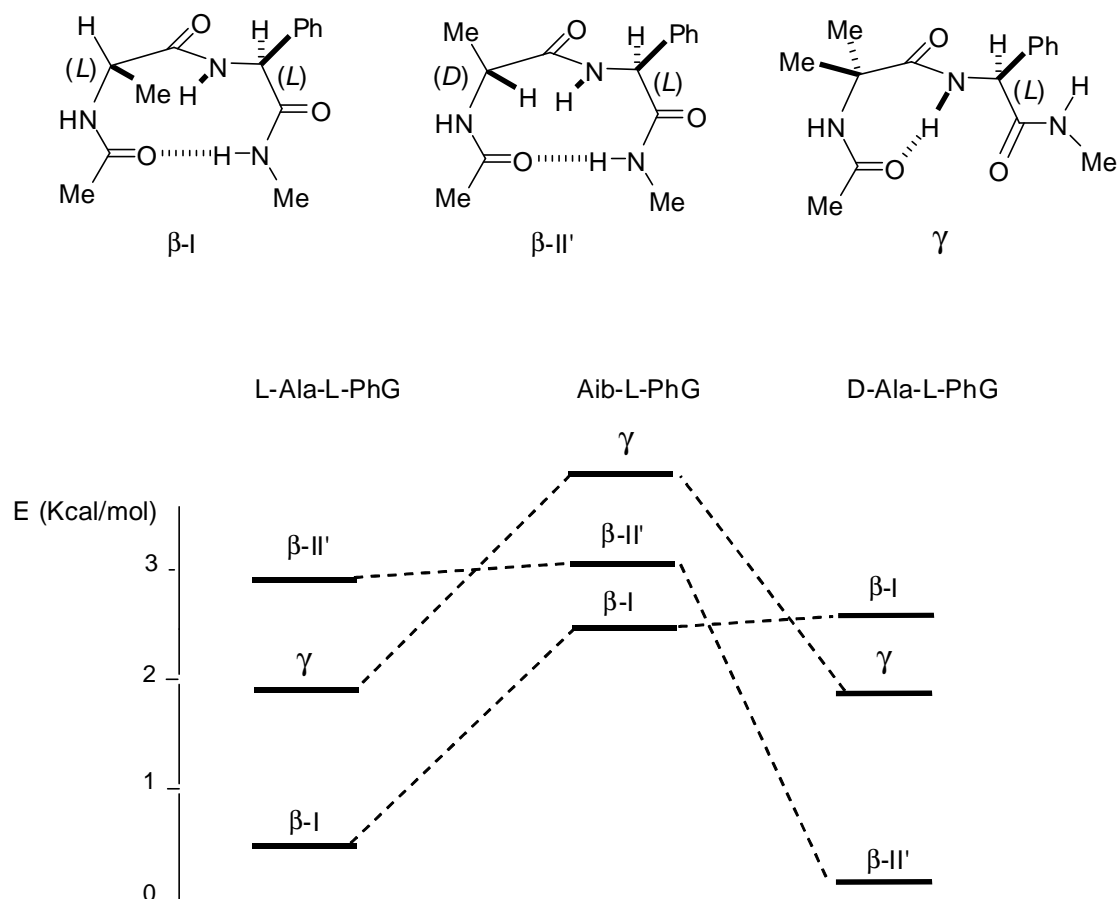


Figura 34: Estabilidad relativa de los conformeros de los dipéptidos *Ac-L-Ala-L-PhG-NHMe*, *Ac-D-Ala-L-PhG-NHMe* y *Ac-Aib-L-PhG-NHMe* (ref. 70).

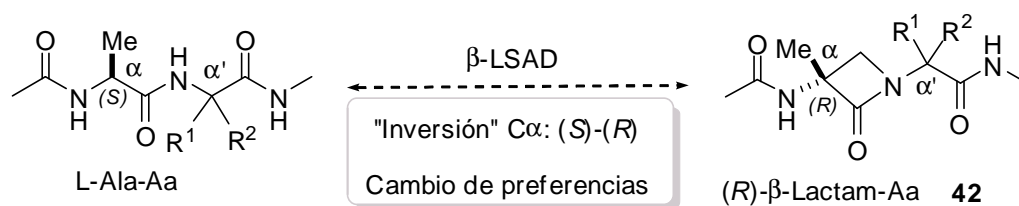
Hasta el momento se han realizado pocos estudios sistemáticos de la influencia de la configuración relativa de residuos contiguos en pseudopéptidos cortos conteniendo lactamas de Freidinger y menos aún conteniendo β -lactamas. En este sentido, Gonzalez-Muñiz ha llevado a cabo análisis estructurales de RMN e IR en disolución de 2-alkil-2-carboxi-azetidinas en las que se pone de manifiesto su capacidad para inducir giros γ ⁷¹, diferenciándolas del efecto betágeno de las prolínas o α -alkil-prolínas⁷². Por otra parte, un único trabajo del grupo de Rapić ha utilizado el efecto restrictivo del ferroceno en

⁷¹ Baeza, J.L.; Gerona-Navarro, G.; Perez de la Vega, M.J.; García-López, M.T.; Gonzalez-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3689-3693.

⁷² Baeza, J.L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de la Vega, M.J.; García-López, M.T.; Gonzalez-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1704-1715.

pseudopéptidos que contienen β -lactamas terminales para inducir láminas paralelas o antiparalelas⁷³.

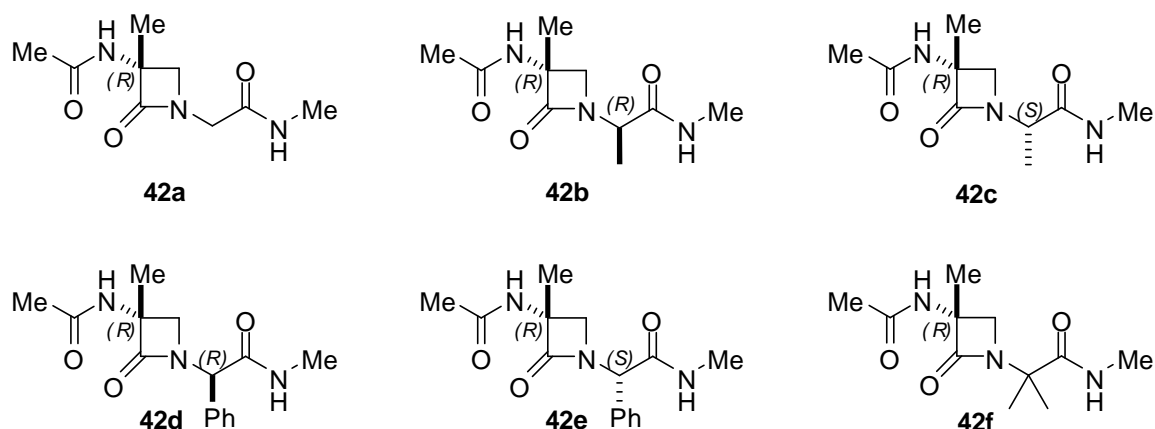
Nosotros nos planteamos observar la influencia del grado de sustitución y de la configuración del estereocentro Ca' contenido en el residuo ($i+2$) sobre la estabilidad de los conformeros de pseudopéptidos β -lactámicos sencillos. Por ello, se pensó en estudiar en primer lugar modelos de baja complejidad como los miméticos del tipo **42** con una estructura general $\text{Ac}-((R)\text{-metil-}\beta\text{-Lactam})\text{-(Aa)-NHMe}$, que imita al péptido $\text{Ac}-(\text{L-Ala})\text{-(Aa)-NHMe}$ incorporando un átomo de carbono adicional según el diseño β -LSAD (ver figura 8, pág. 21). Aunque se observa una aparente inversión de la configuración entre el estereocentro Ca de la β -lactama y el de la L-Ala, ello se debe únicamente al cambio de preferencias CIP⁷⁴ de los grupos sustituyentes del centro estereogénico.



El puente metilénico incorporado en los miméticos β -lactámicos **42** debería restringir mucho la libertad conformacional de los péptidos nativos evitando, por ejemplo, la formación de conformeros de tipo β -I. De este modo, esperábamos obtener pseudopéptidos con rotaciones de tipo β/γ muy bien definidas. En concreto, se seleccionaron las moléculas **42a-f**, formadas por un núcleo común β -lactámico ($i+1$) con un sustituyente de tamaño mínimo (Me) en el átomo Ca del anillo y diversos residuos ($i+2$) tales como la glicina (**42a**), D- y L-alanina (**42b-c**), D- y L-fenilglicina (**42d-e**) y Aib (**42f**) mostradas a continuación. Los compuestos **42b-e** contienen un centro estereogénico adicional en ($i+2$), por lo que se distinguirán sus configuraciones relativas nombrándolos como “diastereómeros homoquirales”, (**42b** y **42d**) y “diastereómeros heteroquirales”, (**42c** y **42e**).

⁷³ Kovac, V.; Radolovic, K.; Habus, I.; Siebler, D.; Heinze, K.; Rapic, V. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 389-399.

⁷⁴ Para más información acerca de las reglas CIP (Cahn, Ingold, Prelog), ver: Nicolau, K.C.; Boddy, C.N.C.; Siegel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 701-704 y referencias citadas en él.



3.3.2 *Análisis conformacional de los modelos Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe*

Para llevar a cabo el análisis conformacional de los compuestos **42a-f**, en primer lugar se efectuó una modelización computacional (DFT) que permitiera caracterizar sus conformeros más estables en función de la naturaleza de los sustituyentes de la posición α' , así como de su configuración. Posteriormente, se comparó dicha información con datos experimentales de RMN y cristalografía de rayos X.

Modelización DFT: Para cada uno de los pseudopéptidos β -lactámicos **42a-f** se llevaron a cabo cálculos ab-initio de nivel B3LYP/6-31++G** minimizando la energía de los posibles conformeros en vacío. Como se muestra en la *figura 35*, los mínimos relativos de energía de los compuestos Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe **42** corresponden a tres conformaciones estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno: un giro β -II y dos giros γ . En estos últimos, el enlace de hidrógeno se forma entre el grupo C=O del anillo β -lactámico y el HN de la amida terminal que, a su vez, se puede situar en la cara inferior al ciclo (γ -down) o en la superior (γ -up). Además, de acuerdo con nuestra suposición inicial, se constató la ausencia de giros β -I.

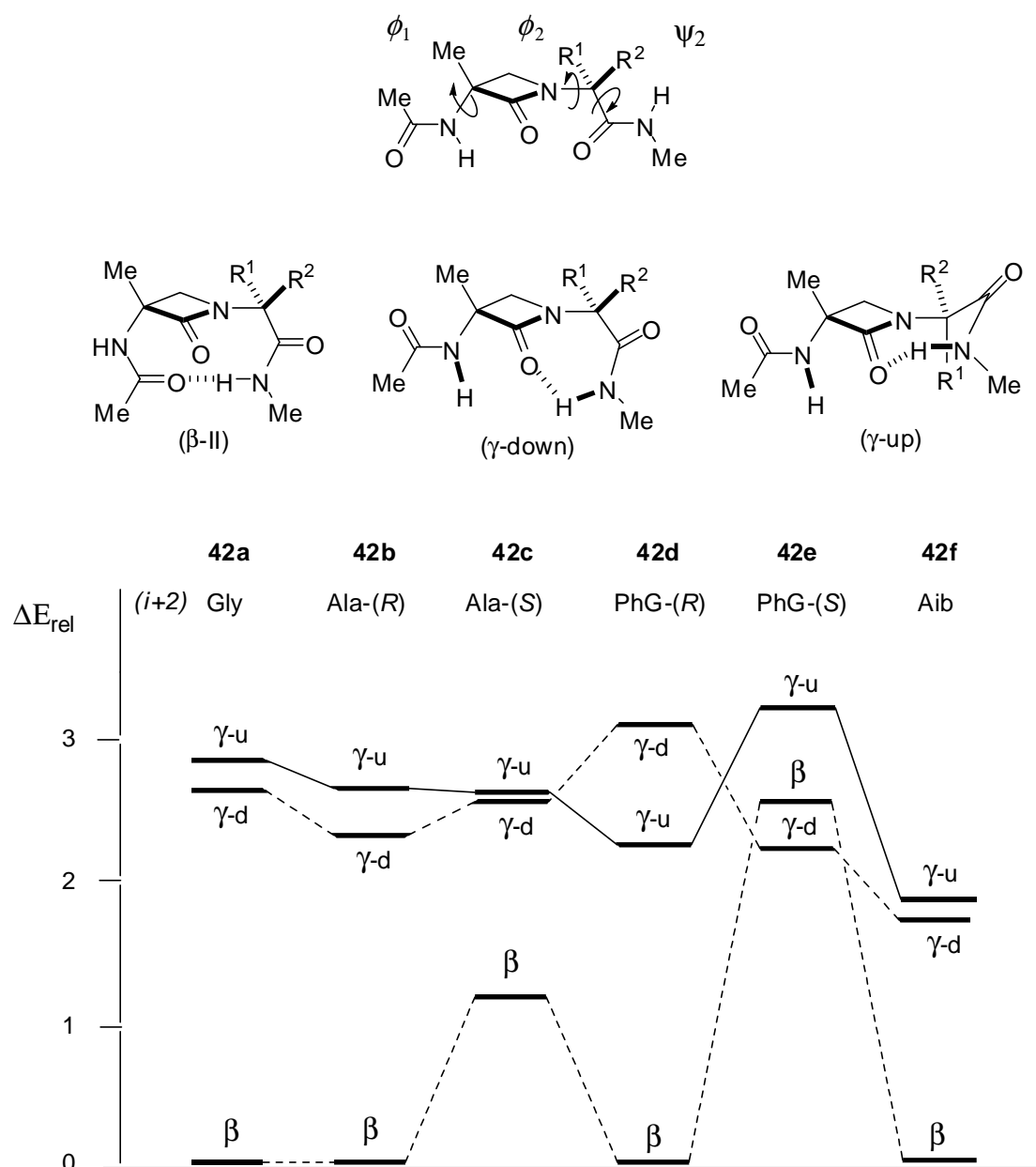


Figura 35: Energía relativa de los conformeros (giro $\beta-II$, giros $\gamma-down$ y giro $\gamma-up$) de los pseudopéptidos 42a-f.

De los datos de energías relativas (“zero energy” a 25°C) recopilados en la *tabla 6*, se dedujo que el giro $\beta-II$ es el conformero más estable en todos los casos excepto para el derivado fenílico **42e**, cuya conformación más estable es $\gamma-down$ (*entrada 5*). Se observó una tendencia a la desestabilización del giro β en los pseudopéptidos heteroquirales **42c** y **42e** con respecto de sus diastereómeros homoquirales **42b** y **42d** (*entradas 2-5*), siendo este contraste especialmente pronunciado entre los derivados de fenilglicina **42d** y **42e**.

Además, en este último caso, existe una clara inversión en la estabilidad de las conformaciones γ -down y γ -up que depende de la configuración de $\text{C}\alpha'$ de los compuestos **42d** y **42e**. Por otro lado, los modelos **42a** y **42f** derivados respectivamente de la glicina y del Aib, muestran un patrón de estabilidad del giro β y los giros γ muy similar en ambos casos, aunque en el último la diferencia de energía entre dichos conformeros es menor.

Tabla 6: Energías de formación relativas (Kcal/mol) de los conformeros de los compuestos **42a-f**^a.

| n | Comp. | R ¹ | R ² | Config. α' | β -II | γ -down | γ -up |
|---|------------|----------------|----------------|-------------------|-------------|----------------|--------------|
| 1 | 42a | H | H | --- | 0.00 | 2.68 | 2.82 |
| 2 | 42b | Me | H | (R) | 0.00 | 2.30 | 2.68 |
| 3 | 42c | H | Me | (S) | 1.10 | 2.54 | 2.63 |
| 4 | 42d | Ph | H | (R) | 0.00 | 3.08 | 2.21 |
| 5 | 42e | H | Ph | (S) | 2.55 | 2.19 | 3.27 |
| 6 | 42f | Me | Me | --- | 0.00 | 1.71 | 1.87 |

^a Valores relativos al conformero más estable de cada grupo de diastereómeros.

Estos resultados se pueden atribuir a las interacciones que origina la proximidad de los sustituyentes R¹ y R² situados en la posición α' con: a) el puente metileno β -lactámico del residuo ($i+1$), y b) el carbonilo del residuo ($i+2$). En la *figura 36* se muestran las proyecciones de Newman de los pseudopéptidos **42a-f**, eclipsando el nitrógeno β -lactámico y el $\text{C}\alpha'$ para la interacción A, y eclipsando el $\text{C}\alpha'$ con el carbono del grupo carbonilo del residuo ($i+2$) para la interacción B. De manera general, el giro β -II posee una disposición alternada de los grupos R¹ y R² tanto con respecto del metileno β -lactámico como del carbonilo ($i+2$), lo cual explica que sea la conformación más estable en la mayoría de los casos. Sin embargo, esta situación puede verse alterada cuando el residuo ($i+2$) es quiral y existe una gran diferencia de tamaño entre los grupos R¹ y R². Así por ejemplo, en el compuesto **42e** de configuración (S) en ($i+2$), los conformeros giro β -II y γ -up se hallan desestabilizados por interacciones *gauche* de tipo B entre el grupo fenilo y el carbonilo adyacente. Como resultado, el conformero más estable para este compuesto es el giro γ -down. Por otra parte, unas interacciones equivalentes en el compuesto **42d**, de

configuración (*R*) en (*i*+2) pueden explicar la estabilización relativa del conformero γ -up con respecto del γ -down.

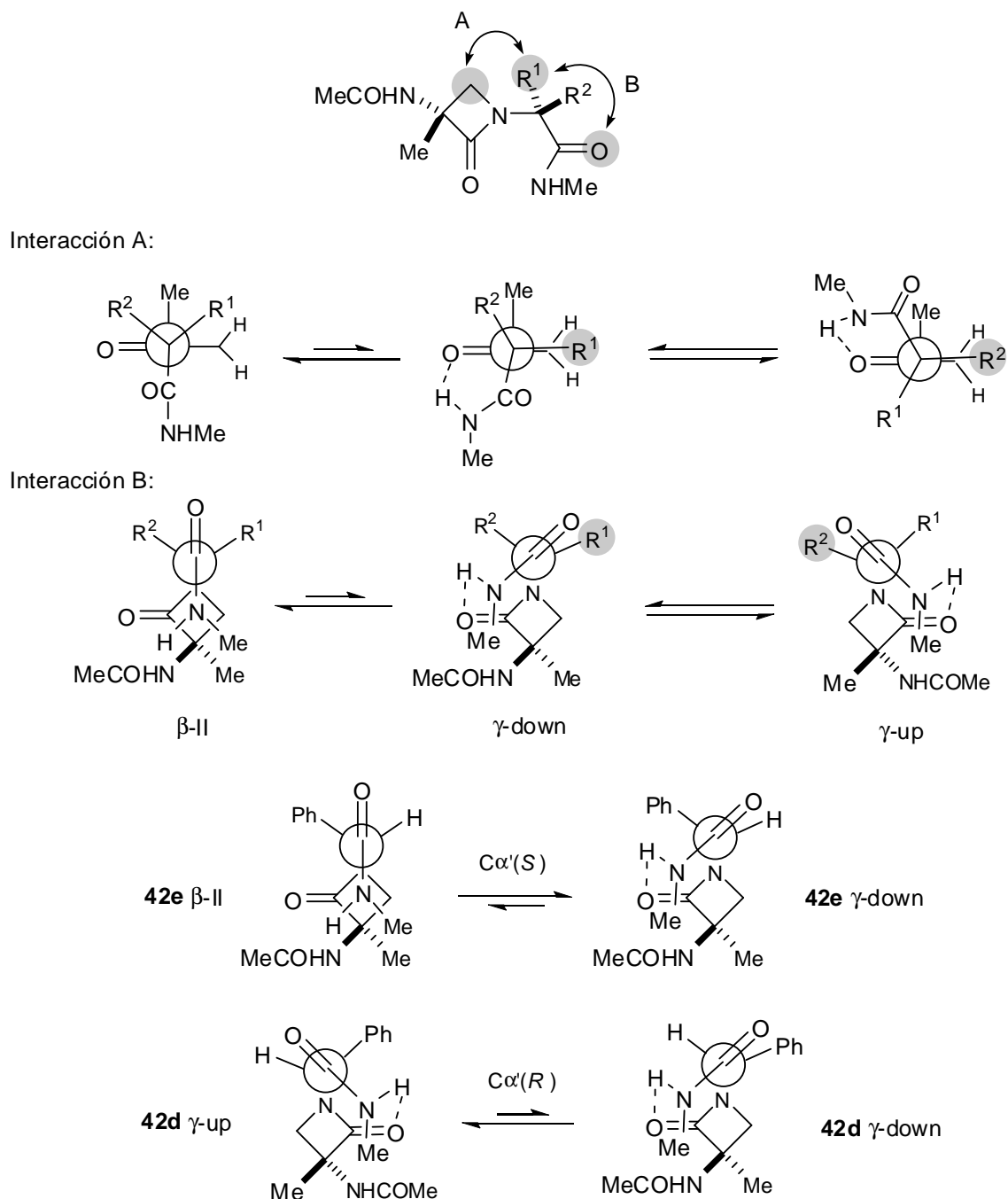


Figura 36: Modelo de interacciones estéricas determinantes de la estabilidad conformacional en los pseudopéptidos β -lactámicos **42a-f**.

Análisis mediante RMN: Esta técnica es particularmente eficaz para el estudio conformacional de péptidos, ya que permite determinar tanto la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares como las distancias interprotónicas y los ángulos diedros $^3J(\text{HC}\alpha\text{-NH})$. A su vez, 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. Es frecuente efectuar estos estudios en disolventes no coordinantes como CDCl_3 ⁷⁵, pero es más significativo aún realizarlos en medios coordinantes (DMSO-d_6 o D_2O), ya que los enlaces de hidrógeno intramoleculares estables en estos últimos son considerados más fuertes. Su existencia se puede poner de manifiesto por el coeficiente térmico de los protones de amida ($\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$).

Tras asignar las señales de RMN de los pseudopéptidos **42a-f** utilizando una combinación de experimentos ^1H , COSY y NOE selectivos, se midió la variación del desplazamiento químico del protón $(\text{NH})_{i+3}$ en CDCl_3 para un rango de temperaturas de 220-300 K a intervalos de 10K. Posteriormente se repitió el proceso en DMSO-d_6 , en cuyo caso se aplicó un rango de temperaturas de 300-325K a intervalos de 5K.

Los resultados de ambos experimentos se muestran en la *tabla 7*. Los desplazamientos químicos de los protones de amida $\delta(\text{NH})_{i+3}$ correspondientes a la posición N_7 (ver *figura 37*) se observaron entre 7.12 y 8.41 ppm en CDCl_3 y entre 8.17 y 8.53 ppm en DMSO-d_6 . La diferencia de desplazamiento químico al pasar de CDCl_3 a DMSO-d_6 osciló entre -0.08 y -0.29 ppm para todos los compuestos excepto para el pseudopéptido **42e**, que mostró un incremento de -1.15 ppm.

Según el criterio definido por Kessler⁷⁶, un protón amídico con un coeficiente térmico inferior o cercano a ± 3 ppb/K en DMSO-d_6 se encuentra formando parte de un enlace de hidrógeno intramolecular y, a medida que este valor se incrementa en valor absoluto, la interacción se hace más débil. En este sentido, los coeficientes térmicos de los análogos **42a** y **42b** indican la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular relativamente estable, que se va debilitando paulatinamente en los compuestos **42c**, **42d** y **42f**, acabando por desaparecer en **42e**.

⁷⁵ a) Dutt, A.; Drew, M.G.B.; Pramenik, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 549-558. b) Sharma, G.; Subash, V.; Reddy, N.; Narsimulu, K.; Ravi, R.; Jadhov, V.; Murthy, U.; Kishore, K.; Kunwar, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4142-4156. c) Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Qasem, A.; Spampinato, S.; Calienni, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3010-3014.

⁷⁶ Kessler, H. *Angew. Chem. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.

Tabla 7: Desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) y coeficientes térmicos ($\Delta\delta/\Delta T$) del protón amídico (NH_{i+3}) en los compuestos **42a-f**.

| Comp. | $\delta(\text{NH})_{i+3}$ CDCl_3 | $\delta(\text{NH})_{i+3}$ DMSO-d_6 | $\Delta\delta(\text{NH})_{i+3}$ $\text{CDCl}_3 \rightarrow \text{DMSO-d}_6$ [ppm] | $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ CDCl_3 [ppb/K] ^a | $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ DMSO-d_6 [ppb/K] ^b |
|------------|--|--|---|---|---|
| | | | | | |
| 42a | 8.17 | 8.17 | -0.08 | -3.5 | -3.2 |
| 42b | 8.13 | 8.26 | -0.18 | -3.2 | -3.4 |
| 42c | 8.01 | 8.23 | -0.29 | -6.0 | -3.9 |
| 42d | 8.41 | 8.53 | -0.16 | -3.9 | -4.0 |
| 42e | 7.12 | 8.27 | -1.15 | -12.7 | -4.9 |
| 42f | 8.47 | 8.35 | -0.16 | -2.9 | -3.9 |

^a Coeficientes térmicos (ppb/K) medidos en CDCl_3 en un rango de temperaturas de 220-300K a intervalos de 10K. ^b Coeficientes térmicos (ppb/K) medidos en DMSO-d_6 en un rango de temperaturas de 300-325K a intervalos de 5K.

Inicialmente, se planteó el estudio registrando los experimentos de ^1H en DMSO-d_6 . Sin embargo, se observaron señales superpuestas y de difícil interpretación, lo que llevó a realizar el análisis conformacional en CDCl_3 . En este disolvente, a partir de las señales de cruce de los espectros NOESY resultó sencillo distinguir entre sí los protones diastereotópicos H_4^{R} y H_4^{S} de la posición β del anillo β -lactámico (*figura 37*). En todos los análogos se observó señal de cruce $\text{H}_4^{\text{S}}/\text{H}_7$ y $\text{H}_4^{\text{R}}/\text{Me}_3$, lo que definió la ubicación de la cadena lateral (Aa)-NHMe en la cara inferior del ciclo, formando un giro de baja estabilidad cuando los coeficientes mostraron unos valores comprendidos entre -3 y -4 ppb/K en DMSO-d_6 (*tabla 7*). Las distancias entre los protones $\text{H}_7\text{-H}_4^{\text{S}}$ y $\text{Me}_3\text{-H}_4^{\text{R}}$ se determinaron integrando las señales de cruce de los espectros NOESY (CDCl_3), siguiendo el método ISPA⁷⁷ (*Isolated Spin-Pair Approximation*) y se recogen en la *tabla 8*.

⁷⁷ 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.

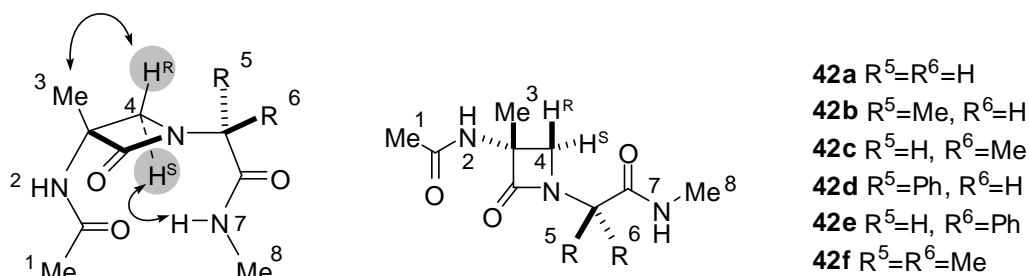


Figura 37: Numeración de los protones en los espectros 1H RMN. Representación de las interacciones NOE H_4^S/H_7 y H_4^R/Me_3 en los pseudopéptidos **42**.

Tabla 8: Distancias(\AA) H_a-H_b determinadas a partir de experimentos NOESY en $CDCl_3$

| NOE | Ha-Hb | Distancia (\AA) | | | | | |
|----------------|---------------|----------------------------|------|------|------------------|------|------|
| | | 42a | 42b | 42c | 42d | 42e | 42f |
| 1 ^a | $H_4^R-H_4^S$ | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.80 |
| 2 | $H_4^R-H_3$ | 2.29 | 2.34 | 2.62 | 2.29 | 2.23 | 2.28 |
| 3 | $H_4^S-H_7$ | 2.81 | 2.79 | 2.96 | 2.58 | 3.17 | 2.65 |
| 4 | $H_4^R-H_5$ | --- | 2.51 | --- | --- ^b | 2.94 | 2.28 |
| 5 | $H_4^S-H_2$ | --- | 3.16 | --- | --- | --- | --- |
| 6 | $H_4^S-H_3$ | --- | --- | --- | --- | 2.56 | --- |
| 7 | $H_4^S-H_5$ | --- | --- | --- | --- ^b | 3.13 | 2.76 |
| 8 | H_1-H_2 | 2.66 | 2.75 | 3.09 | --- | 2.59 | 2.59 |
| 9 | H_2-H_3 | 2.41 | 2.35 | 2.80 | 2.25 | 2.32 | 2.25 |
| 10 | H_5-H_6 | 1.84 | 2.39 | 2.43 | 2.65 | 3.03 | 2.27 |
| 11 | H_7-H_8 | 2.54 | 2.65 | 2.72 | 2.52 | 2.55 | 2.53 |

^a Distancia de referencia establecida en 1.80 \AA . ^b Distancias no calculadas por la imposibilidad de distinguir los protones aromáticos entre sí.

Todos los análogos **42** presentaron señal de cruce H_7/H_4^S , dando distancias más cortas para los miméticos homóquiales (*R,R*), **42b** y **42d**, que para sus homólogos heteróquiales (*R,S*), **42c** y **42e**. Este dato, junto con el valor de los coeficientes térmicos, que permaneció menor en los derivados homóquiales (*tabla 7*), indicó una mayor estabilización del giro β -II en los diastereómeros de configuración $C\alpha'$ (*R*) que en los de configuración $C\alpha'$ (*S*). Por ello, de acuerdo con estos datos, el giro β -II es el confórmero más estable para los compuestos **42a** y **42b**, mientras que el giro γ está favorecido para los derivados **42c**, **42d** y **42f**, y, en menor medida, para **42e**, que presenta una conformación extendida.

A modo de ejemplo, en la *figura 38* se muestran los espectros NOESY de los modelos **42d** y **42e** correspondientes, respectivamente, a los miméticos que incorporaron residuos de (*R*)-fenilglicina y (*S*)-fenilglicina, incluyendo algunas de las distancias interprotónicas no contiguas que permiten esclarecer sus conformaciones más pobladas.

En el caso del análogo **42d** el conjunto de distancias interprotónicas es coherente con una conformación β o γ -girada. La presencia de señales de cruce intensas H_7/H_4^S y H_4^R/H_3 indica distancias cortas entre dichos protones (2.58 y 2.29 Å, respectivamente). Por otro lado, los protones aromáticos (H_5) muestran señales con H_4^S y H_4^R , indicando una ubicación del grupo fenilo próxima al metileno del anillo β -lactámico. Sin embargo, el protón metínico H_6 no da NOE ni con H_4^R ni con H_4^S , por lo que se ubica en la cara anterior de la β -lactama.

Por su parte, en el isómero **42e** el protón H_5 se encuentra prácticamente equidistante de H_4^R y con H_4^S , confirmando que la rama se halla ligeramente girada distorsionando el giro hacia una conformación más extendida. Además, la distancia $H_7-H_4^S$ en este diastereómero es de 3.17Å, considerablemente más larga en el modelo **42d**. Desgraciadamente, en ninguno de los espectros ROESY se apreciaron señales de cruce a muy larga distancia (H_1/H_8) que serían indicadores claros de la presencia de giros β muy estables. Los espectros ROESY del resto de los pseudopéptidos **42a-c** y **42f** mostraron patrones similares y se recogen en el *anexo B*.

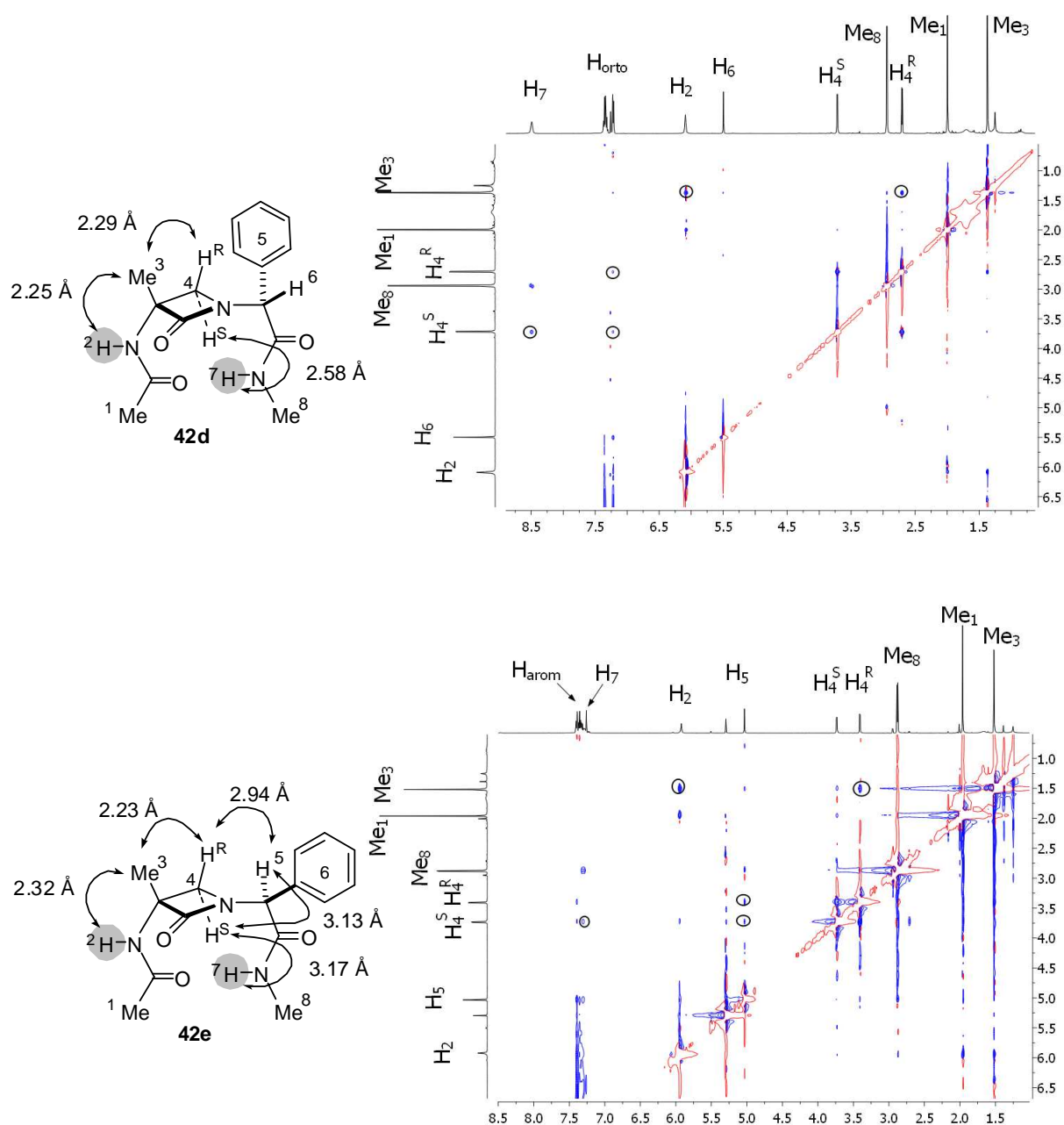


Figura 38: Ampliaciones de los espectros NOESY e interacciones NOE significativas de los pseudopéptidos β -lactámicos **42d** y **42e**.

A continuación, se emplearon las distancias interprotónicas recogidas en la *tabla 8* como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o *clusters* más relevantes para cada uno de los pseudopéptidos **42a-f**. Para ello, se siguió el método de *simulated*

annealing descrito por Seebach y Van Gunsteren⁷⁸, modelizando el enfriamiento de 100 estructuras de cada pseudopéptido desde 1000K hasta 300K. El margen aplicado a cada distancia interprotónica fue de $\pm 10\%$ y las simulaciones se efectuaron en ausencia de disolvente empleando el programa X-PLOR-NIH 2.16⁷⁹. Las estructuras de cada pseudopéptido que no violan ninguna de las restricciones impuestas fueron agrupadas según los diferentes intervalos de valores de los ángulos ϕ_2 y ψ_2 , o bien del ángulo pseudodiedro μ que indica la planaridad de las cuatro posiciones Ca (ver definición en la *figura 2*, pág 13), originando los *clusters* que se recogieron en la *tabla 9*. Para poder observar el efecto que produce en las conformaciones la existencia de un carbono estereogénico en el residuo (*i*+2), el análisis de los clusters se efectuó separadamente para dichos peptidomiméticos. Por una parte, (*tabla 9, figura 39*) se estudiaron los análogos **42b-e** con un residuo (*i*+2) quiral en su esqueleto estructural, y por otra, (*tabla 9, figura 40*) los análogos **42a** y **42f**, con un residuo de Gly y Aib en dicha posición, respectivamente.

Los valores de los ángulos diedros y pseudodiedros representados en la *tabla 9* definieron los *clusters* representados en las *figuras 39* y *40* mediante las correspondientes superposiciones de estructuras. Puesto que los valores de los coeficientes térmicos del protón amídico $_{i+3}(\text{NH})$ ó H_7 no fueron inferiores a 3 ppb/K en ninguno de los casos (ver *tabla 7*), no se consideró la distancia $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})$ como una restricción en el cálculo de *simulated annealing* llevado a cabo con estos compuestos. Este hecho podría ser el causante de la escasa estabilidad conformacional mostrada por el conjunto de análogos señalados en la *tabla 9*.

⁷⁸ Daures, X.; Gademann, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; Van Gunsteren, W.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393-2404.

⁷⁹ Schwieters, C.D.; Kuszewski, J.J.; Clore, G.M. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2006**, *48*, 47-62.

Tabla 9: Clusters conformacionales de los pseudopéptidos **42a-f** con los valores promedio de sus principales parámetros estructurales.

| Cluster (n) ^a | $i+3(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ | $i+3(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ | $\langle\phi_1\rangle$ | $\langle\psi_1\rangle$ | $\langle\phi_2\rangle$ | $\langle\psi_2\rangle$ | $\langle\mu^b\rangle$ |
|--------------------------|--|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 42a-1 (25) | 2.95 | 3.34 | -52.3 | 103.4 | 104.2 | -42.3 | 0.82 |
| 42a-2 (46) | 4.91 | 4.71 | -52.4 | 130.4 | 87.1 | 76.6 | 14.8 |
| 42a-3 (29) | 5.06 | 6.01 | -52.4 | 130.4 | -110.5 | -68.4 | 141.63 |
| 42b-1 (27) | 3.25 | 3.17 | -49.0 | 123.7 | 114.8 | -49.6 | 10.3 |
| 42b-2 (7) | 3.19 | 5.77 | 176.0 | 130.6 | 112.8 | -49.5 | -21.5 |
| 42b-3 (51) | 5.15 | 5.08 | -49.1 | 123.7 | 114.1 | 72.2 | 42.1 |
| 42b-4 (14) | 5.15 | 5.41 | 175.9 | 130.6 | 112.5 | 72.7 | 11.0 |
| 42c-1 (37) | 4.58 | 4.17 | -49.3 | 123.7 | 61.6 | 80.8 | -10.1 |
| 42c-2 (11) | 2.72 | 3.2 | -49.7 | 123.8 | 96.0 | -42.0 | -6.8 |
| 42c-3 (41) | 5.19 | 5.72 | -49.0 | 123.6 | -121.8 | -72.3 | 130.3 |
| 42d-1 (32) | 3.46 | 3.12 | -48.9 | 123.7 | 121.8 | -48.4 | 17.6 |
| 42d-2 (8) | 3.91 | 3.10 | -48.7 | 123.7 | 72.4 | 41.9 | -5.4 |
| 42d-3 (26) | 5.18 | 5.22 | -48.9 | 123.6 | 122.8 | 71.6 | 50.8 |
| 42d-4 (7) | 3.53 | 5.47 | 176.9 | 130.8 | 105.2 | -20.5 | -20.9 |
| 42d-5 (7) | 5.18 | 5.36 | 176.9 | 130.8 | 120.2 | 72.1 | 18.3 |
| 42d-6 (14) | 5.14 | 5.32 | -49.5 | 123.9 | -88.5 | -73.7 | 111.8 |
| 42e-1 (33) | 4.31 | 6.06 | -49.9 | 123.3 | -84.2 | -47.9 | 171.1 |
| 42e-2 (11) | 4.38 | 4.9 | 175.9 | 130.4 | -87.1 | -48.3 | 138.1 |
| 42f-1 (69) | 4.13 | 3.76 | -49.4 | 123.8 | 94.7 | 27.3 | 10.9 |
| 42f-2 (26) | 4.18 | 5.50 | 175.9 | 130.9 | 93.7 | 31.6 | -18.6 |

^a Número de estructuras de cada 100 que no violan ninguna de las restricciones de distancia interprotónica.

^b Ángulo pseudodiedro representado entre las posiciones α .

Analizando las estructuras por parejas de diastereómeros, entre **42b** y **42c** (miméticos del tipo Ac-(β -Lactam)-Ala*-NHMe) sólo el derivado de configuración (*R*) en posición α' (**42b**) presentó cierta tendencia a formar una disposición β -girada (*figura 39*, cluster **42b-1**). Sin embargo, la mayor parte de las estructuras (65) de éste pseudopéptido mostraron una conformación extendida, (*clusters 42b-3 y 42b-4*). Por otro lado, el pseudopéptido **42c** con el residuo (*i*+2) quiral de configuración (*S*), presentó en igual proporción un giro γ -down y un cónformero extendido, aunque en ningún caso se observó el giro β .

Los análogos fenilados **42d** y **42e** (Ac-(β -Lactam)-(PhG)*-NHMe), también mostraron características conformacionales diferentes entre sí. La elevada movilidad de la rama lateral (PhG)-NHMe en el compuesto **42d** quedó reflejada en los 6 *clusters* entre los que se repartieron 40 estructuras en un giro β -II y 58 en cónformeros extendidos. Esta misma movilidad de la cadena lateral también fue observada en el derivado **42e**, por lo que sólo 44 estructuras de las 100 calculadas cumplieron las restricciones impuestas, todas ellas dispuestas en un giro γ -up.

De estos resultados se puede concluir que la conformación extendida y de giro γ están particularmente pobladas en este grupo de pseudopéptidos de estructura Ac-(β -Lactam)-(Ala)*-NHMe y Ac-(β -Lactam)-(PhG)*-NHMe. Además, se hacen patentes los efectos de la configuración del $C\alpha'$ y el volumen del sustituyente situado en esa posición, ya que, por un aparte, únicamente los diastereómeros de configuración (*R*) en el residuo quiral (*i*+2) presentan cierta tendencia a adoptar una conformación de giro β -II, mientras que es el giro γ el más poblado por los diastereómeros de configuración (*S*) en dicho residuo, y por otra, a medida que se incrementa el volumen del sustituyente se favorece una movilidad de la rama (Aa)*-NHMe, lo que origina una mayor dispersión conformacional, disminuyendo entonces el número de cónformeros que cumplen todas las restricciones impuestas.

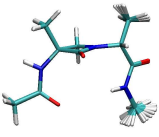
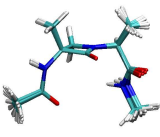
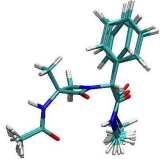
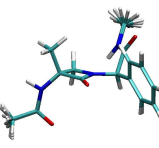
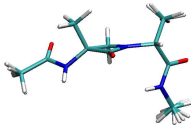
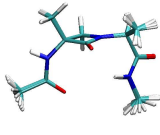
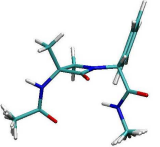
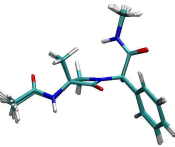
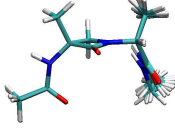
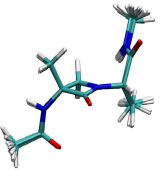
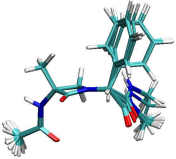
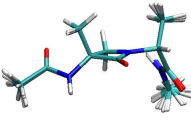
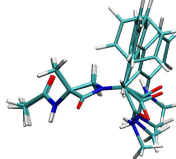
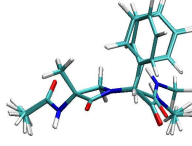
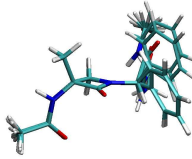
| 42b | 42c | 42d | 42e |
|---|---|--|---|
|  42b-1 (27) [β] |  42c-1 (37) [γd] |  42d-1 (32) [β] |  42e-1 (33) [γu] |
|  42b-2 (7) [γd] |  42c-2 (11) [γd] |  42d-2 (8) [β] |  42e-2 (11) [γu] |
|  42b-3 (51) [ϵ] |  42c-3 (41) [ϵ] |  42d-3 (26) [ϵ] | |
|  42b-4 (14) [ϵ] | |  42d-4 (7) [γd] | |
| | |  42d-5 (7) [ϵ] | |
| | |  42d-6 (14) [ϵ] | |

Figura 39: Superposiciones de conformeros representativos de cada uno de los clusters hallados para los pseudopéptidos **42b-e**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γd]=giro γ down; [γu]=giro γ up; [ϵ]=extendido.

La *figura 40* muestra las estructuras representativas de los pseudopéptidos **42a** y **42f** con residuos ($i+2$) aquirales de glicina y Aib, respectivamente. Se observaron dos conformaciones en el derivado **42a**, siendo mayoritaria la de giro γ -down (71 estructuras, *clusters* **42a-1** y **42a-2**) frente al conformero extendido (29 estructuras, *cluster* **42a-3**). Por otro lado, el compuesto $\alpha'\alpha'$ -disustituído **42f** presenta únicamente estructuras cuya rama lateral (Aib)-NHMe se sitúa por debajo del anillo β -lactámico, de las cuales 69 se encuentran en disposición de giro β , mientras que otras 26 están γ -giradas. De este resultado se puede extraer que la introducción de los dos grupos metilo incorporados en la posición α' de los derivados de tipo **42** es un factor betágeno, ya que favorece la orientación de la rama lateral (Aib)-NHMe para la adopción del giro β -II.

| 42a | 42f |
|---|--|
| <div data-bbox="365 936 560 1077"></div> <div data-bbox="368 1104 552 1133">42a-1 (25) [γd]</div> <div data-bbox="355 1173 544 1308"></div> <div data-bbox="368 1352 552 1382">42a-2 (46) [γd]</div> <div data-bbox="365 1413 539 1592"></div> <div data-bbox="376 1619 544 1648">42a-3 (29) [ϵ]</div> | <div data-bbox="963 920 1150 1084"></div> <div data-bbox="983 1115 1147 1144">42f-1 (69) [β]</div> <div data-bbox="948 1178 1171 1330"></div> <div data-bbox="975 1352 1155 1382">42f-2 (26) [γd]</div> |

*Figura 40: Superposiciones de conformeros representativos de clusters para los análogos de residuo ($i+2$) aquiral **42a** y **42f**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γ d]=giro γ down; [ϵ]= extendido.*

Del análisis de *clusters* de los pseudopéptidos **42a-f** se extrajeron conclusiones que mostraron sólo en algunos casos concordancia con las predicciones de los cálculos DFT

(figura 35, página 76). La preferencia energética que éstos predecían para la conformación de giro β fue constatada en los compuestos de residuo $(i+2)$ quiral **42b**, **42d** y en el pseudopéptido de residuo $(i+2)$ aquiral **42f**.

En general, el estudio mediante RMN mostró que la mayor parte de las estructuras de los análogos **42** adoptaban conformaciones intermedias entre giros γ y extendidas, con valores divergentes de los ángulos ϕ y ψ para los residuos $(i+1)$ e $(i+2)$ y distancias promedio ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ superiores a 4 Å. Este valor indica un alejamiento de la rama (Aa)-NHMe respecto del anillo β -lactámico que impide la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre dichas posiciones. Este hecho concuerda con los valores relativamente altos de los coeficientes térmicos de H_7 medidos en disolución de CDCl_3 y DMSO-d_6 (tabla7).

Cristalografía de rayos X, determinación de estructuras en estado sólido: Tras múltiples intentos de cristalización, se obtuvieron monocristales de los dipéptidos **42e** y **42f** por crecimiento a partir de disoluciones de MeOH.

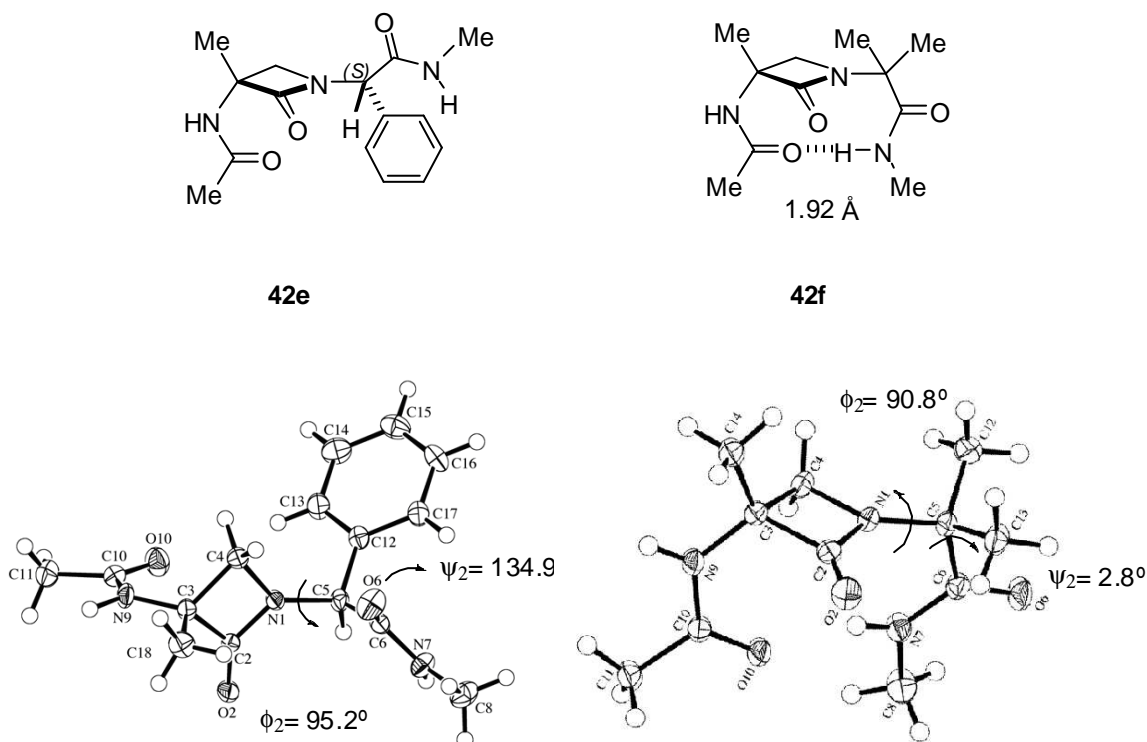


Figura 41: Estructuras de rayos X de los pseudopéptidos β -lactámicos **42e** (giro abierto) y **42f** (giro β -II), incluyendo los ángulos diedros del residuo $(i+2)$.

En la *figura 41* se muestra la representación ORTEP de ambos pseudopéptidos obtenidos a partir de difractogramas de rayos X registrados empleando técnicas de baja temperatura. Al igual que lo observado en la mayoría de las estructuras estudiadas en disolución, en ambos casos la rama lateral con el grupo acetamido del residuo (*i*) se ubica debajo del plano del anillo β-lactámico y perpendicular a éste. En el compuesto **42e** únicamente existen enlaces de hidrógeno intermoleculares, pero no intramoleculares (*tabla 10, entradas 1,2*), y cada uno de los grupos NH actúa como dador frente al grupo C=O aceptor de otra molécula formando una red tridimensional (ver *anexo D*). Por otro lado, el derivado **42f** presenta una distancia $_{i+3}(\text{N}-\text{H})-(\text{O}=\text{C})_i$ intramolecular de 1.92 Å de longitud (*entrada 3*) correspondiente al enlace estabilizante del giro β-II.

Tabla 10: Datos cristalográficos relativos a los enlaces de hidrógeno de los compuestos 42e y 42f.

| n | Comp. | D..H..A ^a | D..H | H..A | D..H..A | D..H..A ^b |
|---|------------|--|------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 1 | 42e | $_{i+3}\text{N}-\text{H}--\text{O}=\text{C}_i$ | 1.03 | 1.95 ^c | 2.94 ^c | 160 ^d |
| 2 | 42e | $_{i+1}\text{N}-\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+2}$ | 0.98 | 2.15 ^c | 2.95 ^c | 138 ^d |
| 3 | 42f | $_{i+3}\text{N}-\text{H}--\text{O}=\text{C}_i$ | 0.88 | 1.92 | 2.76 | 160 |
| 4 | 42f | $_{i+1}\text{N}-\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+3}$ | 0.89 | 2.00 | 2.90 | 176 |

^a D=dador; A=aceptor, distancias en Å ^b Ángulo O-H-N en grados. ^c Distancias intermoleculares. ^d Valores de ángulos intermoleculares

Comparando las conformaciones de los pseudopéptidos β-lactámicos **42e** y **42f** en fase sólida y en disolución, se observó que únicamente **42f** presenta un mismo tipo de conformación mayoritaria en ambos medios. El pseudopéptido **42e** adopta una conformación extendida en estado sólido en contraste con el giro γ-up mostrado en disolución de CDCl₃.

Como conclusión del estudio conformacional de los modelos **42a-f** se pueden realizar las siguientes afirmaciones: a) aunque, en general, los cálculos DFT realizados en vacío predicen una conformación β-girada como la más estable, los experimentos de RMN en disolución (CDCl₃) indican que son confórmeros extendidos o γ-girados los más poblados, lo cual puede explicarse por la exigua diferencia de energía entre los diferentes confórmeros (1-3 kcal/mol) predicha por los cálculos y la previsible ausencia de altas

barreras energéticas de interconversión, b) la configuración y el carácter mono- o disustituído del residuo ($i+2$) juegan un papel importante en la estabilización relativa de conformeros γ -girados o β -girados, siendo el residuo Aib el más betágeno.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de interpretar estos resultados es el tamaño relativamente pequeño (Me) del sustituyente de la posición α de los anillos β -lactámicos estudiados, que podría limitar el carácter betágeno de los pseudopéptidos **42a-f**. Por ello, decidimos estudiar unos modelos conteniendo un sustituyente más voluminoso (Bn) en dicha posición.

3.3.3 Análisis conformacional de los modelos Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH

Con anterioridad al presente trabajo, la Dr. Ana Benito ya había realizado en nuestro laboratorio el estudio conformacional de algunos pseudopéptidos β -lactámicos de cadena corta del tipo Boc-(β -Lactam)-(Gly)-Aib-OH.

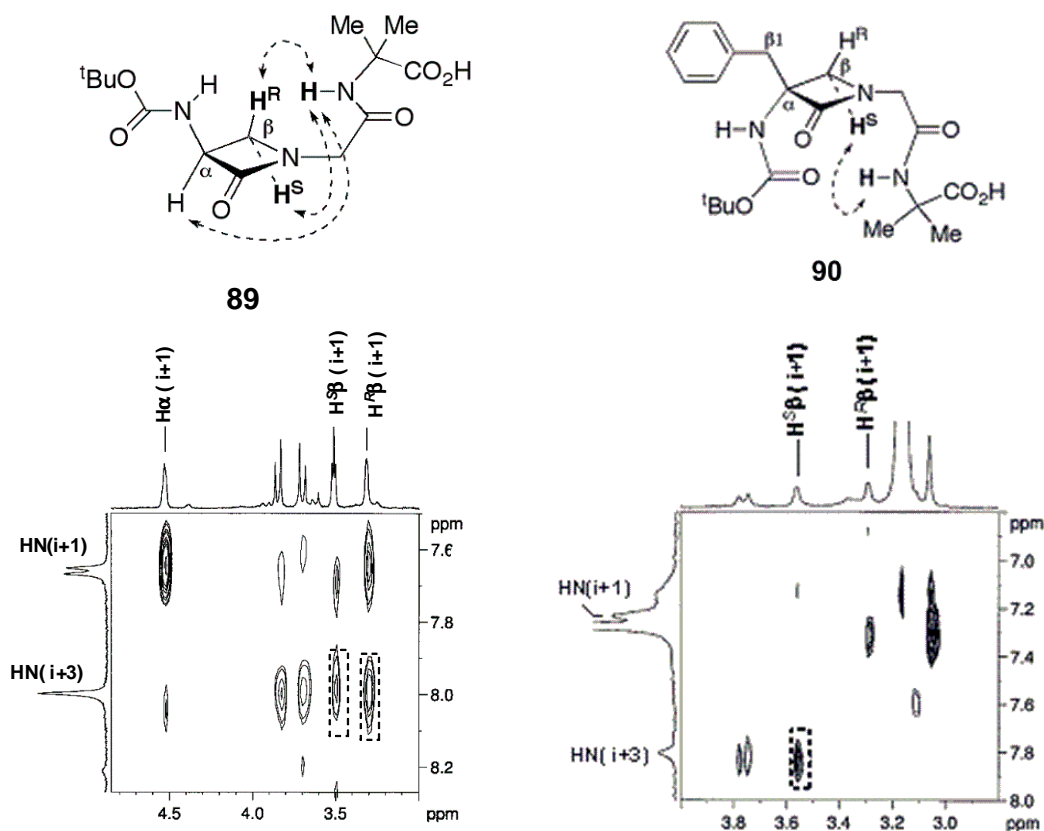
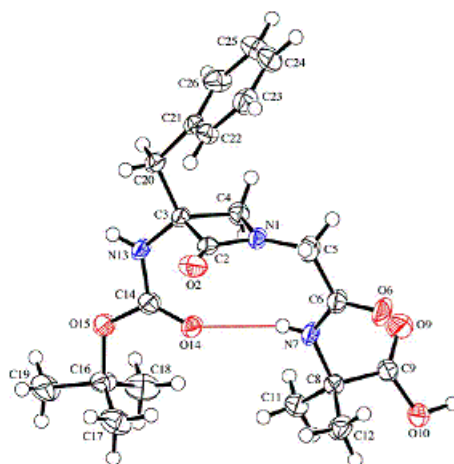


Figura 42: Conformeros principales y ampliaciones de espectros ROESY de los pseudopéptidos α -bencil- β -lactámicos **89** y **90** en DMSO- d_6 .

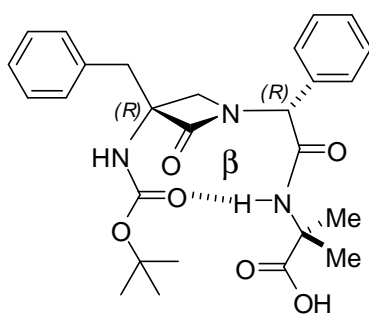
Con este trabajo, se pusieron de manifiesto las diferencias conformacionales entre el peptidomimético **89** monosustituído en la posición α del anillo β -lactámico y el homólogo α -bencilado **90**. Tal y como se muestra en las ampliaciones de los espectros ROESY de la *figura 42*, el protón amídico (NH)_{i+3} del compuesto **89** presenta señal de cruce con los dos protones de la posición β del anillo β -lactámico (H^R y H^S), lo que indica una estructura flexible cuya rama lateral (Gly)-Aib-OH gira en torno al plano de la β -lactama. Sin embargo, al introducir un grupo bencilo en la posición α para formar el mimético **90**, el sistema adopta una conformación de giro β -II y sólo muestra una señal de cruce H^S/(HN)_{i+3}. Además, la caracterización por cristalografía de rayos X de la α -bencil- β -lactama **90** ratificó la existencia de una conformación en estado sólido de giro β -II coincidente con su disposición en disolución (DMSO-d₆).



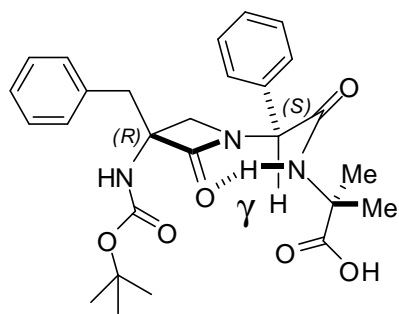
90

Figura 43: Estructura de rayos X del pseudopéptido 90.

Posteriormente, Eva Balentova llevó a cabo estudios preliminares del efecto de la monosustitución en posición α' del residuo ($i+2$) para los pseudopéptidos derivados de fenilglicina Boc-(β -Lactam)-(PhG)-Aib-OH. Las conformaciones observadas por RMN para disoluciones de ambos diastereómeros en DMSO-d₆ fueron de giro β -II para **91** (homoquiral) y giro γ para **92** (heteroquiral), lo que confirmaba una vez más la clara influencia de la configuración relativa de los residuos ($i+1$)/($i+2$) en la orientación de la cadena PhG-Aib-OH con respecto del plano de la β -lactama.

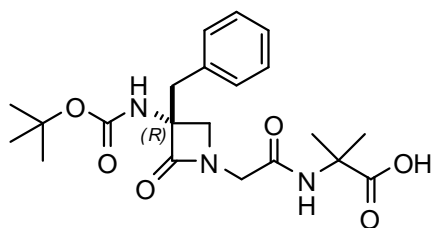


91

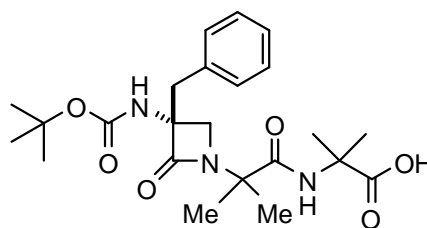


92

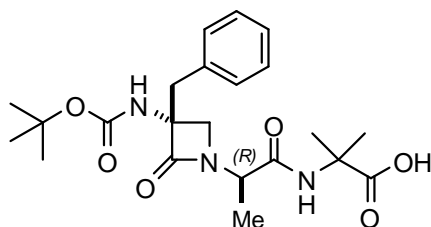
Teniendo en cuenta estos precedentes, pensamos completar dicho estudio con los modelos metilados **44a-c** y efectuar así un análisis conformacional comparativo con los compuestos **90-92**.



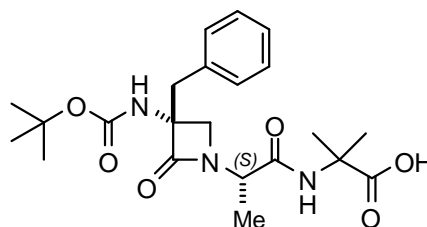
90



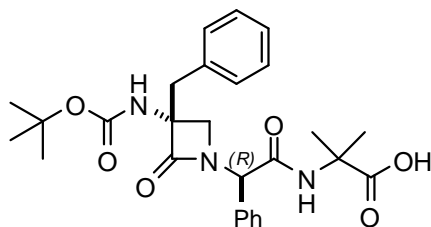
44c



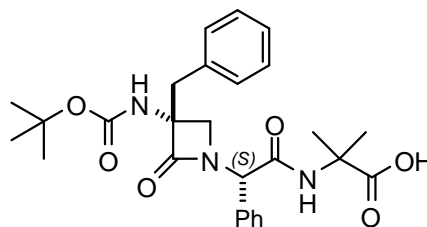
44a



44b



91



92

Análisis mediante RMN: Siguiendo la misma metodología aplicada en los apartados precedentes, se midió el desplazamiento químico de las señales de amida de todos los modelos α -bencilados a intervalos de 5K entre 300-325K utilizando DMSO- d_6 como disolvente.

Tabla 11: Desplazamientos químicos (δ) y coeficientes térmicos ($\Delta\delta/\Delta T$) de los protones amídicos $(NH)_{i+3}$ en los compuestos **90-92** y **44a-c**.

| Comp. | Residuo ($i+2$) | $\delta(NH)_{i+3}$ CDCl ₃ | $\delta(NH)_{i+3}$ DMSO- d_6 | $\Delta\delta(NH)_{i+3}$ CDCl ₃ →DMSO d_6 [ppm] | $\Delta\delta(NH)/\Delta T$ DMSO- d_6 [ppb/K] ^b |
|------------|----------------------|---|-----------------------------------|--|--|
| 90 | Gly | 7.82 | 7.82 | 0.00 | -2.3 |
| 44a | Ala-(R) | 7.93 | 7.93 | 0.00 | -2.8 |
| 44b | Ala-(S) | 7.83 | 7.93 | -0.10 | -3.0 |
| 91 | PhG-(R) | 8.18 | 8.32 | -0.14 | -3.1 |
| 92 | PhG-(S) | 7.85 | 8.40 | +0.45 | -4.2 |
| 44c | Aib | 7.86 | 7.76 | +0.10 | -2.5 |

Tal y como observamos anteriormente en los derivados α -metilados Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe **42** (tabla 7), en los derivados α' -monosustituídos se hizo patente el efecto del grupo en la posición α' , ya que se observó una desestabilización del enlace de hidrógeno intramolecular al aumentar el volumen de éste, siendo menores los coeficientes térmicos de los diastereómeros metilados **44a** y **44b** que los de los compuestos fenilados **91** y **92**. Además, entre estos últimos se observó una mayor desestabilización del enlace de hidrógeno intramoleculares al variar la configuración del $C\alpha'$ de (*R*) a (*S*), siendo el valor del coeficiente térmico de la amida $(NH)_{i+3}$ en el compuesto **92** de -4.2 ppb/K, lo que indica la apertura de la rama (PhG)-Aib-OH. Finalmente, la presencia de dos grupos metilo en el carbono α' en **44c** indujo una conformación de giro β -II similar a la observada para el derivado de glicina **90**.

A continuación, se llevó a cabo la integración de las señales de cruce de los espectros ROESY para calcular las distancias interprotónicas de los miméticos **90-92** y **44a-c**, que se recogen en la tabla 12.

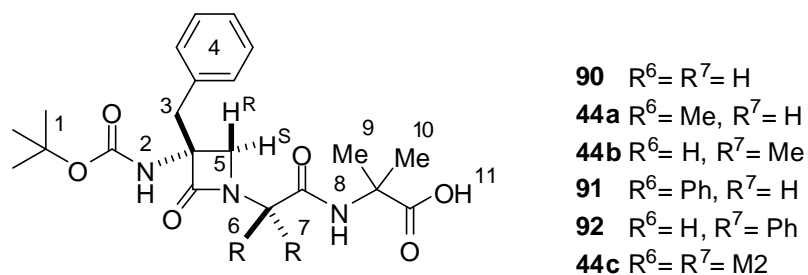


Figura 44: Numeración de los protones en los espectros 1H RMN de la serie de pseudopéptidos **90-92**, **44a-44c**.

Tabla 12: Distancias interprotónicas representativas de los miméticos **90-92** y **44a-c** determinadas a partir de los espectros ROESY en $DMSO-d_6$.

| ROE | Ha-Hb | Distancia (Å) | | | | | |
|-----|----------------|---------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 90 | 44a | 44b | 91 | 92 | 44c |
| 1 | $H_5^R-H_5^S$ | --- | --- | --- | 1.80(ref.) | 1.80(ref.) | 1.80(ref.) |
| 2 | $H_5^R-H_3$ | --- | --- | --- | --- | 2.42 | --- |
| 3 | $H_5^R-H_4$ | 3.56 | 2.94 | 2.90 | 2.50 | --- | 2.39 |
| 4 | $H_5^S-H_8$ | --- | --- | --- | 3.26 | --- | 2.40 |
| 5 | $H_5^R-H_6$ | 2.87 | 3.38 | 3.20 | 3.25 | 2.87 | 2.95 |
| 6 | $H_5^R-H_7$ | --- | --- | 4.10 | --- | 3.10 | 2.21 |
| 7 | $H_5^S-H_2$ | --- | --- | 3.10 | 4.39 | --- | --- |
| 8 | $H_5^S-H_6$ | 3.55 | 3.96 | --- | --- | --- | 3.18 |
| 9 | $H_5^S-H_7$ | --- | --- | 3.40 | --- | 2.95 | 2.59 |
| 10 | H_2-H_3 | --- | 3.10 | --- | 2.51 | --- | 2.46 |
| 11 | H_3-H_4 | --- | 2.32 | 2.20 | 2.19 | 2.17 | 1.94 |
| 12 | H_6-H_7 | 2.40 | 2.50 (ref.) | 2.50(ref.) | 2.47 | 2.29 | --- |
| 13 | H_6-H_8 | --- | 1.84 | 3.20 | --- | --- | 2.95 |
| 14 | H_7-H_8 | 3.23 | 2.85 | --- | 2.70 | 3.31 | 3.28 |
| 15 | $H_8-H_{9,10}$ | --- | 3.43 | 2.80 | --- | --- | 2.00 |

En primer lugar fueron identificados los protones β -lactámicos a partir de la señal de cruce H_5^R/H_4 presente en todas las estructuras excepto en el análogo fenílico **92** (*entrada 3*) y de las señales H_5^S/H_8 y H_5^S/H_2 (*entradas 4 y 7*). A continuación se analizaron los ROEs de R_6 y R_7 con H_5^R y H_5^S (*entradas 5, 6 y 8, 9*), cuyas distancias indicaron que la rama (Ala)-Aib-OH se hallaba orientada hacia la cara inferior del anillo β -lactámico en los miméticos **44a-c** (ver *figura 45*). Sin embargo, únicamente para el análogo α',α' -dimetilado **44c** se observó señal de cruce H_5^S/H_8 , cuya integración dio lugar a una distancia de 2.40 Å (*entrada 4, tabla 12*). Este dato, junto al del valor del coeficiente térmico para **44c** (*tabla 11*) permitió asignar una conformación de giro β -II para dicho compuesto. Ya que los espectros ROESY de los derivados α' -monometilados **44a** y **44b** no mostraron señal H_5^S/H_8 y que los coeficientes térmicos oscilaron entre los -2.8 ppb/K y -3.0 ppb/k, respectivamente, se concluyó que dichos compuestos podrían contar con una amplia población de conformaciones de giro γ en DMSO- d_6 . A pesar de ello, no fue posible determinar la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular estable entre el carbonilo de la β -lactama y el protón amídico H_8 . Una tendencia diferente fue observada en la pareja de diastereómeros **91** y **92**, ya que el análogo con configuración (*R*) en $C\alpha'$ (**91**) mostró las señales de cruce H_5^R/H_4 , H_5^S/H_8 y H_5^S/H_2 (*entradas 3, 4 y 7*), y un coeficiente térmico de -3.1 ppb/K para H_7 , en contraposición al análogo (*S*) (**92**). En este último caso ninguna de las señales citadas fue observada, lo cual unido a un coeficiente de -4.2 ppb/K, fue interpretado como una conformación γ -girada no estabilizada mediante enlace de hidrógeno intramolecular. En consecuencia, se pudo constatar que, aumentando el volumen del sustituyente situado en la posición α' (metilo en **44a,b** y fenilo en **91,92**), se acentúa el efecto que tiene la configuración de este carbono en la estabilización de conformeros en disolución, ya que, mientras que en los derivados metilados (**44a** y **44b**) no se pudo observar una diferencia significativa entre ambos diastereómeros, ésta sí fue constatada en los pseudopéptidos fenilados (**91** y **92**), tal y como se preveía al conocer los valores de los coeficientes térmicos de la *tabla 11*.

A continuación, las distancias interprotónicas recogidas en la *tabla 12* se utilizaron como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o *clusters* utilizando la misma metodología de *simulated annealing* descrita para los pseudopéptidos Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe **42** (ver apartado 3.3.2, pág 75).

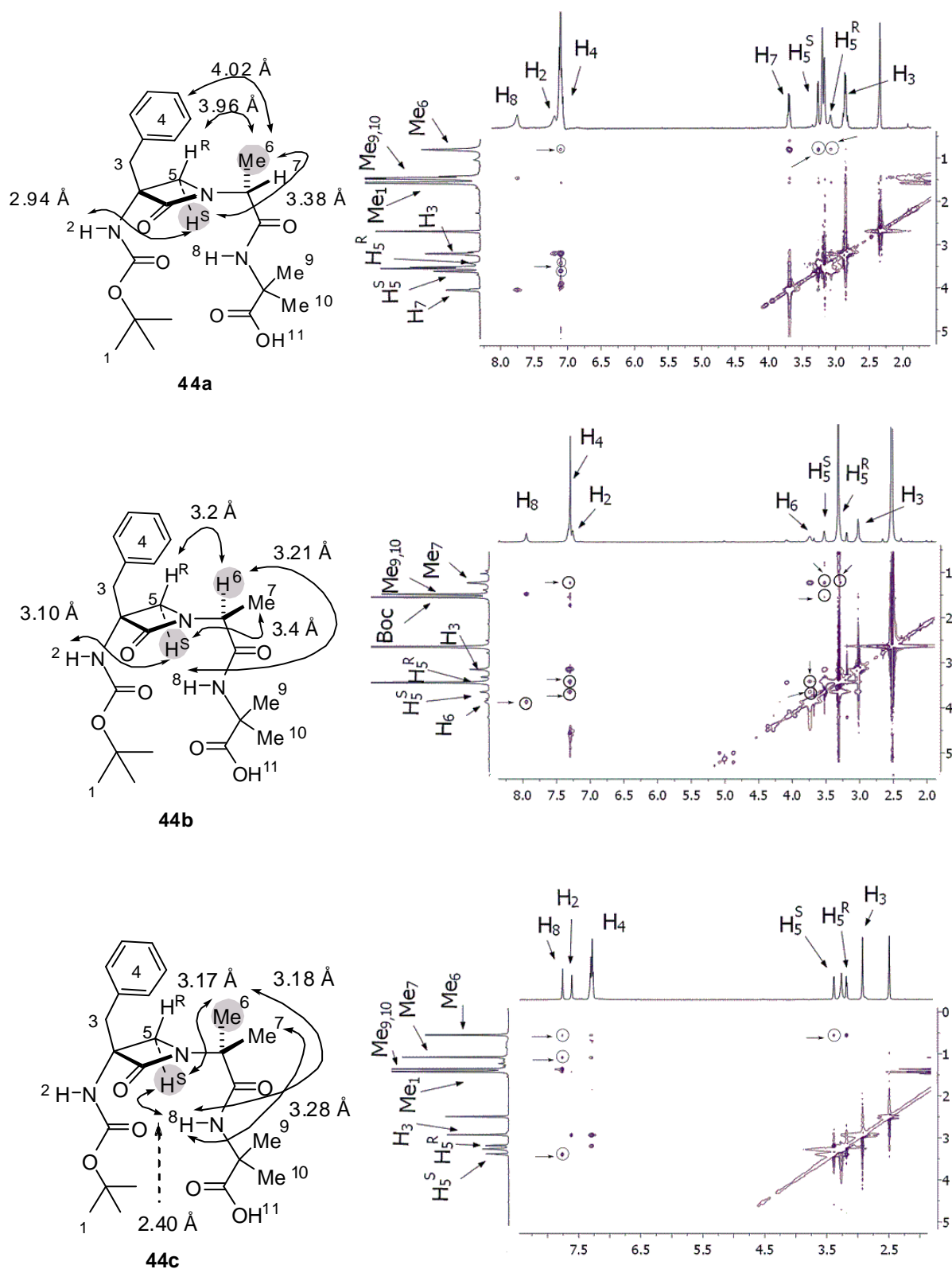


Figura 45: Representación de algunas señales de cruce (ROESY y NOESY) no consecutivas determinantes para **44a**, **44b** y **44c** en DMSO- d_6 .

Las superposiciones se llevaron a cabo utilizando únicamente confórmeros que cumplieran todas las restricciones de RMN experimentales. Al igual que ocurría con los análogos **42**, la distancia ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ no se pudo utilizar como una restricción, puesto que en los análogos **44a** y **44b**, no fue observada la señal de cruce $\text{H}_5^{\text{S}}/\text{H}_8$. En la *tabla 13* se indican los valores promedio de los ángulos diedros y las distancias ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ y ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ de cada uno de los *clusters* hallados.

Tabla 13: Clusters observados en los pseudopéptidos de estructura Boc-(β-Lactam)-(Aa)-Aib-OH con los valores promedio de los siguientes parámetros: distancia(Å) ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$, ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$, valores de los ángulos diedros (°) ϕ y ψ y del pseudodiedro μ .

| Cluster (n) ^a | ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ | ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ | $\langle\phi^1\rangle$ | $\langle\psi_1\rangle$ | $\langle\phi_2\rangle$ | $\langle\psi_2\rangle$ | $\langle\mu^b\rangle$ |
|--------------------------|---|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 90-1 (49) | 4.8 | 3.9 | -27.6 | 114.5 | 82.7 | 79.2 | 23.8 |
| 90-2 (43) | 4.9 | 5.8 | -159.5 | 114.6 | 82.0 | 79.4 | -47.3 |
| 44a-1 (11) | 3.3 | 6.2 | -12.3 | 114.0 | -26.8 | -61.6 | -129.0 |
| 44a-2 (28) | 3.6 | 4.9 | 16.5 | 114.1 | 88.6 | -54.8 | 14.8 |
| 44a-3 (8) | 4.4 | 6.0 | -114.9 | 114.3 | -84.6 | -59.8 | 150.9 |
| 44a-4 (49) | 5.2 | 7.3 | 24.5 | 114.0 | -20.4 | -172.6 | -27.1 |
| 44b-1 (10) | 4.7 | 6.9 | 42.0 | 114.2 | 68.6 | -167.1 | -2.2 |
| 44b-2 (30) | 2.4 | 4.3 | 34.9 | 114.3 | 72.1 | -70.5 | -9.8 |
| 44b-3 (58) | 4.7 | 6.0 | 45.0 | 114.2 | 65.0 | 98.7 | 14.9 |
| 91-1 (29) | 4.3 | 3.5 | -22.5 | 113.1 | 60.6 | 74.8 | 4.2 |
| 91-2 (22) | 4.1 | 5.7 | -16 | 113.9 | -146.2 | 42.0 | 123.8 |
| 92-1 (13) | 2.6 | 5.4 | -13.0 | 115.1 | -26.5 | -38.0 | -10.5 |
| 92-2 (23) | 2.5 | 5.1 | -2.2 | 115.1 | -107.8 | 115.1 | 13.5 |
| 92-3 (37) | 4.5 | 6.9 | 11.3 | 114.2 | -21.4 | 69.5 | -72.7 |
| 44c (83) | 4.3 | 3.6 | -17 | 114.7 | 91.3 | 44.5 | 48 |

^a Representa el número de estructuras por cluster que no violan ninguna de las restricciones de distancias interprotónicas extraídas de los espectros ROESY. ^b Ángulo pseudodiedro de los cuatro carbonos Cα.

En la *figura 46* se representan entre corchetes las conformaciones halladas para cada uno de los *clusters*, teniendo en cuenta los valores de los parámetros estructurales recogidos en la *tabla 13*.

Los compuestos **44a**, **44b**, **91** y **92** de residuo (*i*+2) quiral mostraron una distribución de *clusters* heterogénea. El análogo monometilado **44a** de configuración (*R*) en Cα' presentó 4 *clusters* con diferencias notables entre sus ángulos diedros. Las 47 estructuras de los *clusters* **44a-1**, **44a-2** y **44a-3** presentaron conformaciones de giro γ-up y γ-down, mientras que las estructuras restantes (39) presentaron una disposición extendida (*cluster* **44a-4**, *tabla 13*). Casi la totalidad de las estructuras halladas para este análogo (96 de 100) cumplieron todas las restricciones impuestas, lo mismo que ocurrió con su diastereómero **44b**. Las estructuras de este último compuesto se agruparon en 3 *clusters* en los que se observó una disposición γ-girada con la rama lateral (Ala)-Aib-OH ubicada bajo el plano del anillo β-lactámico (giro γ-down). Los análogos fenilados **91** y **92** presentaron un mayor número de estructuras que violaron las restricciones impuestas. Por una parte, el análogo homoquiral **91** presentó una población prácticamente equivalente de giro β (**91-1**) y giro γ-up (**91-2**), mientras que la única conformación hallada para el derivado **92** fue el giro γ-up, confirmada por las distancias promedio ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ (*tabla 13*). Nuevamente, y al igual que se observó en los derivados de cadena más corta **42**, la introducción de un centro estereogénico en el residuo (*i*+2) generó una mayor dispersión conformacional. Nuevamente el efecto del volumen del sustituyente en Cα' se hizo patente, ya que los derivados fenilados **91** y **92** presentaron una mayor movilidad de la rama (PhG)-Aib-OH que sus análogos **44a** y **44b**. Los resultados obtenidos del *simulated annealing* pusieron de manifiesto también la relevancia de la configuración del Cα' para este tipo de pseudopéptidos, puesto que los análogos de configuración (*R*) presentaron cierta tendencia a estabilizar un giro β, algo que no ocurrió en los análogos (*S*). Por su parte, los análogos **90** y **44c** de residuo (*i*+2) aquiral mostraron una mayor homogeneidad conformacional. Así, 49 estructuras del análogo no sustituido **90** se orientaron en una conformación β-girada, aunque debido a la movilidad de la rama Gly-Aib no todas presentaron una distancia ${}_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ favorable para la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular estabilizante. El resto de las estructuras (43) se orientaron en una conformación de giro γ-down. El análogo dimetilado **44c** presentó un único *cluster*

representado por 83 estructuras dispuestas en un giro β no canónico muy similar al observado para el compuesto **90** en el *cluster* **90-1**.

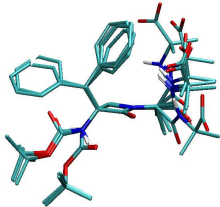
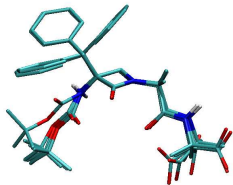
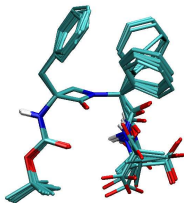
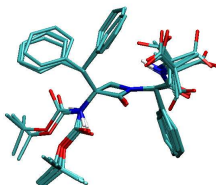
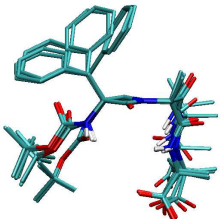
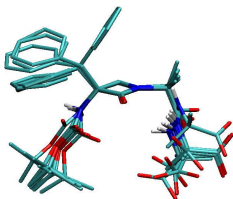
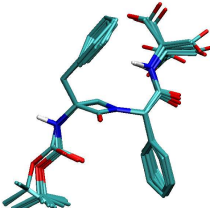
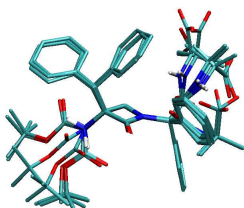
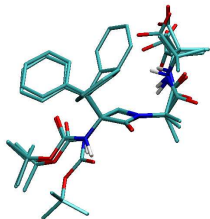
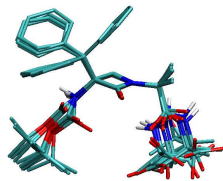
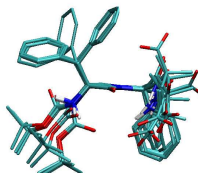
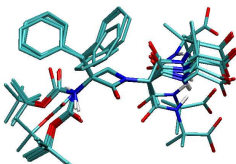
| 44a | 44b | 91 | 92 |
|--|--|---|---|
|  <p>44a-1 (11) [γu]</p> |  <p>44b-1 (10) [γd]</p> |  <p>91-1 (29) [β]</p> |  <p>92-1 (13) [γu]</p> |
|  <p>44a-2 (28) [γd]</p> |  <p>44b-2 (30) [γd]</p> |  <p>91-2 (22) [γu]</p> |  <p>92-2 (23) [γu]</p> |
|  <p>44a-3 (8) [γu]</p> |  <p>44b-3 (58) [γd]</p> | |  <p>92-3 (37) [γu]</p> |
|  <p>44a-4 (39) [ϵ]</p> | | | |

Figura 46: Superposición de conformeros representativos de clusters para los peptidomiméticos **44a**, **44b**, **91** y **92**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γd]=giro γ down; [γu]=giro γ up; [ϵ]= extendido.

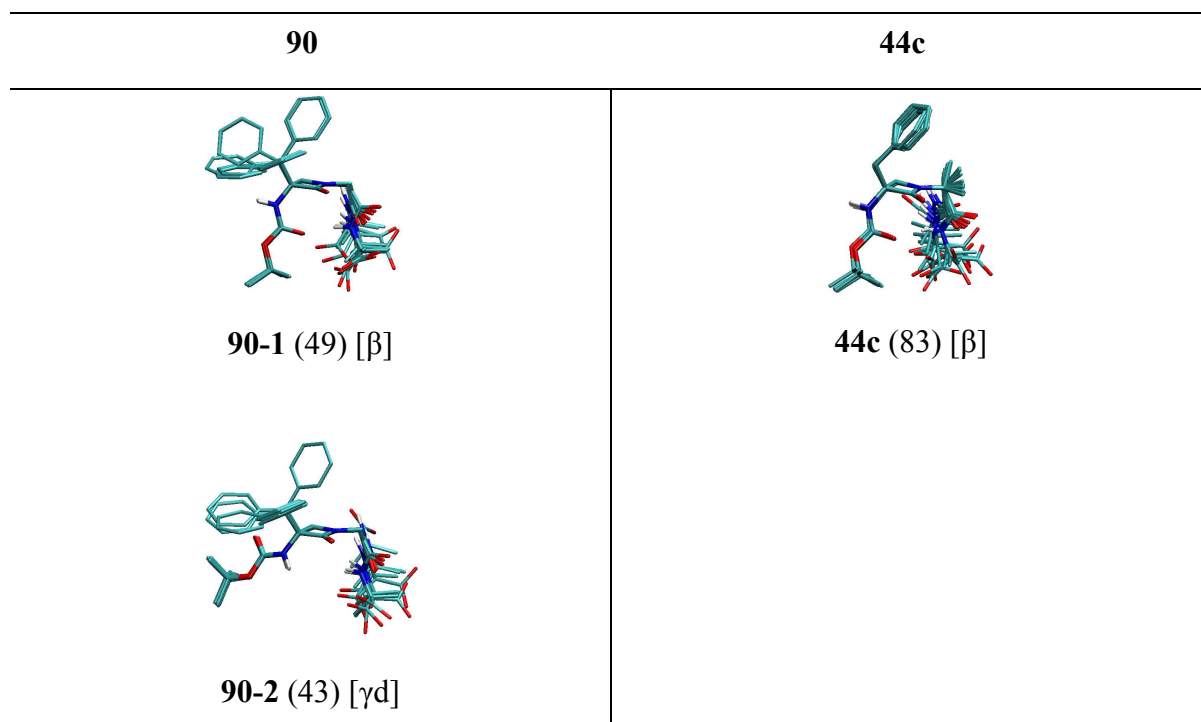
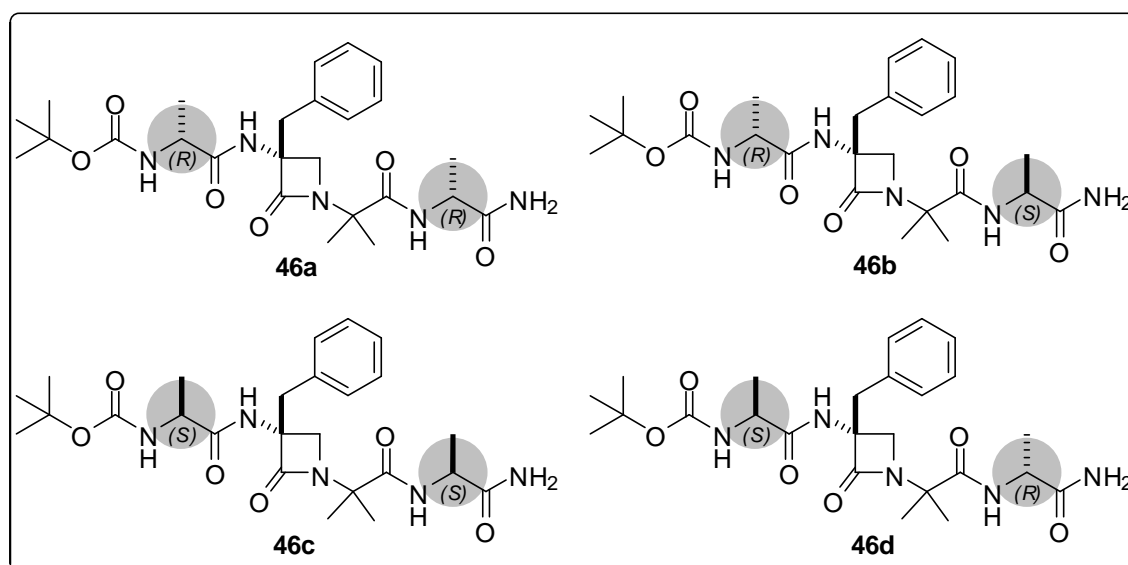


Figura 47: Superposición de algunas de las conformaciones de los peptidomiméticos **90** y **44c**. Entre paréntesis se indica el número de estructuras que no violan las restricciones impuestas. Entre corchetes el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γd]=giro γ down.

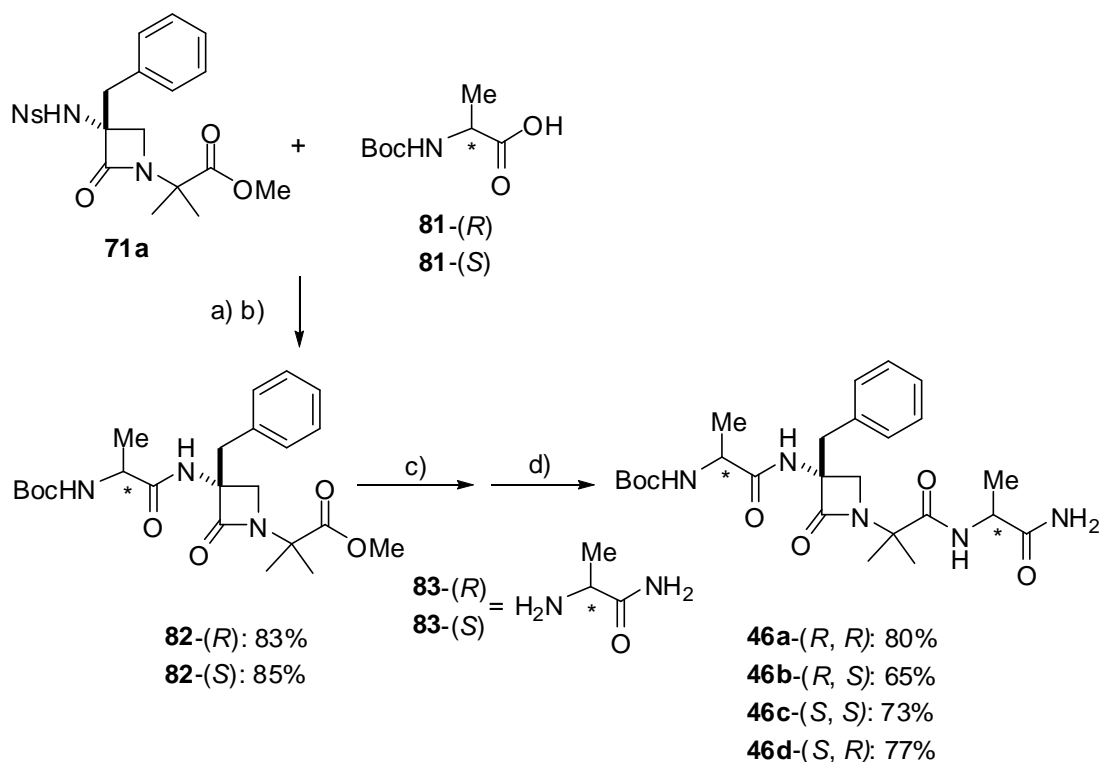
Todo lo observado mediante análisis conformacional en disolución de DMSO- d_6 en los análogos de esqueleto estructural Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH nos llevó a concluir que la introducción de un fragmento ($i+2$) quiral (compuestos **44a**, **44b**, **91** y **91**) provoca una mayor dispersión conformacional, algo que no se observó en los análogos con el fragmento ($i+2$) aquiral (**92** y **44c**). Por otro lado, los resultados observados del derivado **42c** mostraron que la introducción de dos grupos metilo en el Ca' es un factor de betageneicidad, algo que ya se había observado en los derivados de menor tamaño **42a-f** (apartado 3.3.2, pág 75).

3.4 Síntesis de miméticos β -lactámicos portadores de residuos N- y C- terminales quirales: Boc-Ala^{*}-(β -Lactam)-(Aa)-Ala^{*}-NH₂

Tras completar los estudios conformacionales de los miméticos de tipo **42** y **44** conteniendo residuos aquirales en las posiciones (*i*) e (*i*+3), pensamos investigar los pseudopéptidos de tipo **46**, que incorporan en estas posiciones sendos residuos quirales de alanina.



De acuerdo con los criterios anticipados en el apartado de *hipótesis y objetivos* (pag 45), los miméticos **46a-d** fueron diseñados para resaltar al máximo el efecto conformacional de los residuos de alanina. Para favorecer la estabilización de giros β y posibilitar la nucleación de horquillas o *hairpin* se incluyó un resto quiral betágено de Aib en la posición (*i*+2) de todos ellos. Para preparar estos pseudopéptidos se partió de la α -nosilamino- β -lactama **71a** (ver tabla 4, pag 64), y se siguió la ruta sintética mostrada en el esquema 7:



Esquema 7: Reactivos y condiciones: a) PhSH (5eq.), K_2CO_3 (4 eq.), MeCN, t.a., 2h., b) EEDQ (1.5eq.), CH_2Cl_2 , -12°C -t.a., 16h., c) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, MeOH/ H_2O , t.a., 2h., d) H-Ala-NH₂ (**83**) (1.2 eq.), EEDQ (1.5eq.), CH_2Cl_2 , -12°C -t.a., 16h.

En primer lugar, se desprotegió el grupo nosilo de la β -lactama **71a** con tiofenol/ K_2CO_3 y tras aislar la α -amino- β -lactama intermedia, ésta se sometió a acoplamiento peptídico promovido por EEDQ con el correspondiente enantiómero de la *tert*-butoxicarbonil-alanina **81**. Se obtuvieron así los tripéptidos **82**-(R), **82**-(S) con rendimientos del 83% y el 85%, respectivamente. Posteriormente, se saponificó el éster metílico terminal con hidróxido de litio y el ácido carboxílico resultante se acopló por separado cada uno de los enantiómeros de las alaninamidas **83**. En primer lugar se abordó este paso utilizando nuevamente la EEDQ, pero en esta ocasión la conversión fue baja, tal y como se muestra en la *tabla 14*. Por ello, se ensayaron combinaciones alternativas de reactivos tales como N,N'-diciclohexil-carbodiimida/hidroxibenzotriazol (DCC)/HOBt. Así se obtuvieron los pseudopéptidos **46a-d**, pero su purificación cromatográfica resultó ser muy problemática debido a la difícil separación de la N,N-diciclohexil urea residual. De manera similar, cuando se utilizó EDC/HOBt el producto también resultó contaminado con subproductos de difícil separación. Finalmente, se utilizó la mezcla HATU/HOAt y

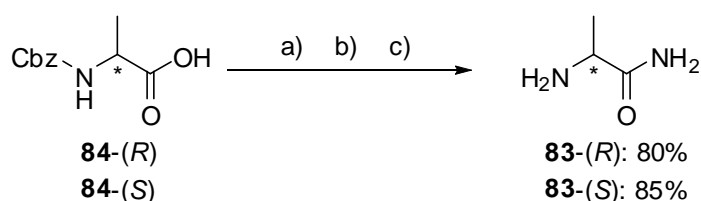
bicarbonato potásico empleando DMF como disolvente. Estas condiciones habían sido puestas a punto para preparar otros péptidos impedidos en nuestro laboratorio por Joseba Oyarbide durante la consecución de su tesis doctoral, y proporcionaron mejores rendimientos que el sistema HATU/HOAt/DIPEA⁸⁰. En este caso, los pseudopéptidos **46** se purificaron sin problemas mediante cromatografía en columna de gel de sílice con rendimientos globales que oscilaron entre el 65% y el 80% para la transformación **82**→**46**.

Tabla 14: Ensayos de acoplamiento de los péptidos β -lactámicos **82** con las alaninamidas **83**.

| Sustratos | Reactivo activante | Disolvente | T ^a (°C) | Tiempo | Conversión ^a |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------|--------|-------------------------|
| 82 -(R), 83 -(S) | EEDQ | CH ₂ Cl ₂ | -12→t.a. | 16h | <10% |
| 82 -(R), 83 -(S) | DCC/HOBt | CH ₂ Cl ₂ | 0→t.a. | 16h | >90% ^b |
| 82 -(S), 83 -(S) | EDC/HOBt | CH ₂ Cl ₂ | 0→t.a. | 16h | >90% ^b |
| 82 , 83 | HOAt/HATU/KHCO ₃ | DMF | 0→t.a. | 16h | 100% ^c |

^a Determinada por análisis ¹H-RMN del crudo de reacción. ^b La purificación del producto por cromatografía de columna resultó ser inviable. ^c Para rendimientos de los productos aislados, ver Esquema 7.

Por su parte, las alaninamidas **83**-(R) y **83**-(S) se prepararon a partir de las N-benciloxycarbonilalaninas **84** comerciales mediante una sencilla secuencia de esterificación del grupo carboxilo, seguida de amidación del éster metílico intermedio con amoníaco (*esquema 8*). El análisis mediante HPLC con fase estacionaria quiral de los productos finales confirmó que no ocurría racemización en ninguna de las etapas de la transformación.



Esquema 8: Reactivos y condiciones: a) DBU (3eq.), MeI (3 eq.), tolueno, 0°C→ t.a., 16h., b) NH₃(g), MeOH, t.a., 24h. c) Pd/C (10%), H₂, MeOH, t.a., 1h.

⁸⁰ a) Tulla-Puche, J.; Marcucci, E.; Prats-Alfonso, E.; Bayó-Puxan, N.; Albericio, F. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 834-839. b) Ghosh, A.K.; Kulkarni, S. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3907-3909.

En la *figura 48* se muestra el espectro ^1H RMN del compuesto **46d**-(*S,R*) en CDCl_3 con la asignación de protones resultante del análisis combinado COSY/HSQC/HMBC.

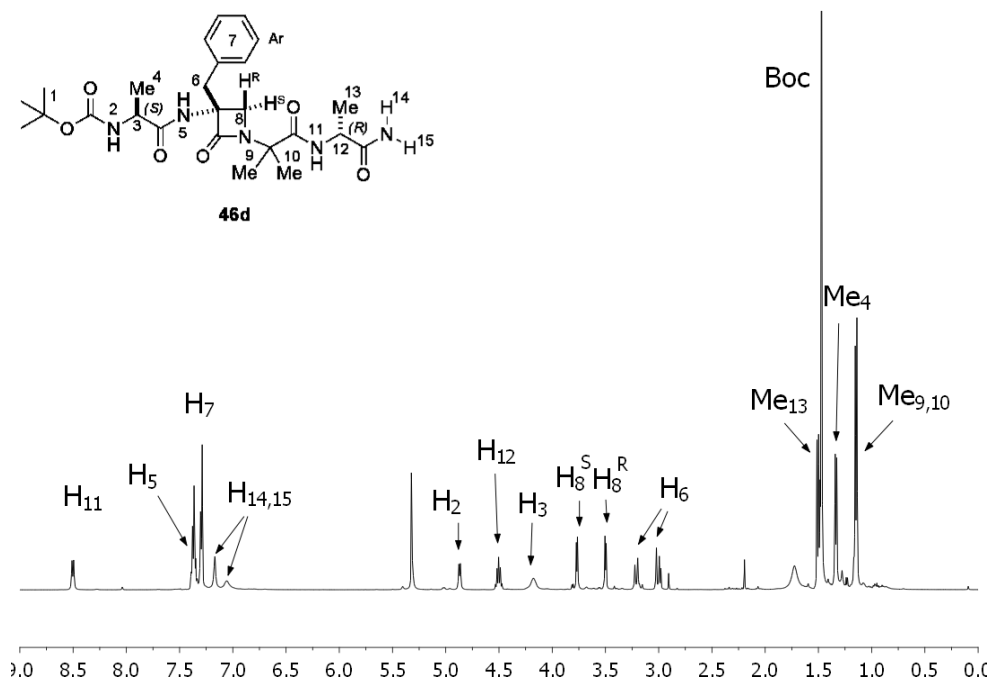


Figura 48: Espectro ^1H RMN del compuesto **46d**-(*S,R*) en CDCl_3 .

3.5 Análisis conformacional de miméticos portadores de residuos *N*- y *C*-terminales quirales: Boc-Ala^{*}-(β -Lactam)-(Aa)-Ala^{*}-NH₂.

La formación de horquillas o *hairpins* estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno “intercadena” se puede favorecer con nucleadores peptídicos o pseudopeptídicos. Así, por ejemplo, la diprolina (D)Pro-(L)Pro **85** de Robinson⁸¹ (*figura 49*), es particularmente eficaz para estabilizar láminas β en macrociclos que han mostrado actividad como agentes antivirales. Por otro lado, Gennari⁸² ha demostrado que los péptidos **86** que incorporan como nucleador una *N*-bencil-dicetopiperazina, presentan un equilibrio entre horquillas moleculares y agregados peptídicos (*figura 49*).

⁸¹ a) Pfeifer, M.E.; Moehle, K.; Linden, A.; Robinson, J.A. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 444-464. b) Moehle, K.; Athanassiou, Z.; Patora, K.; Davidson, A.; Varani, G.; Robinson, J.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9101-9104.

⁸² Resurreiçao, A.S.M.; Bordessa, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Gennari, C.; Piarulli, U. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 652-660.

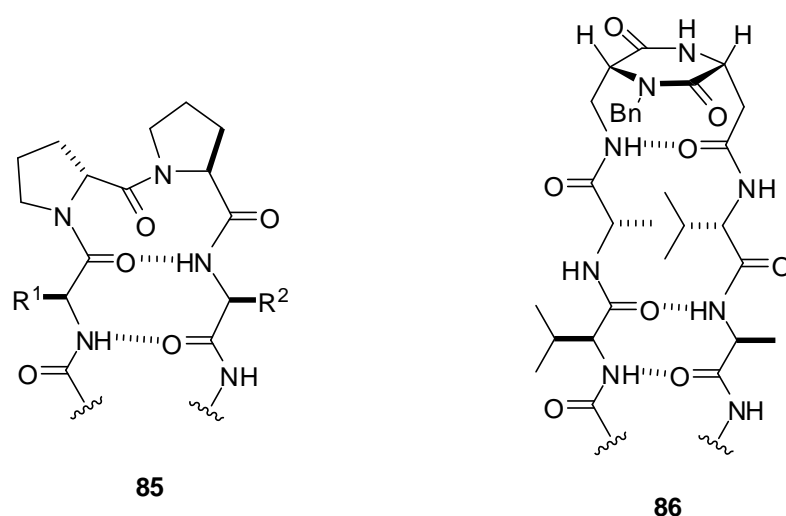
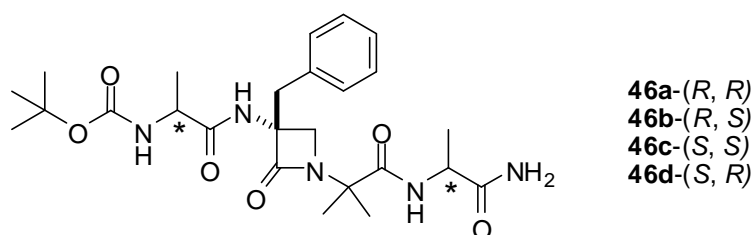


Figura 49: Horquillas nucleadas por una diprolina (Robinson) y una dicetopiperazina (Gennari).

Dado que no existen precedentes en la bibliografía relativos a la aplicación de las β -lactamas como nucleadores de horquillas, uno de nuestros objetivos consistió en el estudio conformacional de los miméticos del tipo Boc-Ala^{*}-(β -Lactam)-(Aib)-Ala^{*}-NH₂ (**46a-d**) para intentar comprender la influencia de la quiralidad relativa de los residuos de alanina sobre los conformeros formados.



Análisis conformacional mediante RMN: Al igual que en el caso de los pseudopéptidos precedentes, los estudios conformacionales de **46a-d** se llevaron a cabo en DMSO-d₆ utilizando experimentos monodimensionales y bidimensionales combinados con modelización de dinámica molecular (*simulated annealing*). La concentración de compuestos se mantuvo constante para cada serie de experimentos en un rango de 6-10 mM, tras verificar la ausencia de deriva por dilución en los desplazamientos químicos.

Los coeficientes térmicos de los protones amídicos H_2 , H_5 , H_{11} , H_{14} y H_{15} se determinaron a partir de experimentos 1H realizados entre 300 y 325K con una diferencia de temperatura de 5K entre espectros. En la siguiente figura se indica la numeración utilizada para designar los protones en toda la serie de compuestos **46a-d**.

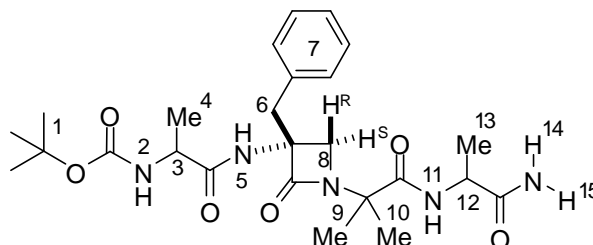


Figura 50: Numeración de los protones de los diastereómeros **46a-d**. Las posiciones H_2 , H_5 , H_{11} , H_{14} y H_{15} corresponden a los protones amídicos potencialmente dadores.

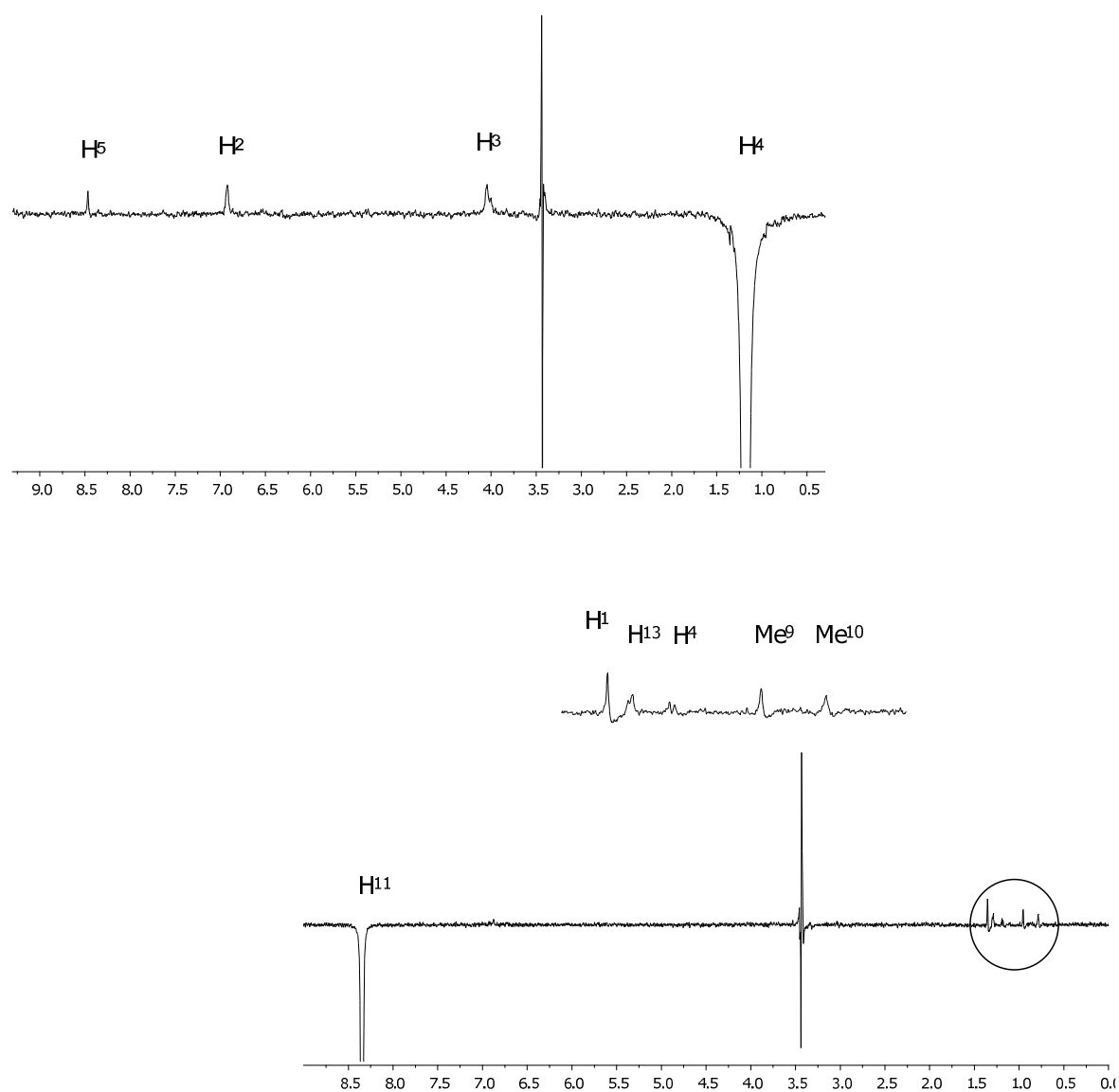
De los protones observados se prestó especial atención a H_{11} por su capacidad potencial para formar enlaces de hidrógeno intramoleculares, bien con el oxígeno del grupo $(C=O)_{i+1}$, dando lugar a un giro β , o con $(C=O)_{i+2}$ para formar un giro γ .

Tabla 15: Coeficientes térmicos ($\Delta\delta/\Delta T$) de los protones amídicos H_2 , H_5 , H_{11} , H_{14} , H_{15} en los pseudopéptidos **46a-d**.

| n | Comp. | $\Delta\delta(H_2)/\Delta T$ (ppb/K) | $\Delta\delta(H_5)/\Delta T$ (ppb/K) | $\Delta\delta(H_{11})/\Delta T$ (ppb/K) | $\Delta\delta(H_{14})/\Delta T$ (ppb/K) | $\Delta\delta(H_{15})/\Delta T$ (ppb/K) |
|---|-------------------|---|---|--|--|--|
| 1 | 46a -(R,R) | -6.97 | -5.77 | -2.50 | -4.28 | -4.51 |
| 2 | 46b -(R,S) | -6.86 | -5.71 | -2.75 | -4.40 | -5.03 |
| 3 | 46c -(S,S) | -7.33 | -6.72 | -2.79 | -3.79 | -4.13 |
| 4 | 46d -(S,R) | -8.23 | -6.74 | -2.46 | -2.16 | -5.55 |

Efectivamente, los valores de los coeficientes térmicos de H_{11} comprendidos entre -2.5 y -2.8 ppb/K resultaron ser notablemente menores que los de H_2 , H_5 o H_{15} . Este dato confirmó una estabilización del giro β por enlace de hidrógeno entre $(C=O)_i$ y $(NH)_{i+3}$ en todos los compuestos **46a-d**. Por otro lado, los coeficientes medidos para H_{14} y H_{15} mostraron valores absolutos superiores a 3 ppb/K, lo que fue interpretado como una tendencia a la apertura de los extremos de las ramas laterales, salvo para el

peptidomimético **46d** cuyo protón amídico H_{14} mostró un coeficiente de -2.16 ppb/K. Este dato es especialmente significativo y nos llevó a realizar experimentos de NOE selectivo con dicho peptidomimético para intentar determinar el carbonilo aceptor del protón H_{14} . Debido a la proximidad de su desplazamiento químico con el de otras señales en el espectro de 1H (ver *anexo A*), la irradiación de H_{14} no aportó ninguna información significativa, por lo que se optó por repetir el experimento irradiando H_4 y H_{11} (*figura 51*).



*Figura 51: Espectros de NOE selectivo obtenidos irradiando los protones amídicos H_4 y H_{11} del compuesto **46d**.*

En contraste con la irradiación de H_4 que sólo mostró NOE con protones de su misma cadena peptídica (*figura 51*), la irradiación de H_{11} reveló una proximidad entre cadenas, ya que se observó el incremento de las intensidades de H_4 y también de los protones H_1 pertenecientes al grupo Boc (*figura 52*). Este hecho sugirió que el valor de -2.16 ppb/K medido para el coeficiente térmico de H_{14} pudo deberse a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular del protón amídico H_{11} con el carbonilo del grupo Boc, que actuaría como aceptor.

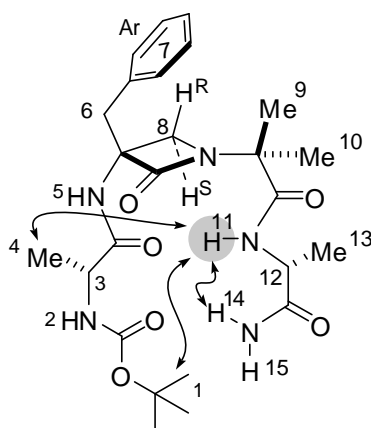


Figura 52: Representación de las señales de NOE del protón amídico H_{11} en el compuesto 46d.

A continuación, se determinaron las distancias interprotónicas de los compuestos **46a-d** a partir de experimentos ROESY. En la *figura 53* se muestra a modo de ejemplo el espectro ROESY del compuesto **46a**-(*R,R*), que resultó tener grupos de señales de cruce muy similares a sus diastereómeros **46b-d** (ver *anexo B*). Las distancias promedio más representativas entre pares de protones no consecutivos se recogen en la *tabla 16*. Las distancias $H_8^S-H_{11}$ y $H_8^R-H_7$, por un lado, y $H_8^S-Me_9$, $H_8^S-Me_{10}$ y $H_8^R-Me_9$, $H_8^R-Me_{10}$ por otro, indicaron que la rama lateral (Aib)-Ala-NH₂ se hallaba orientada hacia la cara inferior del anillo de β -lactama.

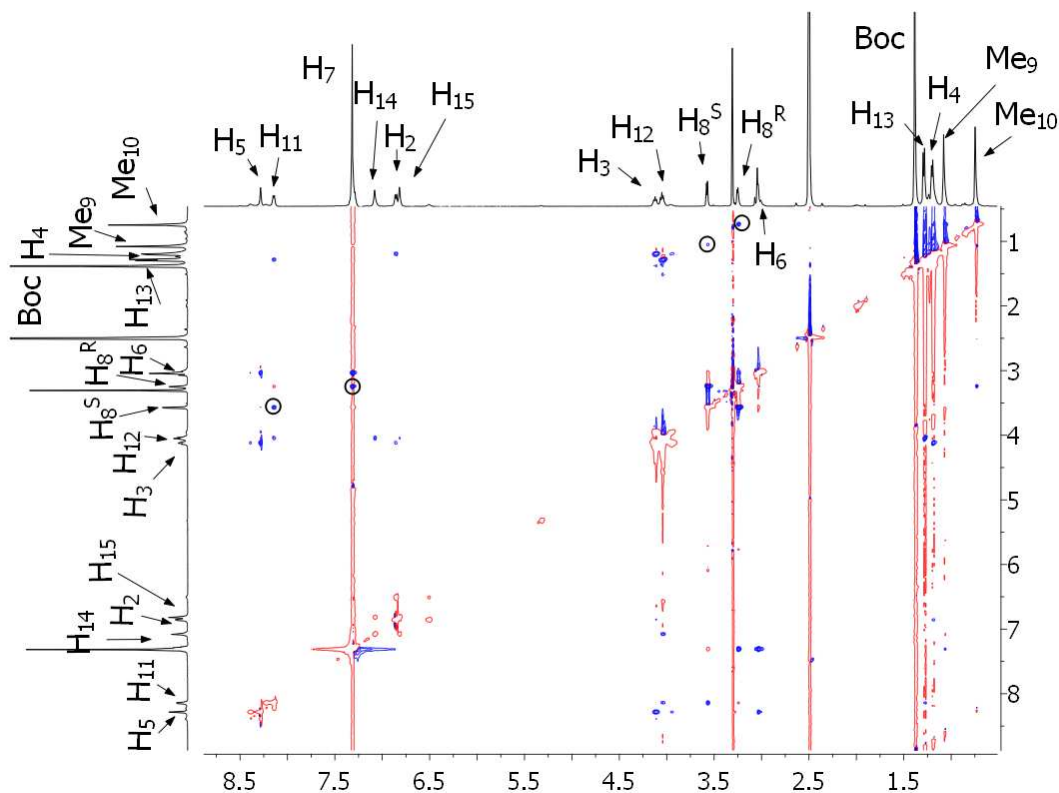


Figura 53: Espectro ROESY del pseudopéptido β -lactámico **46a**-(R,R).

Tabla 16: Relación de algunas de las distancias interatómicas promedio halladas por integración de señales de cruce (ROESY) y el ángulo diedro $\theta(H_{11}N-CH_{12})$ calculado a partir de la constante de acoplamiento $^3J(H_{11}-H_{12})$.

| Compuesto | Distancia(Å) | | | | $^3J(\text{Hz})$ $\theta(^{\circ})$ |
|-------------------|----------------|--------------|-------------|----------------|-------------------------------------|
| | $H_8^S-H_{11}$ | $H_{10}-H_7$ | $H_7-H_8^R$ | $H_{10}-H_8^R$ | |
| 46a -(R,R) | 3.13 | 3.73 | 2.68 | 3.36 | 6.98 (142) |
| 46b -(R,S) | 3.62 | --- | 2.89 | 2.87 | 6.72 (140) |
| 46c -(S,S) | 2.59 | 4.27 | 2.76 | --- | 7.27 (144) |
| 46d -(S,R) | 3.70 | 4.63 | 3.87 | 2.96 | 6.46 (138) |

Otro dato extraído fue la constante de acoplamiento $^3J(H_{11}-H_{12})$, que permitió calcular el ángulo diedro θ del enlace $H_{11}N-CH_{13}$ a través de la ecuación de Karplus⁸³.

⁸³ Ludvigsen, S.; Andersen, K.V.; Poulsen, F.M. *J. Mol. Biol.* **1991**, 217, 731-736.

Estos valores, junto con los bajos coeficientes térmicos de H_{11} medidos para los diastereómeros **46a-d** (tabla 15) permitieron concluir que todos ellos adoptaban una conformación de giro β -II, tal y como se indica en la figura 54.

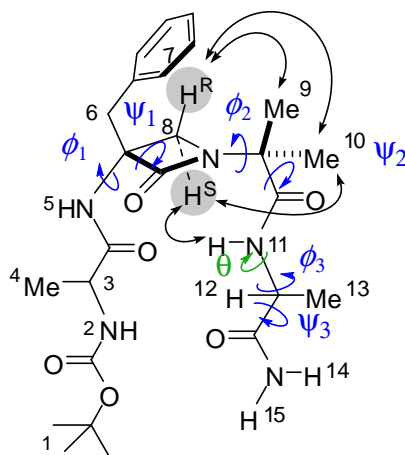


Figura 54: Interacciones NOE entre protones no consecutivos obtenidas a partir de los espectros ROESY para los compuestos **46a-d**. En azul se indican los ángulos diedros (ϕ y ψ) de los residuos (i+1), (i+2) e (i+3).

A continuación, se incorporaron las distancias interprotónicas⁸⁴ y los ángulos diedros θ como restricciones en el cálculo de los grupos conformacionales o *clusters* más relevantes aplicando la aproximación de *simulated annealing* de Seebach y Van Gunsteren⁸⁵ para cada uno de los pseudopéptidos **46a-d**.

Puesto que los coeficientes térmicos hallados por RMN fueron menores de 3 ppb/K y se observó una corta distancia $H_8^S-H_{11}$ en todos los pseudopéptidos, la distancia $_{i+3}(\underline{NH})-(\underline{O}=C)_i$ fue impuesta como restricción en el procedimiento del *annealing* con un valor de 2.5 ± 0.3 Å entre el oxígeno aceptor del residuo (i) y el hidrógeno H_{11} del (i+3). Esto derivó en la obtención de 100 conformeros de cada uno de los peptidomiméticos de tipo **46** que, una vez agrupados según los intervalos de los ángulos diedros, originaron los *clusters* que se recogen en la tabla 17.

⁸⁴ Para un listado completo de las distancias empleadas, ver *anexo C*.

⁸⁵ Daures, X.; Gademann, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; Van Gunsteren, W.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2393-2404.

Tabla 17: Grupos conformacionales de los pseudopéptidos **46a-d** y parámetros promedio de distancias $_{i+3}(\text{NH})-(\text{C}=\text{O})_i$ (Å), de los ángulos diedros ($^\circ$) ϕ_i y ψ_i y del ángulo pseudodiedro μ .

| Cluster (n) ^a | $_{i+3}(\text{NH})-(\text{C}=\text{O})_i$ | $\langle\phi^1\rangle$ | $\langle\psi_1\rangle$ | $\langle\phi_2\rangle$ | $\langle\psi_2\rangle$ | $\langle\phi_3\rangle$ | $\langle\psi_3\rangle$ | $\langle\mu^b\rangle$ |
|--------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 46a-1 (53) (R,R) | 2.7 | -2.9 | 113.4 | 37.9 | 46.2 | --- ^c | --- ^c | -33.4 |
| 46a-2 (29) (R,R) | 2.9 | -2.6 | 113.3 | 120.4 | -47.9 | --- ^c | --- ^c | 22.4 |
| 46b (56) (R,S) | 2.6 | -13.5 | 114.3 | 101.5 | -53.4 | -160.0 | --- ^c | 13.7 |
| 46c (66) (S,S) | 2.1 | -18 | 113.6 | 108.6 | -37 | -160.0 | --- ^c | 10.4 |
| 46d-1 (33) (S,R) | 2.6 | -9.3 | 112.9 | 30.2 | 49.2 | 96.0 | -57.0 | -41.4 |
| 46d-2 (25) (S,R) | 2.4 | -16.3 | 113.1 | 33.2 | 48.1 | 108.0 | 141.0 | -39.7 |
| 46d-3 (16) (S,R) | 2.7 | -15.5 | 113.4 | 114.4 | -60.3 | 93 | -56 | 11.8 |
| 46d-4 (22) (S,R) | 2.6 | -18.3 | 113.6 | 113.7 | -61.2 | 112 | 142 | 10.4 |

^a Representa el número de estructuras por cluster que no violan ninguna de las restricciones de distancias interprotónicas extraídas de los espectros ROESY. ^b Ángulo pseudodiedro de los cuatro carbonos Cα de los residuos (i)-(i+3). ^c No presenta restricción definida.

En la primera columna de dicha tabla se identifica cada *cluster* obtenido incluyendo entre paréntesis el número de estructuras que no violan ninguna de las restricciones. Así, los compuestos **46b** y **46c** presentaron un único *cluster* poblado con 56 y 66 estructuras, respectivamente, mientras que los derivados **46a** y **46d** presentaron un número mayor de clusters, (2 y 4, respectivamente). Sin embargo, estos últimos mostraron un mayor número de estructuras que cumplían las restricciones impuestas, siendo éstas 82 para el análogo **46a** y 96 para **46d**. Por otro lado, los valores promedio de los ángulos diedros reflejados en la *tabla 17* distan, en algunos casos notablemente, de aquellos observados en el giro β-II canónico, aunque se observó gráficamente la conformación β-girada en todos los clusters extraídos de los cálculos (*figura 55*). Además, las distancias halladas entre el oxígeno del grupo carbonilo en (i) y el hidrógeno amídico de (i+3), cuyos valores (2.1-2.9 Å) fueron menores de 3.2 Å, constataron la existencia de un giro β.

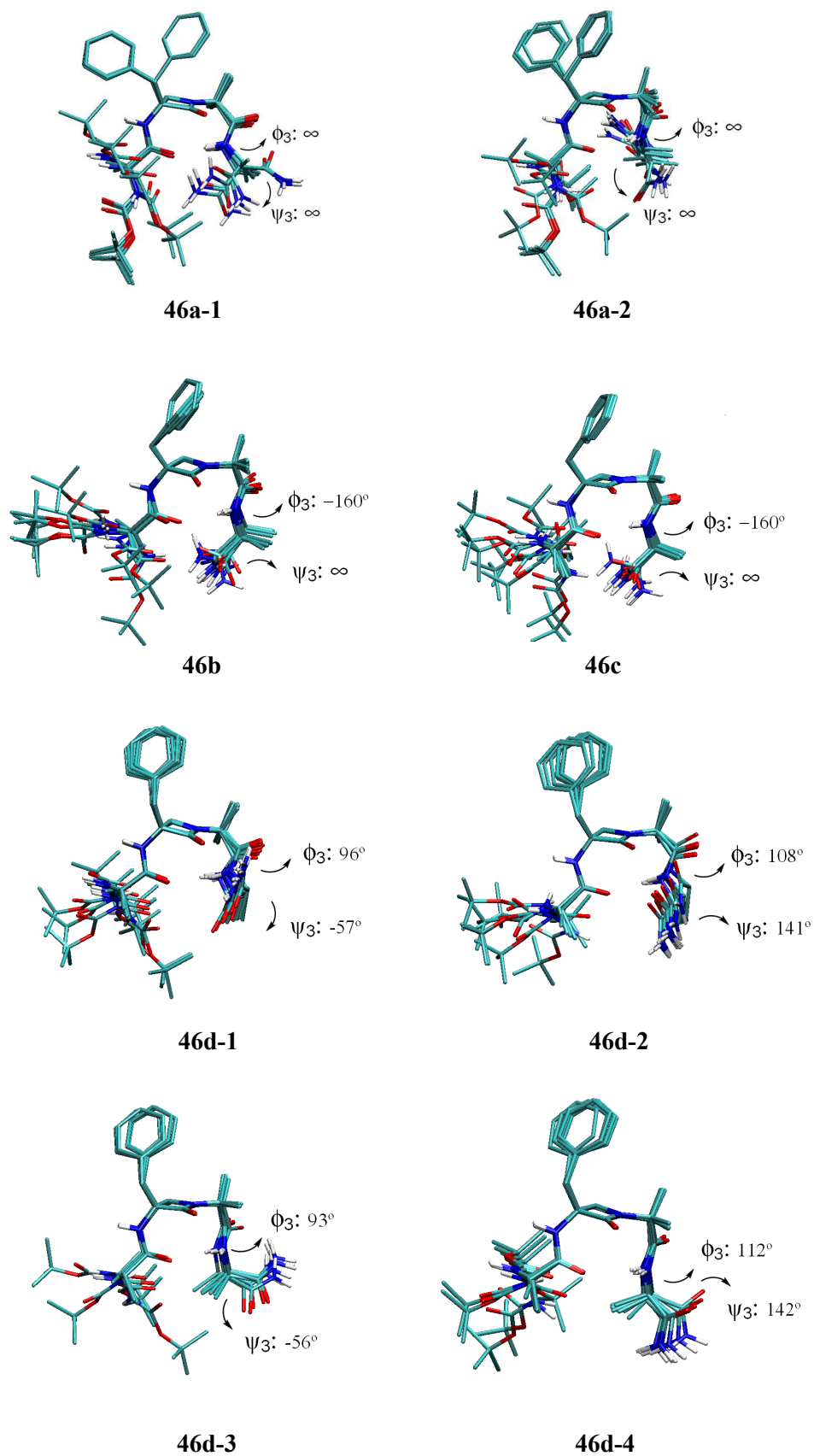


Figura 55: Grupos conformacionales (Clusters) de cada diastereómero **46a-d** incluyendo los valores promedio de los ángulos del residuo ($i+3$). El símbolo ∞ denota la ausencia de restricciones definidas.

Como se observa en la *figura 55*, los compuestos **46b** y **46c** presentaron clusters muy similares, y únicamente mostró una notable movilidad el grupo terminal Boc en las diferentes estructuras encontradas. Por otro lado, las superposiciones **46a-1** y **46a-2** difieren en la disposición de la rama lateral orientada por el ángulo ϕ_2 , que pasa de un valor de 38 a 120°, provocando así una apertura de la cadena (Aib)-Ala-NH₂. Como consecuencia de esta variación, el ángulo μ también se vió afectado, aunque permaneció en un rango aceptable para un giro β , con valores que fueron desde -33.4° hasta 22.4°. Por último, y puesto que los valores de los ángulos diedros pertenecientes a los residuos ($i+1$) e ($i+2$) no permitían diferenciar los clusters **46d-1** del **46d-2**, ni tampoco **46d-3** del **46d-4**, fue preciso extraer los valores de los ángulos diedros ϕ_3 y ψ_3 para cada uno de ellos. Estos valores mostraron que ψ_3 variaba en cada par de clusters como consecuencia de la rotación del grupo CONH₂. En particular, las superposiciones de algunas estructuras de los clusters **46d-1** y **46d-3** (*figura 55*) indicaron una proximidad del protón de amida trans terminal con el oxígeno aceptor del residuo ($i+2$) de su misma cadena que justificaría el valor del coeficiente térmico de -2.16 ppb/K hallado en la deriva térmica del compuesto.

En general, en los peptidomiméticos **46a-d** se hallaron grupos conformacionales homogéneos, observándose en todos los casos un giro β -II. Los grupos bencilo y Boc mostraron una alta movilidad, mientras que los grupos metilo del residuo Aib permanecieron en una disposición aproximadamente fija. Si bien no se pudo apreciar una conformación de horquilla canónica en ninguno de ellos, los compuestos **46b**-(*R,S*) y **46c**-(*S,S*) se mostraron como los mejores candidatos potenciales para estabilizar una conformación de tipo hairpin, al disponer de ángulos diedros ϕ_3 con un valor de, aproximadamente, -160°.

Análisis conformacional mediante dinámicas moleculares

Tras el análisis conformacional de los miméticos **46** por RMN en disolución de DMSO-*d*₆, se consideró oportuno llevar a cabo un estudio adicional mediante dinámica molecular no restringida. Con ello, se pretendía obtener más información acerca de las preferencias conformacionales de dichos compuestos originadas por la quiralidad de los residuos (i) e ($i+3$), al tiempo que se pretendía confirmar la oportunidad de aceptar como restricción el enlace de hidrógeno $_i(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+3}$ aplicado en el estudio precedente de

RMN. Se realizaron dinámicas moleculares utilizando el programa Amber (v.8.0) empleando los campos de fuerzas PARM99 y GAFF simulando una caja explícita de DMSO- d_6 rodeando a cada uno de los compuestos en estudio a 300K de temperatura y 1 atmósfera de presión. Inicialmente se partió de la conformación de giro β , y se sometió cada estructura a ciclos de equilibrado en condiciones adiabáticas registrando las coordenadas del sistema cada picosegundo durante 6 nanosegundos (6000 ps). Los datos ofrecidos por estos experimentos permitieron extrapolar valores para algunas distancias y ángulos pseudodiedros claves.

En este estudio se analizaron las trayectorias de varios parámetros determinantes para la elucidación de la conformación de los análogos. Puesto que se estaba llevando a cabo un estudio de la influencia de la disustitución del $C\alpha'$ y la elongación de las cadenas laterales tanto en la estabilización de giros β como de otras conformaciones más complejas, se tomaron en cuenta los parámetros mostrados en la *figura 56*.

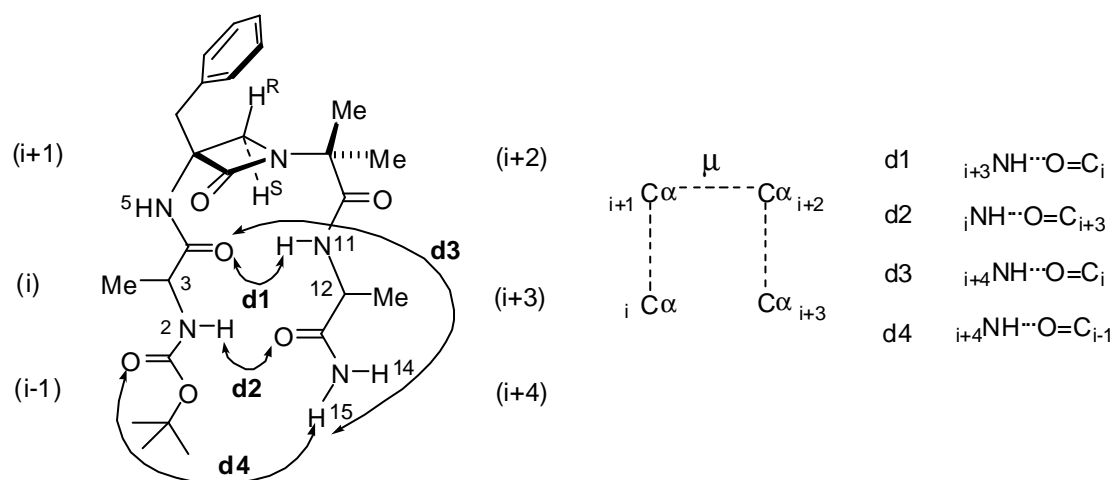


Figura 56: Representación de las distancias d_1, d_2, d_3, d_4 y del ángulo pseudodiedro μ en los miméticos 46a-b.

En la *tabla 18* se recogen los valores extraídos del estudio en las condiciones citadas para las dinámicas moleculares, tomándose como valores los promedios de los diferentes grupos conformacionales observados en cada caso.

Tabla 18: Valores promedio calculados por dinámica molecular para las distancias d_1 - d_4 y el ángulo pseudodiedro μ en los pseudopéptidos **46a-d**.

| Compuesto | d1 (Å) | d2(Å) | d3(Å) | d4(Å) | μ |
|---------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 46a (mayor.) | 2.0 | 6.9 | 1.9 | 7.2 | -30 |
| 46a (minor.) | 2.0 | 7.5 | 3.9 | 9.6 | -30 |
| 46b (mayor.) | 1.9 | 5.1 | 1.9 | 4.1 | -55 |
| 46b (minor.) | 1.9 | 8.4 | 1.9 | 5.9 | -55 |
| 46c | 1.9 | 8.3 | 2.0 | 7.0 | -35 |
| 46d | 2.0 | 8.3 | 1.9 | 6.2 | -40 |

Según los valores de la tabla precedente, los 4 compuestos mantuvieron una conformación β girada del núcleo central de los residuos $(i+1)$ - $(i+2)$ formados por β -Lactam-(Aib), según se deduce de los datos del ángulo pseudodiedro μ (-30-55°, *columna 6*) y de la distancia d_1 entre los residuos (i) e $(i+3)$ (*columna 2*). En resumen, de los datos indicados en la *tabla 18*, se puede deducir que bajo las condiciones de la dinámica la disustitución del Ca' por dos grupos metilo favorece la disposición β girada de todos los pseudopéptidos **46a-d** y que la introducción de dos alaninas homo- o heteroquirales no debilita dicho giro. Este hecho está en buen acuerdo con lo observado experimentalmente por RMN y, más concretamente, con los bajos coeficientes térmicos medidos para el protón amídico H_{11} (ver *tabla 15*, pág 107).

En las *figuras 57-60*, se muestran los diagramas de barras de la distribución de conformaciones para cada uno de los pseudopéptidos.

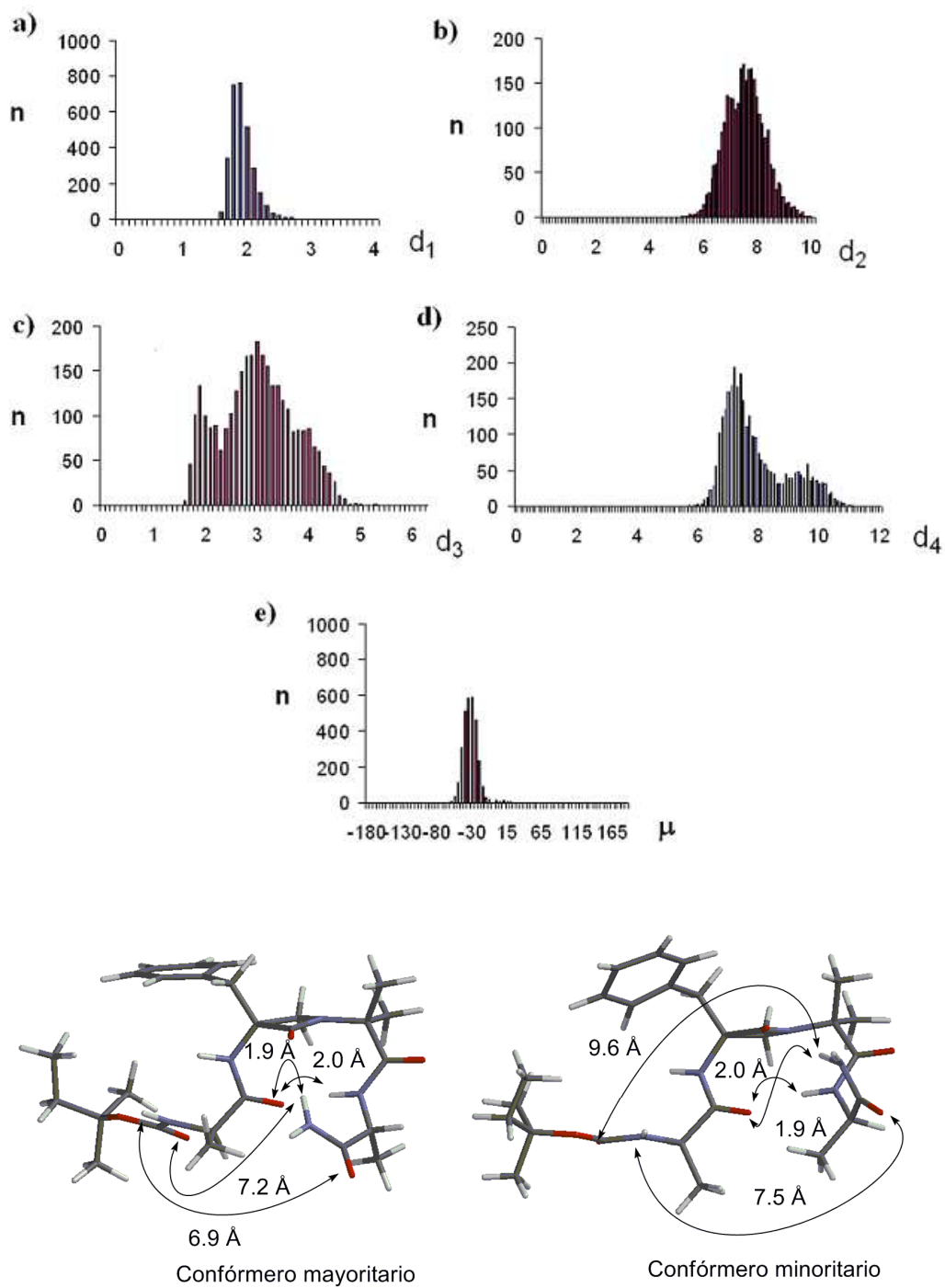


Figura 57: Diagramas de población conformacional (6000 estructuras) del compuesto **46a**-(R,R). a)–d) Distribuciones según las distancias d_1 – d_4 , e) Distribución según el ángulo pseudodiedro μ .

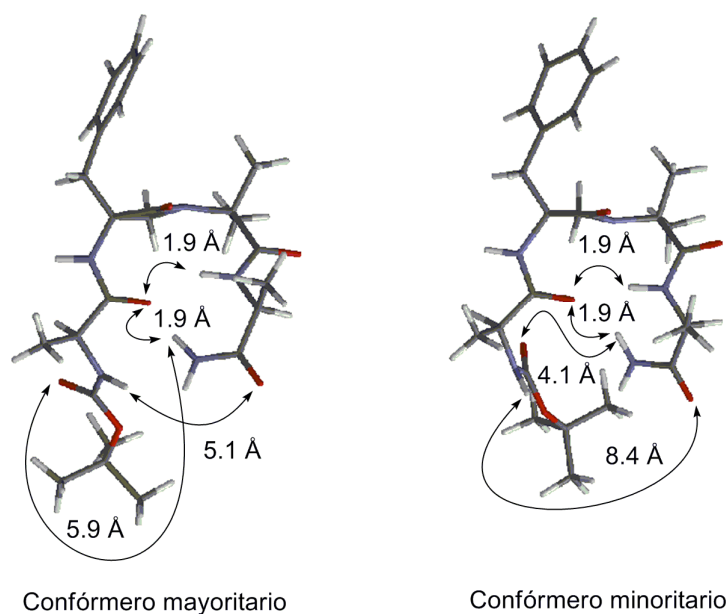
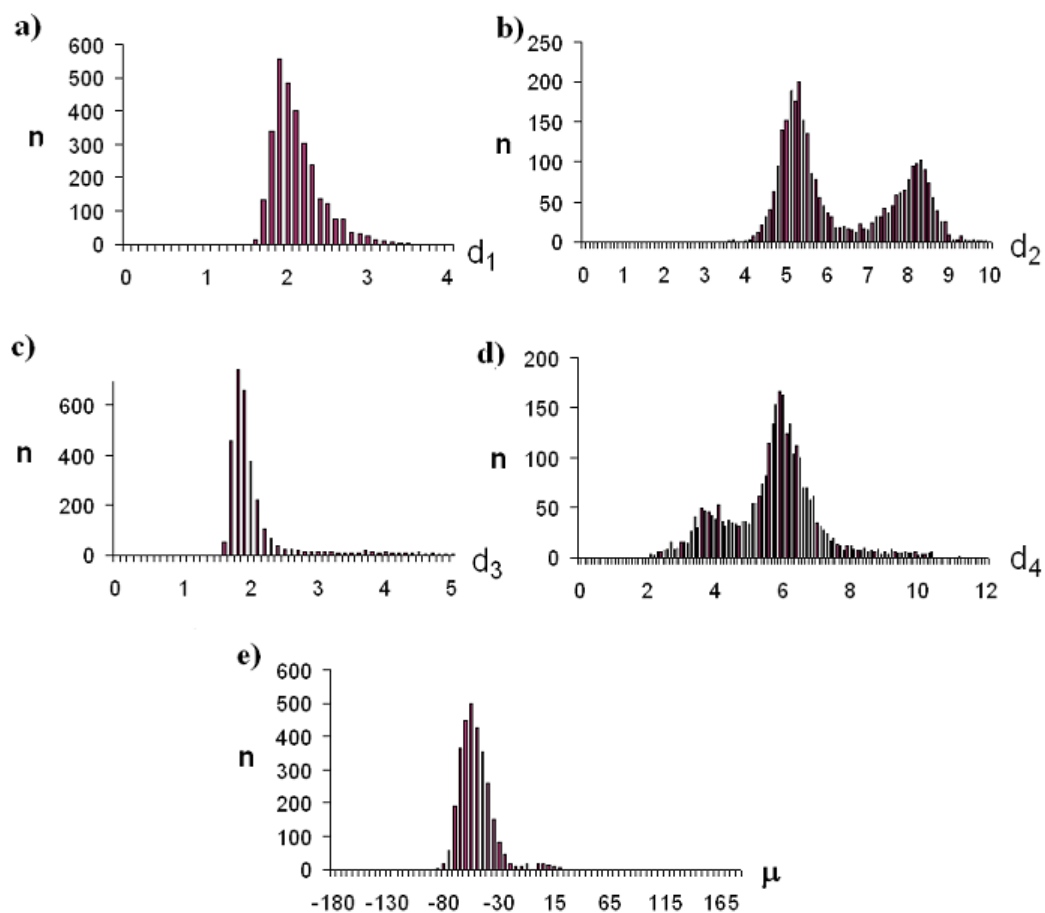


Figura 58: Diagramas de población conformacional (6000 estructuras) del compuesto **46b**-(R,S). a)–d) Distribuciones según las distancias d_1 – d_4 , e) Distribución según el ángulo pseudodiedro μ .

Como ya se ha comentado anteriormente, las poblaciones estudiadas de los pseudopéptidos **46** presentaron una conformación de giro β -II estabilizada por un enlace de hidrógeno $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ según se deduce de las cortas distancias d_1 (1.9-2.0 Å). Sin embargo, en ningún caso se observó un segundo enlace de hidrógeno $_i(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+3}$, puesto que en los 4 análogos, d_2 presentó valores comprendidos entre 5.1 y 8.4 Å. Este hecho también coincide con los valores de los coeficientes térmicos de H_{14} , que fueron superiores a 3 ppb/K en los compuestos **46a-c**, aunque no concuerda con el coeficiente de -2.16 ppb/K hallado para **46d**.

Por otro lado, todos los compuestos **46** presentaron una estructura mayoritaria con un enlace de hidrógeno bifurcado entre los protones amídicos $_{i+3}(\text{NH})$ y $_{i+4}(\text{NH})$ y el carbonilo aceptor $(\text{O}=\text{C})_i$, que explica a su vez las cortas distancias d_1 y d_3 extraídas de las trayectorias de la dinámica (*figuras 57-60*). Esta podría ser la razón del bajo coeficiente térmico presentado por el protón H_{14} de **46d** y también de las cortas distancias H_{11} - H_{14} y H_{11} - H_4 , confirmadas mediante los experimentos de NOE selectivos en DMSO- d_6 (*figura 51*, pág 108).

Atendiendo a los valores promedio extraídos para d_2 y d_4 , se puede afirmar que en ningún caso se halló una conformación de horquilla o *hairpin* canónica. En los compuestos **46a** y **46c-d** se observó una apertura del extremo de la cadena peptídica $^t\text{BuONH-Ala}$, mientras que el compuesto **46b**, aunque mostró en las dos conformaciones halladas las cadenas laterales paralelas, los valores para las distancias d_2 y d_4 resultaron demasiado largas para permitir la formación de un enlace de hidrógeno $_i(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+3}$, tanto en el conformero más poblado ($d_2=5.1\text{Å}$, $d_4=5.9\text{Å}$) como en su estructura menos poblada ($d_2=8.4\text{Å}$, $d_4=4.1\text{Å}$).

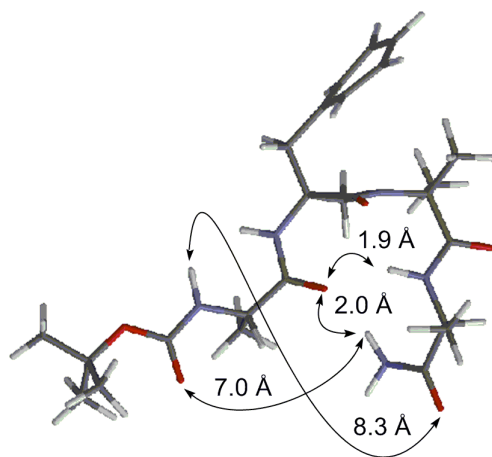
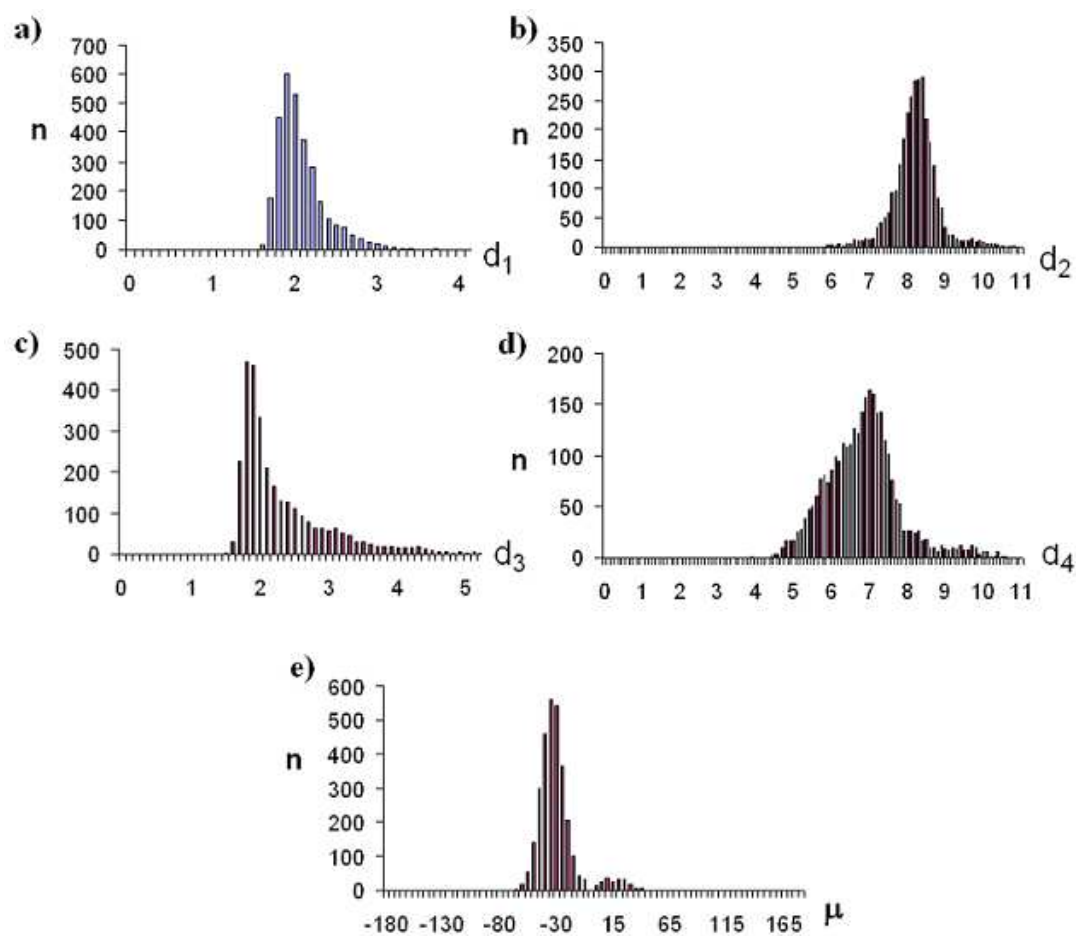


Figura 59: Diagramas de población conformacional (6000 estructuras) del compuesto 46c-(S,S). a)–d) Distribuciones según las distancias d_1 – d_4 , e) Distribución según el ángulo pseudodiedro μ .

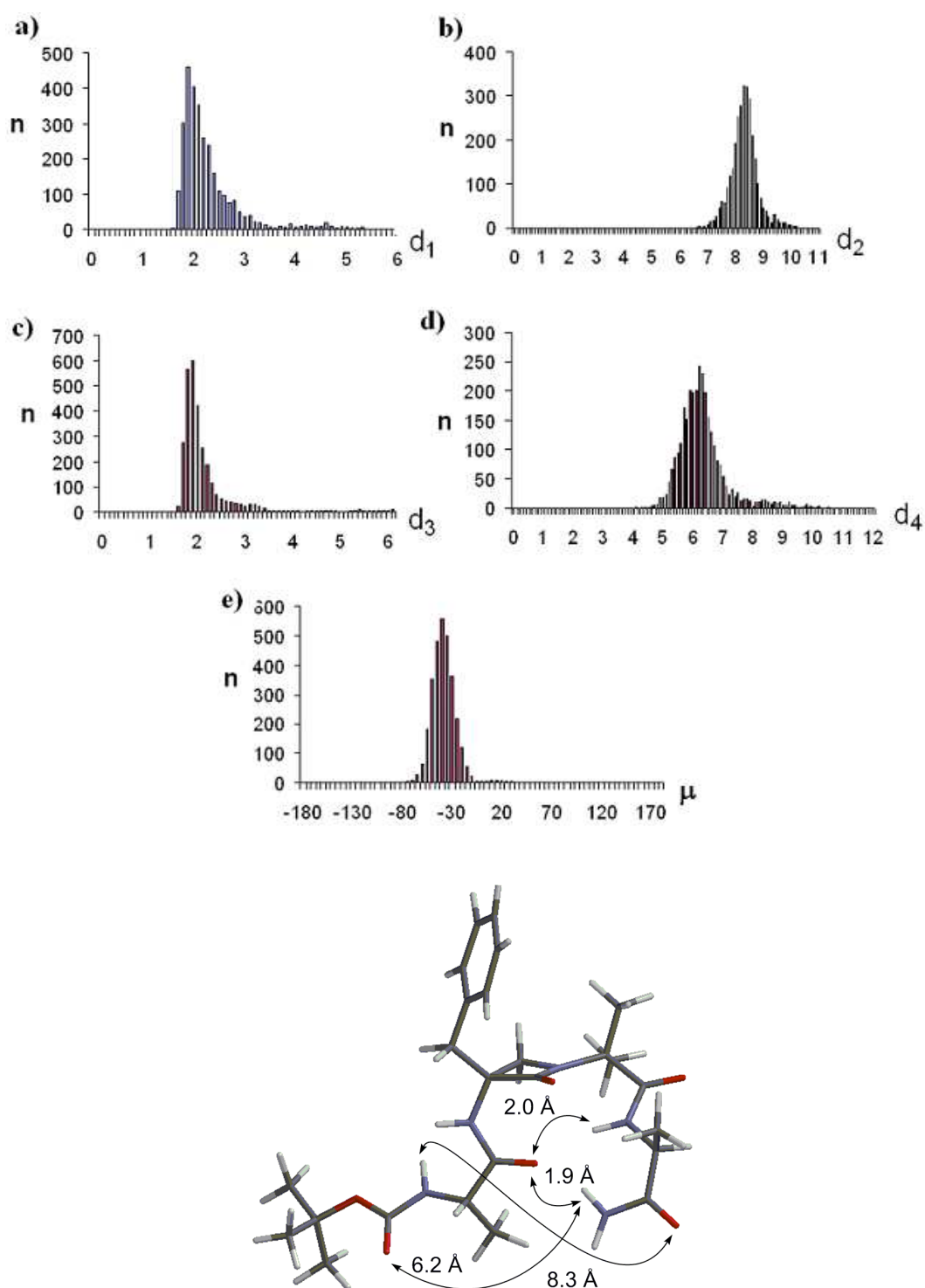


Figura 60: Diagramas de población conformacional (6000 estructuras) del compuesto **46d**-(S,R). a)–d) Distribuciones según las distancias d_1 – d_4 , e) Distribución según el ángulo pseudodiedro μ .

Cristalografía de rayos X

Para completar el estudio estructural de los miméticos **46a-d**, se ensayó su cristalización sistemática, obteniéndose monocristales adecuados de los compuestos **46a** y **46d** por crecimiento en disoluciones de CH₂Cl₂ y MeOH, respectivamente. El análisis cristalográfico de rayos X se llevó a cabo a baja temperatura, constatándose la inclusión en la celda unitaria de una molécula de H₂O para **46a** y una molécula de MeOH para **46d** (figura 61).

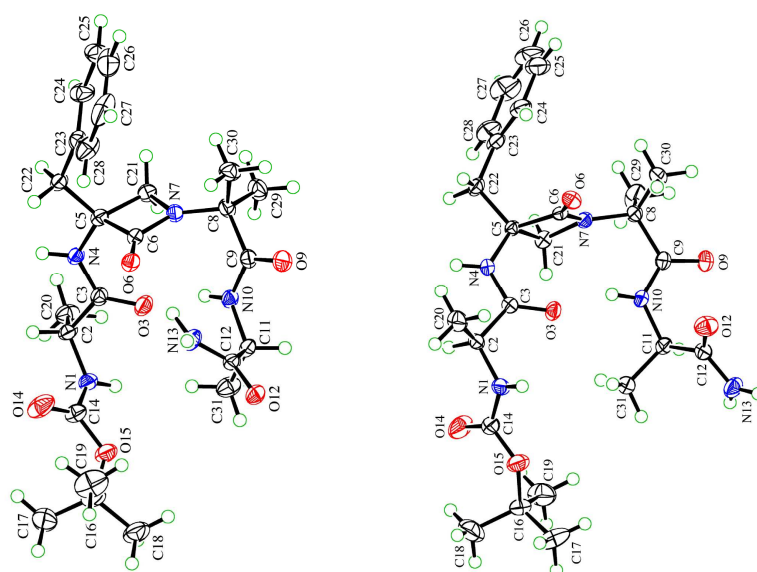


Figura 61: Representación ORTEP de las estructuras de rayos X de **46a**-(*R,R*) y **46d**-(*S,R*.)

Los datos de la *tabla 19* recogen las distancias y ángulos entre los átomos dadores y aceptores involucrados en los enlaces de hidrógeno de **46a**-(*R,R*) y **46d**-(*S,R*). En ambos casos se observó un giro β -II prácticamente canónico, con sendos enlaces de hidrógeno intramoleculares $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ de 2.07 Å (**46a**) y 1.97 Å (**46d**). El resto de los enlaces de hidrógeno correspondió a puentes intermoleculares, exceptuando el enlace $_{i+4}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ de 1.87 Å del compuesto **46a**.

Tabla 19: Datos cristalográficos relativos a los enlaces de hidrógeno de los compuestos **46a** y **46d**.

| n | Comp. | D..H..A ^a | D..H | H..A | D..H..A | D..H..A ^b |
|---|------------|---|------|------|---------|----------------------|
| 1 | 46a | $_i\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+3}$ | 0.89 | 2.17 | 3.04 | 166 |
| 2 | 46a | $_{i+3}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_i$ | 0.85 | 2.07 | 2.90 | 167 |
| 3 | 46a | $_{i+4}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i-1}$ | 1.00 | 2.15 | 3.07 | 154 |
| 4 | 46a | $_{i+4}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+1}$ | 0.99 | 1.87 | 2.85 | 168 |
| 5 | 46d | $_i\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+2}$ | 0.82 | 2.13 | 2.92 | 163 |
| 6 | 46d | $_{i+3}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_i$ | 0.92 | 1.97 | 2.85 | 159 |
| 7 | 46d | $_{i+4}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i+1}$ | 0.89 | 2.07 | 2.90 | 156 |
| 8 | 46d | $_{i+4}\text{N}--\text{H}--\text{O}=\text{C}_{i-1}$ | 0.87 | 2.07 | 2.93 | 173 |

^a D=dador; A=aceptor, distancias en Å. ^b Ángulo O-H-N en grados

Es preciso señalar que la estructura del compuesto **46a** presenta una característica singular en compuestos peptídicos: la imbricación de dos giros β que comparten tres residuos comunes: $(i+1)$, $(i+2)$ e $(i+3)$.

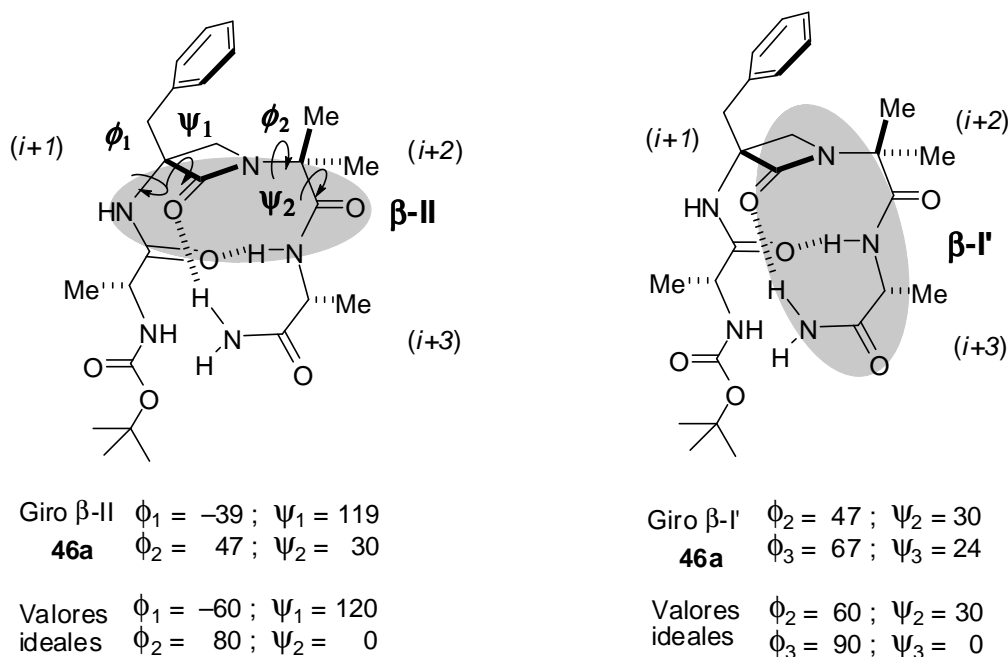


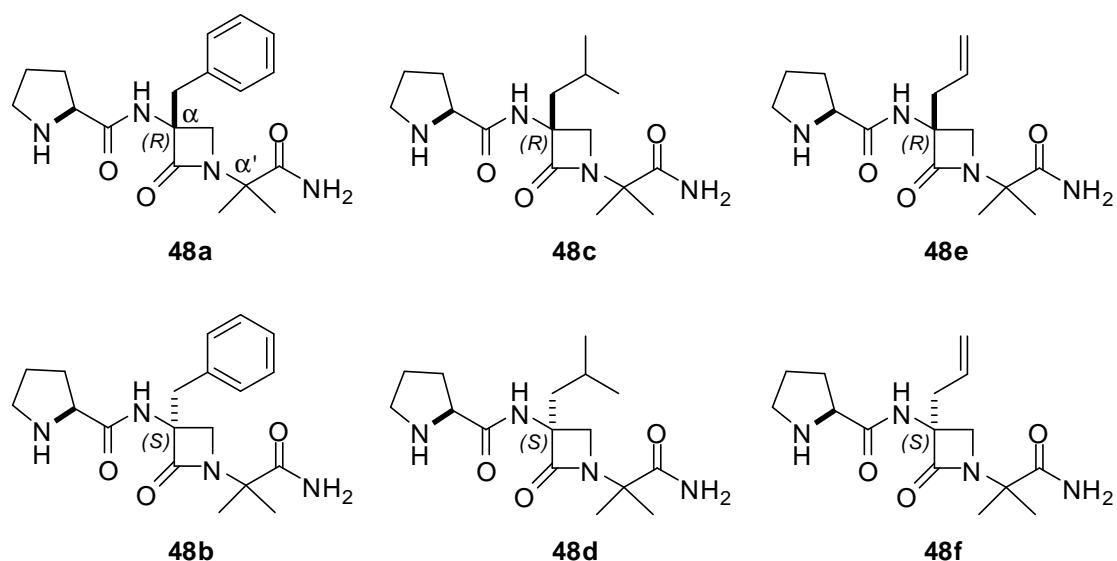
Figura 62: Representación de los dos enlaces imbricados de **46a**. Izquierda: giro β -II. Derecha: giro β -I'. Se indican los valores experimentales y teóricos de los ángulos diedros implicados. Los fragmentos $(i+1)$, $(i+2)$ e $(i+3)$ participan en los dos giros.

Tal y como se muestra en la *figura 62*, los residuos (D-Ala)-(β-Lactam)-(Aib)-(D-Ala) conforman un primer giro β de tipo II (indicado con un sombreado en la figura izquierda) cuyos ángulos diedros se encuentran distorsionados unos 30° con respecto de los valores ideales. Además, los residuos (β-Lactam)-(Aib)-(D-Ala)-NH₂ de la misma molécula participan en otro pseudociclo de diez miembros que corresponde a un giro β de tipo I' distorsionado en unos 20° respecto de los valores ideales (sombreado en la figura derecha).

Las estructuras cristalográficas del compuesto homoquiral **46a**-(*R,R*) y del heteroquiral **46d**-(*S,R*) confirman que este tipo de pseudopéptidos β-lactámicos posee conformaciones similares en estado sólido y en disolución, y que ambos tipos de conformaciones contienen giros β-II muy estables. Asimismo, ponen de manifiesto la incapacidad de las β-lactamas para inducir enlaces de hidrógeno secundarios asociables a estructuras de tipo horquilla (*hairpin*) en peptidomiméticos con cadenas laterales relativamente cortas. Por último, demuestran que la configuración relativa de los restos (*i*) e (*i*+3) juega un papel importante a la hora de definir las poblaciones conformacionales de los pseudopéptidos β-lactámicos.

3.6 Síntesis, análisis conformacional y evaluación biológica de los análogos β -lactámicos de la melanostatina (PLG).

Una vez concluidos los estudios relativos al comportamiento conformacional de los péptidos β -lactámicos modelo, se abordaron los *objetivos 4 y 5* de nuestro trabajo (*pag. 45*) consistentes en la síntesis, análisis conformacional y estudio biológico de nuevos análogos β -lactámicos de PLG. Los pseudopéptidos propuestos para ello se muestran a continuación,



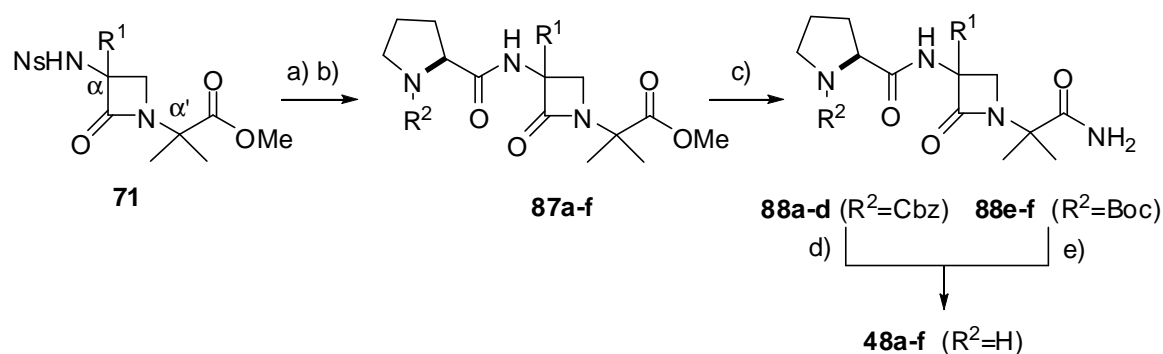
Se seleccionaron tres parejas de diastereómeros en las que se varió el sustituyente del carbono β -lactámico $C\alpha$, así como su configuración. De esta manera, se pretendió estudiar el efecto de la quiralidad del residuo β -lactámico sobre la interacción con el centro activo a través de la evaluación de la actividad biológica de los pseudopéptidos. Como grupos de reconocimiento se escogieron el bencilo, por similitud con el análogo más activo conocido hasta el momento (compuesto **20**, *figura 23, pág 31*), el grupo *iso*-butilo presente en la PLG y, finalmente, el grupo alilo que es semejante en tamaño al grupo isobutilo, pero con una mayor densidad electrónica debido al doble enlace $C=C$.

A la hora de definir el diseño general de los miméticos **48a-f** se tuvieron en cuenta los siguientes factores: a) su conformación, previsiblemente β -girada a causa de la presencia del segmento (β -Lactam)-(Aib)- y, b) su probable inercia hidrolítica, favorecida por la disustitución tanto en la posición α del anillo β -lactámico como en la posición α' del resto de Aib.

3.6.1 Síntesis de análogos β -lactámicos de PLG α,α' -tetrasustituídos

La síntesis de los miméticos **48** se llevó a cabo a partir de las α -nosilamino- β -lactamas **71**, que fueron preparadas como enantiómeros *R* y *S* siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.1.2 (ver *tabla 4*, *pag. 52*).

Tabla 20: Síntesis de análogos de PLG 48a-f a partir de los moldes β -lactámicos 71



Reactivos y condiciones: a) PhSH (5 eq.), K_2CO_3 (4 eq.), MeCN, t.a., 2h. b) R^2 -Pro-OH, BOP-Cl (2.6 eq.), Et_3N (3.9 eq.), CH_2Cl_2 , 0°C -t.a., 16h. c) $\text{NH}_3(\text{g})$, MeOH, t.a., 3-10 d., d) H_2 , Pd/C, MeOH, t.a., 2h. e) HCO_2H (exc.), t.a., 2h.

| n | R^1 | R^2 | Config. α | Prod. | Rdto(%) | Prod. | Rdto(%) | Prod. | Rdto(%) |
|---|-----------------|-------|------------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| 1 | Bn | Cbz | (<i>R</i>) | 87a | 80 | 88a | 64 | 48a | 93 |
| 2 | Bn | Cbz | (<i>S</i>) | 87b | 82 | 88b | 70 | 48b | 95 |
| 3 | ⁱ Bu | Cbz | (<i>R</i>) | 87c | 60 | 88c | 67 | 48c | 100 |
| 4 | ⁱ Bu | Cbz | (<i>S</i>) | 87d | 56 | 88d | 65 | 48d | 100 |
| 5 | Alilo | Boc | (<i>R</i>) | 87e | 91 | 88e | 80 | 48e | 100 |
| 6 | Alilo | Boc | (<i>S</i>) | 87f | 92 | 88f | 90 | 48f | 100 |

En primer lugar, se llevó a cabo la sustitución del grupo nosilo por la N-Cbz-prolina (*entradas 1-4*, *tabla 20*) o por la N-Boc-prolina (*entradas 5-6*) dependiendo de la naturaleza del sustituyente R^1 . Para ello, las β -lactamas **71** se desnosilaron siguiendo el procedimiento habitual (PhSH/ K_2CO_3) y las α -amino- β -lactamas intermedias resultantes se

acoplaron con las correspondientes prolinas N-protegidas empleando cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfonilo (BOP-Cl)⁸⁶ como agente activante. Los rendimientos globales de estas reacciones oscilaron entre el 56 y el 92%. Posteriormente, se trataron los ésteres β -lactámicos **87** con una disolución saturada de amoníaco en metanol para obtener las amidas pseudopeptídicas **88** con rendimientos entre moderados y buenos (64-90%). La eliminación del grupo protector (R^2) del residuo de prolina requirió de condiciones diferentes en función de su naturaleza. Así, se empleó una hidrogenación catalítica (Pd/C) a presión atmosférica para obtener los análogos **48a-d**, mientras que la eliminación del grupo Boc se realizó con ácido fórmico, dando lugar a los compuestos **48e-f** con rendimientos casi cuantitativos. Todos ellos fueron utilizados sin posterior purificación tanto en los estudios conformacionales como en los ensayos biológicos.

3.6.2 *Análisis conformacional de pseudopéptidos β -lactámicos análogos de PLG.*

Con anterioridad al estudio conformacional de los nuevos miméticos β -lactámicos, A. Benito había demostrado en nuestro laboratorio que el análogo **28** (*figura 63*) adopta una conformación de giro β -II en disolución de DMSO- d_6 y que dispone de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el protón amídico terminal H_{trans} y el carbonilo de la prolina. Además, los estudios de RMN revelaron la existencia de un segundo enlace de hidrógeno formado entre el nitrógeno amínico de la prolina y el protón amídico H_β .

Teniendo estos resultados como antecedente, los miméticos **48a-f** se sometieron a análisis estructural por RMN en disolución con el objetivo de definir sus conformaciones más estables y determinar cuáles pudieran estar asociadas a una mayor actividad biológica. En primer lugar, se realizaron las derivas térmicas para detectar la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares y, seguidamente, se registraron espectros NOESY y ROESY para determinar las distancias interprotónicas relevantes. A fin de resaltar mejor las diferencias conformacionales debidas a la naturaleza del sustituyente (Bn, i Bu o Alilo) y a la configuración del estereocentro β -lactámico C_α , cada una de las parejas de diastereómeros fue estudiada por separado.

⁸⁶ a) Diago-Meseguer, J.; Palomo-Coll, A.L.; Fernández-Lizarbe, J.R.; Zugaza-Bilbao, A. *Synthesis* **1980**, 7, 547-551. b) Baker, R.; Castro, J.L. *Chem. Commun.* **1989**, 378-381. b) Ahn, H.C.; Yun, S.; Choi, K. *Chem. Lett.* **2008**, 37, 10-11.

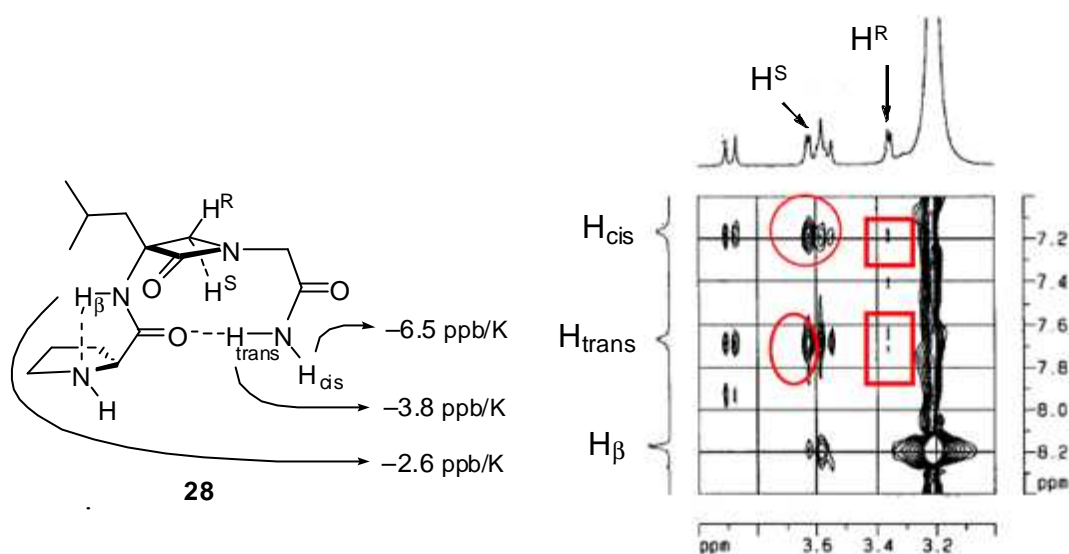


Figura 63: Conformación (giro β -II) del análogo **28** en disolución de DMSO- d_6 , incluyendo los coeficientes térmicos de los protones amídicos. En la ampliación del espectro ROESY se muestran con un círculo rojo las intensas señales de cruce H^S/H_{trans} y H^S/H_{cis} , mientras que con un recuadro se enmarcan las débiles señales de cruce con H^R .

Medida de los coeficientes térmicos $[\Delta\delta(NH)/\Delta T]$

Siguiendo el procedimiento habitual, se midieron los desplazamientos químicos de los protones de amida (H_8 , H_{15} y H_{16}) en un intervalo de temperaturas comprendido entre 300-325K.

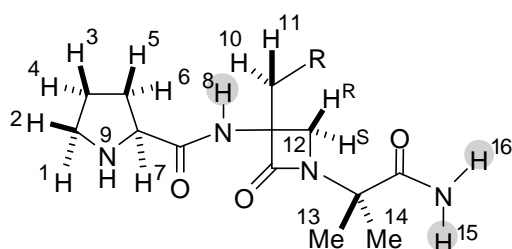


Figura 64: Asignación numérica de los protones del esqueleto de los análogos **48a-f**.

El disolvente utilizado fue DMSO- d_6 y las medidas se efectuaron a concentraciones que oscilaron entre 4.5 mM y 15 mM, verificando la ausencia de deriva por dilución. De

manera general, los protones fueron numerados en todos los análogos estudiados según se indica en la *figura 64*.

*Tabla 21: Desplazamientos químicos(δ) y coeficientes térmicos ($\Delta\delta/\Delta T$) en DMSO- d_6 de los protones amídicos H_8 , H_{15} y H_{16} para los compuestos **48a-f**.*

| Comp. | R | Config. α | δ (ppm) | | | $\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) ^a | | |
|------------|--------------------|------------------|----------------|----------|----------|--|----------|----------|
| | | | H_8 | H_{15} | H_{16} | H_8 | H_{15} | H_{16} |
| 48a | Ph | (R) | 9.12 | 7.22 | 7.20 | -4.6 | -2.7 | -6.7 |
| 48b | Ph | (S) | 8.70 | 7.42 | 7.11 | -3.8 | -2.6 | -6.4 |
| 48c | CHMe ₂ | (R) | 8.23 | 7.97 | 7.21 | -2.8 | -4.2 | -6.9 |
| 48d | CHMe ₂ | (S) | 8.17 | 7.92 | 7.15 | -2.5 | -3.9 | -6.4 |
| 48e | CH=CH ₂ | (R) | 8.17 | 7.91 | 7.23 | -2.5 | -3.5 | -5.7 |
| 48f | CH=CH ₂ | (S) | 8.15 | 7.89 | 7.06 | -2.5 | -3.2 | -6.0 |

^a Los protones amídicos H_8 , H_{15} y H_{16} se sometieron a deriva térmica en un rango de temperaturas de 300-325K.

En la tabla precedente se muestran los valores de los desplazamientos químicos y coeficientes térmicos de las amidas señaladas en la *figura 64*. En función de estos parámetros, fue posible asignar provisionalmente cada pareja de análogos a una de las tres estructuras β -giradas (**A**, **B** ó **C**) representadas en la *figura 65*. De esta manera, la conformación de la *figura 65A*, que contiene un enlace de hidrógeno intramolecular $_{i+3}(\underline{\text{NH}})-(\underline{\text{O}}=\text{C})_i$, podría ser la preferida por los diastereómeros **48a-b**; la estructura de la *figura 65B*, con un enlace de hidrógeno $_{i+1}(\underline{\text{NH}})-(\underline{\text{NH}})_i$, sería la conformación de **48c-d**, y por último los análogos alílicos **48e-f** estarían dispuestos en un giro β como el que se indica en la *figura 65C*, que contiene un enlace de hidrógeno $_{i+1}(\underline{\text{NH}})-(\underline{\text{NH}})_i$ y una interacción débil $_{i+3}(\underline{\text{NH}})-(\underline{\text{O}}=\text{C})_i$. Aunque en la *figura 65* se representan únicamente los isómeros de configuración (R) en el estereocentro Ca del anillo β -lactámico, los homólogos de configuración (S) muestran coeficientes térmicos similares, por lo que se asumió que los enlaces de hidrógeno también podrían serlo. Para confirmar este extremo, se llevó a cabo un análisis de grupos conformacionales por *simulated annealing*.

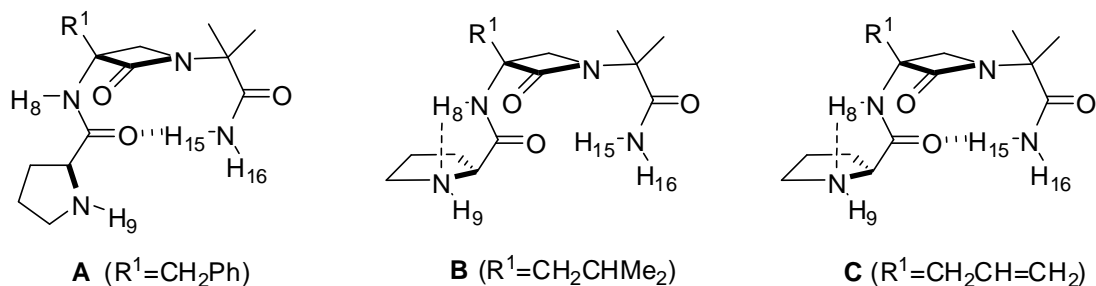


Figura 65: Representación de los sistemas de enlaces de hidrógeno de los análogos **48a-f** deducidos a partir de los coeficientes térmicos de la tabla 21.

Determinación de distancias interprotónicas por espectroscopia de RMN

Las distancias interprotónicas se determinaron en todos los análogos **48a-f** a partir de experimentos ROESY registrados en DMSO- d_6 a concentraciones que oscilaron entre 4.9 mM y 11 mM. Previamente, se realizó la asignación completa de todos los protones. A modo de ejemplo, en la *figura 66* se muestra el espectro ^1H -RMN del compuesto **48c**, con los protones pro*R* y pro*S* claramente diferenciados.

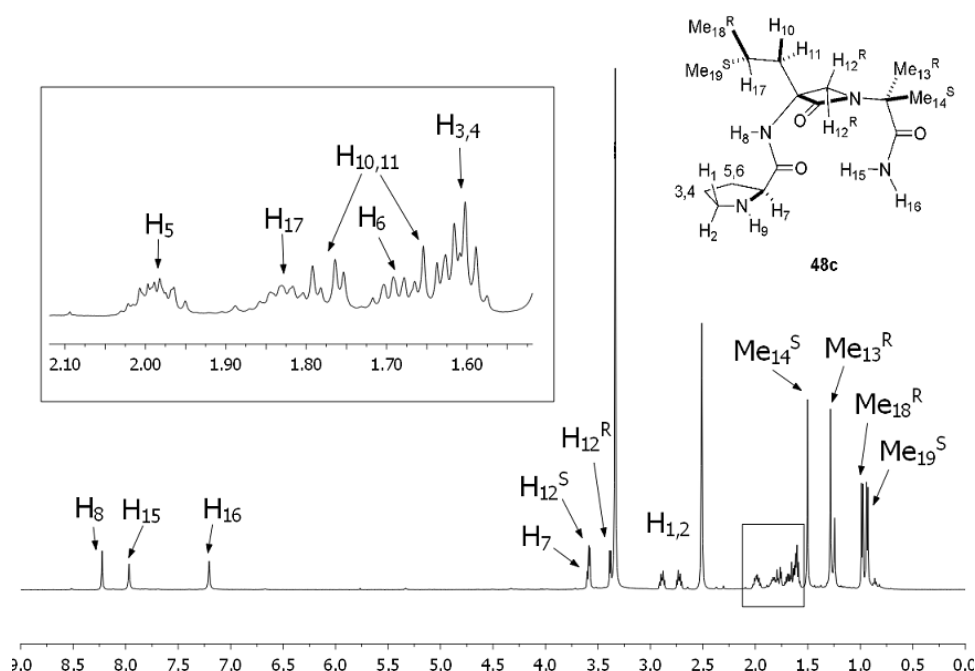


Figura 66: Espectro de ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) del análogo **48c**.

Las amidas H_8 , H_{15} y H_{16} mostraron desplazamientos superiores a 7 ppm, mientras que el protón de amina H_9 no resultó visible. La zona ampliada entre 1.5 y 2.1 ppm recoge la mayor parte de los protones de la prolina, así como algunos pertenecientes al grupo *iso*-butilo. Estas características espectroscópicas resultaron ser similares en el resto de los análogos de PLG estudiados.

Tal y como se ha mencionado más arriba, cada pareja de diastereómeros se estudió por separado para establecer de manera más precisa el efecto del sustituyente R^1 y la configuración del estereocentro Ca sobre el comportamiento conformacional de cada análogo.

Distancias interprotónicas de los análogos bencílicos 48a y 48b

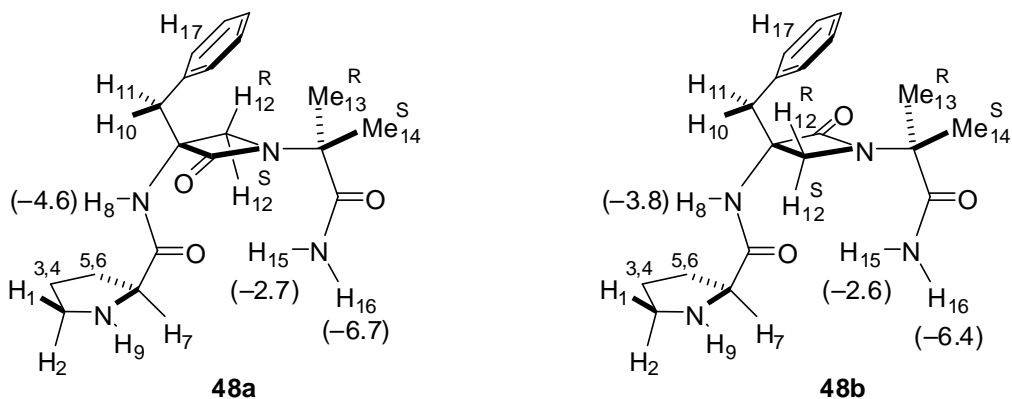


Figura 67: Designación de los protones de los análogos **48a** y **48b**. Entre paréntesis se indican los coeficientes térmicos de los protones amídicos (ppb/K).

Para los compuestos **48a** y **48b** la distinción de los protones pro R y pro S se realizó fácilmente a partir de los espectros ROESY. En la *figura 66* se presentan ampliaciones de los espectros en el que aparecen señales de cruce de H_{12}^R y H_{12}^S con los protones aromáticos H_{17} (*columna izquierda*). En el fragmento correspondiente al análogo **48b** se observa una mayor intensidad de la señal de cruce H_{12}^R/H_{17} frente a la presentada por H_{12}^S/H_{17} , a la vez que H_{15} muestra una señal de baja intensidad con H_{12}^S . Sin embargo, esta distinción no resultó obvia para el análogo **48a** (*figura 68*), ya que las señales de cruce entre H_{12}^S y H_{12}^R y los protones H_{17} y H_{15} resultaron ser de la misma intensidad. Ambas

observaciones sugirieron la existencia de un equilibrio en el que coexisten dos conformaciones diferentes en disolución.

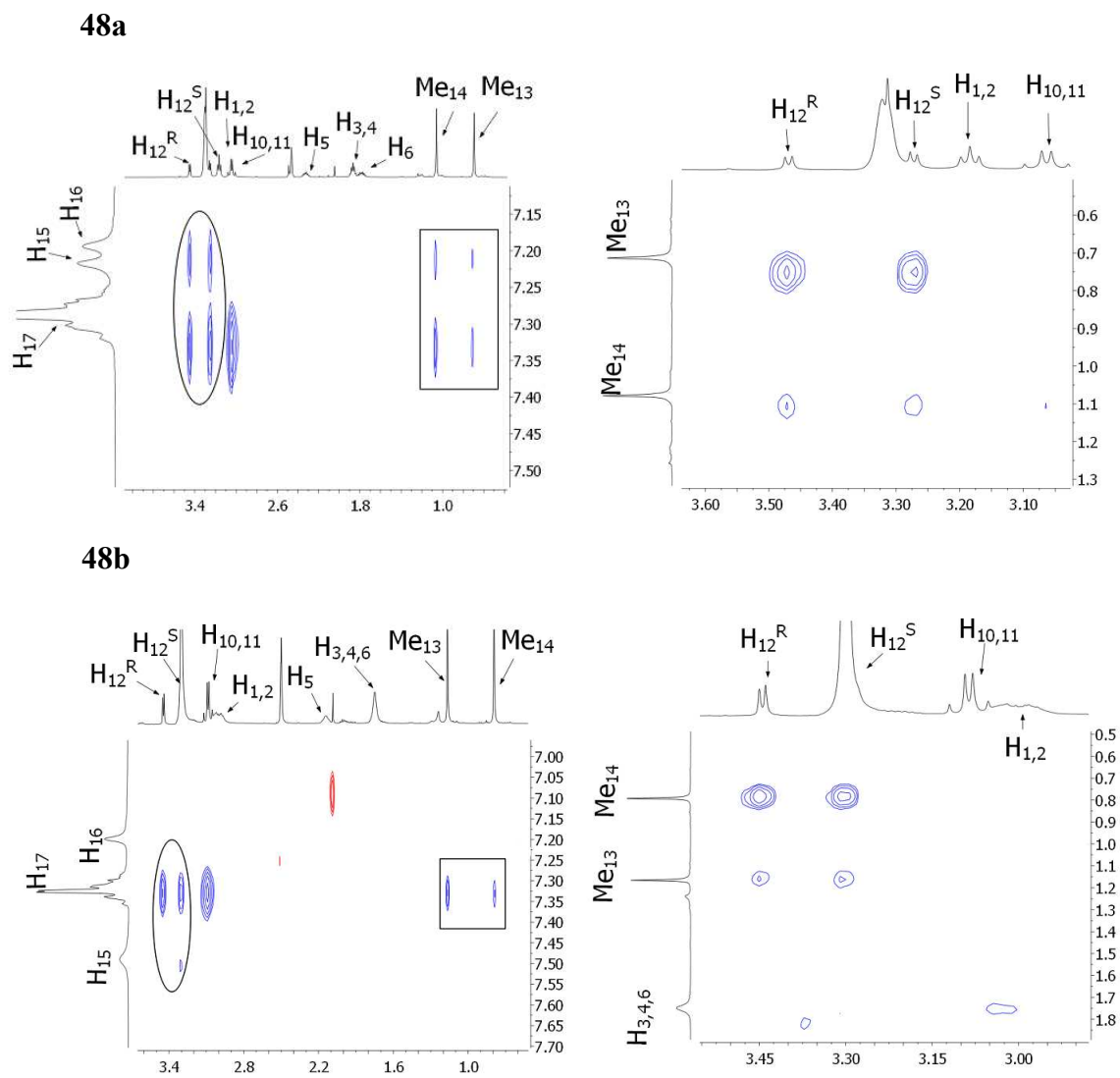


Figura 68: Ampliaciones de espectros ROESY de los compuestos **48a** y **48b**. En la columna de la izquierda se muestran las señales de cruce que permitieron distinguir H_{12}^R de H_{12}^S , y en la columna derecha aquellas que distinguen Me_{13}^R de Me_{14}^S .

En las *tablas* 22 y 23 se recogen las distancias interprotónicas más relevantes obtenidas por integración de los espectros ROESY de los análogos **48a** y **48b**.

Tabla 22: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo **48a**.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|----------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| 1 | Me ₁₃ ^R | 0.76 | Me ₁₄ ^S | 1.11 | 2.53 (ref.) |
| 2 | H ₈ | 9.14 | H ₇ | 4.23 | 3.03 |
| 3 | H ₈ | 9.14 | H ₅ | 2.37 | 3.46 |
| 4 | H ₁₇ | 7.33 | H ₁₂ ^R | 3.50 | 3.17 |
| 5 | H ₁₇ | 7.33 | H ₁₂ ^S | 3.30 | 3.08 |
| 6 | H ₁₇ | 7.33 | Me ₁₄ ^S | 1.11 | 3.52 |
| 7 | H ₁₇ | 7.33 | Me ₁₃ ^R | 0.76 | 4.02 |
| 8 | H ₁₅ | 7.21 | H ₁₂ ^S | 3.30 | 3.48 |
| 9 | H ₁₅ | 7.21 | H ₁₂ ^R | 3.50 | 3.52 |
| 10 | H ₁₅ | 7.21 | Me ₁₄ ^S | 1.11 | 4.82 |
| 11 | H ₁₂ ^S | 3.30 | H ₇ | 3.29 | 3.34 |
| 12 | H ₁₂ ^R | 3.50 | Me ₁₄ ^S | 1.11 | 3.83 |
| 13 | H ₁₂ ^R | 3.50 | Me ₁₃ ^R | 0.76 | 2.77 |

Tabla 23: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo **48b**.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| 1 | Me ₁₄ ^S | 0.74 | Me ₁₃ ^R | 1.12 | 2.53 (ref.) |
| 2 | H ₁₇ ^{orto} | 7.33 | Me ₁₃ ^R | 1.12 | 3.68 |
| 3 | H ₁₇ ^{orto} | 7.33 | Me ₁₄ ^S | 0.74 | 4.21 |
| 4 | H ₁₂ ^R | 3.42 | Me ₁₄ ^S | 0.74 | 3.27 |
| 5 | H ₁₂ ^S | 3.26 | Me ₁₄ ^S | 0.74 | 2.83 |
| 6 | H ₁₂ ^S | 3.26 | H ₁₅ | 7.51 | 4.41 |

Como ya se ha comentado, el análogo **48a** presentó dos conformaciones principales. Una de ellas vino definida por la distancia clave H₁₅-H₁₂^S de 3.48 Å (ROE 8,

tabla 22), así como por el coeficiente térmico de -2.7 ppb/K medido para H₁₅ (tabla 21). Ambos datos son consistentes con una conformación en la que la rama lateral Aib-NH₂ está orientada bajo el plano de la β-lactama formando un giro β-II. Por otro lado, se pudo atribuir la distancia H₁₅-H₁₂^R (3.52 Å, ROE 9) a una conformación alternativa cuya rama Aib-NH₂ estuviera extendida.

El análogo **48b** mostró menos señales de cruce (ver ROESY en el *anexo B*). Al contrario que su diastereómero, este compuesto presentó un conjunto de distancias interprotónicas coherentes con una única conformación. No obstante, el valor medido para la distancia H₁₅-H₁₂^S (4.41 Å, ROE 6) resultó ser mayor del esperado para un giro β canónico, conformación apoyada por el bajo coeficiente térmico de H₁₅ (-2.65 ppb/K, *tabla 21*). Una posible explicación de este hecho fue el solapamiento de la señal de H₁₂^S con el H₂O (*figura 68*) que pudo interferir su integración provocando una disminución en la intensidad de la señal esperada.

Distancias interprotónicas de los análogos de isobutilo 48c y 48d

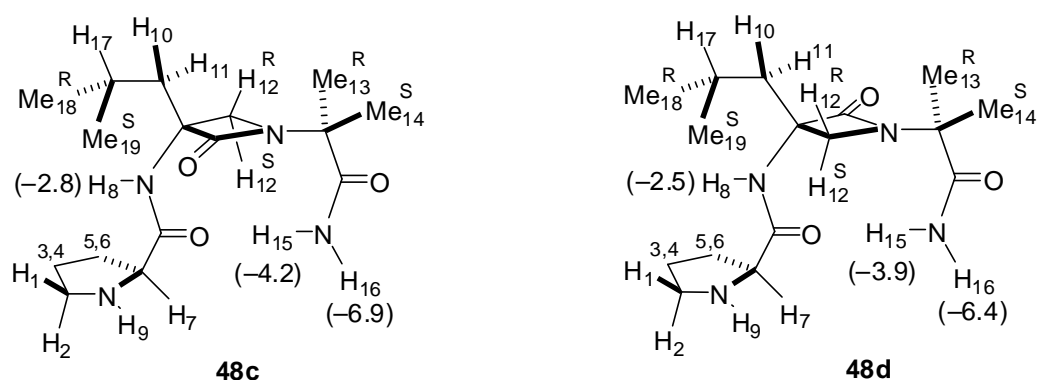


Figura 69: Designación de los protones de los análogos 48c y 48d. Los valores entre paréntesis corresponden a los coeficientes térmicos de los protones amídicos (ppb/K).

Utilizando la metodología habitual, se asignaron los protones de los análogos portadores de un grupo isobutilo **48c** y **48d** tal y como se indica en la *figura 69*. En esta ocasión los protones β-lactámicos fueron fácilmente identificables, ya que en ambos análogos H₁₂^R mostró señal de cruce de mayor intensidad con uno de los grupos metilo contenidos en el sustituyente ⁱBu (*figura 70, columna derecha*). Además, la presencia de una señal H₁₂^S/H₁₅ (resaltada con un círculo en la *figura 70, columna izquierda*) confirma

la orientación de la rama lateral Aib-NH₂ hacia la parte inferior al anillo. Una vez asignados H₁₂^R y H₁₂^S, pudieron distinguirse Me₁₃^R y Me₁₄^S por proximidad a H₁₂^S. Otro aspecto a resaltar es la diferencia de orientación de la prolina en los dos compuestos, ya que en **48d** se da una proximidad de algunos protones del ciclo (H₁, H₆) con H₈ que no se observa en **48c** (figura 70, columna izquierda).

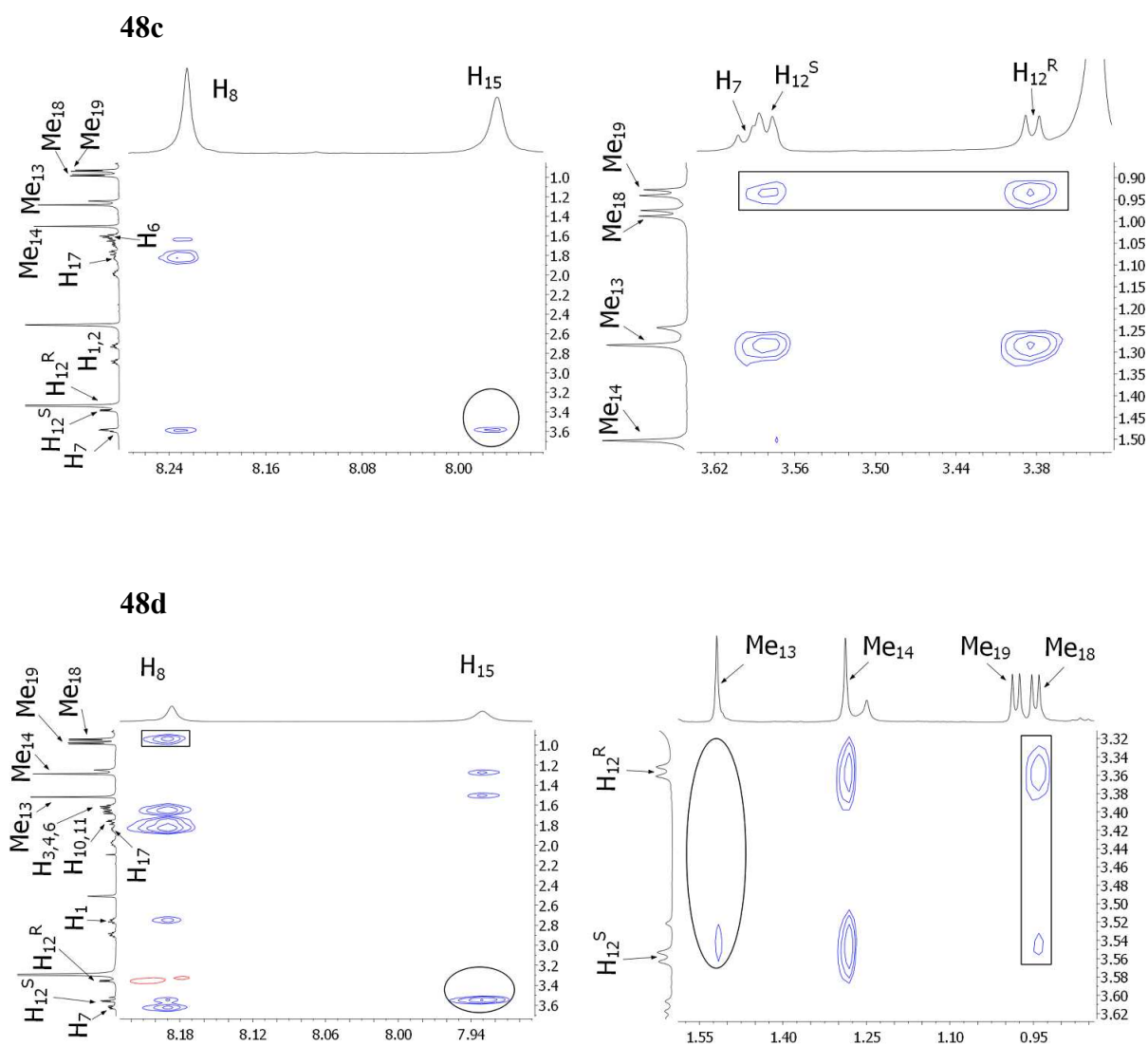


Figura 70: Ampliación de los espectros ROESY de los compuestos **48c** y **48d**. Se han remarcado las señales relevantes para la identificación de los protones H₁₂^R, H₁₂^S, Me₁₃, Me₁₄, Me₁₈ y Me₁₉.

En las *tablas 24 y 25* se muestran las distancias obtenidas por integración del espectro ROESY de los análogos **48c** y **48d**, respectivamente.

Tabla 24: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo 48c.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|-----------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| 1 | H ₁₂ ^S | 3.58 | H ₁₂ ^R | 3.38 | 1.80 (ref.) |
| 2 | H ₈ | 8.22 | H ₁₀ | 1.63 | 2.77 |
| 3 | H ₈ | 8.22 | H ₁₇ | 1.82 | 2.32 |
| 4 | H ₈ | 8.22 | H ₇ | 3.59 | 2.91 |
| 5 | H ₁₅ | 7.93 | H ₁₂ ^S | 3.58 | 2.81 |
| 6 | H ₇ | 3.59 | H ₁₂ ^S | 3.58 | 3.79 |
| 7 | H ₁₂ ^S | 3.58 | Me ₁₉ ^S | 0.94 | 3.57 |
| 8 | H ₁₂ ^R | 3.37 | Me ₁₉ ^S | 0.94 | 2.59 |
| 9 | Me ₁₃ ^R | 1.28 | H ₁₂ ^S | 3.58 | 2.82 |
| 10 | Me ₁₃ ^R | 1.28 | H ₁₂ ^R | 3.37 | 2.47 |

En ambos casos, el protón amídico terminal H₁₅ se encuentra a una corta distancia de H₁₂^S (2.81 y 2.23 Å, respectivamente), indicando una vez más la ubicación preferente de la cadena lateral en la parte inferior al anillo β-lactámico. En este sentido, la proximidad de uno solo de los grupos metilo situados en el Cα' a los protones β-lactámicos H₁₂ (Me₁₃^R en **48c** y Me₁₄^S en **48d**), confirma que la rama Aib-NH₂ se encuentra girada y desfavoreciendo la formación de un enlace intramolecular $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ de tipo giro β. Por otro lado, los coeficientes térmicos para H₁₅ de **48c** (-4.2 ppb/K) y **48d** (-3.9 ppb/K) se encuentran fuera del rango de Kessler (-3.0 ppb/K), lo que indica que no existe un enlace de hidrógeno intramolecular estable entre el carbonilo del residuo (*i*) y el NH del residuo (*i*+3).

Tabla 25: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo **48d**.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|----------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| 1 | H ₁₂ ^S | 3.54 | H ₁₂ ^R | 3.35 | 1.80 (ref.) |
| 2 | H ₈ | 8.21 | H ₁ | 2.74 | 2.76 |
| 3 | H ₈ | 8.21 | H ₁₂ ^S | 3.54 | 3.16 |
| 4 | H ₈ | 8.21 | H ₇ | 3.62 | 2.52 |
| 5 | H ₈ | 8.21 | H ₁₇ | 1.79 | 2.30 |
| 6 | H ₈ | 8.21 | Me ₁₉ ^S | 0.94 | 2.22 |
| 7 | H ₁₅ | 7.95 | H ₁₂ ^S | 3.54 | 2.23 |
| 8 | H ₁₅ | 7.95 | Me ₁₄ ^S | 1.26 | 2.75 |
| 9 | H ₁₂ ^R | 3.35 | Me ₁₉ ^S | 0.94 | 2.29 |
| 10 | H ₁₆ | 7.21 | H ₁₂ ^S | 3.54 | 3.83 |
| 11 | Me ₁₄ ^S | 1.27 | H ₁₂ ^S | 3.54 | 2.35 |
| 12 | Me ₁₄ ^S | 1.27 | H ₁₂ ^R | 3.36 | 2.17 |

Distancias interprotónicas de los análogos alílicos **48e y **48f****

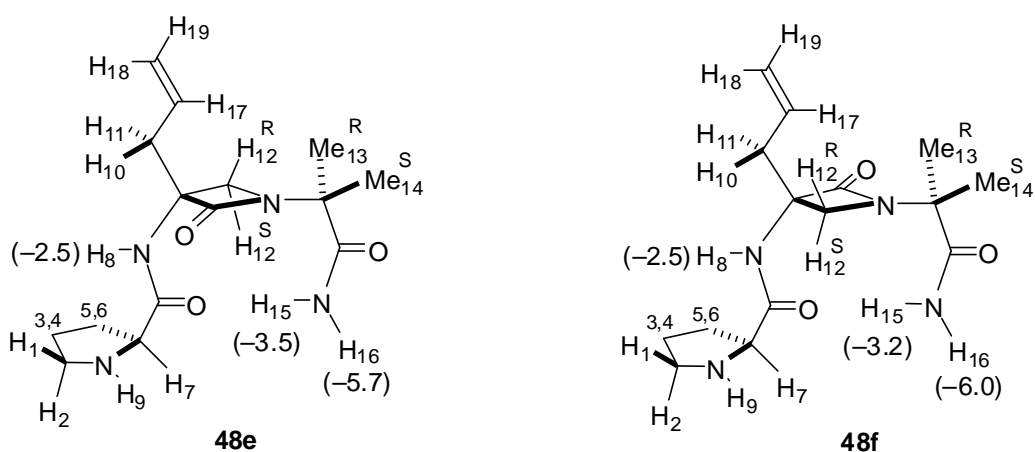
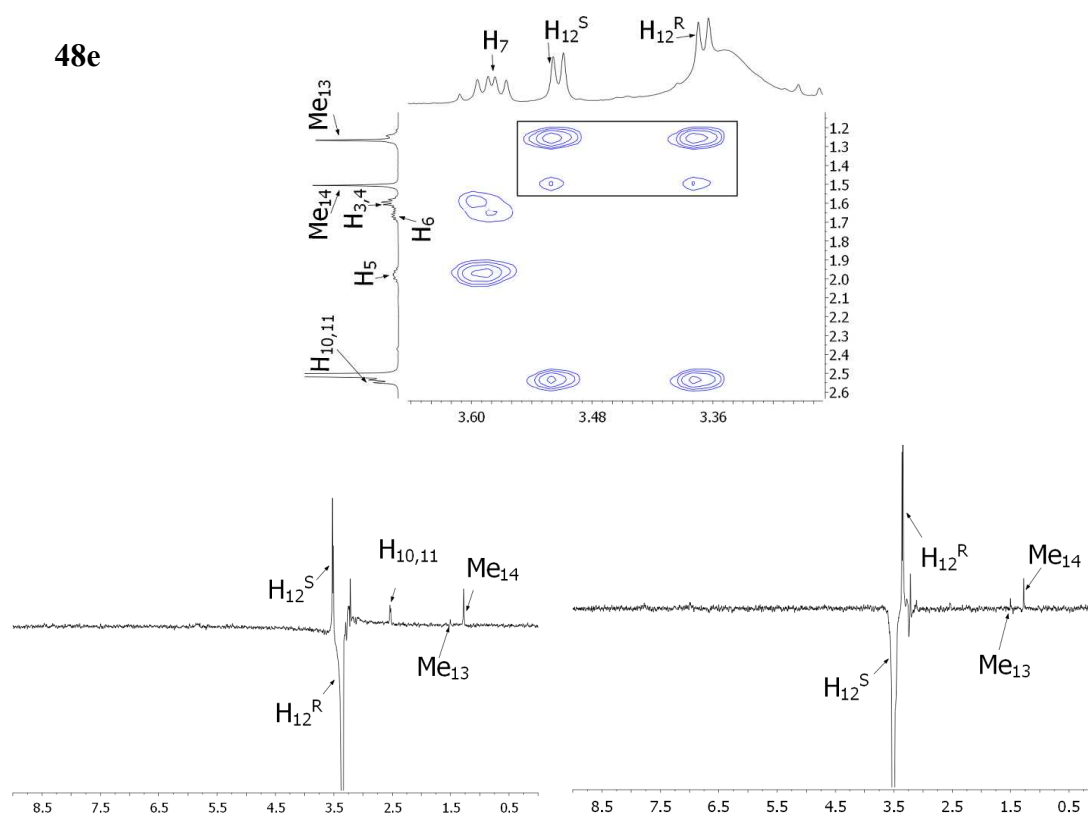


Figura 71: Designación de los protones de los análogos **48e** y **48f**. Los valores entre paréntesis corresponden a los coeficientes térmicos de los protones amídicos (ppb/K).

48e



48f

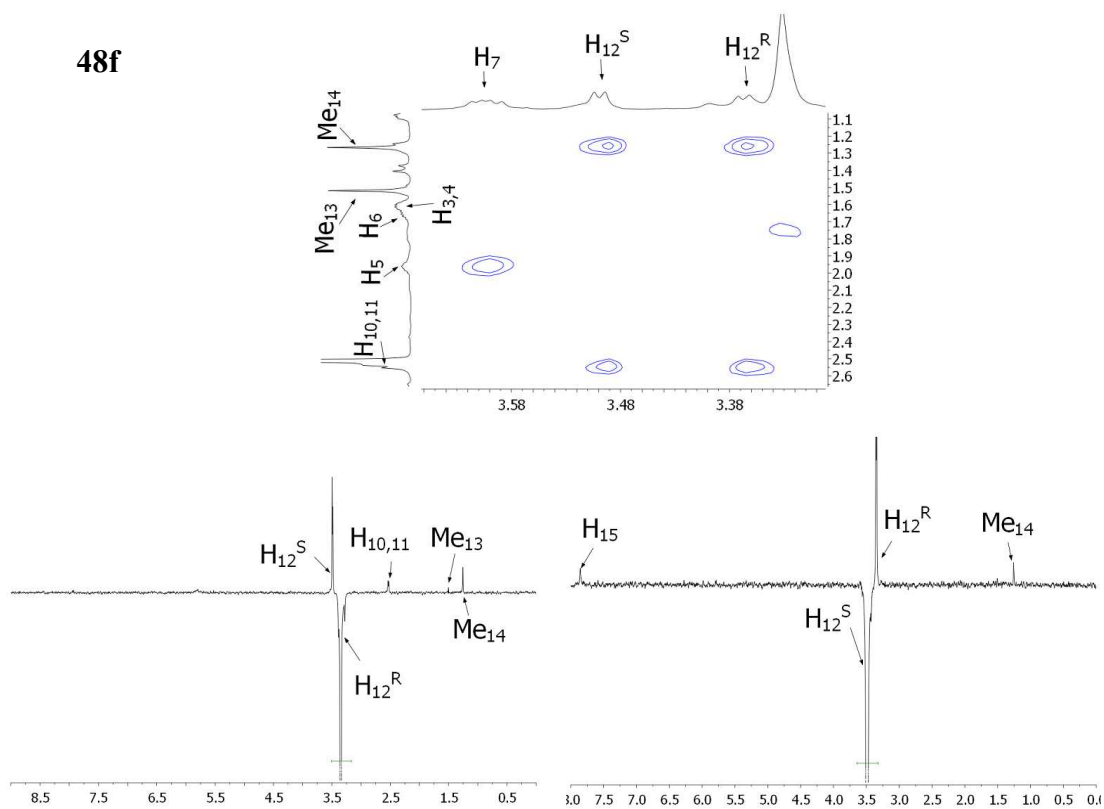


Figura 72: Ampliación de espectros ROESY y espectros NOE 1D de los análogos 48e y 48f.

Los compuestos portadores de un grupo alilo **48e** y **48f** fueron estudiados como los análogos de PLG precedentes. Sin embargo, para la identificación de H_{12}^R y H_{12}^S fue necesario el registro de experimentos adicionales de NOE selectivo, puesto que ambos protones presentaban señales de cruce con H_{10} y H_{11} que eran idénticas en el compuesto **48e** y bastante semejantes en el compuesto **48f** (fragmentos de ROESY, *figura 72*, **48e** y **48f**). Los NOE selectivos se llevaron a cabo irradiando consecutivamente las señales H_{12}^R y H_{12}^S , y revelaron que la señal situada a campos más altos correspondía a H_{12}^R en ambos análogos, según se dedujo por la aparición de sendas señales de NOE con $H_{10,11}$ y la ausencia de las mismas al irradiar H_{12}^S .

Los dos análogos presentaron señales de cruce H_{15}/H_{12}^S cuya integración dio lugar a distancias intermedias (3.17 y 3.79 Å, respectivamente). Ello fue interpretado nuevamente como una orientación de la rama lateral Aib-NH₂ bajo el anillo β-lactámico. Este dato, junto a los valores de los coeficientes térmicos de H_{15} (-3.2 para **48e** y -3.5 ppb/K, para **48f**, *tabla 21*) confirmó una conformación β-girada aunque no estabilizada con un enlace de hidrógeno entre las posiciones (*i*) e (*i*+3). Por otro lado, H_8 presentó valores de coeficientes bajos (-2.5 ppb/K, *tabla 21*), lo cual indica un enlace de hidrógeno intramolecular, que no pudo ser confirmado por distancias interprotónicas en este caso.

Tabla 26: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo 48e.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|----------|-------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|---|
| 1 | H ₅ | 1.98 | H ₇ | 3.59 | 2.40 (ref.) |
| 2 | H ₈ | 8.17 | H ₁₁ | 2.53 | 2.58 |
| 3 | H ₈ | 8.17 | H ₇ | 3.57 | 3.18 |
| 4 | H ₈ | 8.17 | H ₁₇ | 5.82 | 4.06 |
| 5 | H ₁₇ | 3.59 | H_{12}^S | 3.52 | 2.96 |
| 6 | H ₁₇ | 3.59 | H_{12}^R | 3.37 | 2.96 |
| 7 | H ₁₀ | 2.53 | H_{12}^R | 3.37 | 2.50 |
| 8 | Me ₁₃ ^R | 1.24 | H_{12}^R | 3.37 | 2.46 |
| 9 | Me ₁₃ ^R | 1.24 | H_{12}^S | 3.52 | 2.47 |
| 10 | H ₁₅ | 7.91 | H_{12}^S | 3.52 | 3.17 |

Tabla 27: Desplazamientos químicos de los protones (ppm) y distancias interprotónicas (Å) del análogo **48f**.

| ROE (n°) | H _A | δ _A ppm | H _B | δ _B ppm | distancia (H _A -H _B) (Å) |
|----------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| 1 | Me ₁₃ ^R | 1.51 | Me ₁₄ ^S | 1.25 | 2.53 (ref.) |
| 2 | H ₈ | 8.16 | H ₇ | 3.60 | 3.73 |
| 3 | H ₈ | 8.16 | H ₁₁ | 2.53 | 2.74 |
| 4 | H ₁₂ ^R | 3.36 | H ₁₁ | 2.53 | 2.78 |
| 5 | H ₁₂ ^R | 3.36 | H ₁₇ | 5.83 | 3.31 |
| 6 | H ₁₂ ^R | 3.36 | Me ₁₄ ^S | 1.25 | 2.52 |
| 7 | H ₁₂ ^S | 3.51 | H ₁₁ | 2.53 | 3.40 |
| 8 | H ₁₂ ^S | 3.51 | H ₁₅ | 7.90 | 3.79 |
| 9 | H ₁₂ ^S | 3.51 | Me ₁₄ ^S | 1.25 | 2.57 |

Las distancias recopiladas en las *tablas 22-27* fueron utilizadas como únicas restricciones para la dinámica molecular (*simulated annealing*) de los análogos de PLG **48a-f** con el fin de identificar los grupos conformacionales o *clusters* de dichas estructuras y poder conocer así las poblaciones relativas de las distintas conformaciones para cada una de los compuestos. Al igual que en el caso de los pseudopéptidos abiertos descritos anteriormente (pág. 75), se calcularon 100 estructuras para cada análogo **48a-f**. En todos ellos, exceptuando **48d**, se encontró más de un *cluster* utilizando como criterio de diferenciación los valores promedio de los ángulos diedros, las distancias $_{i+3}(\text{NH})-(\text{Q}=\text{C})_{i+1}$ y $_{i+3}(\text{NH})-(\text{Q}=\text{C})_i$, y el ángulo pseudodiedro μ , tal y como se detalla en la *tabla 28*.

Tabla 28: Clusters conformacionales de los pseudopéptidos **48a-f** y valores promedio de sus principales parámetros estructurales.

| Cluster (n) ^a | $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ | $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ | $\langle\phi_1\rangle$ | $\langle\psi_1\rangle$ | $\langle\phi_2\rangle$ | $\langle\psi_2\rangle$ | $\langle\mu^b\rangle$ |
|--------------------------|---|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 48a-1 (35) | 4.28 | 3.06 | -26.5 | 114.8 | 64.5 | 63.5 | -5.2 |
| 48a-2 (38) | 5.26 | 5.02 | -20.3 | 114.6 | 116.8 | 75.9 | 49.6 |
| 48b-1 (26) | 3.13 | 4.71 | -10.3 | -114.2 | -1.39 | -78.6 | 65.1 |
| 48b-2 (43) | 3.04 | 5.99 | -42.0 | -114.5 | 21.7 | 59.1 | 128.6 |
| 48c-1 (37) | 4.17 | 5.58 | -167.4 | 113.1 | 61.3 | 62.6 | -27.3 |
| 48c-2 (13) | 3.14 | 5.46 | -168.2 | 113.1 | 108.3 | -42.6 | -11.3 |
| 48c-3 (18) | 5.14 | 5.78 | -170.8 | 113.4 | 109 | 80.6 | 22.5 |
| 48d (52) | 4.15 | 4.01 | -9.9 | -114.8 | -75.1 | -49.4 | -9.1 |
| 48e-1 (13) | 2.74 | 5.72 | -155.9 | 114.3 | 21.5 | 49.3 | -69.6 |
| 48e-2 (38) | 4.12 | 5.38 | -155.8 | 114.6 | 58.5 | 63.7 | -29.8 |
| 48e-3 (17) | 3.14 | 5.39 | -155.8 | 114.8 | 108.6 | -47.6 | -11.8 |
| 48e-4 (10) | 5.26 | 5.38 | -155.8 | 114.8 | 108.7 | 78.9 | 23.0 |
| 48f-1 (9) | 5.54 | 6.89 | -61.2 | -114.1 | -113.9 | -104.1 | 6.9 |
| 48f-2 (46) | 3.39 | 5.17 | -18 | -114.3 | -113.8 | 67.6 | -1.7 |
| 48f-3 (17) | 4.47 | 5.70 | -75.6 | -113.8 | -54.7 | -81.6 | 16.0 |
| 48f-4 (28) | 3.2 | 5.09 | -27.4 | -113.8 | -11.4 | -72.9 | 60.1 |

^a Representa el número de estructuras por cluster que no violan ninguna de las restricciones de distancias interprotónicas extraídas de los espectros ROESY. ^b Ángulo pseudodiedro de los cuatro carbonos C α de los residuos (i)-(i+3). ^c No presenta restricción definida.

En las figuras 73-75 se detallan las superposiciones de las estructuras de mínima energía de cada uno de los *clusters* de los compuestos **48a-f**, agrupadas por parejas de diastereómeros.

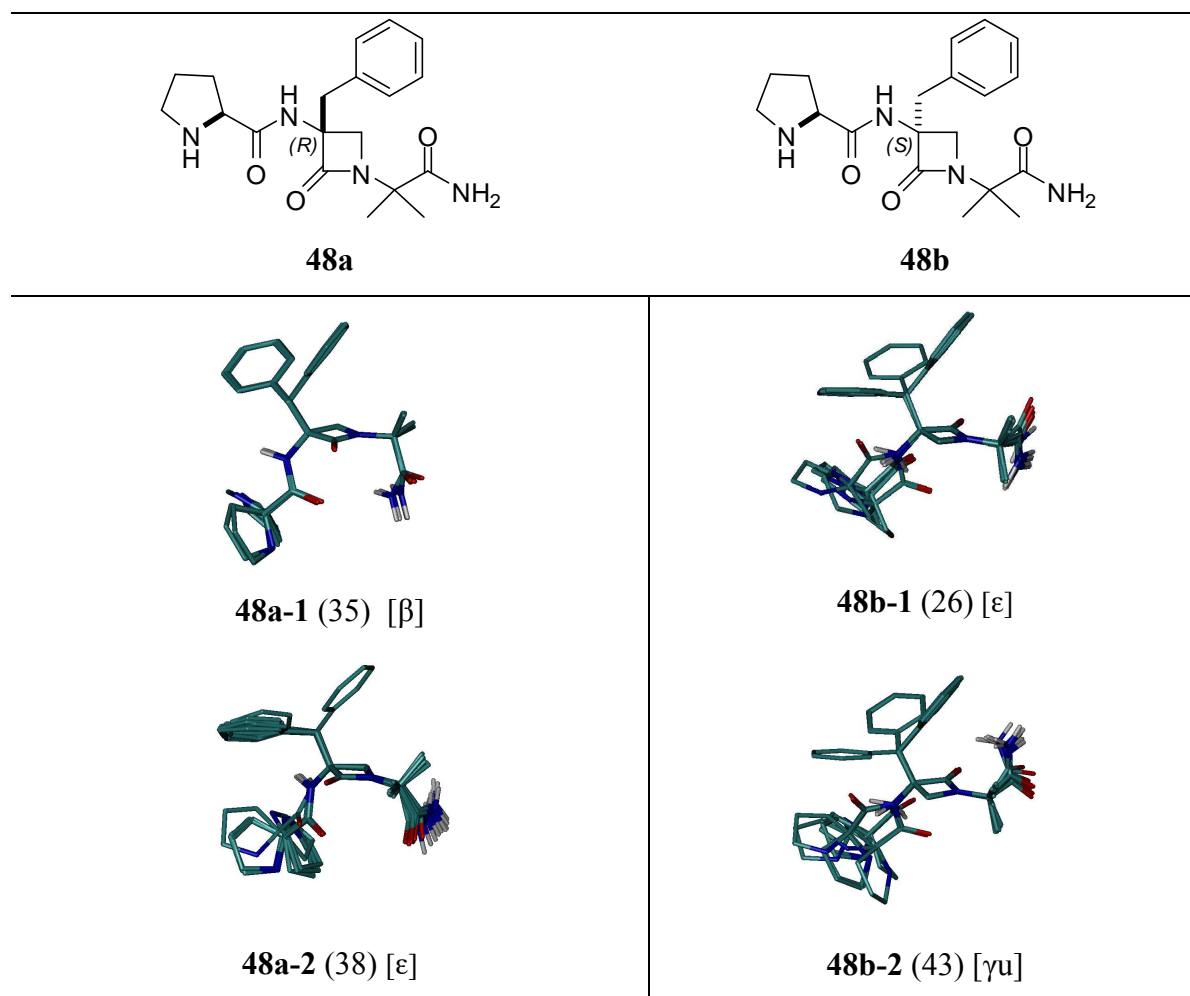


Figura 73: Grupos conformacionales (*clusters*) de los pseudopéptidos **48a-b** en DMSO- d_6 . Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes se indica el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γu]=giro γ up; [ϵ]= extendido.

Analizando los grupos conformacionales de **48a** y **48b**, se observó que ambos compuestos mostraron una alta proporción de estructuras que cumplieran las restricciones impuestas en conformaciones giradas. Sin embargo, únicamente **48a** presentó un giro β -II poblado por 35 estructuras, representado en el *cluster* **48a-1**, cuyo ángulo pseudodiedro μ promedio presentó un valor cuasicanónico de -5.2° y la distancia $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ fue de 3.06 \AA (tabla 28). A su vez, 43 estructuras del análogo **48b** mostraron una conformación de tipo giro γ -up. El resto de las estructuras halladas para ambos compuestos se orientaron en conformaciones extendidas por rotación de la rama lateral Aib-NH₂. De esta manera, mientras que **48a** debe el valor del coeficiente térmico de H₁₅ (-2.7 ppb/K) al enlace de

hidrógeno formado entre $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ en un giro β , su diastereómero **48b** (-2.6 ppb/K) lo hace a un enlace de hidrógeno formado entre $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_{i+1}$ en un giro γ -up.

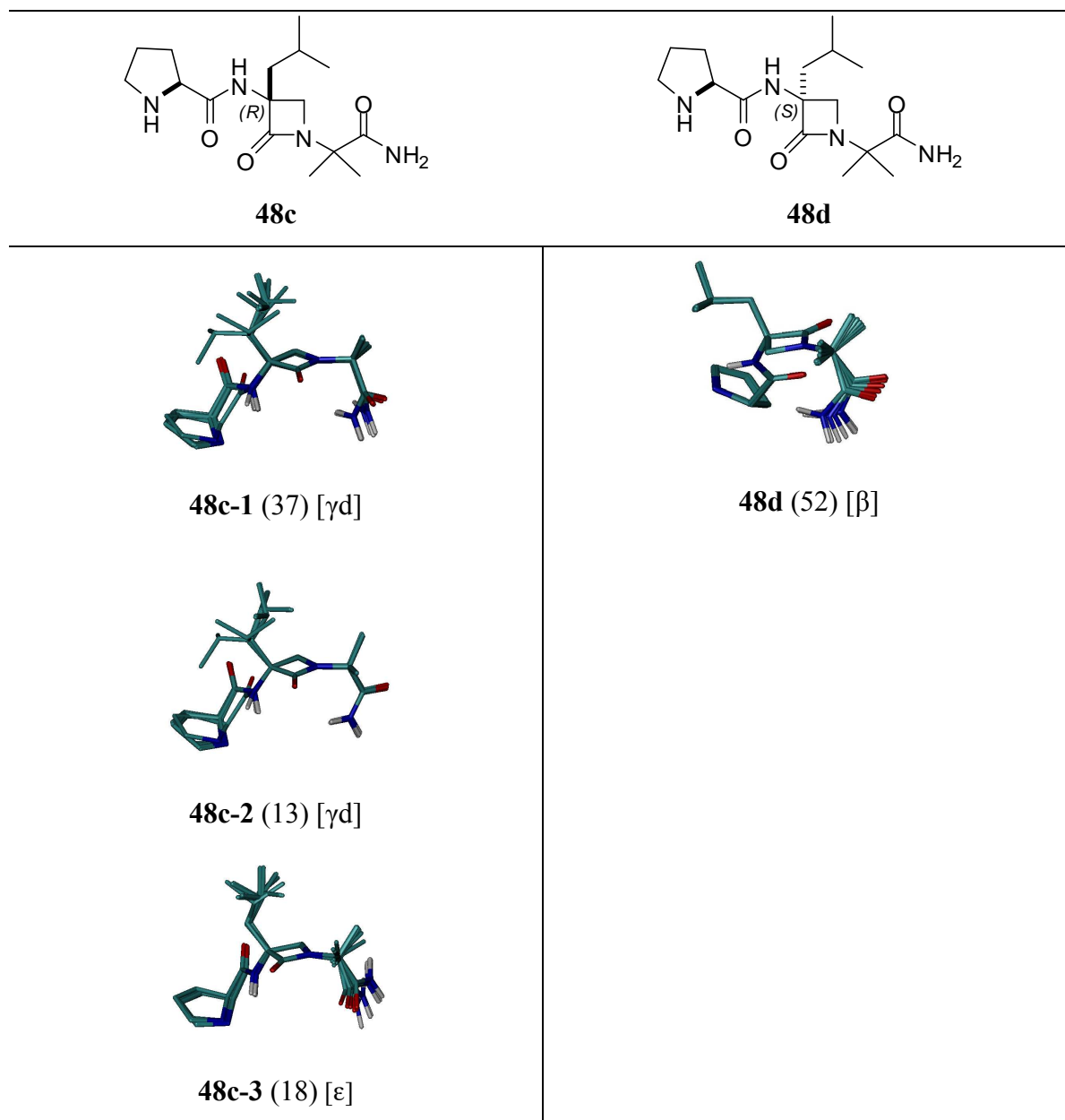


Figura 74: Grupos conformacionales (clusters) de los pseudopéptidos **48c-d** en DMSO- d_6 . Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes se indica el tipo de conformero: [β]=giro β ; [γd]=giro γ down; [ϵ]= extendido.

Estos resultados sugieren que, al menos en el caso de **48a** y **48b** la configuración del estereocentro C_α de la β -lactama puede condicionar el tipo de giro formado (β o γ).

En los análogos **48c** y **48d** se observaron nuevamente diferencias conformacionales en función de la configuración del estereocentro C α . La disposición predominante en 50 de las 68 estructuras que cumplieron todas las restricciones impuestas de **48c** fue el giro γ (*clusters* **48c-1** y **48c-2**, *figura 74*). Por su parte, el análogo **48d** mostró un único cluster β -girado con un valor de μ de -9.1° . Este parámetro explica la distancia $_{i+3}(\text{NH})-(\text{O}=\text{C})_i$ de 4.01, alejada del valor adoptado para este tipo de enlaces (aproximadamente 2.5 Å). Finalmente, las restricciones de distancia entre protones pertenecientes a la prolina y el protón amídico H₈ estabilizaron la orientación del ciclo de pirrolidona en los clusters hallados para los dos compuestos, estabilizando el enlace de hidrógeno intramolecular $_i(\text{HN})-(\text{HN})_{i+1}$. Ello está en buen acuerdo con la observación de bajos coeficientes térmicos de H₈ en ambos (-2.8 y -2.5 ppb/K respectivamente, *tabla 21*).

Los clusters hallados para los diastereómeros **48e** y **48f** presentaron tendencias semejantes entre sí, siendo la conformación giro γ down mayoritaria en el equilibrio. Cabe resaltar que en todos los casos el grupo carbonilo de la prolina se orientó hacia el exterior del anillo β -lactámico imposibilitando la formación de un enlace de hidrógeno entre las posiciones (i) e $(i+3)$ para dar lugar a un giro β . Sin embargo, los valores de los coeficientes térmicos de H₁₅ para sendos análogos (-3.5 y -3.2 ppb/K, respectivamente, *tabla 21*) no son muy altos, lo que podría indicar un enlace de hidrógeno alternativo entre el carbonilo de la β -lactama y el protón de la amida terminal H₁₅. Finalmente, el giro del anillo de piperidina con respecto del carbonilo de la prolina, no parece impedir la formación del enlace de hidrógeno entre el protón H₈ (-2.5 ppb/K en **48e** y **48f**) y el nitrógeno de la prolina.

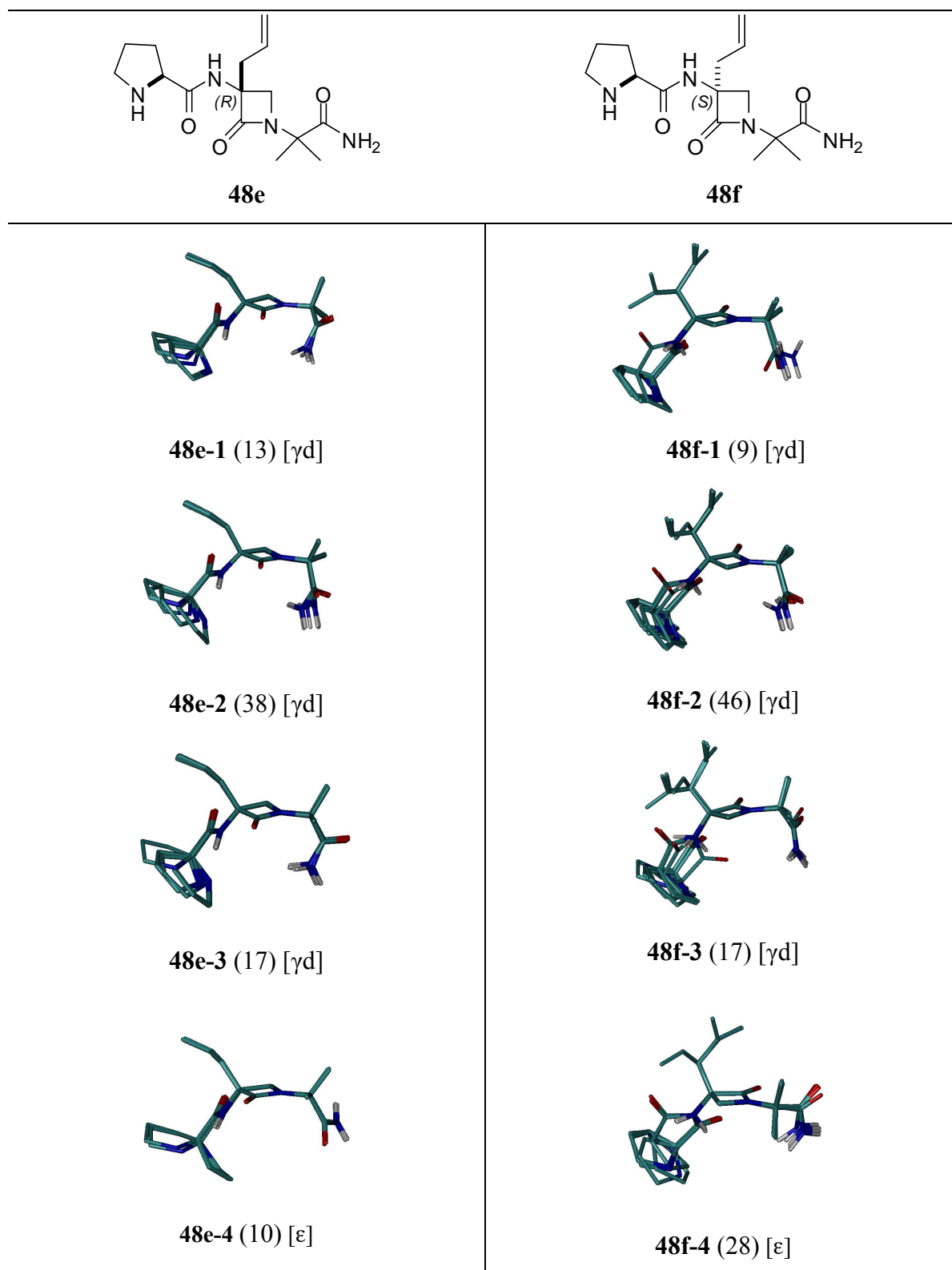


Figura 75: Grupos conformacionales (clusters) de los pseudopéptidos **48e-f** en DMSO- d_6 . Entre paréntesis se indica el número de estructuras que cumplen todas las restricciones. Entre corchetes se indica el tipo de conformero: [γd]=giro γ down; [ϵ]= extendido.

En resumen, nuestro estudio pormenorizado del comportamiento conformacional de los miméticos β -lactámicos de PLG **48a-f** muestra que, en general, dichos compuestos tienden a adoptar conformaciones de tipo γ -down en disolventes coordinantes (DMSO- d_6) y no tanto conformaciones de giro β . Estos resultados matizan la observación previa de A. Benito (*figura 63*, pag. 128) que interpretó la conformación del análogo **28** únicamente en función de la formación de giros β .

Por otra parte, también hemos establecido que la naturaleza del grupo R^1 sustituyente de la posición $C\alpha$ del anillo β -lactámico influye decisivamente en la formación del enlace de hidrógeno entre el nitrógeno de la prolina y el protón amídico del residuo β -lactámico (H_8). En concreto, mientras los grupos isobutilo y alilo lo favorecen, el grupo bencilo impide su formación. Ello parece indicar que el bloqueo conformacional del anillo de pirrolidona en la prolina sólo tiene lugar en ausencia de grupos altamente hidrófobos y/o voluminosos.

Finalmente, se ha observado que la configuración del estereocentro $C\alpha$ del anillo β -lactámico condiciona las poblaciones relativas de los giros γ y β en los miméticos **48a-f**, aunque no ha sido posible establecer una pauta general para dicho efecto. Así, por ejemplo, la β -lactama de configuración (*R*) favorece el giro β en **48a** ($R^1=Bn$). Sin embargo, dicha configuración estabiliza el giro γ -down en **48c** ($R^1=iBu$) y **48e** ($R^1=CH_2CH=CH_2$). Por su parte, la β -lactama de configuración (*S*) proporciona una conformación de giro γ -up en **48b** ($R^1=Bn$) y un giro γ -down en **48f** ($R^1=CH_2CH=CH_2$), mientras que bloquea un giro β -II' en **48d** ($R^1=iBu$). De todo ello se deduce que la incorporación del anillo β -lactámico α -sustituído en los peptidomiméticos de PLG propicia un fuerte bloqueo conformacional que favorece las poblaciones de tipo giro- γ y giro- β , aunque la prevalencia relativa de cada una de ellas depende en gran medida de interacciones sutiles con el sustituyente R^1 y la configuración de la propia β -lactama.

3.6.3 Evaluación de la actividad alostérica de análogos de PLG mediante estudios de fijación de radioligandos (*binding*) a receptores dopaminérgicos D_2 y proteínas G acopladas en membranas de caudado humano postmortem.

Tras el análisis conformacional de los análogos **48a-f**, se llevó a cabo su evaluación biológica en el departamento de Farmacología de la UPV-EHU, bajo la supervisión de la Dra. Ane Gabilondo utilizando la técnica de *binding* o fijación de ligandos. Puesto que en la bibliografía habían sido descritos algunos de los análogos de PLG bioactivos con conformaciones giradas como moduladores alostéricos⁴⁵ de la afinidad de agonistas por receptores dopaminérgicos, quisimos comprobar si las modificaciones estructurales introducidas en los nuevos pseudopéptidos **48a-f** con respecto de la PLG provocaban variaciones en la actividad biológica y establecer algunas relaciones entre la estructura y la actividad de éstos. En este estudio se incluyeron además, el tripéptido natural PLG, el pseudopéptido **8a** (PAOPA) descrito por Johnson⁴² y el análogo **28**⁵⁷ descrito en nuestro laboratorio (*figura 76*).

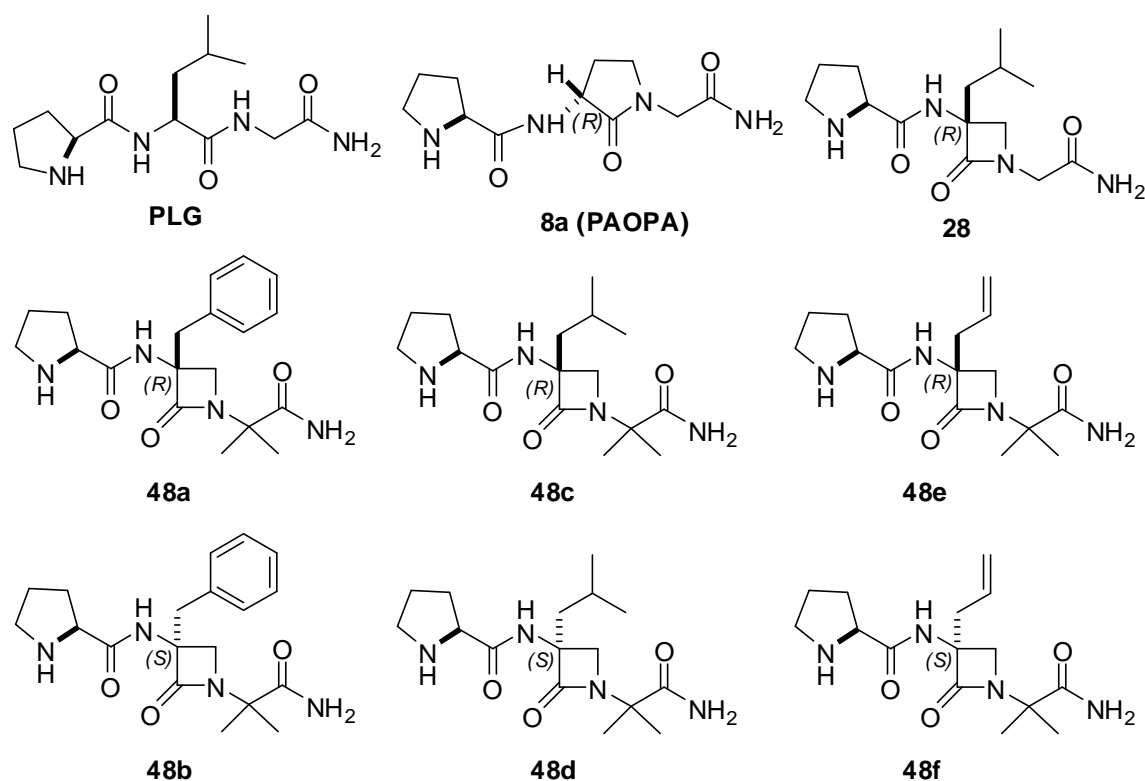


Figura 76: Compuestos sometidos a evaluación biológica.

Los compuestos fueron sometidos a ensayos de competición agonista/antagonista por receptores dopaminérgicos de tipo D₂ en cerebro humano. El hecho de que los experimentos se llevaran a cabo sobre membranas humanas, suponía una novedad y un reto ya que, por una parte, se trataba de un sistema desconocido hasta el momento y, por otra, la accesibilidad de las muestras era muy limitada. Para los ensayos de competición se emplearon N-propilnorapomorfina ((-)NPA) como fármaco agonista y [³H]espiperona como radioligando antagonista. Ambos fueron seleccionados debido a su mostrada eficacia en experimentos de competición en cultivos de células transfectadas con el cDNA del receptor D₂ humano⁸⁷. La capacidad moduladora se midió tanto en ausencia (control) como en presencia del análogo no hidrolizable de GTP, Gpp(NH)p. Además, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la capacidad del agonista (-)NPA para provocar la estimulación del mecanismo efector acoplado a las proteínas G_{i/o} en estos receptores (ver *apartado 1.3.2*, pag. 21-24).

3.6.3.1 Experimentos de competición de [³H]espiperona por (+)-butaclamol y de saturación con [³H]espiperona en membranas de caudado humano postmortem

Previo a los ensayos de inhibición de fijación específica del radioligando [³H]espiperona por el agonista (-)NPA, se realizaron experimentos de competición con (+)-butaclamol frente a una concentración única (0.25 nM) de [³H]espiperona para definir la señal no-específica o ruido de fondo. El (+)-butaclamol desplazó de forma monofásica la fijación del radioligando [³H]espiperona mostrando una elevada afinidad por un único lugar de unión y mostrando datos de pK_i=-8.17±0.13 (K_i=2.8 nM) en un total de 2 experimentos (n=2). El dato K_i se describe como la constante de disociación en un proceso de inhibición e indica la concentración de ligando suficiente para ocupar el 50% de los receptores. El valor mostrado por el (+)-butaclamol fue compatible con su naturaleza de antagonista de los receptores D₂ (*figura 77A*).

⁸⁷ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoniero, G.; Castellano, J.M.; Skoblenik, K.; Gupta, S.K.; Pristupa, Z.; Niznik, H.B.; Johnson, R.L.; Nair, V.D.; Mishra, R.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228-1236.

A partir de estos experimentos, se decidió que la concentración de (+)-butaclamol que se utilizaría en los posteriores ensayos de fijación de [3 H]espiperona para definir su fijación no específica sería de 10 μ M, concentración suficientemente elevada para impedir la fijación del radioligando a los receptores D₂, tal y como se ve en la curva decreciente de la *figura 77A*.

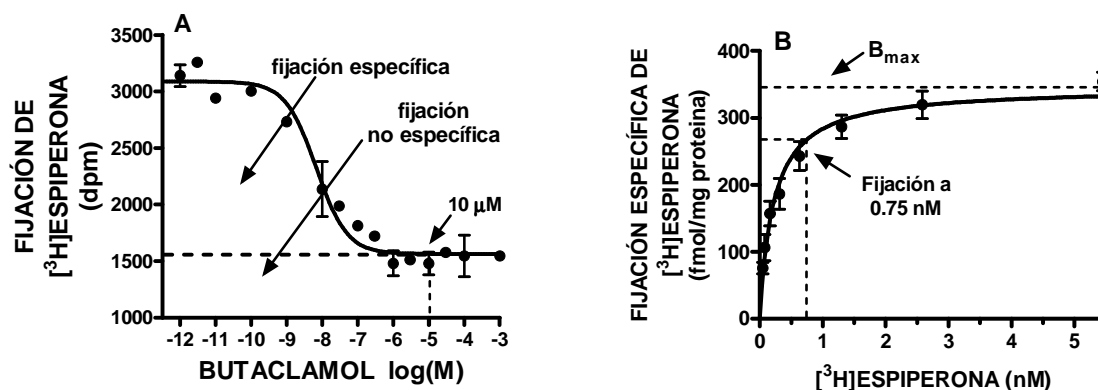


Figura 77: A) Desplazamiento de la fijación de [3 H]espiperona (0.75 nM) por (+)-butaclamol en membranas de caudado humano postmortem. Las flechas indican las partes correspondientes a la fijación específica y a la no específica del radioligando a receptores D₂ y muestran el nivel de fijación obtenido a la concentración de (+)-butaclamol seleccionada (10 μ M) para la definición de la fijación no específica del radioligando. B) Fijación específica de [3 H]espiperona en función de la concentración de radioligando. La flechas indican la fijación máxima (B_{max}) y la fijación esperada a la concentración de radioligando seleccionada (0.75 nM) para los ensayos de competición por (-)NPA.

Posteriormente, se realizaron experimentos de saturación con el radioligando [3 H]espiperona (0.04-5 nM, n=4) que mostraron una fijación saturable de elevada afinidad a un único lugar de unión específico (B_{max} = 346 ± 14 fmol/mg proteína; K_d = 0.22 ± 0.03 nM, n=4) (ver *material y métodos* de la *parte experimental* para definiciones de B_{max} y K_d), compatible con la fijación del radioligando al receptor dopaminérgico D₂ (*figura 77B*), aunque el valor de K_d obtenido en nuestras condiciones experimentales en núcleo de caudado humano fue unas 5 veces superior al descrito previamente para este radioligando en estriado de rata⁸⁸. A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que la señal (en dpm) de la fijación del radioligando a una concentración cercana a la K_d (~0.25 nM) era poco

⁸⁸ Geurts, M.; Hermans, E.; Maloteaux, J.M. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 382, 119-127.

intensa para ser utilizada en experimentos de competición, se seleccionó una concentración mayor, de manera que se pudiera asegurar una señal suficiente sin saturar todos los receptores. De este modo, se estableció una concentración de [³H]espiperona de 0.75 nM (ocupación aproximada del 77% de los receptores) para los ensayos posteriores de competición por (-)NPA.

3.6.3.2 Experimentos de competición de [³H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem en ausencia de Gpp(NH)p

Los ensayos de competición agonista-antagonista fueron llevados a cabo con una concentración fija del radioligando antagonista de los receptores D₂ [³H]espiperona (0.75 nM) y 18 concentraciones crecientes del agonista selectivo de receptores D₂ (-)NPA comprendidas entre 10⁻¹² M y 3x10⁻⁴ M en ausencia (*control*) y en presencia de 1 μM de PLG o el pseudopéptido correspondiente. La concentración de PLG/análogo fue seleccionada por similitud con la bibliografía conocida, en la que queda patente el efecto modulador de la PLG^{32,43,55,57} en estas condiciones. La fijación específica de la [³H]espiperona se determinó sustrayendo la fijación no específica (en presencia de (+)-butaclamol (10 μM)) a la fijación total.

En situación control (ausencia de PLG o análogo), el análisis de los experimentos de competición de (-)NPA frente a la fijación de [³H]espiperona dio lugar a curvas bifásicas que ajustaron significativamente mejor a un modelo de unión a dos lugares de fijación (*tabla 29, figura 78*), revelando que el agonista (-)NPA discrimina entre dos estados de afinidad de los receptores D₂ que son marcados por el antagonista [³H]espiperona. Estos dos estados de afinidad, tal y como se ha descrito en la *Introducción* se definen como estado de alta afinidad (*high affinity state*) y estado de baja afinidad (*low affinity state*). El estado de alta afinidad proporcionó el dato de K_{i1} para (-)NPA en rango nanomolar bajo, que denominaremos K_H a partir de ahora, y representó un porcentaje de receptores en alta afinidad (R_H) aproximado del 65%, mientras por su parte, el de baja afinidad indicó un valor de K_{i2} para (-)NPA en rango micromolar bajo, que denominaremos K_L, mostrando un porcentaje de receptores en baja afinidad (R_L) aproximado del 35% en nuestras condiciones experimentales. En las condiciones control, los valores de afinidad obtenidos en núcleo de caudado humano para el estado de alta afinidad del receptor D₂ fueron unas 4-6 veces inferiores a los descritos previamente en

estriado bovino⁴³ y en cultivos de células transfectadas con el cDNA del receptor D₂ humano³². Sin embargo, los valores de afinidad para el estado de baja afinidad y la proporción de receptores en alta y baja afinidad fueron similares a los descritos en estos sistemas.

En presencia de PLG, las curvas de competición sufrieron un desplazamiento hacia la izquierda (*figura 78A*) con un aumento significativo en la afinidad de (-)NPA por el lugar de alta afinidad, dando un valor de $K_H \sim 10$ veces inferior, tal y como se indica en la *tabla 29*. Este péptido no mostró cambios significativos en el lugar de baja afinidad ni en el porcentaje de receptores en cada estado de afinidad (*tabla 29*). Cabe destacar que el aumento de afinidad observado con PLG en cerebro humano fue mayor que el descrito previamente en cultivos celulares que expresaban el receptor D₂ humano, donde se indicaba una reducción de la K_H de 3.25 veces³² y en estriado bovino, en cuyo caso el sistema mostró una reducción de la K_H de 2.25 veces⁴³ utilizando la misma concentración de PLG. Sin embargo, a diferencia de lo observado en cerebro humano, en estos dos últimos sistemas la PLG sí provocó incrementos significativos en la proporción de receptores en estado de alta afinidad, observando un aumento del R_H del 12% al 20%, respectivamente. El análogo **28** (*figura 78B*) provocó efecto similar aunque algo menor que el provocado por PLG (valor de $K_H \sim 4$ veces inferior que en situación control, *tabla 29*).

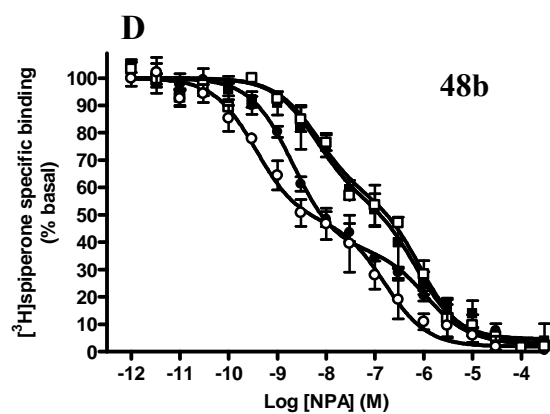
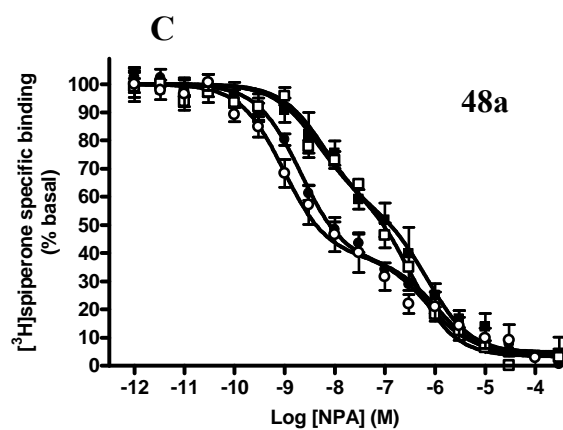
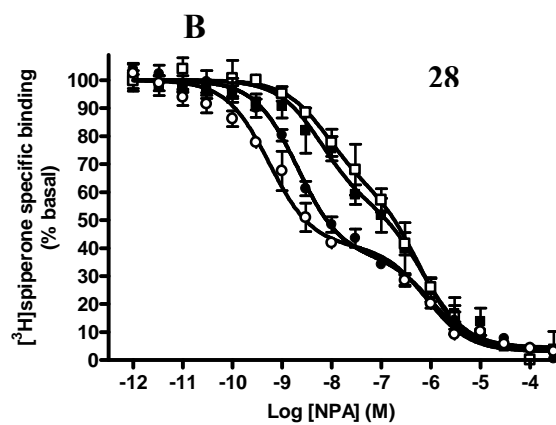
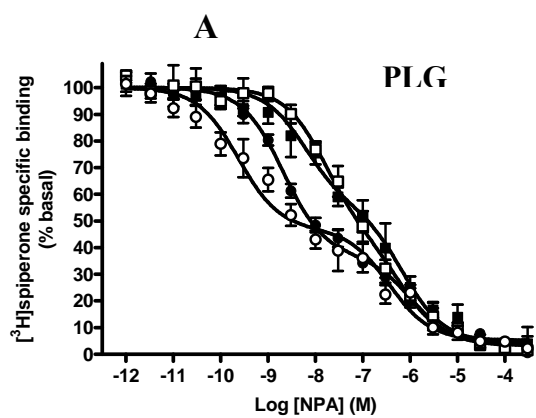
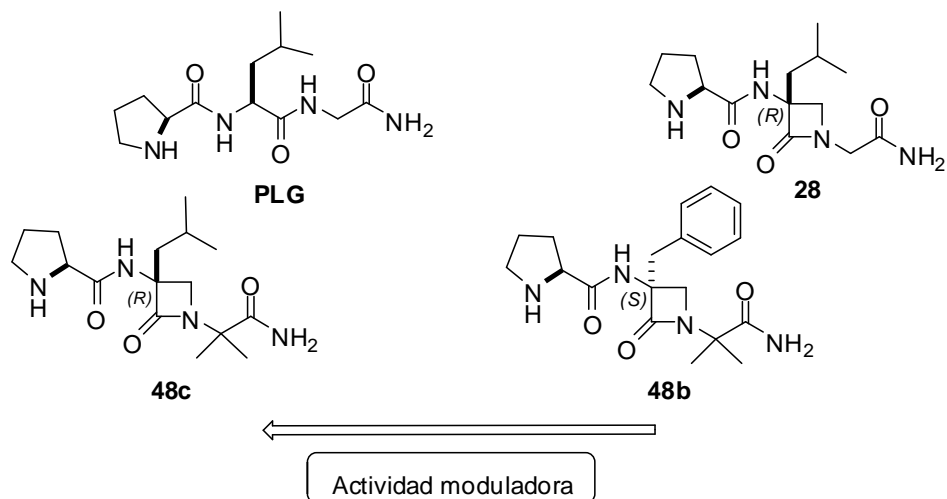
Los análogos **48c** (*figura 78E*) y **48b** (*figura 78D*) también provocaron desplazamientos hacia la izquierda en las curvas de competición, pero, en este caso el aumento en la afinidad de (-)NPA se observó tanto en el componente de alta afinidad (valores de $K_H \sim 12$ y ~ 6 veces inferiores, respectivamente) como en el de baja afinidad (valor de $K_L \sim 7$ veces inferior en ambos casos), (*tabla 29*). El compuesto **48c** produjo además una ligera aunque significativa reducción en el porcentaje de receptores en estado de alta afinidad (del 65 al 53%). De este modo, el orden de los compuestos estudiados en función de su efecto alostérico sobre el estado de alta afinidad del receptor D₂ a la concentración estudiada (1 μ M) fue **48c**, **PLG**, **48b** y **28**, tal y como se muestra en la *figura 78*.

Tabla 29: Parámetros de la inhibición de la fijación de [³H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem en ausencia (control) y presencia de PLG o análogos.

| Condición | n | pK _H | K _H (nM) | pK _L | K _L (nM) | R _H (%) |
|----------------------|---|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| Control | 8 | 9.41 ± 0.06 | 0.390 | 6.68 ± 0.13 | 207.8 | 64.9 ± 2.7 |
| + PLG | 7 | 10.41±0.11**** | 0.039**** | 7.30 ± 0.16 | 50.3 | 54.8 ± 3.1 |
| + análogo 28 | 4 | 10.05±0.09**** | 0.090**** | 6.82 ± 0.13 | 151.7 | 60.0 ± 2.7 |
| + análogo 48a | 4 | 9.75 ± 0.12 | 0.180 | 6.88 ± 0.25 | 132.7 | 64.3 ± 4.1 |
| + análogo 48b | 4 | 10.17 ± 0.15** | 0.068** | 7.53 ± 0.18* | 29.8* | 53.3 ± 4.9 |
| + análogo 48c | 8 | 10.48±0.08**** | 0.033**** | 7.51±0.11*** | 30.8**** | 53.2 ± 2.2* |
| + análogo 48d | 4 | 9.66 ± 0.08 | 0.215 | 6.90 ± 0.18 | 124.9 | 66.7 ± 3.0 |
| + PAOPA | 4 | 9.43 ± 0.11 | 0.370 | 6.58 ± 0.19 | 263.0 | 60.3 ± 4.6 |
| +análogo 48e | 4 | 9.56 ± 0.08 | 0.275 | 6.45 ± 0.16 | 351.8 | 65.2 ± 3.0 |
| + análogo 48f | 3 | 9.58 ± 0.09 | 0.261 | 6.55 ± 0.18 | 285.0 | 65.4 ± 3.8 |

Los valores de los parámetros de competición pK_H, pK_L y R_H se obtuvieron mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los datos muestran los valores del mejor ajuste ± SE de n experimentos realizados por duplicado. K_H y K_L representan las constantes de inhibición (K_i) para el agonista (-)NPA, calculadas para el estado de alta y de baja afinidad, respectivamente. R_H corresponde al porcentaje de receptores D₂ en alta afinidad. n representa el número de experimentos de los cuales se extrajeron los parámetros K_H, K_L y R_H. La concentración de PLG o el análogo correspondiente fue de 1 μM. La comparación de las curvas obtenidas en ausencia (control) y en presencia de PLG o análogo se realizó mediante análisis simultáneos con parámetros compartidos utilizando un test F. ****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05 vs control (F-test)

Los análogos PAOPA (figura 78I), **48a** (figura 78C), **48d** (figura 78F), **48e** (figura 78G) y **48f** (figura 78H) no produjeron ningún cambio significativo sobre los parámetros de afinidad ni porcentaje de receptores en uno u otro estado de afinidad. Los resultados obtenidos con PAOPA contrastan con los descritos en cultivos celulares en los que a una concentración de 1 nM, donde dicho compuesto provocó una mejora de 2 veces en la K_H para (-)NPA y un aumento en la proporción de receptores en estado de alta afinidad de un 22%³².



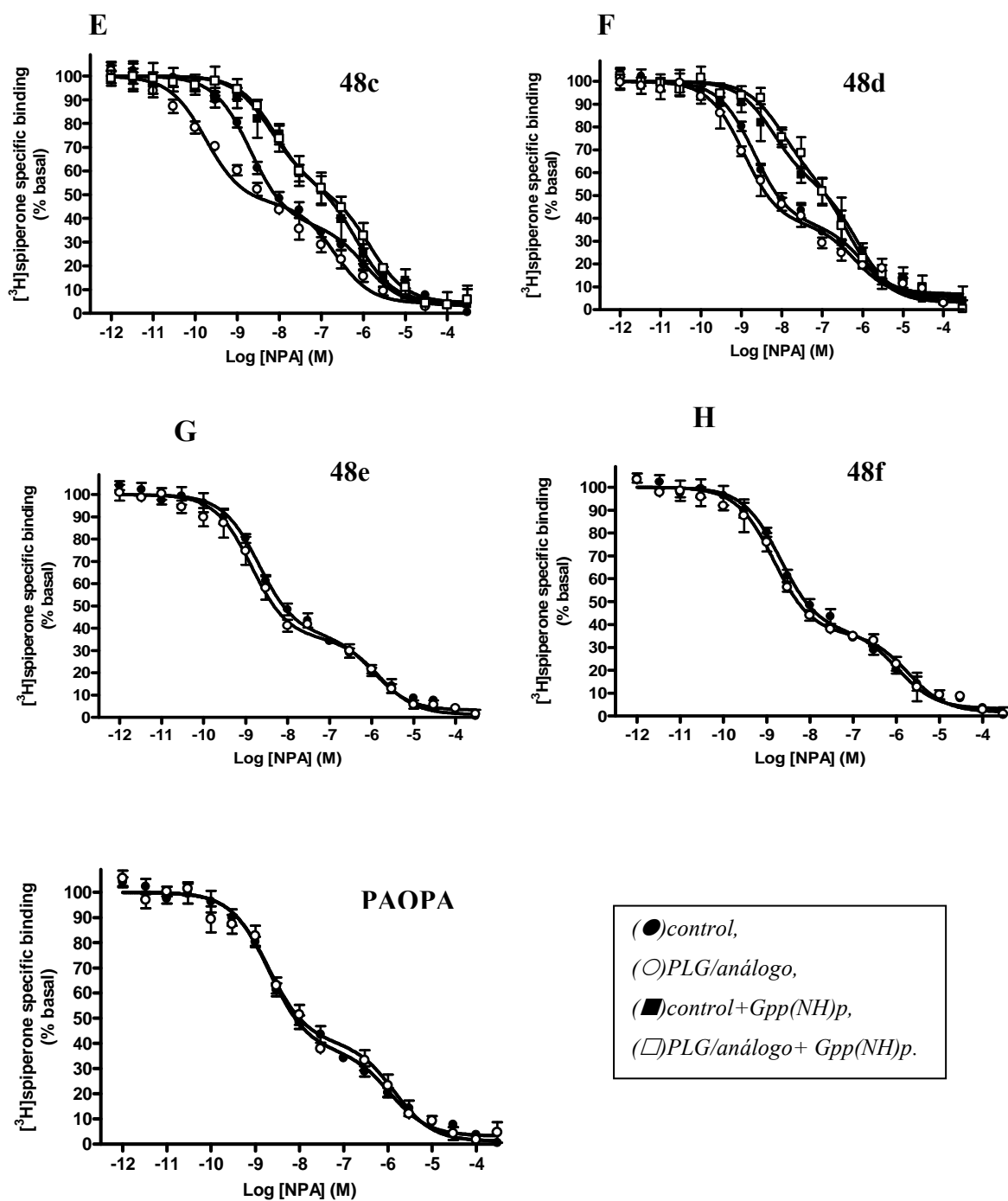


Figura 78: Curvas de la inhibición de la fijación específica del antagonista D_2 $[^3H]$ -espiperona (0.75 nM) por el agonista D_2 (-)NPA a receptores D_2 en membranas de caudado humano en ausencia (control) y en presencia de 1 μ M de PLG (A), y análogos **28** (B), **48a** (C), **48b** (D), **48c** (E), **48d** (F), **48e** (G), **48f** (H) y PAOPA (I) y efecto del Gpp(NH)p (100 μ M). (●) control, (○) PLG o análogo, (■) control+Gpp(NH)p y (□) PLG o análogo+Gpp(NH)p. Los puntos representan medias \pm SEM de 3-8 experimentos realizados en duplicado. En el caso de los compuestos PAOPA y los análogos **48e** y **48f** no hay datos en ausencia de Gpp(NH)p. Los valores de los parámetros de inhibición se muestran en las tablas 29 y 30.

3.6.3.3 Experimentos de competición de [³H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem en presencia de Gpp(NH)p

En paralelo al estudio del efecto alostérico de los análogos de PLG sobre receptores D₂, se llevó a cabo otra serie de ensayos de competición en presencia de guanililimidodifosfato (Gpp(NH)p), un análogo no hidrolizable de guanililtrifosfato (GTP) para observar el efecto que éste producía sobre el sistema receptor/agonista/“modulador alostérico”. Los nucleótidos de guanina reducen la afinidad de los agonistas por los receptores dopaminérgicos D₂ marcados con el radioligando antagonista [³H]espiperona, debido a la interconversión del estado de alta afinidad por agonistas (receptores acoplados a las proteínas G) hacia el estado de baja afinidad (receptores no acoplados)⁸⁹.

Para estos ensayos se seleccionaron los miméticos de PLG que en los primeros ensayos en ausencia de Gpp(NH)p mostraron actividad alostérica; es decir, la PLG y los análogos **28**, **48c** y **48b**. Los diastereómeros inactivos (compuestos **48a**, **48d**) se emplearon como negativos con el objetivo de obtener una mayor información que permitiera posteriormente llevar a cabo un análisis conformación/actividad.

En condiciones control (ausencia de PLG o análogos) el Gpp(NH)p (100 μM) no consiguió hacer desaparecer el estado de alta afinidad pero dificultó de forma parcial el acoplamiento entre los receptores D₂ y las proteínas G, provocando un desplazamiento significativo (p<0.0001) de las curvas de competición hacia la derecha, con una pérdida de afinidad del agonista por el estado de alta afinidad (K_H ~3 veces mayor) y una reducción en el porcentaje de receptores en estado de alta afinidad (del 65 al 45%) (tablas 29 y 30, figura 78).

El efecto de Gpp(NH)p observado en cerebro humano sobre la afinidad del receptor D₂ fue de nuevo más evidente que el descrito en cultivos celulares y en estriado bovino (K_H 1.4 a 2.3 veces mayor), pero menos marcado sobre la proporción de receptores en estado de alta afinidad (R_H 35 y 30% menor, respectivamente).

⁸⁹ Wreggett, K.A.; De Lean, A. *Molecular Pharmacology*, **1984**, 26, 214-227.

En presencia de Gpp(NH)p (100 μ M) los compuestos estudiados no provocaron alteraciones significativas en ninguno de los parámetros de las curvas de competición con respecto a la curva control (*tabla 30*), como puede observarse en la superposición de la curvas en ausencia (*control*) y presencia de PLG o análogo (*figura 78A-F*).

Tabla 30: Parámetros de la inhibición de la fijación de [3 H]espiperona por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem incubadas con 100 μ M Gpp(NH)p en ausencia (control) y presencia de PLG o análogos.

| Condición | n | pK _H | K _H (nM) | pK _L | K _L (nM) | R _H (%) |
|----------------------|---|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| Control | 3 | 8.94 \pm 0.20 | 1.14 | 6.87 \pm 0.19 | 133.4 | 46.4 \pm 6.6 |
| + PLG | 3 | 8.53 \pm 0.15 | 2.96 | 6.91 \pm 0.23 | 123.8 | 57.5 \pm 8.7 |
| + análogo 28 | 3 | 8.83 \pm 0.22 | 1.48 | 6.94 \pm 0.18 | 115.4 | 39.5 \pm 7.3 |
| + análogo 48a | 3 | 9.10 \pm 0.20 | 0.79 | 7.20 \pm 0.17 | 62.4 | 40.7 \pm 7.2 |
| + análogo 48b | 3 | 8.91 \pm 0.18 | 1.22 | 6.79 \pm 0.16 | 162.8 | 43.5 \pm 6.1 |
| + análogo 48c | 3 | 8.83 \pm 0.21 | 1.49 | 6.57 \pm 0.23 | 266.8 | 50.3 \pm 6.4 |
| + análogo 48d | 3 | 8.75 \pm 0.23 | 1.77 | 7.09 \pm 0.23 | 81.2 | 44.1 \pm 10.1 |

Los valores de los parámetros de competición pK_H, pK_L y R_H se obtuvieron mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los datos muestran los valores del mejor ajuste \pm SE de n experimentos realizados por duplicado. K_H y K_L representan las constantes de inhibición (K_i) para el agonista (-)NPA, calculadas para el estado de alta y de baja afinidad, respectivamente. R_H corresponde al porcentaje de receptores D₂ en alta afinidad. n representa el número de experimentos de los cuales se extrajeron los parámetros K_H, K_L y R_H. La concentración de PLG o el análogo peptidomimético fue de 1 μ M. La comparación de las curvas obtenidas en ausencia (control) y en presencia de PLG o análogo se realizó mediante análisis simultáneos con parámetros compartidos utilizando un test F.

Esta falta de efecto de los análogos de PLG sobre la afinidad del receptor D₂ en membranas de cerebro humano en presencia de Gpp(NH)p contrasta con lo descrito en cultivos celulares y en membranas de estriado bovino en los que la PLG y PAOPA mostraban un efecto modulador similar en ausencia y en presencia de Gpp(NH)p. Un factor a tener en cuenta es que, al menos en el caso del estudio en cultivos celulares, la densidad de receptores D₂ fue aproximadamente 4 veces superior a la obtenida en membranas de caudado humano. Este elevado nivel de expresión que alteraría la

proporción de receptores/proteínas G podría estar implicado en estas diferencias observadas entre distintos sistemas. De hecho, el efecto modulador de PLG y PAOPA en estos cultivos celulares sí que desapareció en presencia de suramina, fármaco que provoca el desacoplamiento entre los receptores y las proteínas G.

Como se acaba de mencionar, los ensayos de actividad alostérica de los análogos β -lactámicos **48a-f** frente a receptores dopaminérgicos D_2 , revelaron que los miméticos **48c** ($R^1=iBu$) y **48b** ($R^1=Bn$) eran los más activos de entre los compuestos estudiados. Curiosamente, según el análisis conformacional por RMN, ninguno de ellos presentaba poblaciones con conformaciones de giros- β en disolución de $DMSO-d_6$. Por el contrario, el más activo de ellos (**48c**) presentaba predominantemente conformeros de tipo γ -down, y el siguiente (**48b**) conformaciones de tipo γ -up (figura 79).

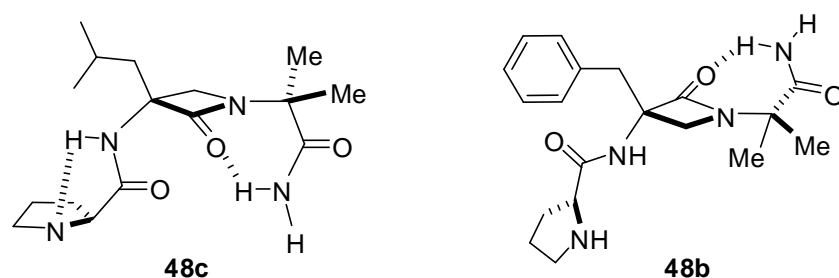


Figura 79: Representación de las conformaciones más pobladas los análogos β -lactámicos de PLG con mayor actividad moduladora de la fijación del agonista (-)NPA por receptores D_2 .

Por su parte, los diastereómeros **48a** ($R^1=Bn$) y **48d** ($R^1=iBu$) que sí presentaban una población mayoritaria de tipo giro- β y carecían de conformeros γ -girados, no proporcionaron actividad alostérica. Finalmente, el grupo alilo de los análogos **48e** y **48f** no parece ser adecuado para su reconocimiento por el centro activo del receptor dopaminérgico D_2 y, aunque ambos poseen amplias poblaciones de conformeros γ -girados, ninguno de ellos mostró actividad.

Este conjunto de observaciones sugiere que las conformaciones de tipo giro γ pueden jugar un papel importante en el mecanismo de reconocimiento de las PLG por receptores dopaminérgicos D_2 en humanos, constituyendo una conformación bioactiva alternativa a los conformeros giro β -II y hélice de poliprolina tipo II (figura 80) que son los únicos cuyos miméticos rígidos han mostrado actividad moduladora superior a la

PLG natural. Nuestros resultados abren el camino a futuros trabajos encaminados a obtener análogos de PLG que incorporan motivos γ -girados en su estructura.

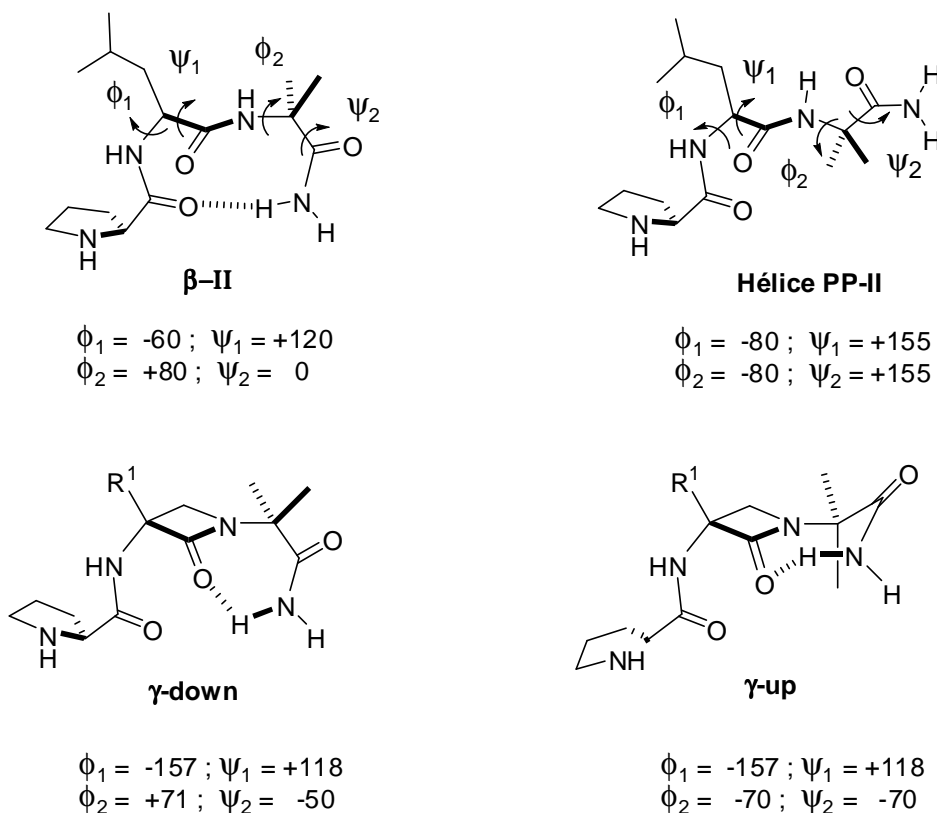


Figura 80: Representación de la PLG en sus conformaciones bioactivas: giro β -II, hélice de poliprolina de tipo II y giro γ -“down”.

Por último, también se realizaron ensayos concentración-respuesta para medir el efecto de PLG y análogos sobre el complejo receptor D_2 /proteína $G_{i/o}$ con el análogo radioactivo del GTP [^{35}S]GTP γ S. Este compuesto se une a la subunidad α de la proteína G tras la activación del receptor por el agonista (*ver apartado 1.3.2 de la introducción*, pág 27). En este estudio se incluyeron los compuestos que mostraron actividad alostérica en los estudios de competición de (-)NPA por la fijación de [^3H]espiperona, (PLG y análogos **28**, **48c** y **48b**). Como controles negativos se incluyeron el análogo **48d** (diastereómero inactivo del análogo **48c**) y PAOPA.

Los valores de los parámetros de las curvas concentración-efecto obtenidos en membranas de núcleo caudado humano son compatibles con los descritos para el

receptor D₂ en otros sistemas como el estriado de rata para este tipo de experimentos^{88,90}. Ni PLG ni ninguno de los análogos estudiados provocó alteraciones significativas en ninguno de los parámetros de las curvas concentración-efecto de (-)NPA con respecto a la curva control (ver *anexo D*).

⁹⁰ Rinken, A.; Finnman, U.B.; Fuxe, K. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 390, 25-36.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

Se ha establecido una metodología general para la preparación de β -lactamas α,α' -polisustituídas de configuración definida que implica la apertura de aziridinas con α -aminoésteres o con intermedios equivalentes de tipo β -sililoxiamina seguida de condensación de las azaalaninas resultantes en medio básico.

Los estudios DFT de los peptidomiméticos de tipo Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe indicaron una ligera estabilización (1-3 Kcal/mol) de la conformación de tipo giro β frente a los denominados giro γ -down y γ -up, excepto en el caso del Ac-(β -Lactam)-((S)-PhG)-NHMe, cuya conformero más estable fue el giro γ -down.

El análisis conformacional en DMSO- d_6 de peptidomiméticos de tipo Ac-(β -Lactam)-(Aa)-NHMe y Boc-(β -Lactam)-(Aa)-Aib-OH cuya β -lactama central está α,α' -sustituída mostró como conformaciones predominantes giros γ y giros β estabilizados frecuentemente por enlaces de hidrógeno intramoleculares, estando éste último giro favorecido en los pseudopéptidos de cadena más larga. Además, se pudo observar que los miméticos con un fragmento ($i+2$) quiral (Ala y PhG) mostraron una mayor dispersión conformacional, observándose mayoritariamente conformeros γ -girados y ocasionalmente extendidos, mientras que aquellos con un fragmento ($i+2$) aquiral (Gly y Aib) mostraron una restricción conformacional mayor, favoreciendo la formación del giro β .

Los pseudopéptidos del tipo Boc-(Ala)-(β -Lactam)-(Aib)-(Ala)-NH₂ mostraron una conformación de giro β en disolución de DMSO- d_6 estabilizada por un enlace de hidrógeno intramolecular entre las posiciones (i) e ($i+3$). Sin embargo, no se pudo constatar la formación de una estructura secundaria de tipo *hairpin* en ninguno de ellos. En el compuesto con los dos residuos de alanina de configuración opuesta **46d**-(S,R), se observó la formación de un enlace intramolecular adicional entre los residuos ($i+4$) e ($i+2$) en disolución, y entre los residuos ($i+1$) e ($i+4$) en estado sólido, formando parte éste último de dos giros imbricados de tipo β -II y β -I'.

El análisis biológico de los análogos β -lactámicos de PLG indicó que el pseudopéptido **48c** posee un efecto modulador de la fijación del agonista (-)NPA por receptores dopaminérgicos D₂ en membranas de caudado humano, incrementando más de diez veces el efecto observado en su ausencia.

El análogo **48c** posee el mismo sustituyente y estereoquímica en posición α de la β -lactama que la PLG y su análisis conformacional en disolución indicó que la conformación adoptada en disolución por este pseudopéptido es un giro γ -down, aportando una conformación adicional a las consideradas hasta la fecha como bioactivas en los estudios de este tipo de neuromoduladores.

PARTE EXPERIMENTAL

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Técnicas generales

Reactivos y disolventes comerciales

Los reactivos comerciales fueron suministrados por las casas Aldrich, Acros, Merck, Sigma y Fluka y salvo que se indique lo contrario se utilizaron sin purificación previa.

Secado y destilado de disolventes

Los disolventes utilizados en las reacciones fueron secados y destilados siguiendo los procedimientos habituales⁹¹. Tanto el THF como el Et₂O fueron secados antes de su uso mediante calefacción a reflujo sobre sodio, utilizando benzofenona como indicador. El CH₂Cl₂ comercial es anhidro al 99 %, aunque para su almacenamiento se añadió al recipiente tamiz molecular de 4Å. El tolueno se secó mediante destilación sobre sodio y se almacenó sobre sodio hilado. El acetonitrilo se destiló sobre hidruro cálcico. La DMF y DMSO se destilaron sobre hidruro cálcico y se almacenaron sobre tamiz molecular de 4 Å. La DIPA se secó mediante destilación a vacío sobre hidróxido sódico y se almacenó sobre tamiz molecular. La evaporación de disolventes se llevó a cabo en rotavapores tipo Büchi RE-111 ó RE-200.

Purificación de productos

Los productos sintetizados se purificaron mediante los procedimientos habituales: cromatografía en columna de gel de sílice (Merck 60F PF254, 230-400 mesh) bajo presión o cromatografía sobre placas de gel de sílice (Merck Kiesselgel 60 F-254) utilizando las mezclas adecuadas de eluyentes. La visualización se efectuó mediante irradiación UV o bien utilizando como agente revelador ácido fosfomolibdico seguido de un leve calentamiento de la placa. En algunos casos se procedió a la

⁹¹ Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon: Oxford **1993**.

purificación vía cromatografía preparativa de alta resolución (HPLC) empleando un cromatógrafo Waters 600 equipado con detector de absorbancia dual Waters 2487 Dual λ .

RMN

Los espectros de ^1H -RMN fueron registrados en espectrómetros Varian Gemini 200, Bruker Avance DPX300 y Bruker Avance DPX500 a frecuencias de 200, 300 y 500MHz respectivamente. Los espectros de ^{13}C -RMN se registraron en los equipos Bruker Avance DPX300 y Bruker Avance DPX500 a frecuencias de 75 y 125 MHz. Para los experimentos bidimensionales se utilizó el equipo Bruker Avance DPX500, empleando una sonda BBI. En la siguiente tabla se indican los desplazamientos químicos de las señales de referencia de los disolventes deuterados empleados.

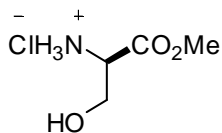
| Disolvente-<i>d</i> | ^1H | ^{13}C |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| $\text{CDCl}_3\text{-}d_4$ | 7.29 ppm | 77 ppm |
| $\text{MeOD-}d_4$ | 3.3 ppm | 45 ppm |
| $\text{DMSO-}d_6$ | 2.5 ppm | 40 ppm |

Otras técnicas analíticas

Las rotaciones ópticas fueron medidas en CH_2Cl_2 , CHCl_3 y MeOH en un polarímetro Perkin-Elmer 243B con un baño termostático Frigiterm 6000382 usando una lámpara de sodio (589nm, D line) a $25\pm 0.2^\circ\text{C}$. Los análisis de espectrometría de masas se registraron en un espectrómetro Finigan MAT GCQTM operando a 70eV. Los fragmentos detectados están expresados en m/e (intensidad relativa). También se utilizaron detectores TOF, MS, EI+. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP-20. Las microdestilaciones se llevaron a cabo en un destilador de bolas Kügelrohr Büchi GKR-50. Los espectros de IR fueron registrados en un espectrómetro Shimadzu IR-435 y las muestras se prepararon depositando una pequeña cantidad de disolución del producto sobre la pastilla de KBr.

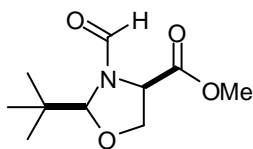
5.2 Síntesis de precursores peptídicos y aminoácidos funcionalizados: síntesis de α -alquilserinatos de metilo enantiopuros

Clorohidrato del éster metílico de la (D)-serina (ref.⁹²)



Se adicionaron por goteo 62 mL de cloruro de acetilo (714.25 mmol) a un matraz con 350 mL de MeOH manteniendo la temperatura de la mezcla a 0°C. A continuación, se le adicionó la serina (285.7 mmol, 30 g) en porciones hasta apreciar su completa disolución. La mezcla se agitó durante 2 horas a reflujo. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un sólido blanco que fue filtrado y lavado con porciones de 250 mL de Et₂O hasta observar la eliminación del HCl. El producto final se obtuvo con un rendimiento cuantitativo y se guardó sin posterior purificación en un medio libre de humedad.

(2*S*,4*R*)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxicarbonil-1,3-oxazolidinas (ref.⁹³)



A una suspensión del correspondiente clorhidrato de éster metílico de la serina (20 mmol, 3.10 g) en 25 mL de pentano se le adicionó trietilamina (22 mmol, 3.06 mL) y pivalaldehído (40 mmol, 5.85 mL). La mezcla se dejó agitar a temperatura de reflujo con un separador azeotrópico Dean-Stark durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, el clorhidrato de trietilamina se filtró, se lavó con Et₂O anhidro (3 x 75 mL) y la disolución se evaporó a presión reducida hasta obtener la mezcla 50:50 de rotámeros de la (2-*terc*-butil-4-metoxicarbonil-1,3-oxazolidina) intermedia como un sólido blanco con un 95% de rendimiento. Este producto se trató directamente con anhídrido mixto acético-fórmico a 0°C ⁹⁴ (4.21 mL) y la mezcla se agitó durante 6 horas. Posteriormente, se vertió sobre una disolución saturada de NaHCO₃ (10mL) y se extrajo con Et₂O. La

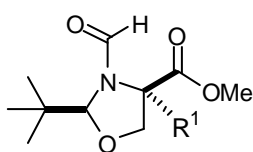
⁹² McKillop, A.; Taylor, R.J.K.; Watson, R.J.; Lewis, N. *Synthesis*, **1994**, 31.

⁹³ Seebach, D.; Aebi, J.D. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2545-2548.

⁹⁴ Anhídrido acético-fórmico: el reactivo se preparó enfriando 2 volúmenes de anhídrido acético a 0°C y anadiéndole lentamente 1 volumen de ácido fórmico (100%). Posteriormente se calentó la mezcla a 50°C durante 15 minutos y tras ese tiempo se enfrió a 0°C de nuevo. (Krimen, L. I. *Org. Synth.* **1970**, 50, 1).

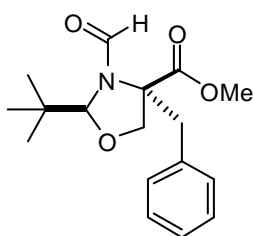
fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y el disolvente fue evaporado a presión reducida. El producto final se obtuvo como un aceite por el que se hizo pasar una corriente de aire para eliminar los restos de anhídrido acético. Tras cristalización con Et_2O /Hexano (1:5) se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 82% (3.53 g).

5.2.1 Procedimiento general para la alquilación de oxazolidinas (ref^{95, 96}).



Sobre una disolución de la correspondiente 2-*tert*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (20 mmol, 4.31 g), HMPA previamente destilada (5 eq., 100 mmol, 17 mL) y el correspondiente agente alquilante R^1X (40 mmol) en 20 mL de THF a -78°C se adicionó rápidamente vía cánula otra disolución de LDA (28 mmol) en THF (80 mL) a la misma temperatura. Inmediatamente después, el matraz con la mezcla se introdujo en un baño a 0°C y se agitó 16 horas, dejando subir la temperatura hasta temperatura ambiente. Se añadieron 100 mL de CH_2Cl_2 y la mezcla de reacción se lavó sucesivamente con disoluciones de NH_4Cl (3 x 50 mL), NaCl (sat) (3 x 50 mL) y HCl 1M (3 x 50 mL). El producto se extrajo con CH_2Cl_2 , la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se llevó a cabo por cristalización en EtOAc /Hexano 1:10, o mediante cromatografía de columna (gel de sílice, Hexano/ EtOAc). Rendimiento: 28-75%.

(2*S*, 4*R*)-4-Bencil-2-*tert*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina

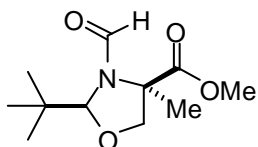


Se siguió el procedimiento general de alquilación de oxazolidinas a partir de (2*S*, 4*R*)-2-*tert*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (20 mmol, 4.3 g) y bromuro de bencilo (40 mmol, 5.7 mL). El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 60%, (3.70 g). Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la bibliografía (ref. 93).

⁹⁵ Seebach, D.; Aebi, J.D.; Gander, Coquoz, M.; Naef, R. *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1194-1216.

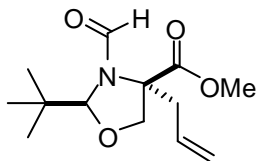
⁹⁶ Palomo, C.; Aizpurua, J.M. Balentova, E.; Jimenez, A.; Oyarbide, J.; Fratila, R.M.; Miranda, J.I. *Org. Lett.* **2007**, 9, 101-104.

(2S,4R)-4-Metil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina



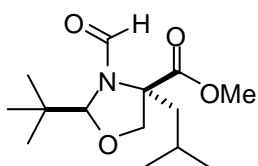
Se siguió el procedimiento general a partir de (2*R*, 4*S*)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (20 mmol, 4.31 g) y yoduro de metilo (50 mmol, 3.11 mL). El producto se obtuvo como un aceite incoloro. Rendimiento: 60%, (2.75 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_{25}^D = +23.1$ ($c = 0.9$, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3 1:1 mezcla de rotámeros): 8.48; 8.35 (s, 1H, CHO); 5.30, 4.90 (s, 1H, CH-tBu); 4.67, 4.30 (d, 1H, $J = 8.6\text{Hz}$, CH_2); 3.79, 3.76 (s, 3H, OCH_3); 3.77, 3.61 (d, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$, CH_2); 1.70, 1.68 (s, 3H, $\text{Cq}(\text{CH}_3)$); 1.03, 0.90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$).

(2S, 4R)-4-Alil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina



Se siguió el procedimiento general a partir de (2*S*, 4*R*)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (20 mmol, 4.31 g) y bromuro de alilo (50 mmol, 4.4 mL). El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 75%, (3.78 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_{25}^D = +7.9$ ($c = 0.85$, CHCl_3); IR(cm^{-1} , KBr): 1743; 1688 (C=O); MS (70 eV, EI): m/z : 198(73); 196(82); 171(79); 170(99); 156(38); 127(11); 125(14); 111(33); 110(100); 86(25); 83(51); 82(97); 67(35); 57(93); 55(98); 53(22). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3 , 1:1 mezcla de rotámeros): 8.54, 8.40 (s, 1H); 5.77, 5.67 (M, 1H); 5.26-5.18 (m, 2H); 4.92 (s, 1H); 4.85 (s, 1H); 4.62, 3.92 (d, 1H, $J = 9.2\text{ Hz}$); 4.27, 4.07 (d, 1H, $J = 9.2\text{ Hz}$); 3.83, 3.80 (s, 3H); 3.25 (dd, 1H, $J_1 = 14.2\text{ Hz}$, $J_2 = 8.2\text{ Hz}$); 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 14.2\text{ Hz}$, $J_2 = 7.0\text{ Hz}$); 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 14.2\text{ Hz}$, $J_2 = 6.6\text{ Hz}$); 2.68 (dd, 1H, $J_1 = 14.0\text{ Hz}$, $J_2 = 7.4\text{ Hz}$); 1.04, 0.94 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3 , 1:1 mezcla): 171.5; 170.9; 162.3; 159.5; 131.5; 129.4; 121.3; 120.1; 98.1; 97.0; 74.0; 73.0; 68.0; 67.3; 52.8; 52.6; 42.4; 38.3; 37.3; 36.3; 25.9; 25.5. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C, 61.16; H, 8.29; N, 5.49. Hallado: C, 60.78; H, 8.35; N, 5.25.

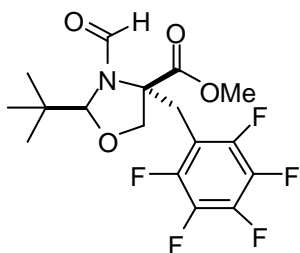
(2*S*, 4*R*)-4-Isobutil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina



Se siguió el procedimiento general a partir de (2*S*, 4*R*)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (10 mmol, 2.15 g) y yoduro de isobutilo (20 mmol, 2.3 mL). El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 30%, (0.81 g).

Datos de caracterización: $[\alpha]_{25}^D = +27.6$ ($c = 1.0$, Cl_2CH_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1753; 1688 ($\text{C}=\text{O}$); MS (70 eV, EI): m/z : 125(14); 111(25); 97(41); 85(34); 83(38); 71(49); 69(37); 57(100). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3 , mezcla de rotámeros): 8.51, 8.38 (s, 1H, CHO); 5.27, 4.92 (s, 1H, $\text{CH-}^t\text{Bu}$); 4.69, 4.37 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-C(5)); 3.96, 3.74 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-C(5)); 3.78, 3.74 (s, 3H, OCH_3); 2.23, 2.15 (m, 2H, CH_2CH); 1.70 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.00, 0.90 (s, 9H, ^tBu); 0.98, 0.93 (dd, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 172.1; 162.5; 159.8; 98.2; 96.5; 74.3; 72.9; 68.0; 52.8; 46.7; 40.4; 38.0; 26.0; 25.6; 24.8; 24.2; 23.4. HRMS (m/z): 271.1784; $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ requiere: 271.1784.

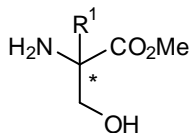
(2*S*,4*R*)-4-(2,3,4,5,6-Pentafluorobencil)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina



Se siguió el procedimiento general a partir de (2*S*, 4*R*)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (20 mmol, 4.31 g) y bromuro de 2,3,4,5,6-pentafluorobencilo (24 mmol, 2.11 mL). El producto se obtuvo como un aceite. Rendimiento: 85%, (6.72 g). *Datos de caracterización:* MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 310(100); 250(38);

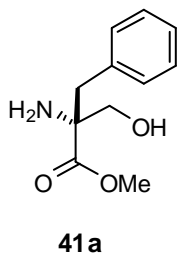
181(73). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3 , 1:1 mezcla de rotámeros): 8.67-8.21 (s, 1H, CHO); 4.82-4.56 (s, 1H, $\text{CH-}^t\text{Bu}$); 4.41- 4.16 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-C(5)); 4.06-3.95 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-C(5)); 3.88-3.85 (s, 3H, OCH_3); 3.67-3.28 (d, 2H, $J = 14.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{F}_5$); 1.00-0.95 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3 , 1:1 mezcla de rotámeros): 169.8; 161.7; 161.0; 160.6; 159.7; 147.6; 144.3; 139.3; 135.8; 109.9; 98.8; 97.3; 96.6; 73.2; 72.5; 67.6; 60.4; 53.2; 52.6; 48.1; 46.7; 40.9; 38.5; 37.8; 31.9; 31.2; 29.7; 26.3; 25.6; 24.9; 24.7; 24.5. HRMS (m/z): 395.1162; $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_5\text{NO}_4$ requiere 395.1156.

5.2.2 Procedimiento general de preparación de ésteres metílicos de α -alquilserinas enantioméricamente puras



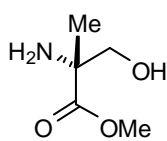
A la disolución de la correspondiente 4-alkil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina, (10 mmol) en MeOH (70 mL), se le adicionaron 19.2 mL de HCl 12N. La mezcla se agitó a reflujo de 6 a 12 horas, hasta comprobar la finalización de la reacción por ^1H -RMN. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el crudo se filtró y lavó con Et₂O. Al clorhidrato resultante se le adicionó una disolución saturada de NaHCO₃ hasta pH básico. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 15 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, se obtuvieron los productos como ésteres metílicos de α -alquilserina.

(*R*)-2-Bencil-serinato de metilo



Se siguió el procedimiento general partiendo de (2*S*, 4*R*)-4-bencil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (10 mmol, 3.05 g). el producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 92%, (1.92 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 110-111°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6.4$ ($c = 1.0$, CH Cl₃); IR(cm⁻¹, KBr): 3254; 1743, 1601 (C=O); 1422; MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+1: 210.1; MS2(210.1): 150.0, 143.0, 133.0, 132.1, 115.1, 91.2, 70.3; MS3(150.0): 133.0, 132.1, 120.2, 91.2; MS4(133.0): 115.1, 105.1, 91.1, 55.5. ^1H -NMR (500MHz, CDCl₃): 7.30-7.11 (m, 5H, CH₂Ph); 3.83 (d, 1H, J= 10.6Hz, CH₂OH); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 3.57 (d, 1H, J= 10.6Hz, CH₂OH); 3.10 (d, 1H, J= 13.4Hz, CH₂Ph); 2.80 (d, 1H, J= 13.4Hz, CH₂Ph); 1.65 (bs, 3H, OH, NH₂). ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl₃): 175.5; 135.3; 129.7; 128.6; 127.2; 67.9; 63.6; 52.3; 41.8. Análisis elemental calculado para C₁₁H₁₅NO₃: C, 63.14; H, 7.23; N, 6.69. Hallado: C, 62.79; H, 7.49; N, 6.51.

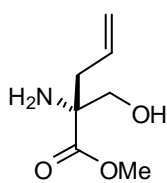
(R)-2-Metil-serinato de metilo



41b

Se siguió el procedimiento general partiendo de (2*S*, 4*R*)-4-metil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (10 mmol, 3.05 g). El producto se obtuvo como sólido blanco. Rendimiento: 97%, (1.29 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = +13.94$ ($c = 0.35$, CHCl_3); IR(cm^{-1} , KBr): 3442 (NH); 2993, 1738 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 3.79 (d, 1H, $J = 10.7\text{Hz}$, CH_2OH); 3.77 (s, 3H, OCH_3); 3.48 (d, 1H, $J = 10.7\text{Hz}$, CH_2OH); 2.17 (bs, 3H, OH y NH_2); 1.31 (s, 3H, CqCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 177.0; 68.8; 59.1; 52.6; 23.1. Análisis elemental teórico para $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (133.15): C, 45.10; H, 8.33; N, 10.52. Experimental: C, 44.87; H, 8.21; N, 9.98.

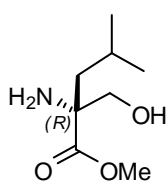
(R)-2-Alil-serinato de metilo



41c

Se siguió el procedimiento general partiendo de (2*S*, 4*R*)-4-alil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (10 mmol, 2.55 g). El producto se obtuvo como un aceite incoloro. Rendimiento: 70%, (1.11 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = +0.9$ ($c = 0.25$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 1739 (C=O); 1220 (^tBu); MS (70 eV, EI): m/z : 139.2(21); 125.2(67); 123(28); 111(100); 109(51); 99(22); 97(93); 95(87); 85(82); 83(86); 81(62); 71(85); 67(20), 57(41); 55(66). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 5.66 (m, 1H, CHCH_2); 5.16-5.12 (m, 2H, CH_2CH); 3.78 (d, 1H, $J = 10.7\text{ Hz}$, CH_2OH); 3.75 (s, 3H, OCH_3); 3.49 (d, 1H, $J = 10.7\text{ Hz}$, CH_2OH); 2.48 (dd, 1H, $J_1 = 13.7\text{ Hz}$, $J_2 = 6.6\text{ Hz}$, CH_2Cq); 2.28 (dd, 1H, $J_1 = 13.8\text{ Hz}$, $J_2 = 8.2\text{ Hz}$, CH_2Cq); 2.14 (bs, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.7; 131.7; 119.9; 67.8; 62.3; 52.4; 40.5. HRMS (m/z): 159.0857; $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_3$ requiere: 159.0895.

(R)-2-Isobutil-serinato de metilo

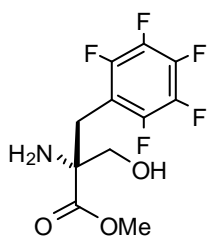


41d

Se siguió el procedimiento general partiendo de (2*S*, 4*R*)-4-isobutil-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxycarbonil-1,3-oxazolidina (10 mmol, 2.71 g). el producto se obtuvo como aceite incoloro. Rendimiento: 82%, (1.43 g).

Datos de caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -35.6$ ($c = 1.07$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1733 (C=O); 1236(^tBu); MS (70 eV, EI): m/z : 125(19); 105(34); 97(63); 95(26); 85(69); 83(75); 71(100); 69(53), 67(23). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 3.75 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz); 3.71 (s, 3H); 3.37 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz); 2.59 (bs, 3H); 1.68-1.58 (m, 2H); 1.41 (dd, 1H, $J_1 = 13.9$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz); 0.91 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz); 0.79 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 176.7; 69.1; 62.3; 52.2; 44.5; 24.4; 23.9; 22.8. HRMS (m/z): 175.1212; $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3$ requiere 175.1208.

(*R*)-2-(2,3,4,5,6-Pentafluorobencil)serinato de metilo

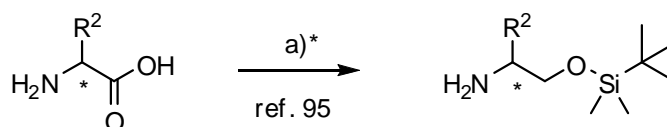


41e

Se siguió el procedimiento general partiendo de (*2S,4R*)-4-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-2-*terc*-butil-3-formil-4-metoxicarbonil-1,3-oxazolidina de metilo (10 mmol, 3.95 g). El producto se obtuvo como aceite incoloro. Rendimiento: 80%, (2.39 g). *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 88-9 °C; $[\alpha]_D^{25} = +2.8$ ($c = 0.5$, Cl_2CH_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1726 (C=O); 1102; 1065 (C-F); MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 208(17); 207(19); 181(100); 71(15). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, ppm, CDCl_3): 3.92 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, CH_2OH); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 3.59 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, CH_2OH); 3.13 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{F}_5$); 3.04 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{F}_5$); 1.70 (bs, 3H, OH and NH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 174.4; 147.2; 143.9; 142.0; 139.1; 138.7; 135.8; 109.5; 67.0; 62.6; 52.8; 29.5. HRMS (m/z): 299.0584; $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_5\text{NO}_3$ requiere: 299.0581.

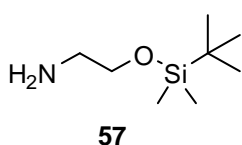
5.2.3 Preparación de α -aminoéteres, α -aminoésteres y alaninamidas enantiopuras

α -aminoéteres



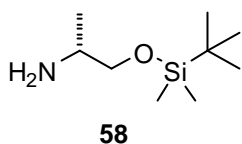
Los β -aminoalcoholes O-protegidos con el grupo *tert*-butildimetilsililo fueron preparados a partir del correspondiente aminoalcohol enantiopuro siguiendo el procedimiento de la referencia 97.

2-(*tert*-Butildimetilsililo)etanamina



Se siguió el procedimiento indicado en la ref. 97 a partir de 2-aminoetanol (10 mmol, 6.1 g.). El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 75%, (1.08 g). *Datos de caracterización:* $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): 3.57 (t, 2H, $J = 5.2\text{Hz}$, SiOCH_2); 2.70 (t, 2H, $J = 5.1\text{Hz}$, H_2NCH_2); 2.35 (bs, 2H, NH_2); 0.83 (s, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$); -0.004 (s, 6H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (50MHz, CDCl_3): 64.85; 44.07; 25.93; 18.3; -5.31.

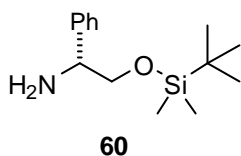
(*R*)-2-Amino-*tert*-butildimetilsiloxipropano



Se siguió el procedimiento indicado en la ref. 97 a partir de (*R*)-2-aminopropan-1-ol (10 mmol, 8.9 g.). El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 92%, (1.74 g). *Datos de caracterización:* $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): 3.56 (dd, 1H, $J = 4.3, 9.7\text{Hz}$, OCH_2CH); 3.33 (dd, 1H, $J = 7.3, 9.7\text{Hz}$, OCH_2CH); 3.08-3.05 (m, 1H, CHCH_3); 1.07 (d, 3H, $J = 6.5\text{Hz}$, CHCH_3); 0.94 (s, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$); 0.10 (s, 6H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): 69.4; 48.5; 25.8; 19.0; 18.2; -5.48; -5.50.

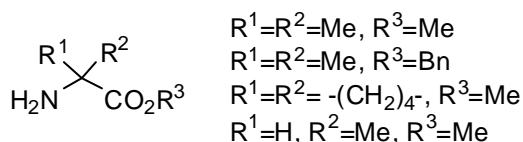
⁹⁷ Steinig, A.G.; Spero, D.M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2406-2410.

(R)-2-Amino-2-fenil-*tert*-butildimetilsiloxipropano



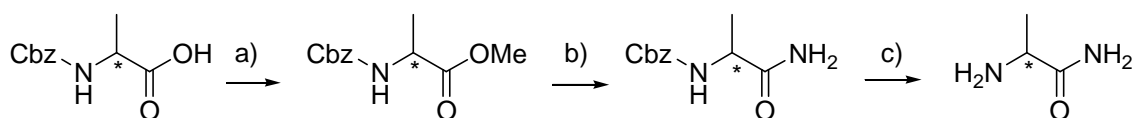
Se siguió el procedimiento indicado en la ref. 97 a partir de (*R*)-2-amino-2-feniletanol (10 mmol, 1.4 g.). El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 84%, (0.77 g). *Datos de caracterización*: $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): 7.43-7.27 (m, 4H, Har); 4.10 (dd, 1H, $J=3.9, 8.3$ Hz, CH_2Ph); 3.76 (dd, 1H, $J=4.3, 9.7$ Hz, OCH_2CH); 3.56 (dd, 1H, $J=8.3, 9.7$ Hz OCH_2CH); 1.98 (bs, 2H, NH_2); 0.95 (s, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$); 0.07 (s, 6H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (50MHz, CDCl_3): 142.7; 128.4; 127.4; 127.0; 69.7; 57.7; 26.1; 18.4; -5.3.

α -Aminoésteres



Los aminoésteres **68** (H-Aib-OMe), **74** (H-Aib-OBn), **65b** (H-Ala-OMe) y **69** (H-C(Cyp)-OMe) fueron preparados a partir del ácido α -aminoisobutírico, alanina y ácido α -aminociclopentánico según los procedimientos descritos en las referencias 98 y 99.

Alaninamidas



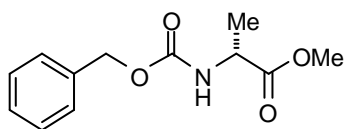
⁹⁸ Dubnisson, C.; Fukunato, Y.; Hegedus, L.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 13, 3697-3704.

⁹⁹ Gilbertson, S.R.; Chen, G.; Kao, J.; Beatty, A.; Campana, Ch. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5557-5566.

Procedimiento general para la esterificación de N-benciloxycarbonilalanina:

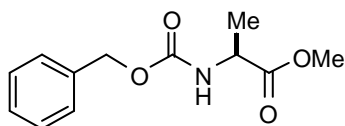
A una suspensión de Cbz-Ala-OH (1 mmol, 0.223 g) en 5 mL de tolueno seco a 0°C se le adicionaron DBU (2 mmol, 0.3 mL) y yoduro de metilo, (3 mmol, 0.2 mL). La mezcla se dejó agitar 16 horas permitiendo que alcanzara temperatura ambiente. Transcurrido este período, se lavó con HCl 1M (3x10 mL), NaHCO₃ (3x10 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂. El crudo de reacción se purificó mediante filtración en columna de gel de sílice eluyendo primeramente con CH₂Cl₂ y posteriormente MeOH.

(R)-Cbz-Ala-OMe



Se siguió el procedimiento general a partir de la (R)-Cbz-Ala-OH (1 mmol, 0.223 g). El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 80%, (0.189 g). *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 47-48°C; $[\alpha]_D^{25} = +30.2$ (c= 1, MeOH); ¹H-NMR (δ, CDCl₃): 7.37-7.32 (m, 5H, Ar); 5.3 (bs, 1H, NH); 5.13 (d, 1H, J=12.6Hz, Ph-CH₂); 5.10 (d, 1H, J=12.3Hz, Ph-CH₂); 4.41 (m, 1H, CH(CH₃)); 3.76 (s, 3H, OCH₃); 1.42 (d, 3H, J=7.1Hz, (CH₃)C); ¹³C-NMR (δ, CDCl₃): 173.3; 155.5; 136.2; 128.4; 128.0, 127.9, 66.8; 52.2; 49.5; 18.4. Análisis elemental calculado para C₁₂H₁₅NO₄: C, 60.75; H, 6.37; N, 5.90. Hallado: C, 60.35; H, 6.01; N, 5.94.

(S)-Cbz-Ala-OMe

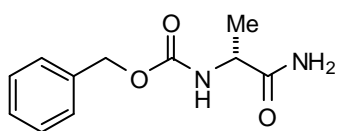


Se siguió el procedimiento general a partir de la (S)-Cbz-Ala-OH (1 mmol, 0.223 g). Sólido blanco. Rendimiento: 85%, (0.200 g). *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 47-48°C; $[\alpha]_D^{25} = -33$ (c= 1.2, MeOH). Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los del compuesto anterior.

Procedimiento general de preparación de N-benciloxycarbonilalaninamidas

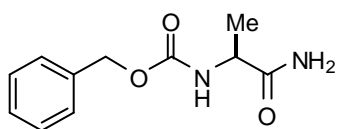
Se saturó una suspensión del correspondiente éster metílico de N-benciloxycarbonilalanina (1 mmol, 0.237 g) en 10 mL de MeOH con $\text{NH}_3(\text{g})$ repetidas veces durante 24 horas hasta observar mediante TLC la conversión total del producto de partida. El rendimiento de reacción en ambos casos resultó cuantitativo y el producto no requirió de posterior purificación.

(R)-Benciloxycarbonilalaninamida



Se siguió el procedimiento general a partir de la (R)-Cbz-Ala-OMe (1 mmol, 0.237 g). El producto se obtuvo como sólido blanco. Rendimiento: 100%, (0.222 g). *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 130-131°C; $[\alpha]_D^{25} = +12$ (c= 0.7, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 7.38-7.31 (m, 5H, Ar); 6.26 (bs, 1H, NH_2), 5.7 (bs, 1H, NH_2); 5.53 (d, 1H, J=6.9Hz, CH_2Ph); 5.11 (d, 1H, J=12.1Hz, CH_2Ph); 4.27 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$); 1.39 (d, 3H, J=7.1Hz, $(\text{CH}_3)\text{CH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.4; 156.1; 136.2; 128.5; 128.2, 127.9, 67.0; 50.4; 18.5. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 59.45; H, 6.35; N, 12.60. Hallado: C, 59.11; H, 6.10; N, 12.64.

(S)-Benciloxycarbonilalaninamida



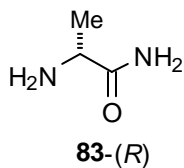
Se siguió el procedimiento general a partir de la (S)-Cbz-Ala-OMe (1 mmol, 0.237 g). El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 100%, (0.222 g). *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 130-131°C; $[\alpha]_D^{25} = -11.2$ (c= 0.6, CH_2Cl_2). Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los del compuesto anterior.

Procedimiento general de preparación de alaninamidas:

A una suspensión de la correspondiente Cbz-Ala- NH_2 (1 mmol, 0.222 g) en 10 mL de MeOH se le adicionó Pd/C (10% en peso, 0.022 g) y sobre la suspensión se hizo

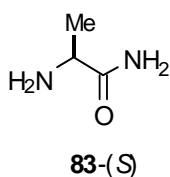
borbotear H₂. La mezcla se dejó agitar durante 1 hora en atmósfera de hidrógeno, se filtró sobre celita y se evaporó a presión reducida. El rendimiento de la reacción fue cuantitativo y el crudo obtenido no precisó de purificación.

(*R*)-Alaninamida



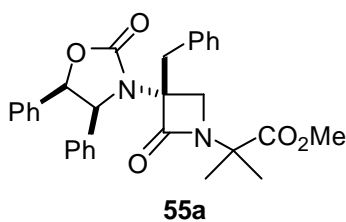
Se siguió el procedimiento general a partir de la (*R*)-Cbz-Ala-NH₂ (1 mmol, 0.222 g). El producto se obtuvo como un aceite amarillo. Rendimiento: 100%, 0.104 g. *Datos de caracterización*: ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃, mezcla de rotámeros): 7.1 (bs, 1H, NHCO); 6.40 (bs, 1H, NHCO), 3.45 (m, 1H, CH(CH₃)); 1.29 (d, 3H, J=7.0Hz, (CH₃)CH).

(*S*)-Alaninamida



Se siguió el procedimiento general a partir de la (*S*)-Cbz-Ala-NH₂ (1 mmol, 0.222 g). El producto se obtuvo como un aceite amarillo. Rendimiento: 100%, (0.104 g). Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los del compuesto **83-(*R*)**.

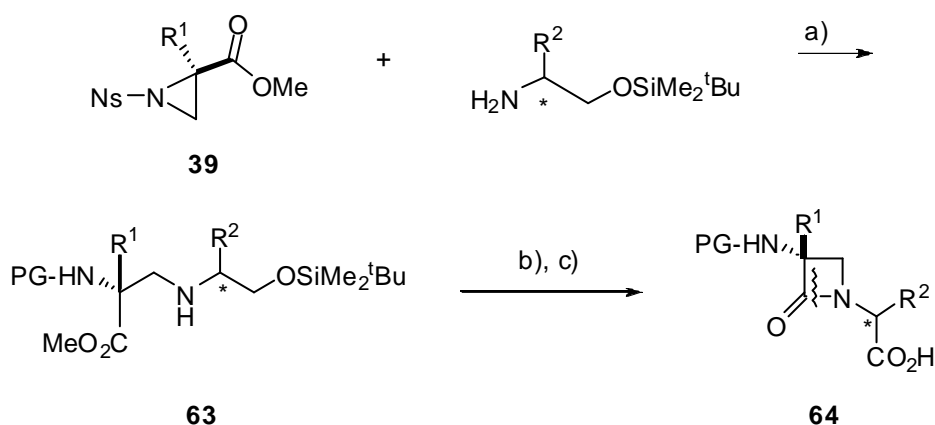
3-Bencil-3-[(4*R*,5*S*)-4,5-difenil-2-oxooxazolidin-3-il]-1-(1-metoxycarbonil-isopropil)azetidín-2-ona



Se disolvió 3-Bencil-3-[(4*R*,5*S*)-4,5-difenil-2-oxooxazolidin-3-il]-1-(1-metoxycarbonilmetil)azetidín-2-ona **54a** (1 mmol, 0.48 g) en 120 mL de THF a -78°C. A continuación se adicionó LiHMDS (3 mmol, 3 mL) y la mezcla se dejó agitar 5 minutos antes de gotearle MeI como agente alquilante. La reacción se siguió por TLC hasta observar la total desaparición del producto de partida tras 30 min. El crudo se purificó mediante columna cromatográfica con gel de sílice utilizando como eluyente Hexano/EtOAc 3/2. El producto se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento: 50%, (0.250 g). *Datos de caracterización*: IR(cm⁻¹, KBr): 1754 (C=O), 1708 (C=O), 738.8, 698 (SiO).; MS m/z (70 eV, EI): m/z:

+MS: 521.5, +MS2: 499.8, +MS3: 471.3. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.3-7.1 (m, 5H, Ar); 6.01 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$, CHPh), 5.43 (d, 1H, $J=7.55\text{Hz}$, CHPh); 3.67 (d, 1H, $J=5.9\text{Hz}$, CH_2N); 3.34 (d, 1H, $J=5.9\text{Hz}$, CH_2N); 3.02 (d, 1H, $J=13.3\text{Hz}$, CH_2Ph); 2.55 (d, 1H, $J=13.3\text{Hz}$, CH_2Ph); 1.35 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 0.96 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 172.8; 164.3; 156.6; 135.6; 134.5; 133.9; 130.4; 128.5; 128.1; 127.9; 127.6; 127.0; 125.7; 80.9; 68.9; 64.9; 58.8; 52.6; 48.2; 37.6; 23.3; 23.3. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 72.27; H, 6.06; N, 5.62. Hallado: C, 71.42; H, 6.31; N, 5.39.

5.3 Síntesis de α,α' -dialquil- β -lactamas vía condensación de β -azaalaninas α -sustituídas

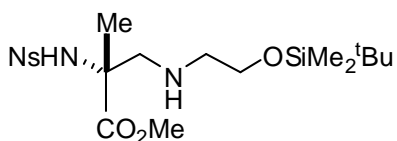


5.3.1 Procedimiento general de preparación de β -azaalaninas α -sustituídas

Una suspensión del correspondiente éster metílico de α -alquilserina (1 mmol), cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (2.1 mmol, 0.47g) y KHCO_3 (5 mmol, 0.5 g) en acetonitrilo (15 mL) se calentó a reflujo con agitación en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. A continuación, sobre la disolución de la 2-alkil-2-metoxycarbonil-N-(2-nitrobenzenosulfonamido)-aziridina **39** así formada se adicionó a temperatura ambiente la correspondiente β -(O-*terc*-butil-dimetilsilil)amina **57-62** (1.5 mmol) y una cantidad adicional de KHCO_3 (2 mmol, 0.20 g). La mezcla se agitó 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añadió EtOAc (50 mL), la mezcla se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 (3x15 mL) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x15

mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: Hexano/EtOAc).

(R)-2-Metil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)amino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo

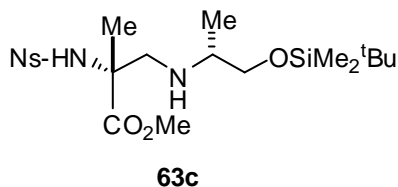


Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39b** (1 mmol, 0.300 g) y 2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etanamina (1 mmol, 0.271 g). Aceite incoloro.

Rendimiento: 70%, (0.328 g). $[\alpha]_D^{25} = +37.2$ ($c = 0.9$,

CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹, KBr): 2934, 2858 (NH), 1740 (C=O), 1542 (NO₂), 1364. MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 352(94); 322(124); 224(222); 188(258); 172(274); 145(301); 130(316); 92(354); 73(373); 59(387). ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD): 8.10-7.70 (m, 4H, Ns); 3.65 (t, 2H, J= 8.8, 4.4Hz, CH₂NH); 3.56 (s, 3H, OCH₃), 3.03 (d, 1H, J= 12.8Hz, OCH₂); 2.75 (d, 1H, J=12.8Hz, OCH₂); 2.67 (t, 1H, J= 10.2, 5.1Hz, CqCH); 1.56 (s, 3H, CqCH₃); 0.86 (s, 9H, ^tBu); 0.03 (s, 6H, Si(Me₃)₂); 0.01 (s, 3H, OSi-CH₃). ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD): 173.1, 136.7, 133.0, 132.8, 130.2, 125.3, 62.7, 62.3, 57.3, 52.6, 51.6, 25.9, 22.3, 18.3, -5.3. Análisis elemental calculado para C₁₉H₃₃N₃O₇SSi: C, 47.98; H, 6.99; N, 8.83. Hallado: C, 47.65; H, 6.86; N, 8.53.

(R)-2-Metil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo



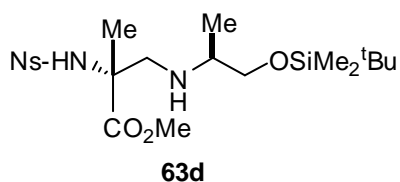
Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39b** (1 mmol, 0.300 g) y (*R*)-2-amino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.188 g).

Rendimiento: 70%, (0.202 g). ¹H-NMR (500MHz,

CD₃OD): 8.10-7.70 (m, 4H, Ns); 3.54-3.52 (m, 1H, OCH₂); 3.53 (s, 3H, OCH₃); 3.37-3.34 (m, 1H, OCH₂); 3.01 (d, 1H, J=12.3Hz, CqCH₂); 2.68-2.66 (m, 2H, CqCH, CHMe); 1.58 (s, 3H, CqCH₃); 0.99 (d, 3H, J=6.4Hz, CHCH₃); 0.84 (s, 9H, ^tBu); 0.01 (s,

3H, OSi-CH₃). ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD): 173.0; 147.6; 136.8; 132.8; 130.2; 125.1; 66.9; 62.4; 55.2; 54.5; 52.4; 25.8; 22.3; 16.99; -5.49; -5.52.

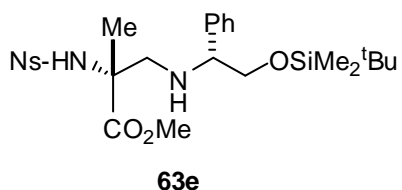
(R)-2-Metil-3-[(1S)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39b** (1 mmol, 0.300 g) y (*S*)-2-amino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.188 g). Rendimiento: 84%, (0.242 g). ¹H-NMR (500MHz,

CD₃OD): 8.09-7.67 (m, 4H, Ns); 3.58 (s, 3H, OCH₃); 3.52 (dd, 1H, J= 4.4, 9.8Hz, CHCH₂); 3.41 (dd, 1H, J= 4.4, 9.8Hz, CHCH₂); 2.97 (d, 1H, J=12.3Hz, CqCH₂); 2.77 (d, 1H, J=12.3Hz, CqCH); 2.70-2.67 (m, 1H, CHCH₃); 1.53 (s, 3H, CqCH₃); 0.98 (d, 3H, J=6.4Hz, CHCH₃); 0.86 (s, 9H, ^tBu); 0.03 (s, 3H, OSi-CH₃). ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD): 173.0; 147.6; 136.9; 132.8; 130.1; 125.2; 67.0; 54.8; 54.8; 52.5; 25.9; 22.0; 17.1; -5.5.

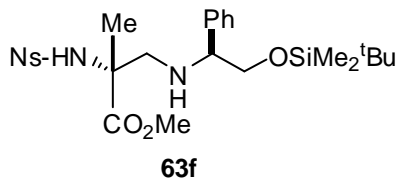
(R)-2-Metil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39b** (1 mmol, 0.300 g) y (*R*)-2-fenilamino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.251 g). Rendimiento: 79%, (0.276 g). ¹H-

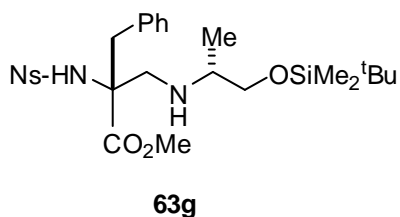
NMR (500MHz, CD₃OD): 8.07-7.70 (m, 4H, Ns); 7.42-7.29 (m, 5H, Ar-H, Ph); 3.75-3.73 (dd, 1H, J=6.6, 13.3Hz, CHCH₂); 3.67-3.58 (m, 5H, CHCH₂, CHPh, OCH₃); 2.87 (d, 1H, J=12.0Hz, CqCH₂); 2.54 (d, 1H, J=12.0Hz, CqCH); 1.53 (s, 3H, CqCH₃); 0.88 (s, 9H, ^tBu); 0.03 (s, 3H, OSi-CH₃); 0.02 (s, 3H, OSi-CH₃); ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD): 172.9; 147.0; 139.5; 136.7; 132.8; 132.6; 130.2; 128.7; 127.9; 127.8; 125.2; 68.2; 64.6; 62.1; 55.1; 52.5; 25.8; 22.4; -5.5.

(R)-2-Metil-3-[(1S)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo



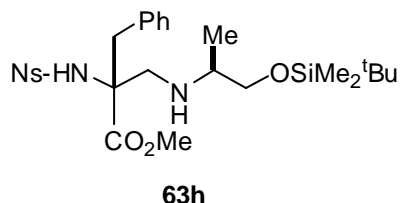
Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39b** (1 mmol, 0.300 g) y (*S*)-2-fenilamino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.251 g). Rendimiento: 84%, (0.294 g). ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD): 8.12-7.70 (m, 4H, Ns); 7.35-7.26 (m, 5H, Ar-H, Ph); 3.73-3.68 (dd, 1H, $J=6.6, 13.3\text{Hz}$, CHCH_2); 3.02 (s, 3H, OCH_3); 2.91 (d, 1H, $J=12.0\text{Hz}$, CqCH_2); 2.77 (d, 1H, $J=12.0\text{Hz}$, CqCH); 1.51 (s, 3H, CqCH_3); 0.90 (s, 9H, ^tBu); 0.03 (s, 3H, OSi-CH_3); ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD): 172.9; 147.7; 140.5; 136.8; 133.1; 132.8; 130.1; 128.3; 127.7; 127.6; 127.4; 125.3; 68.1; 64.7; 63.6; 55.2; 52.7; 25.9; 21.7; 18.2; -5.5.

(R)-2-Bencil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39a** (1 mmol, 0.376 g) y (*R*)-2-amino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.188 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 50%, (0.283 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 77-80°C; $[\alpha]_D^{25} = +14$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3340, 3320 (NH); 1740 (C=O), 1540 (NO_2), 1360 (SO_2), 1170 (SO_2), 1090 (SiO), 838 (SiO); MS m/z (70 eV, EI): m/z : 566.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3): 8.20-7.65 (m, 4H, Ns); 7.45-7.20 (m, 5H, Har (Ph)); 3.51 (s, 3H, OCH_3); 3.39 (s, 2H, CqCH_2NH); 3.33 (dd, 2H, $J=6.5, 14.4\text{Hz}$, CH_2OSi); 2.99 (d, 1H, $J=12.5\text{Hz}$, CCH_2Ph); 2.90 (d, 1H, $J=12.5\text{Hz}$, CCH_2Ph); 2.55-2.45 (m, 1H, $J=6.4\text{Hz}$, CHCH_3); 0.83 (d, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$); 0.75 (d, 3H, $J=6.4\text{Hz}$, CH_3); -0.02 (s, 6H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_3)_3$). ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3): 171.9; 147.4; 136.7; 134.9; 132.9; 132.7; 130.4; 130.1; 128.4; 127.1; 125.3; 67.8; 67.1; 52.4; 51.3; 41.1; 25.9; 18.2; 17.1; -5.5. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7$: C, 55.20; H, 6.95; N, 7.43. Hallado: C, 55.90; H, 7.75; N, 7.25.

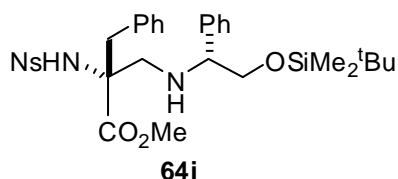
(R)-2-Bencil-3-[(1S)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39a** (1 mmol, 0.376 g) y (*S*)-2-amino-*tert*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.188 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 50%, (0.283 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 86-88°C; $[\alpha]_D^{25} = +28$

(*c* = 1, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3350, 3330 (NH); 1750 (C=O), 1540 (NO₂), 1360 (SO₂), 1160 (SO₂), 1080 (SiO), 836 (SiO).; MS m/z (70 eV, EI): m/z: 566.4 [M+H]⁺. ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 8.15-7.35 (m, 4H, Ns); 7.28-7.20 (m, 5H, Ph); 3.51 (s, 3H, OCH₃); 3.37 (s, 2H, CqCH₂NH); 3.32 (dd, 2H, J=5.5, 14.4Hz, CH₂OSi); 3.28 (d, 1H, J=5.5Hz, CH₂OSi); CCH₂Ph); 2.90 (s, 1H, CCH₂Ph); 2.56-2.44 (m, 1H, J=5.4Hz, CHCH₃); 0.87 (d, 3H, J=6.4Hz, CH₃); 0.86 (d, 9H, OSi(CH₃)₂(CH₃)₃); -0.003 (s, 6H, OSi(CH₃)₂(CH₃)₃). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 171.9; 147.4; 136.7; 134.9; 132.8, 132.7, 130.4; 130.1; 128.3; 127.1; 125.3; 67.8; 67.1; 52.4; 51.3; 41.1; 25.9; 18.2; 17.1; -5.5. Análisis elemental calculado para C₂₆H₃₉N₃O₇ (565.67): C, 55.20; H, 6.95; N, 7.43. Hallado: C, 55.70; H, 7.48; N, 7.57.

(R)-2-Bencil-3-[(1R)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenceno sulfonamido)-propanoato de metilo

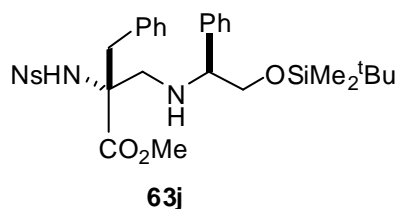


Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39a** (1 mmol, 0.376 g) y (*R*)-2-fenilamino-*tert*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.251 g). Aceite incoloro. Rendimiento: 46%, (0.293 g).

Datos de caracterización: $[\alpha]_D^{25} = +6.6$ (*c* = 1, CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹, KBr): 3343 (NH), 1739 (C=O), 842 (Si-C); MS m/z (Fuente de iones de tipo: ESI, polaridad positiva): MS+1: 628.3; MS2(628.3): 508.1, 498.0, 497.0, 496.1, 395.0, 394.1, 334.1, 305.1, 234.1; MS3(496.0): 437.0, 436.0, 250.0, 249.0, 235.0, 234.0, 178.0, 169.9, 159.0; MS4(234.0): 155.9, 143.0; MS3(394.1): 334.0, 305.0, 178.0, 175.0, 148.0, 147.0, 142.9, 131.0, 115.1; MS4(305.0): 195.9, 194.9, 185.9, 134.0, 120.1, 119.0, 118.1, 108.1. ¹H-

NMR (500MHz, CDCl₃): 8.08-7.63 (m, 4H, Ns); 7.28-7.12 (m, 10H, Ph); 3.60-3.55 (m, 3H_s); 3.48 (s, 3H, OCH₃); 3.36 (s, 2H, CH₂Ph); 2.87 (d, 1H, J=12Hz, CH₂OSi); 2.77 (d, 1H, J=12Hz, CH₂OSi); 0.84 (s, 9H, ^tBu); -0.04 (s, 3H, OSi(CH₃)₂); -0.05 (s, 3H, OSi(CH₃)₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.9, 147.5, 139.4, 136.5, 134.7, 132.8, 132.6, 130.5, 130.3, 128.3, 128.2, 128.2, 127.6, 127.0, 125.2, 68.0, 66.9, 64.6, 52.3, 51.3, 41.0, 25.9, 25.8, -5.6, -5.5. Análisis elemental calculado para C₃₁H₄₁N₃O₇SSi (426.6437) : C, 59.31; H, 6.58; N, 6.69. Hallado: C, 58.10; H, 6.59; N, 6.54.

(R)-2-Bencil-3-[(1S)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenzeno sulfonamido)-propanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de la aziridina **39a** (1 mmol, 0.376 g) y (*S*)-2-fenilamino-*terc*-butildimetilsililoxipropano (1 mmol, 0.251 g). Aceite incoloro. Rendimiento: 50%, (0.318 g). *Datos de*

caracterización: $[\alpha]_D^{25} = +45.98$ ($c = 0.5$, CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹, KBr): 3436 (NH), 1744 (C=O), 1653.; MS m/z (Fuente de iones de tipo: ESI, polaridad positiva): MS+1: 628.3; MS2(628.3): 508.1, 498.0, 497.0, 496.1, 395.0, 394.1, 334.1, 305.1, 234.1; MS3(496.0): 437.0, 436.0, 250.0, 249.0, 235.0, 234.0, 178.0, 169.9, 159.0; MS4(234.0): 155.9, 143.0; MS3(394.1): 334.0, 305.0, 178.0, 175.0, 148.0, 147.0, 142.9, 131.0, 115.1; MS4(305.0): 195.9, 194.9, 185.9, 134.0, 120.1, 119.0, 118.1, 108.1. ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 8.17-7.68 (m, 4H, Ns); 7.39-7.18 (m, 10H, Ph); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 3.64-3.57 (m, 3H_s); 3.49 (d, 1H, J= 14.3Hz, CH₂Ph); 3.33 (d, 1H, J= 14.3Hz, CH₂Ph); 3.21 (d, 1H, J=12.2Hz, CH₂OSi); 2.97 (d, 1H, J=12.2Hz, CH₂OSi); 0.94 (s, 9H, ^tBu); 0.04 (s, 3H, OSi(CH₃)₂); -0.017 (s, 3H, OSi(CH₃)₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.7, 147.5, 140.7, 136.6, 135.0, 133.0, 132.8, 130.0, 128.3, 128.3, 127.7, 127.5, 127.0, 125.3, 68.7, 68.2, 64.6, 52.5, 40.8, 25.9, -5.6. Análisis elemental calculado para C₃₁H₄₁N₃O₇SSi (426.6437) : C, 59.31; H, 6.58; N, 6.69. Hallado: C, 59.39; H, 6.61; N, 7.65.

5.3.2 Procedimiento general de preparación de α -metil, α -(2-nosilbencenosulfonamido)- α' -alquil- β -lactamas 64

Se adicionaron lentamente 2.5 mmol de LiHMDS en THF (1M) sobre una disolución de la correspondiente azaalanina **63** (1 mmol) en THF seco (15 mL) enfriada a 0°C. Se observó el oscurecimiento inmediato del medio de reacción. Tras 12 horas de agitación, se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3x10 mL). El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía de columna con una mezcla de eluyente Hexano/EtOAc. El intermedio sililado (1 mmol) se sometió a desprotección con HF al 48% (1.2 mmol, 0.1 mL) en CH₃CN (10 mL) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras neutralizar con una disolución saturada de NaHCO₃ la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3x10 mL), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a presión reducida. El producto resultante consistente en la correspondiente N-hidroxietil- β -lactama no requirió de purificación alguna para el siguiente paso. Para éste se aplicaron dos métodos diferentes:

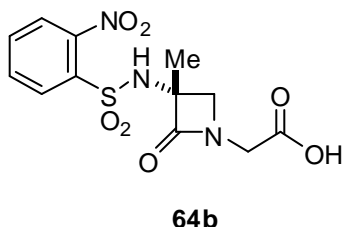
Método A¹⁰⁰: BAIB (2.2 mmol, 0.707 g), TEMPO (0.5 mmol, 0.078g) y la N-hidroxietil- β -lactama correspondiente (1 mmol) fueron disueltos en una mezcla de acetona/H₂O 1:1 (2 mL). La reacción se dejó agitar durante 3 horas tras lo cual se evaporará el disolvente en el rotavapor. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía de columna (gel de sílice, Hexano/EtOAc 1:10 o CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

Método B: Se adicionó el reactivo de Jones¹⁰¹ (CrO₃ en H₂SO₄ 0.6 M, 2 mmol) sobre una disolución de la correspondiente N-hidroxifeniletal- β -lactama (1 mmol) en acetona (15 mL) a 0°C y se dejó agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se eliminó el exceso de reactivo oxidante con ⁱPrOH (20 mL) y el sólido restante se redisolvió en H₂O (10 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x10 mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ (3x10 mL) y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

¹⁰⁰ Epp, J.E.; Widlanski, T.S. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 293-295.

¹⁰¹ Reactivo de Jones 3.12M: CrO₃, 0.67 g disuelto en 1.25 mL de H₂O. Añadir gota a gota 0.58 mL de H₂SO₄ (98%). El precipitado formado se redissuelve en una cantidad adicional de H₂O hasta un volumen total de 2.23 mL: Rychnovsky, S.D.; Skatitzky, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 671-677.

(3R)-3-Metil-1-[(R)-1-carboximetil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona

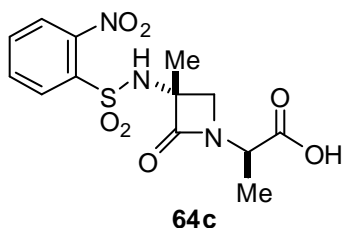


64b

Se siguió el procedimiento general a partir del (R) 2-metil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-amino]-2-(2-nitrobenzensulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.274 g) utilizando el método de oxidación A. El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 93%, 0.105

g. *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 150°C. $[\alpha]_D^{25} = -9.18$ (c= 0.5, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3320, 2944 (NH, OH); 1756, 1728 (C=O), 1544 (NO_2), 1161, 812 (SO_2). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 342.0; MS2(342.0): 200.7, 294.8, 194.7, 185.7, 137.8; MS3(200.7): 136.8. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 8.19-7.78 (m, 4H, Ar (Nosil)); 3.87 (d, 1H, J=20Hz, NCHCq); 3.65-3.62 (m, 3H, NCHCq , NCH_2CO); 3.44 (d, 1H, J=5Hz, NCHCq); 1.57 (s, 3H, CH_3Cq); 1.38 (d, 3H, J=7.5Hz, $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 174.2, 169.9, 149.3, 136.4, 135.0, 133.6, 131.7, 125.9, 67.9, 56.7, 46.1, 20.6. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: C, 41.98; H, 3.82; N, 12.24. Hallado: C, 40.32; H, 3.96; N, 11.93.

(3R)-3-Metil-1-[(R)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



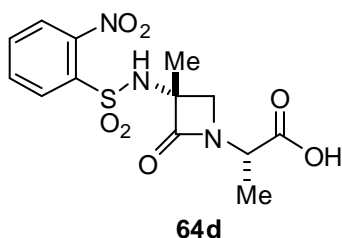
64c

Se siguió el procedimiento general a partir del (R) 2-metil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenzensulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.288 g) utilizando el método de oxidación A. El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 88%,

0.314 g. *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 58-60°C. $[\alpha]_D^{25} = -21.29$ (c= 0.5, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3260, 2901 (NH, OH); 1742, 1728 (C=O), 1543 (NO_2), 1170, 820 (SO_2). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 356.0; MS2(356.0): 200.7, 137.8; MS3(200.7): 136.8. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 8.17-7.83 (m, 4H, Ar (Nosil)); 4.23 (q, 1H, J=7.5Hz, $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}$); 3.63 (d, 1H, J=5.5Hz, NCHCq); 3.50 (d, 1H, J=5.5Hz, NCHCq); 1.58 (s, 3H, CH_3Cq); 1.38 (d, 3H, J=7.5Hz, $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 176.1; 168.1; 147.9; 135.1; 133.6, 132.2,

130.1; 124.4; 65.0; 52.5; 51.5; 19.3; 14.9. Análisis elemental calculado para $C_{13}H_{15}N_3O_7S$: C, 43.69; H, 4.23; N, 11.76. Hallado: C, 43.23; H, 4.38; N, 11.12.

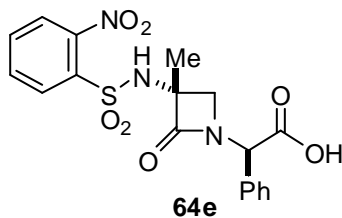
(3R)-3-Metil-1-[(S)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir del (R) 2-metil-3-[(1S)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.288 g) utilizando el método de oxidación A. El producto se obtuvo como un sólido amarillento. Rendimiento: 87%,

(0.310 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 55°C. $[\alpha]_D^{25} = +7.69$ ($c = 0.45$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3320, 2944 (NH, OH); 1747, 1718 (C=O), 1545 (NO₂), 1169, 832 (SO₂). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 355.9; MS2(355.9): 308.8, 200.7, 185.7, 137.8. ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD): 8.22-7.78 (m, 4H, Ar (Nosil)); 4.09 (q, 1H, J=7.2Hz, CH₃CHCO₂H); 3.72 (d, 1H, J=5.8Hz, NCHCq); 1.52 (s, 3H, CH₃Cq); 1.38 (d, 3H, J=7.3Hz, CCH₂Ph); 3.15 (d, 1H, J=13.5Hz, CCH₂Ph); 0.73 (d, 3H, J=7.5Hz, CH₃); ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD): 177.7; 169.4; 149.4; 136.4; 135.0, 133.7, 131.9; 125.9; 66.5; 54.8; 54.8; 54.3; 20.5; 16.5. Análisis elemental calculado para $C_{13}H_{15}N_3O_7S$: C, 43.69; H, 4.23; N, 11.76. Hallado: C, 43.38; H, 3.98; N, 11.23.

(3R)-3-Metil-1-(R)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)azetidin-2-ona

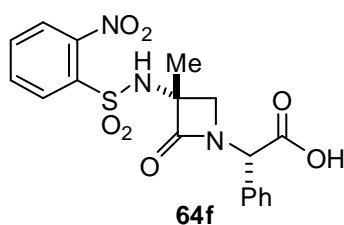


Se siguió el procedimiento general (método de oxidación B) a partir del (R)-2-metil-3-[(1R)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.350 g). Rendimiento: 55%, (0.230 g); El producto se obtuvo como un sólido

amarillento. *Datos de caracterización*: Pto. Fusion: 115°C; $[\alpha]_D^{25} = -56.06$ ($c = 0.7$, MeOH). IR (cm^{-1} , KBr): 3050, 2934 (NH, OH), 1749, 1725 (C=O), 1530 (NO₂), 1156, 802. MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 442.0, 420.0; MS2(420.1): 392.0; 204.9; MS3(392.0): 346.0, 205.0, 158.9. ¹H NMR (500MHz,

CD₃OD): 8.24–7.32 (m, 9H), 5.37 (s, 1H), 3.97 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 3.08 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 1.41 (s, 3H). ¹³C NMR (300MHz, CD₃OD): 170.9, 166.4, 146.4, 134.2, 132.2, 130.86, 129.1, 126.9, 126.5, 126.4, 123.1, 63.8, 58.4, 52.5, 17.8. Análisis elemental calculado para C₁₈H₁₇N₃O₇S: C, 51.55; H, 4.09; N, 10.02. Hallado: C, 51.78; H, 4.28; N, 9.76

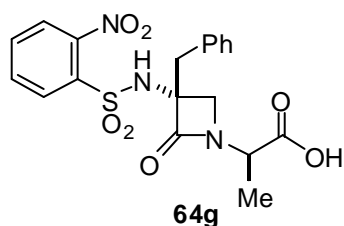
(3R)-3-Metil-2-[(S)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-azetidin-2-ona.



Se siguió el procedimiento general (método de oxidación B) a partir del (R)-2-metil-3-[(1S)-2-(*tert*-butildimetilsililo)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.350 g). Sólido amarillento. Rendimiento: 58%, 0.243 g. *Datos de caracterización:*

Pto. Fusión: 188–190°C. $[\alpha]_D^{25} = +66.35$ ($c = 1.25$, MeOH). IR (cm⁻¹, KBr): 3360, 2944 (NH, OH), 1741, 1736 (C=O), 1536 (NO₂), 1167, 826. MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 442.0, 420.1; MS2(420.1): 392.0; MS3(392.0): 346.0, 205.0, 159.0. ¹H NMR (500MHz, CD₃OD): 7.83–7.33 (m, 9H), 5.38 (s, 1H), 3.56 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 3.23 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 1.60 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CD₃OD): 173.4, 168.1, 147.8, 135.6, 134.9, 133.6, 132.2, 130.0, 128.4, 128.3, 127.7, 124.5, 65.0, 59.8, 52.8, 19.7. Análisis elemental calculado para C₁₈H₁₇N₃O₇S: C, 51.55; H, 4.09; N, 10.02. Hallado: C, 51.32; H, 3.82; N, 9.82.

(3R)-3-Bencil-1-[(R)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona

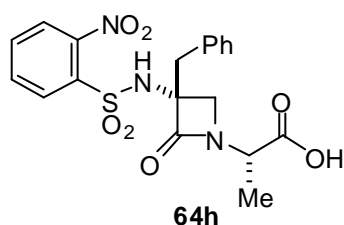


Se siguió el procedimiento general a partir del (R)-2-bencil-3-[(1R)-2-(*tert*-butildimetilsililo)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.364 g) utilizando el método de oxidación B. El producto se obtuvo como un aceite amarillo.

Rendimiento: 89%, (0.385 g). *Datos de caracterización:* $[\alpha]_D^{25} = -95$ ($c = 0.7$, CH₂Cl₂);

IR(cm^{-1} , KBr): 1760 (C=O), 1715 (C=O), 1540 (NO_2), 1360 (SO_2), 1170 (SO_2). MS m/z (70 eV, EI): m/z : 432.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD): 8.05-7.66 (m, 4H, Ns); 7.27-7.20 (m, 5H, Ph); 4.22 (q, 1H, $J=6.9\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}$); 3.60 (d, 1H, $J=5.3\text{Hz}$, NCHCq); 3.58 (d, 1H, $J=5.3\text{Hz}$, NCHCq); 3.22 (s, 2H, CCH_2Ph); 1.32 (d, 3H, $J=7.0\text{Hz}$, CH_3); ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD): 174.6; 168.4; 149.0; 136.3; 135.7; 134.9; 133.7; 131.6; 131.5; 129.5; 128.4; 125.9; 70.5; 51.9; 51.1; 41.0; 15.5. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: C, 52.65; H, 4.42; N, 9.69. Hallado: C, 52.28; H, 5.21; N, 8.98.

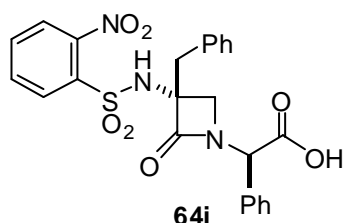
(3R)-3-Bencil-1-[(S)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidín-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir del (*R*)-2-bencil-3-[(1*S*)-2-(*tert*-butildimetilsililo)-1-metilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.364 g) utilizando el método de oxidación B. Aceite incoloro. Rendimiento: 90%, (0.390 g). *Datos de*

caracterización: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20$ ($c = 0.7$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1750 (C=O), 1715 (C=O), 1540 (NO_2), 1360 (SO_2), 1170 (SO_2). MS m/z (70 eV, EI): m/z : 432.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD): 8.24-7.76 (m, 4H, Ns); 7.32-7.22 (m, 5H, Ph); 4.04 (q, 1H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}$); 3.75 (d, 1H, $J=6.1\text{Hz}$, NCHCq); 3.45 (d, 1H, $J=6.1\text{Hz}$, NCHCq); 3.20 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CCH_2Ph); 3.15 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CCH_2Ph); 0.73 (d, 3H, $J=7.5\text{Hz}$, CH_3); ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD): 175.5; 167.6; 149.2; 136.4; 135.6; 135.1; 133.8; 131.9; 131.7; 129.5; 128.5; 126.0; 70.6; 51.2; 49.8; 40.6; 15.3. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: C, 52.65; H, 4.42; N, 9.69. Hallado: C, 52.33; H, 5.02; N, 8.65.

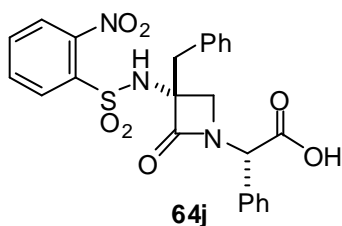
(3R)-3-Bencil-1-[(R)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrofenilsulfonamido)-azetidín-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir del (*R*)-2-bencil-3-[(1*R*)-2-(*tert*-butildimetilsililo)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.426 g) utilizando el método de oxidación B.

Sólido amarillento. Rendimiento: 55%, (0.272 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión = 115°C; $[\alpha]_D^{25} = -56.06$ (c= 0.7, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3050, 2934 (NH, OH), 1749, 1725 (C=O), 1530 (NO_2), 1156, 802 (SO_2). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 442.0, 420.0; MS2(420.1): 392.0; 204.9; MS3(392.0): 346.0, 205.0, 158.9. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD): 8.24-7.32 (m, 9H, Ph, Ns); 5.37 (s, 1H, CH_2Ph), 3.97 (d, 1H, $J=6.0\text{Hz}$, NCHCq); 3.08 (d, 1H, $J=6.0\text{Hz}$); 1.41 (s, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD): 170.9, 166.4, 146.4, 134.2, 132.2, 130.86, 129.1, 126.9, 126.5, 126.4, 123.1, 63.8, 58.4, 52.5, 17.8. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: C, 51.55; H, 4.09; N, 10.02. Hallado: C, 51.79; H, 4.28; N, 9.76.

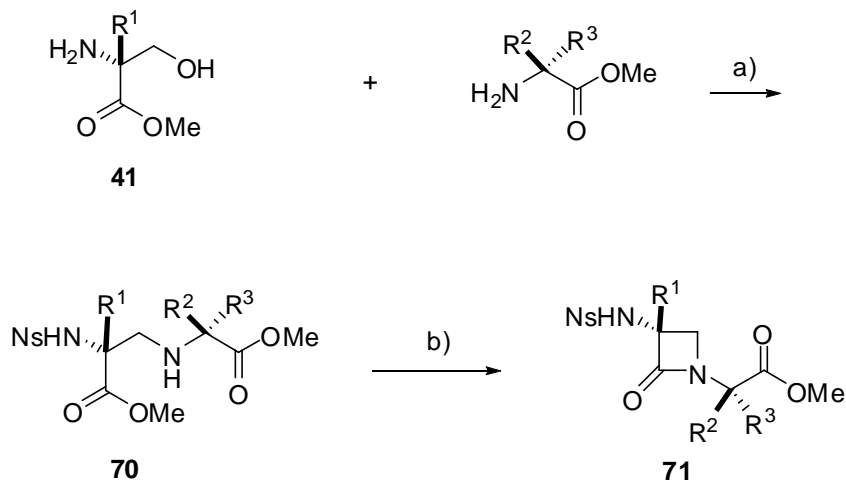
(3R)-3-Metil-1-[(S)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrofenilsulfonamido)-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir del (R)-2-bencil-3-[(1R)-2-(*terc*-butildimetilsililo)-1-fenilamino]-2-(2-nitrobenzenosulfonamido)-propanoato de metilo (1 mmol, 0.426 g) utilizando el método de oxidación B. Sólido amarillento. Rendimiento: 58%, (0.364 g). *Datos de*

caracterización: Pto. Fusión = 188-190°C; $[\alpha]_D^{25} = +66.35$ (c= 1.25, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3360, 2944 (NH, OH), 1741, 1736 (C=O), 1536 (NO_2), 1167, 826 (SO_2). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 442.0, 420.1; MS2(420.1): 392.0; MS3(392.0): 346.0, 205.0, 159.0. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD): 7.83-7.33 (m, 9H, Ph, Ns); 5.38 (s, 1H, CH_2Ph), 3.56 (d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$, NCHCq); 3.23 (d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$); 1.60 (s, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (75MHz, CD_3OD): 173.4, 168.1, 147.8, 135.6, 134.9, 133.6, 132.2, 130.0, 128.4, 128.3, 127.7, 124.5, 65.0, 59.8, 52.8, 19.7. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: C, 51.55; H, 4.09; N, 10.02. Hallado: C, 51.32; H, 3.82; N, 9.82.

5.4 Síntesis de α,α',α' -trialquil- β -lactamas vía condensación de β -azaalaninas α -sustituídas.



5.4.1 Procedimiento general de preparación de 3-alkuil-1-[1,1-dialquil-1-(metoxycarbonil)metil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidín-2-onas

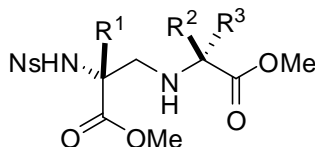
A una disolución de la correspondiente α -alquilserinato de metilo (1 mmol) en CH_3CN seco (20 mL) se le adicionó cloruro de o-nosilo (2.1 mmol, 0.472 g) y KHCO_3 ¹⁰² (5 mmol, 0.50 g). Se calentó la mezcla a reflujo y se agitó durante 16 horas. Después de comprobar mediante ^1H -RMN la formación completa de la correspondiente α -alquil-2-metoxycarbonil-1-(2-nitrobenzenosulfonil)-aziridina intermedia **39**, el α -aminoéster H-Aa-OMe (1.1 mmol) se disolvió en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 seco y se adicionó al medio. Para la preparación de la β -lactama **71e** se le adicionó a la mezcla el complejo CuBrMe_2S ¹⁰³ (0.1 eq.). El sistema se agitó durante 2-24 horas a 40-80°C¹⁰⁴. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró sobre celita, eliminando así el exceso

¹⁰² El KHCO_3 se empleó exento de humedad tras someterlo a un leve calentamiento en la bomba de vacío.

¹⁰³ Para la preparación de los compuestos con un grupo ^iBu en α , se adicionaron 0.1 eq de $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$ para acelerar la reacción de apertura de la aziridina. Ver: Cantrill, A., A., Osborn, H. M. I., Sweeney, J., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 2188-2208.

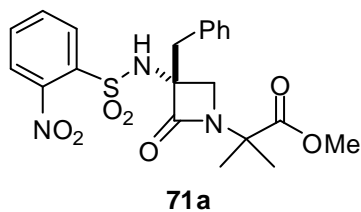
¹⁰⁴ La apertura de la aziridina con H-Aib-OMe debe seguirse analizando alícuotas por ^1H -RMN, siendo ocasionalmente necesario añadir cantidades adicionales del ester metílico hasta completar la reacción.

de KHCO_3 . El β -aminoéster resultante se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice; eluyente: Hexano/EtOAc).



A continuación, el intermedio se disolvió en THF seco (20 mL) a 0°C . Sobre el sistema se adicionó lentamente una disolución de LiHMDS (1M) en THF (2.5 mmol), observándose un fuerte oscurecimiento del color. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 1 hora, tras lo cual se añadió CH_2Cl_2 (30 mL), y se lavó con NaHCO_3 (sat) (3x15 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 . Su evaporación a presión reducida proporcionó un crudo que se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente Hexano/EtOAc).

(3R)-3-Bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidín-2-ona

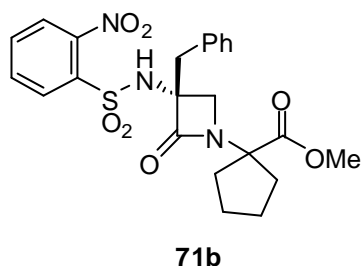


Se siguió el procedimiento general a partir del (R)-2-bencil-serinato de metilo (1 mmol, 0.209 g), *o*-NsCl (2.2 mmol, 0.221 g) y H-Aib-OMe (1.1 mmol, 0.117 g). La reacción de apertura de la aziridina se prolongó durante 16h. El producto se obtuvo como un aceite denso

amarillo. Rendimiento global desde **41a**: 70%, (1.61 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = +53.6$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1746 (C=O); 1713 (C=O); HPLC-MS, MeOH/ HCO_2H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS: 460.0, MS2 (460.0): 434.1, 435.0, 247.1, MS3 (434.0): 248.1, 247.1, 147.0, 146.0, 131.1, 130.1, MS4 (247.1): 189.0, 147.1, 145.9, 130.0. ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3): 7.28-8.19 (m, 9H, Ar), 3.74 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CNCH}_2$), 3.71 (s, 3H, CCO_2CH_3), 3.5 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CNCH}_2$), 3.16 (s, 2H, CCH_2Ph), 1.43 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 1.39 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_3$). ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3): 172.9, 165.1, 147.3, 135.3, 133.5,

132.9, 131.0, 130.1, 128.7, 127.6, 125.2, 68.1, 58.9, 52.6, 51.2, 40.4, 23.6, 23.5.
Análisis elemental calculado para C₂₁H₂₃N₃O₇S: C, 54.65; H, 5.02; N, 9.11. Hallado: C, 54.06; H, 5.25; N, 8.07.

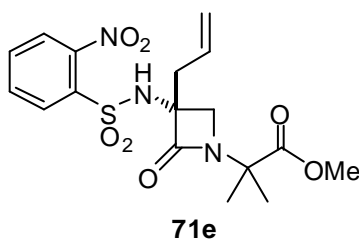
(3R)-3-Bencil-1-[1-(metoxycarbonil)ciclopentil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidina-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir del éster metílico de la (*R*)-2-bencilserina (1 mmol, 0.209 g) y H-Cyp-OMe (1.1 mmol, 0.157 g). La apertura de la aziridina se prolongó durante 16h. Aceite amarillo. Rendimiento desde **41a**: 51%, (0.250 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -45.5$ (c= 1.7, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹

¹, KBr): 3352, 2957 (NH); 1767, 1759 (C=O); HPLC-MS, MeOH/HCO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 288 (10), 219 (13), 133 (12), 120 (15), 97 (12), 92 (25), 91 (100), 71 (11), 67 (24), 57 (15). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 8.18 (dd, 1H, J=7.7Hz), 7.90 (d, 1H, J=7.7Hz), 7.76(m, 4H), 7.31-7.29 (m, 5H), 5.94 (br s, 1H), 3.74-3.73 (m, 4H), 3.54 (d, 1H, J=5.3Hz), 3.22 (s, 2H), 2.35 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.02 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.54 (m, 1H). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 172.9; 165.8; 147.4; 135.5; 133.8; 133.4; 132.9; 130.9; 130.0; 128.8; 127.7; 125.2; 68.9; 68.0; 52.6; 51.8; 40.5; 35.1; 34.9, 23.7. HRMS (m/z): 487.1420; C₂₃H₂₅N₃O₇S requiere: 487.1413.

(3R)-3-Alil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidina-2-ona

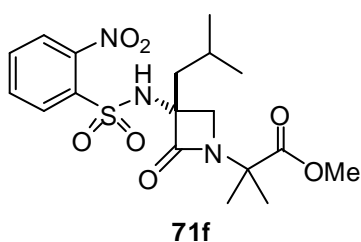


Se siguió el procedimiento general a partir del éster metílico de la (*R*)-2-alilserina (1 mmol, 0.159 g) y H-Aib-OMe (1.1 mmol, 0.117 g). La apertura de la aziridina se prolongó durante 16h. Sólido amarillo. Rendimiento desde **41c**: 63%, 0.259 g. *Datos de caracterización*: Pto.

Fusión: 102°C; $[\alpha]_D^{25} = -104.0$ (c= 1.0, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 1749.4; 1748 (C=O);

1537; 1152. ; HPLC-MS, MeOH/HCO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS (70eV, EI):m/z: 324(52); 186(100); 133(63); 125(50); 123(50); 121(30); 111(52); 109(44); 107(54); 98(26); 96(21); 95(58); 92(54); 85(34); 83(24); 82(73); 79(30); 71(51); 70(75); 68(58); 67(51); 56(32); 55(35). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 8.15 (dd, 1H, J₁= 1.6Hz, J₂= 7.6Hz, *o*-Ns); 7.90 (dd, 1H, J₁= 1.5Hz, J₂= 7.6Hz, *o*-Ns); 7.73(m, 2H, *o*-Ns); 5.93 (bs, 1H, SO₂NH); 5.80 (m, 1H, CHCH₂); 5.25-5.20 (m, 2H, CH₂CH); 3.82 (d, 1H, J= 5.2Hz, CH₂NCO); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 3.42 (d, 1H, J= 5.2Hz, CH₂NCO); 2.63 (d, 2H, J=7.2Hz, CqCH₂); 1.68 (s, 3H, NC(CH₃)₂CO₂CH₃); 1.53 (s, 3H, NC(CH₃)₂CO₂CH₃). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 172.8; 165.1; 147.2; 134.9; 133.5; 132.7; 130.7; 130.3; 125.0; 120.7; 66.6; 58.7; 52.3; 51.4; 39.1; 26.0; 23.6. Análisis elemental calculado para C₁₇H₂₁N₃O₇S: C, 49.63; H, 5.14; N, 10.21. Hallado: C, 50.03; H, 5.15; N, 10.05.

(3*R*)-3-Isobutil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)azetidina-2-ona

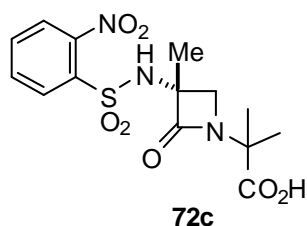


Se siguió el procedimiento general a partir del éster metílico de la (*R*)-2-isobutylserina (1 mmol, 0.175 g) y H-Aib-OMe (1.1 mmol, 0.117 g), adicionando CuBr·Me₂S (0.059 g) para acelerar la reacción. La apertura de la aziridina se prolongó durante 16h. Aceite incoloro.

Rendimiento desde **41d**: 45%, 0.192 g. *Datos de caracterización*: [α]_D²⁵ = -71.9 (c= 1.0, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 1763 (C=O); 1738 (C=O); 1537, 1377. MS (70 eV, EI): m/z: 242(16); 212(13); 186(17); 175(14); 149(21); 148(17); 133(62); 120(21); 111(21); 197(25); 97(44); 85(34); 84(29); 71(51); 57(100). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 8.15 (dd, 1H, J₁= 1.3Hz, J₂= 7.4Hz, H₃-Ns); 7.90 (dd, 1H, J₁= 1.3Hz, J₂= 7.4Hz, H₆-Ns); 7.74 (m, 2H, H₄ and H₅-Ns); 5.90 (bs, 1H, SO₂NH); 3.82 (d, 1H, J= 5.1Hz, CH₂NCO); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 3.44 (d, 1H, J= 5.1Hz, CH₂NCO); 1.92-1.84 (m, 2H, CH(CH₃)₂ y CH₂CH(CH₃)₂); 1.72 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 1.68 (s, 3H, NC(CH₃)₂CO₂Me); 1.52 (s, 3H, NC(CH₃)₂CO₂Me); 0.98 (d, 3H, J= 6.2Hz, CH(CH₃)₂); 0.92 (d, 3H, J= 6.3Hz, CH(CH₃)₂). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 173.1; 165.9; 147.6; 135.4; 133.5; 132.9; 131.3; 125.3; 68.1; 59.0; 53.4; 52.6; 43.3; 29.7; 24.5; 23.9; 23.8; 22.8. Análisis

elemental teórico para $C_{18}H_{25}N_3O_7S$ (427.1413): C, 50.57; H, 5.89; N, 9.83. Hallado: C, 51.23; H, 5.30; N, 9.50. HRMS (m/z): 427.1435; $C_{18}H_{25}N_3O_7S$ requiere: 427.1413.

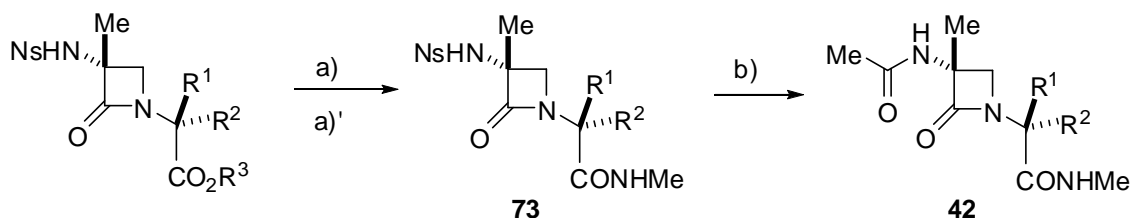
(3R)-3-Metil-1-[1-(carboxi)-isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



A una disolución de (3R)-3-metil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido) azetidin-2-ona **71c** (1 mmol, 0.385 g) en THF (10 mL) se le adicionó una disolución de LiOH.H₂O (5 mmol, 0.211 g) en H₂O (5 mL). La mezcla se dejó agitar durante 2

horas, tras lo cual se acidificó con HCl 2M y se extrajo la fase orgánica con EtOAc. El crudo de reacción se purificó por cromatografía de columna utilizando una mezcla Hexano/EtOAc 2:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 93%, 0.345 g. *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -33.2$ (c= 1.2, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3260, 2989 (NH, OH), 1785, 1764 (C=O); 1532 (NO₂); 1179, 816 (SO₂). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 383.0; MS2(383.0): 200.7, 185.7, 137.8; MS3(137.8): 117.9. ¹H NMR (500MHz, CD₃OD): 8.16–7.78 (m, 4H), 3.68 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 3.34 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 1.61 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.44 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CD₃OD): 175.9, 169.1, 149.3, 136.4, 135.0, 133.6, 131.7, 125.9, 65.6, 60.2, 54.5, 24.3, 24.2, 20.9. Análisis elemental calculado para $C_{14}H_{17}N_3O_7S$: C, 45.28; H, 4.61; N, 11.32. Hallado: C, 45.04; H, 5.02; N, 11.93.

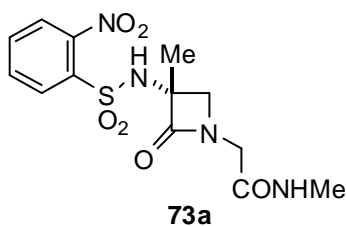
5.5 Síntesis de peptidomiméticos del tipo Ac-(β-Lactam)-Aa-NHMe



5.5.1 Procedimiento general para la preparación de las 3-metil-1-[(N-metilcarbamoyl)metil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)azetidin-2-onas 73. (ref. ¹⁰⁵)

A una disolución de la correspondiente β -lactama (1.0 mmol, 0.357 g) en THF seco (15 mL) se adicionaron NMM (1.0 mmol, 0.11 mL) y IBCF (1.0 mmol, 0.125 mL) sucesivamente a -20°C. Tras un periodo de activación de 3 min, se adicionó una disolución de metilamina al 40% en THF (2.0 mmol, 0.068 mL). La mezcla se dejó agitar durante 45 min a la misma temperatura. El crudo de reacción obtenido evaporando el disolvente a presión reducida se purificó directamente mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: Hexane/EtOAc 1:7).

(3R)-3-Metil-1-[1-(1R)-(N-metilcarbamoyl)-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona

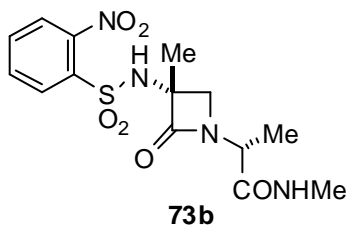


Se siguió el procedimiento general a partir de la (3R)-3-metil-1-[(R)-1-carboximetil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.342 g). Sólido blanco. Rendimiento: 80%, 0.285 g. *Datos de caracterización:* Pto. Fusion: 145-147 °C; $[\alpha]_D^{25} = -87.3$ (c= 1.5, CH₂Cl₂);

IR(cm⁻¹, KBr): 3108, 2990 (NH, OH), 1760, 1732 (C=O), 1526 (NO₂), 1140, 825. HPLC-MS, MeOH/HCO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 354.9; MS2(354.9): 135.8 137.7 185.7, 193.7. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): 8.10–7.26 (m, 4H, Ns), 6.98 (bs, 1H, NHCH₃), 5.95 (s, 1H, NHCq), 4.35 (d, 1H, J = 17Hz, CH₂CO), 3.89 (d, 1H, J = 5.5 Hz, (CH₃)CqCH₂), 3.57 (d, 1H, J = 17 Hz, CH₂CO), 3.37 (d, 1H, J = 5.5 Hz, (CH₃)CqCH₂), 2.90 (d, 3H, J = 5.5 Hz), 1.62 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 167.4, 167.1, 147.6, 134.9, 133.9, 133.2, 130.8, 125.5, 67.9, 57.4, 45.6, 26.3, 21.8. Análisis elemental calculado para C₁₃H₁₆N₄O₆S: C, 43.82; H, 4.53; N, 15.72. Hallado: C, 43.36; H, 5.07; N, 14.96.

¹⁰⁵ Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 3675-3678.

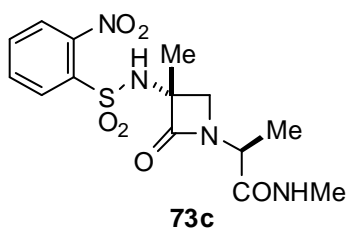
(3R)-3-Metil-1-[1-(1R)-(N-metilcarbamoil)-etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de la (3R)-3-metil-1-[(R)-1-carboxi-etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.375 g). Sólido blanco. Rendimiento: 58%, 0.214 g. *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 152 °C; $[\alpha]_D^{25} = -67.34$ (c= 0.75, CH₂Cl₂);

IR(cm⁻¹, KBr): 3150, 2963 (NH, OH), 1750, 1735 (C=O); 1520 (NO₂); 1160, 825 (SO₂). HPLC-MS, MeOH/HCO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS1: 369.0; MS2(369.0): 185.7, 137.8, 126.8. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.09–7.74 (m, 4H), 7.08 (br s, 1H), 5.92 (s, 1H), 4.47 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 3.74 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 3.40 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 2.88 (d, 3H, J = 4.7 Hz), 1.60 (s, 3H), 1.42 (d, 3H, J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 170.1, 166.9, 147.6, 135.0, 133.9, 133.2, 130.8, 125.4, 66.5, 53.9, 50.3, 26.4, 21.9, 14.48. Análisis elemental calculado para C₁₄H₁₈N₄O₆S: C, 45.40; H, 4.90; N, 15.11. Hallado: C, 45.00; H, 4.06; N, 15.19.

(3R)-3-Metil-1-[1-(1S)-(N-metilcarbamoil)-etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona

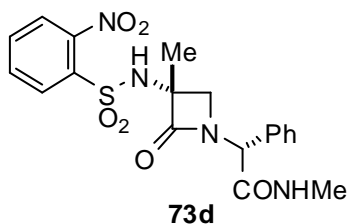


Se siguió el procedimiento general a partir de la (3R)-3-metil-1-[(S)-1-carboxi-etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.375 g). Sólido blanco. Rendimiento: 59%, 0.217 g. *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 163-164°C; $[\alpha]_D^{25} = -69.30$ (c= 0.67, CH₂Cl₂);

IR(cm⁻¹, KBr): 3120, 2959 (NH, OH), 1765, 1745 (C=O); 1540 (NO₂); 1100, 808 (SO₂). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 369.0; MS2(369.0): 185.7, 137.8, 126.9; MS3(137.0): 121.8, 90.0. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.12–7.72 (m, 4H), 6.56 (br s, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.06 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 3.84 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 3.39 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 2.84 (d, 3H, J = 4.8 Hz), 1.58 (s, 3H), 1.57 (d, 3H, J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 171.1, 167.4, 148.0, 135.8, 134.2, 133.5, 131.2, 125.8,

66.5, 55.9, 53.90, 26.8, 21.9, 15.90. Análisis elemental calculado para C₁₄H₁₈N₄O₆S: C, 45.40; H, 4.90; N, 15.11. Hallado: C, 44.84; H, 4.32; N, 15.64.

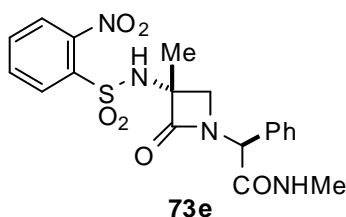
(3R)-3-Metil-1-[(1R)-fenil-(N-metilcarbamoil)metil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



A una disolución de la (3R)-3-metil-1-[(R)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrofenilsulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.416 g) y metilamina (2M THF; 1.48 mmol, 0.744 mL) en CH₂Cl₂ (20 mL) se le adicionaron de manera secuencial DCC (5.8 mmol, 1.20 g) y HOBT

(1.19mmol, 0.16 g) a 0°C. la reacción se dejó agitar durante 12 horas, permitiéndole al sistema alcanzar temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida y se obtuvo un crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía en placa preparativa de gel de sílice (Hexano/EtOAc 1:5). Rendimiento: 78% (0.337 g). Sólido amarillo. Pto. Fusión: 145 °C; $[\alpha]_D^{25} = -144.42$ ($c = 0.75$, CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹, KBr): 3320, 2984 (NH, OH), 1768, 1732 (C=O), 1540 (NO₂), 1158, 828. MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS+1: 431.0; MS2(431.0): 193.7, 188.8, 137.8.1; MS3(188.8): 137.8, 131.8. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.14–7.25 (m, 10H), 5.52 (s, 1H), 3.80 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz), 2.99 (d, 3H, $J = 4.7$ Hz), 2.94 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz), 1.46 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 169.1, 167.2, 147.9, 135.4, 134.3, 133.7, 131.3, 129.6, 129.2, 125.9, 66.7, 60.07, 55.3, 27.0, 21.8. Análisis elemental calculado para C₁₉H₂₀N₄O₆S: C, 52.77; H, 4.66; N, 12.96. Hallado: C, 52.85; H, 4.58; N, 12.29.

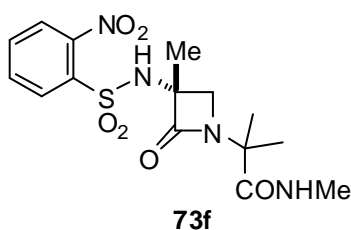
(3R)-3-Metil-1-[(1S)-fenil-(N-metilcarbamoil)metil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



Se preparó el compuesto **73e** partiendo de la ácido (3R)-3-metil-1-[(S)-fenil-carboximetil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.416 g) y metilamina (2M THF; 1.49 mmol, 0.745 mL) de acuerdo con el

procedimiento indicado para el compuesto precedente **73d**. La reacción provoca una epimerización en C α , dando lugar a una mezcla de diastereómeros **73d** y **73e** (ratio 4:96) que se separó mediante cromatografía de capa fina preparativa sobre gel de sílice (Hexane/EtOAc 1:5). Rendimiento: 85% (0.367 g). Sólido amarillento. Pto. Fusión: 148-150 °C; $[\alpha]_D^{25} = +38.90$ ($c = 0.7$, CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹, KBr): 3210, 2943 (NH, OH), 1745, 1725 (C=O), 1544 (NO₂), 1164, 821. MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 431.0; MS2(431.0): 137.8, 188.8, 185.7. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.92–7.35 (m, 10H), 5.99 (br s, 1H), 5.93 (br s, 1H), 5.38 (s, 1H), 3.62 (s, 2H), 2.79 (d, 3H, $J = 4.7$ Hz), 1.62 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 168.7, 167.1, 147.5, 135.3, 133.9, 133.5, 132.9, 130.7, 129.2, 128.9, 128.4, 125.3, 65.9, 59.2, 54.8, 26.4, 21.3. Análisis elemental calculado para C₁₉H₂₀N₄O₆S: C, 52.77; H, 4.66; N, 12.96. Hallado: C, 53.00; H, 4.59; N, 12.58.

(3R)-3-Metil-1-[1-(N-metilcarbamoil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona



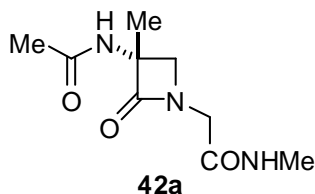
A una disolución de (3R)-3-metil-1-[1-(carboxi)-isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.371 g) en CH₂Cl₂ seco (10 mL) a 0°C, se le adicionó una disolución 2M de metilamina en THF (2 mmol, 1 mL). La reacción se enfrió hasta -12°C y se le adicionó EEDQ (1.8 mmol, 0.44 g) disuelto en 5 mL de CH₂Cl₂ seco. La mezcla se dejó agitar hasta alcanzar temperatura ambiente durante 16 horas. El crudo de reacción resultante se purificó mediante cromatografía de columna o capa fina preparativa utilizando una mezcla eluyente de Hexano/EtOAc 1:7. Sólido blanco. Rendimiento: 75%, (0.288 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 135°C. $[\alpha]_D^{25} = -46.21$ ($c = 1.75$, CH₂Cl₂); IR (cm⁻¹, KBr): 3315, 2934 (NH, OH), 1758, 1728 (C=O); 1540 (NO₂); 1166, 798 (SO₂). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 383.0; MS2(383.0): 200.7, 185.7, 137.8; MS3(137.8): 117.9. ¹H NMR (500MHz, CD₃OD): 8.14–7.84 (m, 4H), 3.63 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.41 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 2.79 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.45 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CD₃OD): 174.5, 168.3, 148.2, 135.4, 134.1, 132.6, 130.2, 124.8, 64.8, 60.2, 53.8, 25.8, 23.4, 23.3, 20.1. Análisis

elemental calculado para C₁₅H₂₀N₄O₆S: C, 46.87; H, 5.24; N, 14.57. Hallado: C, 47.37; H, 5.57; N, 14.00.

5.5.2 Procedimiento general para la preparación de Ac-(β-Lactam)-(Aa)-NHMe

A una disolución de la correspondiente (3*R*)-3-metil-1-[1-(*N*-metilcarbamoil)metil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol) en CH₃CN seco (75 mL) se le adicionaron tiofenol (5 mmol, 0.507 g) y K₂CO₃ (4 mmol, 0.552 g). Tras 1 hora de reacción, se le adicionó anhídrido acético (6 mmol, 1.313 g) y la mezcla se agitó 16 horas más. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla Hexano/EtOAc 1:7 ó CH₂Cl₂/MeOH 10:1.

(3*R*)-3-Acetamido-3-metil-1-[1-(*N*-metilcarbamoil)metil]-azetidin-2-ona

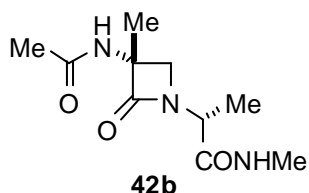


Se siguió el procedimiento experimenta descrito partiendo de (3*R*)-3-metil-1-[1-(*N*-metilcarbamoil)metil]-3-(2-nitro benzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.356 g). Aceite amarillento. Rendimiento: 84%, (0.179 g). *Datos de*

caracterización: Pto. Fusión: 159-160°C. $[\alpha]_D^{25} = +94.80$ (c

= 0.5, CH₂Cl₂); IR (cm⁻¹, KBr): 3210, 2965 (NH), 1740, 1728 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 211.8; MS2(212.0): 181.8, 169.8, MS3(169.8): 126.8, 112.8, 100.8, 96.0, 82.9. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.19 (bs, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.44 (d, 1H, $J = 17.6$ Hz), 3.89 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.57 (d, 1H, $J = 17.6$ Hz), 3.37 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 2.90 (d, 3H, $J = 4.6$ Hz), 2.06 (s, 3H), 1.58 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 170.7, 168.8, 168.0, 65.0, 53.5, 45.3, 26.3, 22.9, 20.5. Análisis elemental calculado para C₉H₁₅N₃O₃: C, 50.69; H, 7.09; N, 19.71. Hallado: C, 50.61; H, 7.70; N, 19.53.

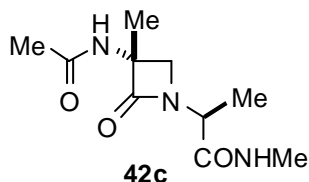
(3R)-3-Acetamido-3-metil-1-[1-(1R)-(N-metilcarbamoil)etil]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento experimenta descrito partiendo de la (3R)-3-metil-1-[1-(1R)-(N-metilcarbamoil)etil]-3-(2-nitro bencenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.370 g). Sólido amarillento. Rendimiento: 72%, (0.163 g).

Datos de caracterización: Pto. Fusión: 159-160°C. $[\alpha]_D^{25} = +58.22$ (c= 0.5, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3125, 3060 (NH, OH), 1782, 1768 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 225.9; MS2(225.9): 183.8; MS3(183.8): 126.8, 96.9. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.13 (br s, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.47 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 3.73 (d, 1H, J = 5.1 Hz), 3.23 (d, 1H, J = 5.1 Hz), 2.84 (d, 3H, J = 4.6 Hz), 2.04 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.40 (d, 3H, J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 170.6, 168.6, 63.5, 50.2, 49.8, 26.5, 23.0, 20.7, 14.42. Análisis elemental calculado para C₁₀H₁₇N₃O₃: C, 52.85; H, 7.54; N, 18.49. Hallado: C, 52.36; H, 7.60; N, 18.53.

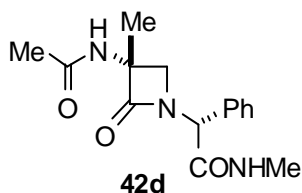
(3R)-3-Acetamido-3-metil-1-[1-(1S)-(N-metilcarbamoil)etil]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento experimental descrito partiendo de la (3R)-3-metil-1-[1-(1S)-(N-metilcarbamoil)etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.370 g). Sólido blanco. Rendimiento: 81%, 0.183 g.

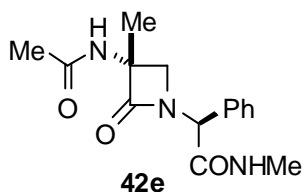
Datos de caracterización: Pto. Fusión: 115°C. $[\alpha]_D^{25} = +58.58$ (c= 0.5, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3310, 3140 (NH, OH), 1785, 1758 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 225.9; MS2(225.9): 195.8, 183.8; MS3(183.8): 126.8, 96.9. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.01 (br s, 1H), 5.96(s, 1H), 3.80 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 3.75 (q, 1H, J = 7.4 Hz), 3.17 (d, 1H, J = 5.0 Hz), 2.86 (d, 3H, J = 4.7 Hz), 2.03 (s, 3H), 1.73 (d, 3H, J = 7.5 Hz), 1.55 (s, 3H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 171.4, 170.5, 168.6, 63.4, 56.2, 53.5, 26.4, 23.0, 20.6, 16.3. Análisis elemental calculado para C₁₀H₁₇N₃O₃: C, 52.85; H, 7.54; N, 18.49. Hallado: C, 52.61; H, 7.70; N, 19.13.

(3R)-3-Acetamido-3-metil-1-[(1R)-fenil-(N-metilcarbamoil)etil]-azetidin-2-ona



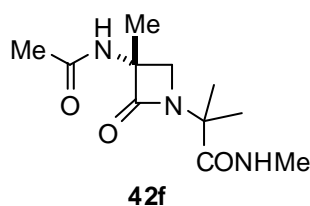
Se siguió el procedimiento experimental descrito partiendo de (3R)-3-metil-1-[(1R)-fenil-(N-metilcarbamoil)etil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.432 g). Sólido blanco. Rendimiento: 89% (0.028 g). Pto. Fusión: 99°C; $[\alpha]_D^{25} = +21.2$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2). IR (cm^{-1} , KBr): 3125, 3094 (NH), 1760, 1725 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 288.1; MS2(288.0): 245.8, 230.8, 171.8, 126.8, 111.9; MS3(245.8): 126.8; MS4(126.8): 111.8, 98.9. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): 8.44 (br s, 1H), 7.37-7.22 (m, 5H), 5.99 (br s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.73 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 2.95 (d, 3H, $J = 4.6$ Hz), 2.72 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 2.00 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): 170.9, 169.2, 168.3, 134.3, 129.0, 128.9, 128.4, 63.4, 59.4, 51.3, 26.6, 22.9, 20.2. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 62.27; H, 6.62; N, 14.52. Hallado: C, 62.83; H, 6.32; N, 14.62.

(3R)-3-Acetamido-3-metil-1-[(1S)-fenil-(N-metilcarbamoil)etil]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento experimental descrito partiendo de (3R)-3-metil-1-[1-(1S)-fenil-(N-metilcarbamoil)etil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.432 g). Rendimiento: 94% (0.039 g). Sólido blanco. Pto. Fusión: 198-199°C; $[\alpha]_D^{25} = +133.49$ ($c = 0.75$, MeOH). IR (cm^{-1} , KBr): 3210, 2998 (NH), 1744, 1725 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad negativa): MS-1: 288.1; MS2(288.0): 245.8, 230.8, 188.8, 171.8, 126.8; MS3(245.8): 126.8; MS4(126.8): 111.8, 58.3. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): 7.43-7.39 (m, 5H), 7.14 (br s, 1H), 5.66 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.77 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.46 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 2.93 (d, 3H, $J = 4.7$ Hz), 2.02 (s, 3H), 1.58 (s, 3H). ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): 170.1, 168.9, 168.3, 134.6, 128.8, 128.7, 128.5, 76.6, 63.4, 62.3, 53.9, 26.5, 23.0, 20.4. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 62.27; H, 6.62; N, 14.52. Hallado: C, 62.67; H, 6.70; N, 14.30.

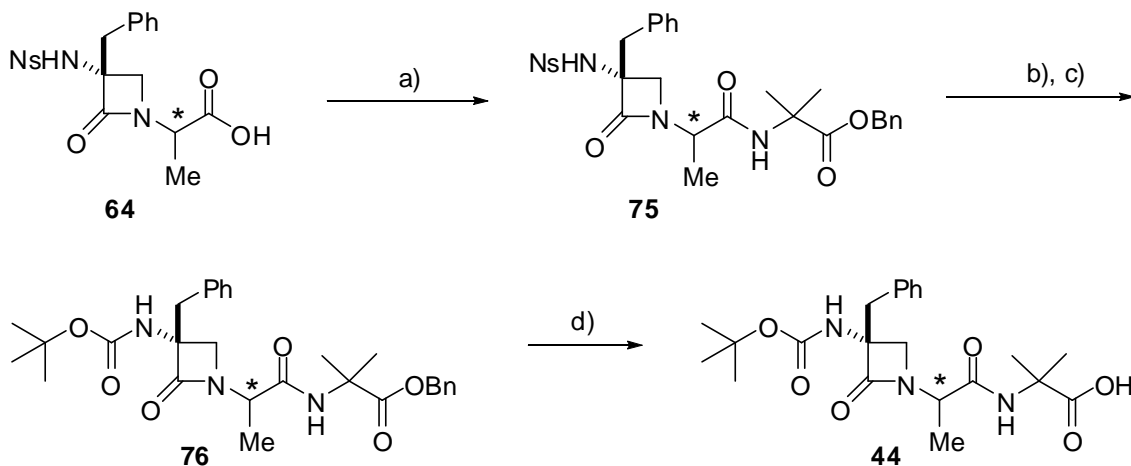
(3*R*)-3-Acetamido-3-metil-1-[1-(*N*-metilcarbamoil)isopropil]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento experimental descrito partiendo de la (3*R*)-3-metil-1-[1-(*N*-metilcarbamoil)isopropil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.385 g).

Sólido amarillento. Rendimiento: 82%, (0.197 g). *Datos de caracterización*: Pto, Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = +57.7$ ($c = 0.75$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3320, 3180 (NH), 1769, 1748 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 264.0, 242.0; MS2(242.0): 129.0; MS3(129.0): 101.1, 58.4. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): 8.28 (br s, 1H), 6.30 (s, 1H), 3.73 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.20 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 2.82 (d, 3H, $J = 4.6$ Hz), 2.02 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.36 (s, 3H). ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): 173.7, 170.7, 168.3, 62.2, 60.3, 51.0, 26.6, 24.8, 24.3, 22.9, 20.7. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 54.76; H, 7.94; N, 17.42. Hallado: C, 54.50; H, 8.00; N, 17.09.

5.6 Síntesis de peptidomiméticos del tipo Boc-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OH

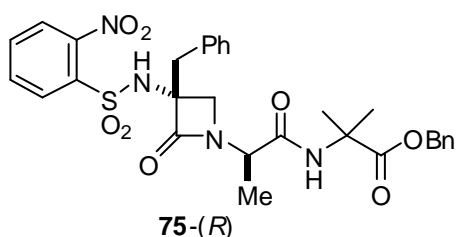


5.6.1 Procedimiento general para la formación de Ns-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OBn

A una disolución de la correspondiente (3*R*)-3-bencil-1-[1-(carboxi)etil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona **64** (1 mmol) se le adicionó en CH_2Cl_2 seco

(20 mL) a 0°C H-Aib-OBn¹⁰⁶ (1 mmol, 0.193 g). A continuación se enfrió la mezcla a -12°C y se adicionó el reactivo EEDQ (1.2 mmol, 0.310 g). La mezcla se agitó 16 horas permitiendo que alcanzara temperatura ambiente, tras lo cual se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (3x10 mL) y con HCl 1M hasta observar la total desaparición de EEDQ. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente Hexano/EtOAc 2:1).

2-{2-[(3R)-3-Bencil-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-oxoazetidin-1-il]-(2R)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo

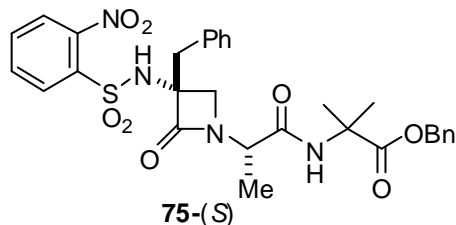


Se siguió el procedimiento experimental partiendo de (3R)-3-bencil-1-[(R)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.433 g). Sólido blanco. Rendimiento: 80%, (0.486 g). *Datos de caracterización:* Pto,

Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = +54.7$ (c= 0.42, CH₂Cl₂); IR (cm⁻¹, KBr): 3396, 3085 (NH), 1762, 1681 (C=O), 1539 (NO₂), 1347 (SO₂), 1153 (SO₂). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 264.0, 242.0; MS2(242.0): 129.0; MS3(129.0): 101.1, 58.4. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.15-7.72 (m, 4H, Ns), 7.37-7.21 (m, 10H, Ar), 7.17 (s, 1H, NH_C(CH₃)₂), 5.89 (s, 1H, NH-Ns), 5.21 (d, 1H, J=12.3Hz, OCH₂Ph), 5.09 (d, 1H, J=12.6Hz, OCH₂Ph), 4.32 (m, 1H, NCH(CH₃)), 3.55 (d, 1H, J=5.7Hz, NCH₂Cq), 3.34 (d, 1H, J=5.7Hz, NCH₂Cq), 3.14 (d, 1H, J=13.5Hz, CqCH₂Ph), 3.03 (d, 1H, J=13.5Hz CqCH₂Ph), 1.59 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.56 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 0.83 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃CHNH). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 173.8, 168.8, 166.1, 147.4, 134.9, 133.8, 133.2, 132.6, 130.9, 130.2, 128.9, 128.5, 128.2, 128.1, 125.3, 70.1, 67.0, 56.6, 50.5, 49.5, 40.3, 25.4, 24.7, 13.4.

¹⁰⁶ La amina es liberada a partir de la sal TsO⁻NH₃⁺-Aib-OBn en las siguientes condiciones: KHCO₃/K₂CO₃, CH₃CN, 40°C, 1h; con un rendimiento del 93%.

2-{2[(3*R*)-3-Bencil-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-oxoazetidin-1-il]-(2*S*)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo



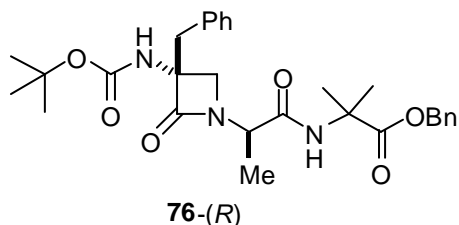
Se siguió el procedimiento experimental partiendo de (3*R*)-3-bencil-1-[(*S*)-1-carboxietil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.433 g). Sólido blanco. Rendimiento: 70%, 0.426 g. *Datos de caracterización:* Pto,

Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = +106.7$ ($c = 0.3$, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3378, 3105 (NH), 1748 (C=O). 1539 (NO₂), 1356 (SO₂), 1165 (SO₂). MS m/z (TOF MS ES⁺): MS[+Na]: 630.9, MS[+H]: 608.8, MS: 562.8, 500.9, 472.9, 394.0, 359.9, 115.9. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8.14-7.74 (m, 4H, Ns), 7.40-7.25 (m, 10H, Ar), 6.93 (s, 1H, NHC(CH₃)₂), 5.86 (s, 1H, NH-Ns), 5.18 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.89 (q, 1H, NCH(CH₃)CO), 3.72 (d, 1H, J=5.7Hz, CqCH₂NH), 3.47 (d, 1H, J = 5.7Hz, CqCH₂NH), 3.14 (q, 2H, CqCH₂Ph), 1.59 (s, 3H, (CH₃)₂CqCO), 1.58 (s, 3H, (CH₃)₂CqCO), 1.46 (d, 3H, J=7.25Hz, CH₃CHNH). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 173.9, 169.5, 166.5, 147.4, 133.6, 133.2, 133.1, 130.9, 130.0, 129.0, 128.5, 128.2, 128.1, 127.9, 125.3, 69.5, 67.2, 56.6, 53.8, 53.5, 40.6, 29.7, 24.9, 15.1.

5.6.2 Procedimiento general para la formación de BocNH-(β-Lactam)-(Ala)-Aib-OBn

A una disolución del correspondiente 2-{[(3*S*)-3-bencil-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-oxoazetidin-1-il]-metilacetamido}-2-metilpropanoato de bencilo **75** (1 mmol, 0.608 g) en CH₃CN se le adicionó tiofenol (5 mmol, 0.469 mL) y K₂CO₃ (4 mmol, 0.567 g). La mezcla se agitó durante 2 horas, siguiendo la desaparición de producto de partida por cromatografía de capa fina. Finalizada la reacción, el crudo se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, eluyentes: CH₂Cl₂, luego MeOH). El producto obtenido se disolvió en CH₃CN (15 mL) y se le adicionó el anhídrido de *di-tert*-butilo (5.1 mmol, 1.17 mL) y se agitó 16 horas. Tras evaporar el disolvente, la mezcla se purificó mediante cromatografía de columna (sílica gel), utilizando una mezcla de eluyente Hexano/EtOAc 2:1.

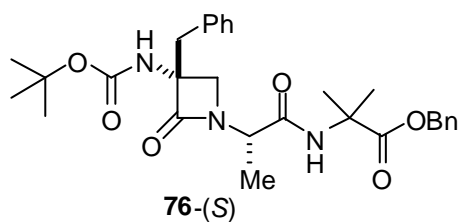
2-{2[(3R)-3-Bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2R)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo



Se siguió el procedimiento general partiendo de 2-{2[(3R)-3-bencil-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-oxoazetidin-1-il]-(2R)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo (1 mmol, 0.608 g). Sólido blanco. Rendimiento:

90%, 0.537 g. *Datos de caracterización*: Pto, Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = -4.8$ (c= 0.1, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3320, 2980 (NH), 1756, 1700 (C=O). 1542 (NO₂), 1365 (SO₂), 1156 (SO₂). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.71 (s, 1H, NHC(CH₃)₂), 7.38-7.30 (m, 5H, Ar), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.76 (bs, 1H, ^tBuONH), 3.71 (d, 1H, J=4.9Hz, CqCH₂N), 3.49 (m, 1H, CH(CH₃)), 3.25 (d, 1H, J=4.9Hz, CqCH₂N), 3.16 (d, 1H, J=14.0Hz, CqCH₂Ph), 2.98 (d, 1H, J=14.0Hz, CqCH₂Ph), 1.58 (s, 3H, (CH₃)₂CH), 1.57 (s, 3H, (CH₃)₂CH), 1.47 (d, 3H, J=7.3Hz, (CH₃)CH), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃O). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 174.5, 169.4, 168.5, 154.5, 136.5, 133.6, 130.5, 129.2, 128.8, 128.5, 128.4, 128.2, 81.4, 67.9, 67.2, 56.9, 49.1, 47.6, 39.6, 28.6, 26.5, 24.8, 13.7. HRMS (m/z +C₂H₅): 552.3074; requiere: 552.3089.

2-{2[(3R)-3-Bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2S)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo



Se siguió el procedimiento experimental partiendo de 2-{2[(3R)-3-bencil-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-2-oxoazetidin-1-il]-(2S)-propanamido}-2-metilpropanoato de bencilo (1 mmol, 0.608 g). Sólido blanco. Rendimiento:

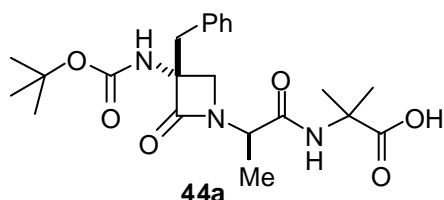
89%, 0.523 g. *Datos de caracterización*: Pto, Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = -17.0$ (c= 0.1, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3338, 2925 (NH), 1762, 1692 (C=O). 1521 (NO₂), 1373 (SO₂), 1162 (SO₂). MS m/z (TOF MS ES+): MS(C₇H₇·): 91.05 (61), MS(C₅H₉NO₂·): 115.05 (5), MS(C₁₁H₁₅N₂O₄·): 239.14 (5). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.70 (s, 1H, NHC(CH₃)₂), 7.38-7.26 (m, 5H, Ar), 5.18 (d, 1H, J=12.6Hz, OCH₂Ph), 5.04 (d, 1H,

$J=12.3\text{Hz}$, OCH_2Ph), 4.81 (s, 1H, $^t\text{BuONH}$), 4.32 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 3.54 (d, 1H, $J=5.4\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.19 (d, 1H, $J=5.4\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.15 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 2.90 (d, 1H, $J=13.2\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 1.59 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.52 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{O}$), 0.77 (d, 3H, $J=7.2\text{Hz}$, $(\text{CH}_3)\text{CH}$). ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): 174.5, 169.4, 168.5, 154.5, 136.5, 133.6, 130.5, 129.2, 128.8, 128.5, 128.4, 128.2, 81.4, 67.9, 67.2, 56.9, 49.1, 47.6, 39.6, 28.6, 26.5, 24.8, 13.7.

5.6.3 Procedimiento general para la formación *BocNH-(β -Lactam)-(Ala)-Aib-OH*

A una disolución del correspondiente 2-{[2(3*R*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxi carbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-metilacetamido}-2-metilpropanoato de bencilo **76** (1 mmol, 0.523 g) en MeOH (20 mL) se le adicionó Pd/C al 20% en peso (52 mg). La mezcla se agitó 2 horas, se filtró sobre celita y se obtuvo el producto final sin necesidad de posterior purificación.

Ácido 2-{2[(3*R*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2*R*)-propanamido}-2-metilpropanóico

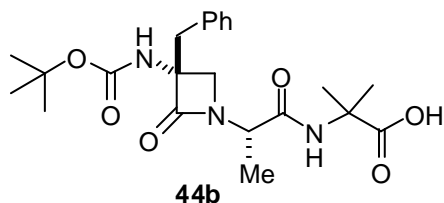


Se siguió el procedimiento experimental partiendo de 2-{2[(3*R*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonil amino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2*R*)-propana mido}-2-metilpropanoato de bencilo. Aceite incoloro.

Rendimiento: 95%, 0.411 g. Datos de

caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -15$ ($c = 0.2$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3320, 3180 (NH), 1769, 1748 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS+23: 264.0, 242.0; MS2(242.0): 129.0; MS3(129.0): 101.1, 58.4. ^1H NMR (500MHz, CD_3OD): 7.31-7.29 (m, 5H, Ar), 4.0 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 3.67 (d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.35 (d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.07 (d, 1H, $J=13.3\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 2.97 (d, 1H, $J=13.3\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 1.47 (s, 9H, ^tBuO), 1.46 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0.58 (d, 3H, $J=7.1\text{Hz}$, $(\text{CH}_3)\text{CH}$). ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD): 181.2, 171.2, 171.0, 156.6, 135.6, 131.8, 129.4, 128.4, 81.0, 68.8, 59.5, 50.8, 39.1, 28.7, 26.9, 25.8, 13.9.

Ácido 2-{2[(3R)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2S)-propanamido}-2-metilpropanóico

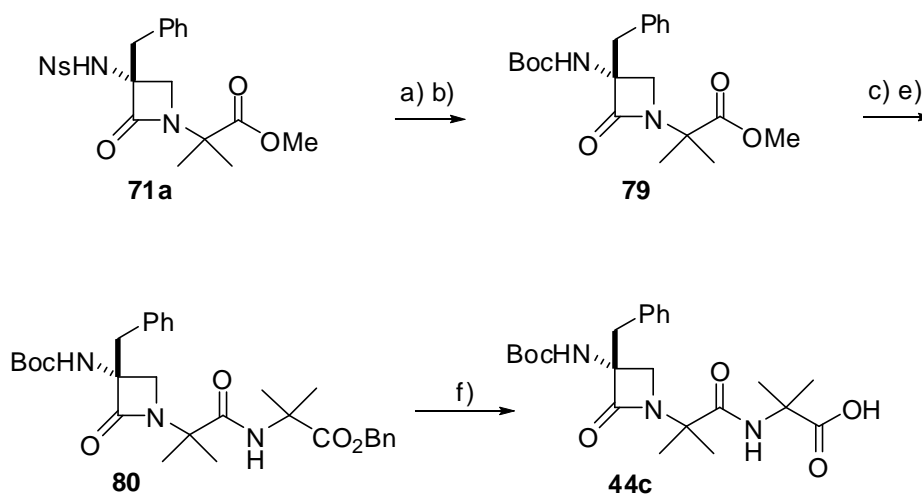


Se siguió el procedimiento experimental partiendo de 2-{2[(3*S*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonil amino)-2-oxoazetidin-1-il]-(2*S*)-propanamido}-2-metil propanoato de bencilo. Sólido blanco.

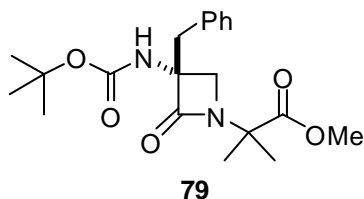
Rendimiento: 96%, 0.415 g. *Datos de*

caracterización: Pto. Fusión: 216-218°C. $[\alpha]_D^{25} = -28.1$ ($c = 0.36$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 2974 (NH), 1739, 1698 (C=O). 1583 (NO_2), 1363 (SO_2), 1166 (SO_2). MS m/z (TOF MS ES⁺): MS($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_2^{++}$): 233.1416 (17), MS($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4^+$): 200.1 (3). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.77 (s, 1H, $\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$), 7.39-7.19 (m, 5H, Ar), 4.9 (s, 1H, $^t\text{BuONH}$), 4.34 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 3.65 (d, 1H, $J=4.4\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.38 (d, 1H, $J=5.4\text{Hz}$, CqCH_2N), 3.19 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 2.94 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CqCH_2Ph), 1.55 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.55 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{O}$), 0.85 (d, 3H, $J=7.25\text{Hz}$, $(\text{CH}_3)\text{CH}$). ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): 180.6, 170.2, 169.8, 155.5, 134.6, 130.7, 128.4, 127.4, 79.9, 67.7, 58.4, 49.8, 38.1, 29.7, 27.7, 25.8, 24.8, 12.9. HRMS (m/z $-\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4^+$): 233.1416; requiere: 233.1427.

5.7 Síntesis de peptidomiméticos de tipo Boc-(β -Lactam)-(Aib)-Aib-OH



(3R)-3-Bencil-3-*tert*-butoxicarbonil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-azetidin-2-ona.



A una disolución de (3R)-3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobencenosulfonamido)-azetidin-2-ona **71a** (1 mmol, 0.461 g) en CH₃CN (5 mL), se le adicionó PhSH (5 mmol, 0.469 mL) y K₂CO₃ (4 mmol, 0.567 g).

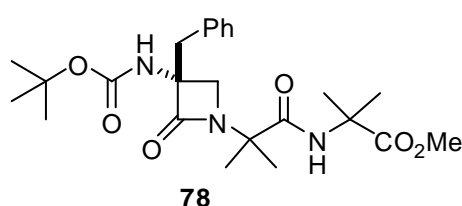
La mezcla se dejó agitar 2 horas, tras lo que se evaporó el disolvente y purificó la amina intermedia mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: EtOAc, luego MeOH), obteniéndose el producto puro con un rendimiento del 90%. A continuación se disolvió la amina (0.9 mmol, 0.248 g) en CH₂Cl₂ (5 mL) y se añadió (Boc)₂O (3 mmol, 0.654g). La mezcla se agitó 16 horas a temperatura ambiente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía de columna (gel de sílica, eluyente Hexano/EtOAc 5:1). Rendimiento desde **71a**: 50%, 0.188 g. Aceite amarillo. Rendimiento: 50%, 0.202 g. *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = +10.2$ (c= 0.6, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3318, (NH), 1760, 1742, 1714 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): +MS2: 343.1, +MS4: 283.0. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.38-7.25 (m, 5H, Har), 4.78 (s, 1H, NH), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.58 (d, 1H, J=5.2Hz, NCH₂Cq), 3.38 (d, 1H, J=5.2Hz, NCH₂Cq), 3.11 (s, 2H, CqCH₂Ph), 1.48 (s, 9H, O(CH₃)₃), 1.35 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.21 (s, 3H, C(CH₃)₂). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 173.2, 166.9, 153.4, 135.3, 130.3, 128.4, 127.1, 65.8, 58.8, 52.6, 49.9, 39.1, 28.2, 23.7, 23.6. Análisis elemental calculado para C₂₀H₂₈N₂O₅: C, 63.81; H, 7.5; N, 7.44. Hallado: C, 63.64; H, 7.16; N, 6.89.

5.7.1 Procedimiento general para la formación de Boc-(β-Lactam)-(Aib)-Aib-OR

A una disolución del (3R)-3-bencil-3-*tert*-butoxicarbonil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-azetidin-2-ona **79** (1 mmol, 0.376 g) en MeOH (20 mL), se le adicionó LiOH.H₂O (10 mmol, 0.485 g) en 10 mL de H₂O. La mezcla se agitó a temperatura ambiente 4 horas. Se comprobó la desaparición del producto de partida por cromatografía de capa fina, se añadió HCl 1M hasta obtener un pH ácido y se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). A continuación se disolvió el ácido intermedio en

CH₂Cl₂ seco (15 mL) y se le adicionó el correspondiente aminoéster (H-Aib-OR¹) a 0°C, se enfrió el medio a -12°C y se adicionó EEDQ (1.5 mmol). La mezcla se agitó 16 horas hasta alcanzar temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente Hexano/EtOAc 5:1).

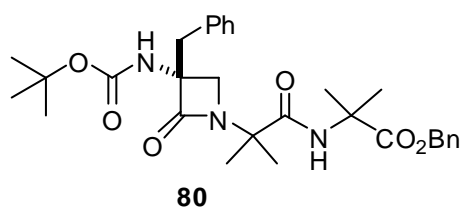
2-[(3*R*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-dimetilacetamido}-2-metilpropanoato de metilo



Se siguió el procedimiento experimental partiendo del (3*R*)-3-bencil-3-*tert*-butoxicarbonil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-azetidin-2-ona **79** (1 mmol, 0.376 g) y H-Aib-OMe (1.2 mmol, 0.140 g)

Purificación mediante cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: Hexano/EtOAc 5:3). Aceite amarillo. Rendimiento: 80%, 0.369 g. *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = +65.3$ ($c = 1$, CHCl₃); IR (cm⁻¹, KBr): 3450, (NH), 1738, 1690 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): +MS2: 428.2, +MS3: 283.0; +MS4: 239.0. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.85 (s, 1H, NH₂C(CH₃)₂), 7.30-7.32 (m, 5H, Ar), 4.84 (s, 1H, NHCCO), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.60 (d, 1H, J=5.2Hz, NCH₂Cq), 3.31 (d, 1H, J=5.2Hz, NOCH₂Cq), 3.14 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 2.88 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 1.53 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.49 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.44 (s, 9H, (CH₃)CO), 1.43 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 0.84 (s, 3H, (CH₃)₂Cq). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 174.8, 172.5, 167.4, 154.3, 133.3, 130.4, 128.7, 127.7, 80.8, 66.0, 59.9, 56.3, 52.1, 47.8, 39.2, 28.3, 25.7, 24.7, 24.3, 23.3. Análisis elemental calculado para C₂₄H₃₅N₃O₅: C, 62.97; H, 7.23; N, 7.73. Hallado: C, 62.33; H, 7.76; N, 8.40.

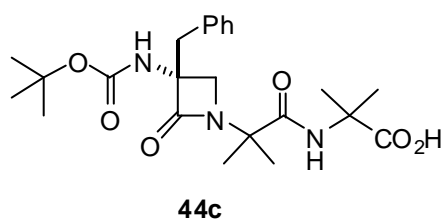
2-[(3*R*)-3-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-dimetilacetamido}-2-metilpropanoato de bencilo



Se siguió el procedimiento experimental partiendo del (3*R*)-3-bencil-3-*tert*-butoxicarbonil-1-[1-(meto

xicarbonil)isopropil]-azetidin-2-ona **79** (1 mmol, 0.376 g) y H-Aib-OBn (1.2 mmol, 0.231 g). Purificación mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: Hexano/EtOAc 5:1). Sólido amarillo. Rendimiento: 92%, 0.494 g. *Datos de caracterización*: Pto Fusión: 149-151°C. $[\alpha]_D^{25} = +27.1$ (c= 0.48, CH₂Cl₂); IR (cm⁻¹, KBr): 3334, (NH), 1754, 1702, 1648 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS: 538.3, MS2(538.0): 482.2, 430.2, 374.1, MS3(482.2): 464.2, 436.2, 410.2, 374.1, 346.1, 289.0, 261.1, MS4(374.0): 346.1, 289.0, 261.0, MS5(346.1): 318.2, 261.1, 217.0, MS6(261.1): 233.0, 190.0, 189.0, 172.0, 160.0, 157.9, 132.0. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.84 (s, 1H, NHC(CH₃)₂), 7.35-7.27 (m, 5H, Ar), 5.06 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.77 (s, 1H, CONHCq), 3.53 (d, 1H, J=5.2Hz, NCH₂Cq), 3.20 (d, 1H, J=5.2Hz, NCH₂Cq), 3.12 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 2.86 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 1.56 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.52 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.44 (s, 9H, (CH₃)CO), 1.40 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 0.79 (s, 3H, (CH₃)₂Cq). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 174.2, 172.3, 167.3, 154.3, 136.2, 133.3, 130.3, 128.7, 128.3, 128.1, 127.9, 127.7, 80.8, 66.7, 59.9, 56.3, 47.8, 39.2, 28.3, 25.8, 24.6, 24.3, 23.2. Análisis elemental calculado para C₃₀H₃₉N₃O₆: C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82. Hallado: C, 66.58; H, 6.89; N, 7.36.

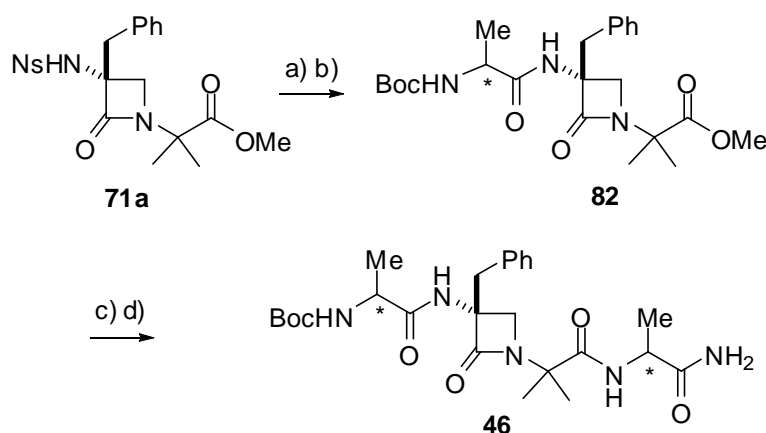
Ácido 2-{[(3R)-3-bencil-3-(terc-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-dimetilacetamido}-2-metilpropanóico



A una disolución de 2-{[(3R)-3-bencil-3-(terc-butoxicarbonilamino)-2-oxoazetidin-1-il]-dimetilacetamido}-2-metilpropanoato de bencilo **80** (1 mmol, 0.537 g) en EtOAc (35 mL) se le adicionó Pd/C (20% en peso) bajo atmósfera de H₂. La mezcla se agitó 1h y se filtró sobre celita, obteniéndose se el producto puro. Sólido blanco. Rendimiento: 100%, (0.447 g). *Datos de caracterización*: Pto Fusión: 213-215°C. $[\alpha]_D^{25} = +65.2$ (c= 0.48, CH₂Cl₂); IR (cm⁻¹, KBr): 3346, (NH), 1736, 1702, 1685 (C=O). MS m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): MS: 446.2, MS2(446.2): 372.8, 372.1, MS3(372.1): 329.0, MS4(329.0): 329.1, 242.9, 201.9, 199.9, 172.0, 168.9, 153.9, 127.9, 111.0. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.87 (s, 1H, NHC(CH₃)₂), 7.38-7.27 (m, 5H, Ar), 4.84 (s, 1H, CONHCq), 3.62 (d, 1H, J=5.1Hz,

NCH₂Cq), 3.35 (d, 1H, J=5.1Hz, NCH₂Cq), 3.14 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 2.89 (d, 1H, J=13.4Hz, CqCH₂Ph), 1.58 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.57 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 1.45 (s, 9H, (CH₃)CO), 1.32 (s, 3H, (CH₃)₂Cq), 0.95 (s, 3H, (CH₃)₂Cq). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 175.8, 174.5, 168.3, 154.7, 133.5, 130.8, 129.1, 128.2, 81.6, 66.4, 59.9, 57.9, 48.6, 39.5, 28.7, 25.9, 25.3, 24.4, 23.8. Análisis elemental calculado para C₂₃H₃₃N₃O₆: C, 61.73; H, 7.43; N, 9.39. Hallado: C, 67.04; H, 7.39; N, 8.93.

5.8 Síntesis de peptidomiméticos de tipo Boc-Ala-(β-Lactam)-(Aib)-Ala-NH₂

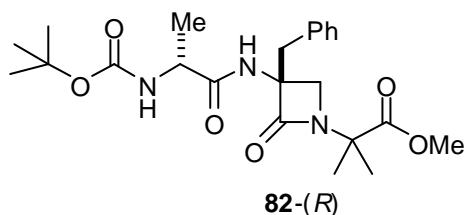


5.8.1 Procedimiento general de preparación de los derivados Boc-Ala*-(β-Lactam)-Aib-OMe

A una disolución de (3*R*)-3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzeno sulfonamido)-azetidín-2-ona **71a** (1 mmol, 0.461 g) en CH₃CN (5 mL), se le adicionó PhSH (5 mmol, 0.469 mL) y K₂CO₃ (4 mmol, 0.567 g). La mezcla se agitó 2 horas, el disolvente se evaporó y el crudo se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: EtOAc, luego MeOH), obteniéndose el producto puro con un rendimiento del 90%. La amina intermedia se disolvió en 15 mL de CH₂Cl₂ seco y se adicionó sobre una suspensión de Boc-Ala-OH (1.3 mmol, 0.248 g) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco a 0°C. La mezcla se agitó 10 minutos, se enfrió a -12°C para adicionar EEDQ (1.3 mmol, 0.331 g) y se agitó 16 horas más hasta alcanzar temperatura ambiente. El crudo de reacción se trató con HCl 1M (3x10 mL), la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y se secó sobre MgSO₄. La purificación se llevó a cabo por

cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla Hexano/EtOAc 2:1.

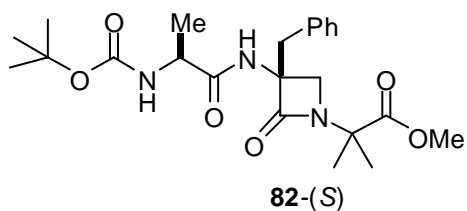
2-[(3R)-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2R)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-bencil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobenzenosulfonamido)-azetidin-2-ona **71a** (1 mmol, 0.461 g) y la Boc-D-Ala-OH (1.3 mmol, 0.248 g). Sólido blanco. Rendimiento:

83%, (0.371 g). *Datos de caracterización*: Pto.Fusión: 135-137°C; $[\alpha]_D^{25} = +28.5$ ($c = 0.2$, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3309 (NH); 3000 (CH₃); 1763 (C=O); 1752 (C=O); 1704 (C=O); 1656 (C=O); 1160 (C-O); 672 (NH). HPLC-MS, MeOH/CO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 187.1(35), 133.1(99), 126.1(62), 112.1(41), 97.1(41), 72.1(85), 59.1(100), 57.1(48), 55.1(53). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 7.28-7.32 (m, 5H, Ar), 6.62 (bs, 1H, CONHCH₂Ph), 4.9 (bs, 1H, CONHCH(CH₃)CO), 4.14 (m, 1H, NHCH(CH₃)CO), 3.71 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.63 (d, 1H, J=5.5Hz, NCH₂CCH₂Ph), 3.45 (d, 1H, J=5.4Hz, NCH₂CCH₂Ph), 3.21 (d, 1H, J=14.2Hz, CCH₂Ph), 3.18 (d, 1H, J=14.0Hz, CCH₂Ph), 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃O), 1.43 (s, 3H, (CH₃)₂CCO₂CH₃), 1.36 (s, 3H, (CH₃)₂CCO₂CH₃), 1.31 (d, 3H, J=7.1Hz, (CH₃)CHCONH). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 173.1, 172.7, 166.8, 155.3, 134.8, 130.2, 128.4, 127.2, 80.2, 65.7, 58.9, 52.5, 49.4, 38.7, 28.3, 23.6, 18.3, 16.8. HRMS (m/z): 447.2369; C₂₃H₃₃N₃O₆ requiere: 447.2372.

2-[(3R)-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2S)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo



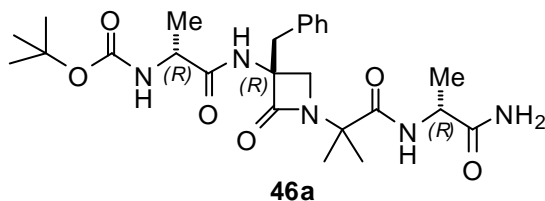
Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-bencil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-azetidin-2-ona **71a** (1 mmol, 0.461 g) y la Boc-Ala-OH (1.3 mmol, 0.248 g). Aceite amarillento. Rendimiento: 85%, (0.380 g). *Datos de*

caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -22.4$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3271 (NH); 2993 (CH_3) 1753 (C=O); 1721 (C=O); 1716 (C=O); 1673 (C=O); 1167 (C-O); 740 (NH); HPLC-MS, MeOH/ CO_2H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 187.1(32), 134.1(28), 133.1(100), 115.6(27), 102.5(21), 92.1(33), 91.1(41), 58(56). $^1\text{H-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 7.32 (m, 5H, Ar), 4.08 (m, 1H, $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{NH}$), 3.65 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.59 (d, 1H, $J=5.5$ Hz, NCH_2C), 3.41 (d, 1H, $J=5.3$ Hz, NCH_2C), 3.15 (dd, 2H, $J=13.7$ Hz, CCH_2Ph), 1.45 (s, 9H, $^t\text{BuO-}$), 1.33 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 1.29 (d, 1H, $J=6.9$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}$), 1.23 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 173.2, 172.9, 155.3, 134.9, 130.3, 128.4, 127.1, 79.6, 65.9, 58.9, 53.5, 52.5, 49.8, 38.5, 28.3, 23.4, 18.3. HRMS (m/z): 447.2369; $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ requiere: 447.2348.

5.8.2 Procedimiento general para la preparación de los derivados Boc-Ala- β -lactam-Aib-Ala- NH_2

A una disolución del correspondiente 2- $\{[(3R)$ -3-bencil-3-[2-(*terc*-butoxicarbonil amino)-2*R*-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo (1 mmol, 0.447 g) en MeOH (20 mL) se le adicionó LiOH. H_2O (10 mmol, 0.485 g) en MeOH/ H_2O 10:5 mL. La mezcla se agitó 2 horas y posteriormente el medio se acidificó con HCl 1M (5 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 mL) y el ácido se obtuvo con un rendimiento del 85%. A continuación se disolvió este intermedio en DMF seca (15 mL) y se le adicionó la correspondiente alaninamida (1.5 mmol, 0.131 g) a 0°C , HATU (1.5 mmol, 0.570 g), HOAT (1.4 mmol, 0.191 g) y KHCO_3 (15 mmol, 1.5 g). La mezcla se agitó 16 horas permitiendo que alcanzara temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente bajo presión de bomba de vacío, se redisolvió el sólido resultante en CH_2Cl_2 y se realizaron los lavados con HCl 1M (3x10 mL) y NaHCO_3 (3x10 mL). El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla Hexano/EtOAc 5:1 ó $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1.

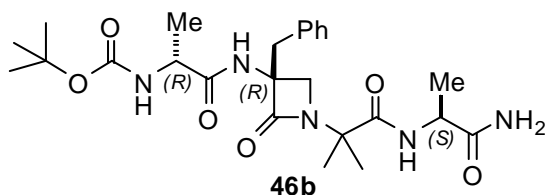
2-(2-((3R)-Bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2R)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il)-2-metilpropanamido)-(2R)-propanamida



Se siguió el procedimiento general a partir de 2-[[[(3R)-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2R)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo **82**-(R) (1 mmol, 0.447 g) y (R)-

Alaninamida (1.5 mmol, 0.131 g). Sólido blanco. Rendimiento: 80%, (0.629 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 190-192°C; $[\alpha]_D^{25} = +58$ (c=0.45, CH₂Cl₂); IR(cm⁻¹, KBr): 3416 (NH₂); 3308 (NH); 2965 (NH); 1741 (C=O); 1726 (C=O); 1694 (C=O); 1536 (C=O); 691 (NH). HPLC-MS, MeOH/CO₂H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 217.2 (19), 167.1 (33), 149.0 (100), 119.1 (26), 85.9 (29). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆): 8.3 (s, 1H, NH₂CCH₂Bn), 8.16 (d, 1H, J=6.9Hz, NHCH(CH₃)CONH₂), 7.33-7.28 (m, 5H, Ar), 7.1 (bs, 1H, NH₂), 6.87 (d, 1H, J=8.1Hz, ^tBuOCONH), 6.83 (bs, 1H, NH₂), 4.13 (m, 1H, ^tBuOCONHCH(CH₃)), 4.06 (m, 1H, CH(CH₃)CONH₂), 3.58 (d, 1H, J=5.1Hz, CH₂NC(CH₃)₂), 3.26 (d, 1H, J=5.0Hz, CH₂NC(CH₃)₂), 3.05 (d, 1H, J=13.4Hz, CH₂Bn), 3.02 (d, 1H, J=13.5Hz, CH₂Bn), 1.39 (s, 9H, ^tBuO-), 1.29 (d, 3H, J=7.2Hz, CH(CH₃)CONH₂), 1.20 (d, 3H, J=6.9Hz, ^tBuOCONHCH(CH₃)), 1.12 (s, 3H, (CH₃)₂CCO), 0.7 (s, 3H, (CH₃)₂CCO). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 175.0, 173.6, 173.2, 166.8, 156.1, 133.1, 130.3, 128.7, 127.8, 80.9, 77.2, 65.8, 59.8, 49.6, 38.9, 28.3, 24.3, 23.6, 15.9, 16.5. Análisis elemental teórico para C₂₅H₃₇N₅O₆ (503.2744): C, 59.63; H, 7.41; N, 13.91. Hallado: C, 59.70; H, 7.01; N, 13.91. HRMS (m/z): 503.2744; C₂₅H₃₇N₅O₆ requiere: 503.2763

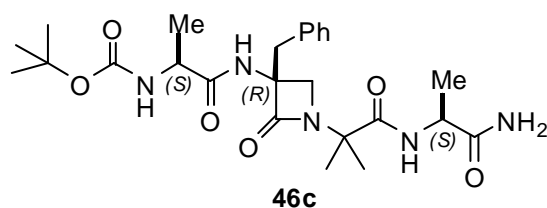
2-(2-((3R)-Bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2R)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il)-2-metilpropanamido)-(2S)-propanamida



Se siguió el procedimiento general a partir del 2-[[[(3R)-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2R)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato

de metilo **82-(R)** (1 mmol, 0.447 g) y (*S*)-Alaninamida (1.5 mmol, 0.131 g). Sólido blanco. Rendimiento: 65%, (0.327 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 202-204°C; $[\alpha]_D^{25} = +53$ ($c = 0.3$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3412 (NH_2); 3213 (NH); 1733 (C=O); 1730 (C=O); 1681 (C=O); 1629 (C=O), 696 (NH), 734 (NH); HPLC-MS, MeOH/ CO_2H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 119.1(88), 97.1(60), 91.1(72), 71.1(67), 69.1(63), 57.1(100), 55.1(90). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6): 8.41 (s, 1H, $\text{NH}\text{CCH}_2\text{Bn}$), 8.30 (d, 1H, $J=6.7\text{Hz}$, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 7.33-7.28 (m, 5H, Ar), 7.10 (s, 1H, NH_2), 6.88 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONH}$), 6.84 (s, 1H, NH_2), 4.13 (m, 1H, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 4.06 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 3.58 (d, 1H, $J=5.3\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.26 (d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.06 (d, 1H, $J=13.4\text{Hz}$, CH_2Bn), 3.02 (d, 1H, $J=13.6\text{Hz}$, CH_2Bn), 1.39 (s, 9H, $^t\text{BuO-}$), 1.29 (d, 3H, $J=7.1\text{Hz}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 1.20 (d, 3H, $J=6.9\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 1.09 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$), 0.75 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.2, 175.1, 173.5, 173.3, 167.0, 156.1, 133.1, 130.3, 128.7, 127.8, 80.8, 77.2, 65.8, 59.8, 49.7, 47.5, 38.8, 28.3, 24.3, 16.6. HRMS (m/z): 503.2744; $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ requiere: 503.2727.

2-(2-((3*R*)-Bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2*S*)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il)-2-metilpropanamido)-(2*S*)-propanamida

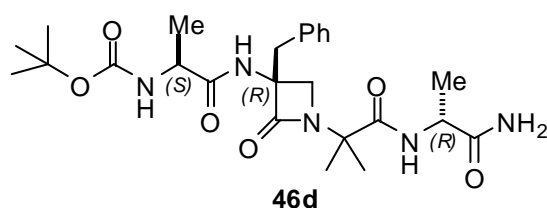


Se siguió el procedimiento general a partir de 2-[[*(3R)*-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2*S*)-propanamido]-2-oxoazetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo **82-(S)** (1 mmol, 0.447 g) y la *S*-

Alaninamida (1.5 mmol, 0.131 g). Sólido amarillento. Rendimiento: 73%, (0.326 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 160-162°C. $[\alpha]_D^{25} = -24.3$ ($c = 0.3$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3334 (NH_2), (NH); 2969 (CH_3); 1748 (C=O); 1682 (C=O); 1536 (C=O); 1165 (C-O); HPLC-MS, MeOH/ COOH m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 187.1(49), 133.1(37), 91.1(100), 70.1(60), 57.1(42). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6): 8.32 (s, 1H, $\text{NH}\text{CCH}_2\text{Bn}$), 8.16 (d, 1H, $J=6.5\text{Hz}$, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 7.33-7.28 (m, 5H, Ar), 7.06 (bs, 1H, NH_2), 6.91 (d, 1H, $J=7.0\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONH}$), 6.77 (bs, 1H, NH_2), 4.08 (m, 1H, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 4.02 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 3.61

(d, 1H, $J=4.7\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.24 (d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.05 (d, 1H, $J=13.4\text{Hz}$, CH_2Bn), 3.01 (d, 1H, $J=13.5\text{Hz}$, CH_2Bn), 1.38 (s, 9H, $^t\text{BuO-}$), 1.31 (d, 3H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 1.20 (d, 3H, $J=7.2\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 1.12 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$), 0.7 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.0, 173.6, 173.0, 166.7, 155.9, 133.0, 130.3, 128.7, 127.8, 80.9, 75.8, 65.9, 59.8, 49.6, 47.6, 38.9, 28.3, 24.3, 23.6, 16.5. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_6$ (503.2744): C, 59.63; H, 7.41; N, 13.91. Hallado: C, 58.85; H, 7.34; N, 13.92. HRMS (m/z): 503.2744; $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_6$ requiere: 503.2771.

2-(2-((3R)-Bencil-3-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-(2S)-propanamido]-2-oxo azetidin-1-il)-2-metilpropanamido)-(2R)-propanamida

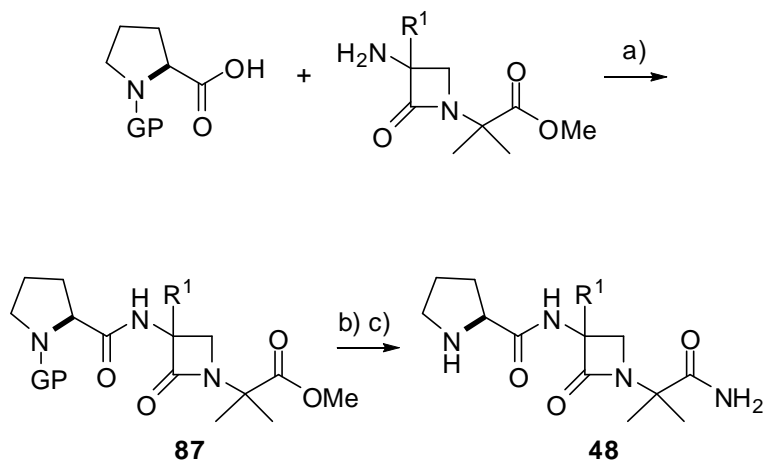


Se siguió el procedimiento general a partir del 2-[[[(3R)-3-bencil-3-[2-(*tert*-butoxi carbonilamino)-(2S)-propanamido]-2-oxo azetidin-1-il]-2-dimetilpropanoato de metilo **82**-(S) (1 mmol, 0.447 g) y la R-

Alaninamida (1.5 mmol, 0.131 g). Sólido amarillento. Rendimiento: 78%, (0.392 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 219-20°C. $[\alpha]_D^{25} = +3.25$ ($c=0.4$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3413 (NH_2); 3303 (NH); 2978, 2914 (CH_3); 1744, 1663, 1542 (C=O); HPLC-MS, MeOH/ CO_2H m/z (Tipo de fuente de iones: ESI, polaridad positiva): 187.1 (44), 173.1 (28), 172.1 (26), 117.1 (37), 116 (25), 115 (26), 113.1 (35), 91 (100), 70.0 (47). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6): 8.53 (s, 1H, NHCCCH_2Bn), 8.37 (d, 1H, $J=7.3\text{Hz}$, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 7.33-7.28 (m, 5H, Ar), 7.03 (d, 1H, $J=6.7\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONH}$), 6.97 (s, 1H, NH_2), 6.88 (s, 1H, NH_2), 4.04 (m, 1H, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 4.03 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 3.46 (d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.34 (d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$), 3.06 (d, 1H, $J=13.4\text{Hz}$, CH_2Bn), 3.01 (d, 1H, $J=13.4\text{Hz}$, CH_2Bn), 1.38 (s, 9H, $^t\text{BuO-}$), 1.31 (d, 3H, $J=7.2\text{Hz}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$), 1.19 (d, 3H, $J=7.0\text{Hz}$, $^t\text{BuOCONHCH}(\text{CH}_3)$), 0.97 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$), 0.79 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCO}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.9, 173.4, 172.5, 167.7, 155.9, 132.7, 130.3, 128.8, 127.9, 80.8, 77.2, 65.6, 58.9, 49.5, 48.1, 38.8, 28.3, 23.7, 17.3. Análisis elemental calculado para

C₂₅H₃₇N₅O₆ (503.2744): C, 59.63; H, 7.41; N, 13.91. Hallado: C, 59.21; H, 7.90; N, 13.19 HRMS (m/z): 503.2744; C₂₅H₃₇N₅O₆ requiere: 503.2742.

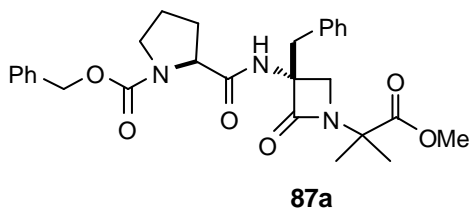
5.9 Síntesis de miméticos β -Lactámicos de PLG de tipo Pro-(β -Lactam)-(Aib)-NH₂



5.9.1 Procedimiento general para la preparación de 3-alkil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-L-prolilamido-azetidin-2-onas

A una disolución de Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.373 g) ó Boc-prolina (1.5 mmol, 0.322 g) y Et₃N (1.3 mmol, 180 μ L) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco, se adicionaron BOP-Cl (1.7 mmol, 0.431 g) y Et₃N (1.3 mmol, 180 μ L) a 0°C. La mezcla se agitó durante 30 minutos, y a continuación se adicionó la correspondiente 3-Alquil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobencensulfonamido)-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol), seguido de una cantidad adicional de Et₃N (1.3 mmol, 180 μ L). La reacción se agitó 16 horas y el crude de reacción se lavó sucesivamente con HCl 1M (3 x 5 mL), NaHCO₃ (3 x 5 mL) y NaCl (2 x 10 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó en cromatografía de columna (gel de sílice, Hexano/ EtOAc).

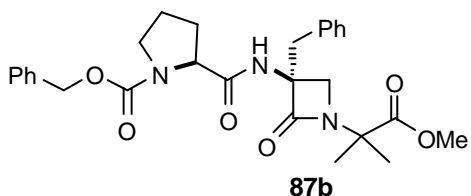
(3R)-3-Bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de 3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-(2-nitrobencensulfonamido)-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.276 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.373 g). Aceite amarillo. Rendimiento:

80%, (0.406 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -53.8$ ($c = 0.5$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3326 (NH); 1757 (C=O); 1734 (C=O); 1700 (C=O); MS (70eV, EI): m/z : 160.1 (31), 91.1(100), 70.1(40), 57.1(11), 55.1(19). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.40-7.24 (m, 10H); 5.15-5.03 (m, 2H); 4.20 (m, 1H); 3.67 (s, 3H); 3.62 (m, 2H); 3.47 (m, 1H); 2.23 (m, 1H); 2.03 (m, 1H); 1.96 (m, 3H); 1.83 (m, 3H);, 1.43 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): 173.7; 172.6; 168; 154.9; 136.6; 134.6; 130.3; 128.3; 128.0; 127.9; 126.8; 66.9; 60.2; 59.7; 58.6; 57.0; 51.7; 47.9; 37.9; 31.3; 29.9; 23.3; 22.4. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ (507.2369): C, 66.26; H, 6.55; N, 8.28. Hallado: C, 62.47; H, 7.23; N, 5.10. HRMS ($m/z +1$): $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6$: 507.2448; $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6$ requiere: 508.2445.

(3S)-3-Bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-propil amido]-azetidin-2-ona

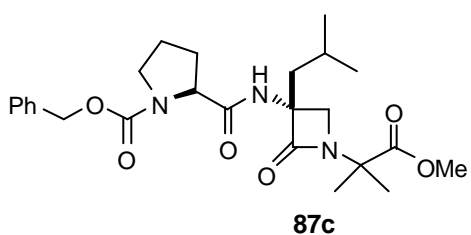


Se siguió el procedimiento general a partir de (S)-3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.276 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.373 g). Aceite amarillo.

Rendimiento: 82%, (0.416 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -54.4$ ($c = 0.5$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3276 (NH); 1763 (C=O); 1754 (C=O); 1684 (C=O); MS (70eV, EI): m/z : 364.2(19), 204.1(12), 160.1(52), 91.1(100), 70.1(71), 65.0(11). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.36-7.31 (m, 10H); 5.13 (m, 2H); 4.33-4.28 (m, 1H); 3.61 (s, 3H); 3.56-3.35 (m, 4H); 3.11 (s, 2H); 2.27-1.88 (m, 3H); 1.36-1.30 (s, 3H); 1.28-1.21 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 175.0; 174.2; 168.6; 156.9; 156.3; 138.1; 136.4;

131.5; 129.5; 129.4; 129.1; 128.9; 128.2; 68.3; 68.1; 67.1; 61.7; 61.3; 59.9; 50.6; 50.3; 49.9; 48.1; 43.4; 42.4; 42.1; 39.2; 32.5; 31.2; 25.3; 24.5; 23.8. HRMS (m/z): 507.2369; $C_{28}H_{33}N_3O_6$ requiere: 507.2339.

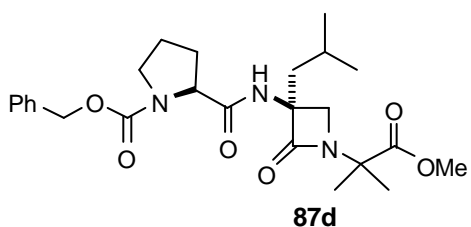
(3R)-3-Isobutil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-propil amido]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (*R*)-3-isobutil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.242 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.373 g). Aceite amarillo. Rendimiento: 60%, (0.284 g). *Datos de*

caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -68.6$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1760 (C=O); 1703 (C=O); 1688 (C=O); 1650 (C=O). MS (70eV, EI) m/z : 204(48); 160(88); 91(100); 70(53). 1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$, mezcla de confórmers): 7.37 (m, 5H); 7.36-6.36 (bs, 1H); 5.22-5.14 (d, 2H, $J=12.3$ Hz); 4.44-4.42 (m, 1H); 3.74-3.72 (m, 4H); 3.56 (m, 2H); 3.34 (d, 1H, $J=4.6$ Hz); 2.40-2.35 (m, 2H); 2.12 (m, 1H); 2.01-1.88 (m, 4H); 1.69 (s, 3H); 1.52 (s, 3H); 0.92-0.91 (d, 6H, $J=6.0$ Hz). ^{13}C -NMR (75MHz, $CDCl_3$): 173.5; 171.3; 168.2; 156.3; 136.4; 128.5; 128.1; 127.9; 67.4; 65.5; 60.4; 58.9; 52.5; 51.2; 47.1; 42.0; 27.7; 24.7; 24.1; 23.8; 22.9. HRMS (m/z): 473.2549; $C_{25}H_{35}N_3O_6$ requiere: 473.2526.

(3S)-3-Isobutil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-propil amido]-azetidin-2-ona

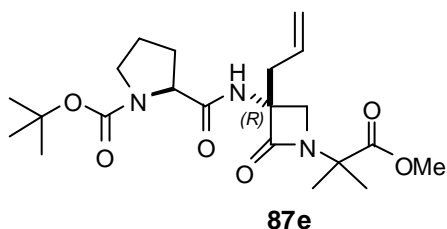


Se siguió el procedimiento general a partir de (*S*)-3-isobutil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.242 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.374 g). Aceite amarillo. Rendimiento: 56%, (0.265 g). *Datos de*

caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -55.2$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 1758 (C=O); 1703 (C=O); 1688 (C=O); 1650 (C=O). MS (70eV, EI): m/z : 97(18); 91(63); 70(100). 1H -

NMR (500MHz, CDCl₃, mezcla de conformeros): 7.36 (m, 5H); 7.16-6.29 (bs, 1H); 5.15 (s, 2H); 4.34 (m, 1H); 3.73-3.72 (m, 4H); 3.51 (m, 2H); 3.43 (d, 1H, J= 4.6Hz); 2.38 (m, 2H); 2.18 (m, 1H); 2.01-1.90 (m, 4H); 1.58 (s, 3H); 1.51 (s, 3H); 0.95-0.94 (d, 6H, J= 6.0Hz). ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD, mezcla de conformeros): 175.1; 174.7; 169.8; 156.5; 138.1; 129.6; 129.0; 128.9; 68.2; 66.9; 61.7; 61.2; 60.1; 53.1; 52.3; 42.8; 32.7; 31.0; 25.5; 24.6; 24.0; 23.8. HRMS (m/z) 473.2505. C₂₅H₃₅N₃O₆ requiere: 473.2526.

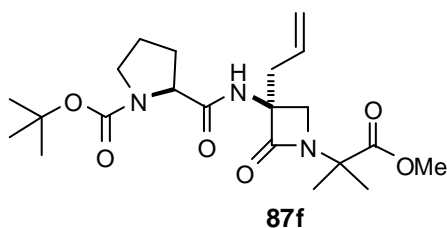
(3R)-3-Alil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-propil amido]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (*R*)-3-alil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-amino-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.226 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.322 g). Eluyente: Hexano/EtOAc 5:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 91%, (0.385 g).

Datos de caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -66.4$ (c= 1.0, MeOH); IR(cm⁻¹, KBr): 3303 (NH); 2995 (NH); 1765 (C=O); 1753 (C=O); 1698 (C=O); 1681 (C=O). MS (70eV, EI)m/z: 368.2(100), 324.2(30), 280.12(22), 239.1(61), 224.1(29), 114.1(26). ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD, mezcla de conformeros): 5.91 (m, 1H); 5.22 (dd, 2H, J₁= 13.4 Hz, J₂= 25.8 Hz); 4.19 (bs, 1H); 3.74 (s, 3H); 3.70 (d, 1H, J= 5.0 Hz); 3.50-3.42 (m, 4H); 2.61-2.59 (m, 2H); 2.23 (m, 1H); 1.99-1.846 (m, 4H); 1.62 (s, 3H); 1.50 (s, 3H); 1.44 (s, 9H). ¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD, mezcla de conformeros): 175.7; 175.3; 174.6; 172.6; 169.8; 169.6; 156.65; 155.9; 132.8; 121.5; 120.3; 81.5; 66.1; 61.2; 60.2; 54.8; 54.2; 53.1; 50.2; 48.0; 38.6; 32.5; 31.2; 28.8; 25.4; 24.7; 24.0. HRMS (m/z): 424.2459. C₂₁H₃₃N₃O₆ requiere: 424.2448.

(3S)-3-Alil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-propil amido]-azetidin-2-ona



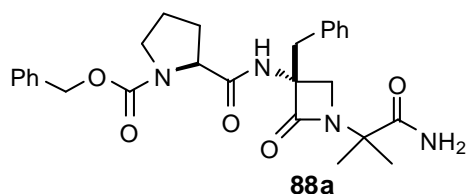
Se siguió el procedimiento general a partir de (*S*)-3-alil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-amino-aze

tidin-2-ona (1 mmol, 0.226 g) y Cbz-Pro-OH (1.5 mmol, 0.322 mg). Aceite amarillo. Eluyente de cromatografía hexano/EtOAc 5:1. Rendimiento: 92%, (0.390 g). Datos de caracterización: $[\alpha]_D^{25} = -30.8$ ($c = 0.59$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3303 (NH); 2995 (NH); 1765 (C=O); 1753 (C=O); 1698 (C=O); 1681 (C=O). MS (70eV, EI)m/z: 139(19); 125(64); 123(33); 111(92); 109(57); 99(23); 97(100); 95(79); 85(82); 83(92); 81(69); 71(94); 70(48); 67(43); 57(98); 56(28); 55(74). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD , mezcla de conformeros): 5.93 (m, 1H); 5.20 (dd, 2H, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 18.3$ Hz); 4.39 (m, 1H); 4.06 (dd, 1H, $J_1 = 6.2$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz); 3.74 (s, 3H); 3.66 (m, 1H); 3.50-3.39 (m, 4H); 2.63 (m, 2H); 2.26 (m, 1H); 2.00-1.85 (m, 4H); 1.62 (s, 3H); 1.49 (s, 3H); 1.45 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD , mezcla de conformeros): 176.5; 176.2; 175.5; 175.0; 174.5; 169.0; 156.6; 155.9; 133.1; 120.0; 119.2; 81.5; 81.4; 66.0; 61.2; 60.5; 60.1; 54.2; 53.1; 50.5; 47.9; 38.5; 31.8; 31.0; 28.7; 25.3; 24.6; 24.1.

5.9.2 Procedimiento general para la preparación de 3-alkuil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-L-prolilamido-azetidin-2-onas

Se saturó con $\text{NH}_3(\text{g})$ una disolución de la correspondiente 3-alkuil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-propilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol) en MeOH (30 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2-10 días, repitiendo el proceso de saturación con $\text{NH}_3(\text{g})$ 3 o 4 veces para favorecer la completa transformación, que fue seguida por $^1\text{H-RMN}$. Finalizada la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, eluyente EtOAc/Hexano).

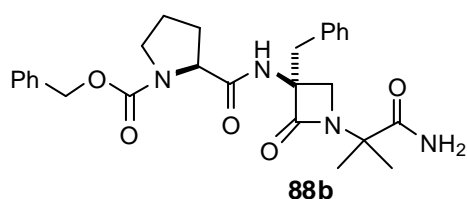
(3R)-3-Bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.507 g). La reacción finalizó en 10 días, utilizándose para purificar cromatografía de

sílica gel con una mezcla de elución de EtOAc/Hexano 1:3. Sólido blanco. Rendimiento: 64%, (0.315 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 135-7°C; $[\alpha]_D^{25} = -22.2$ ($c = 0.27$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3306 (NH); 1739 (C=O); 1700 (C=O); 1675 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 160.1(31), 91.1(100), 70.1(40), 57.1(11), 55.1(19). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD , mezcla de confórmeros): 7.38-7.25 (m, 10H); 5.30-4.91 (d, 2H, $J = 12.3$ Hz); 4.32 (m, 1H); 3.63/3.38 and 3.52 (m, 2H); 3.10 and 3.00/2.86 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz); 2.90 (m, 2H); 2.28 (m, 1H); 2.03-1.90 (m, 3H); 1.20/0.79 (s, 3H); 1.17/0.68 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD , mezcla de confórmeros): 176.9; 173.6; 167.7; 154.7; 136.6; 133.3; 130.5; 130.4; 128.3; 128.1; 127.9; 127.2; 66.8; 59.4; 46.1; 37.2; 31.2; 23.3; 22.9; 22.6; 22.5. HRMS (m/z): 492.2373; $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$ requiere: 492.2316.

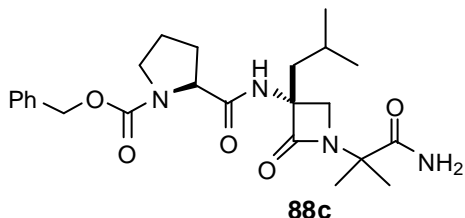
(3S)-3-Bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3S)-3-bencil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.507 g). La reacción

finalizó en 10 días, y la purificación se llevó a cabo por cromatografía de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla EtOAc/Hexano: 1:3. Sólido blanco. Rendimiento: 70%, (0.344 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 88-90°C; $[\alpha]_D^{25} = -89.2$ ($c = 0.25$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3407 (NH_2); 3397 (NH); 1768 (C=O); 1679 (C=O); 1663 (C=O); 1557 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 364.2(12), 160.1(42), 91.7(15), 91.0(100), 70.1(52), 65.0(13). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.43-7.33 (m, 10H); 5.11 (m, 2H); 4.34 (m, 1H); 3.56-3.51 (m, 2H); 3.38 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz); 3.27 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz); 3.07 (d, 1H, $J = 13.1$ Hz); 2.96 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz); 2.28-2.18 (m, 1H), 2.01-1.89 (m, 3H); 1.25 (s, 3H); 0.81 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 178.6; 175.2; 169.0; 156.5; 136.7; 138.1; 135.1; 131.9; 129.6; 129.2; 128.7; 68.5; 67.2; 61.4; 60.7; 38.9; 32.6; 31.1; 25.4; 24.6; 24.5; 24.0. HRMS (m/z): 492.2373; $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$ requiere: 492.2349.

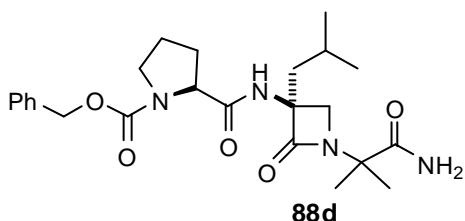
(3R)-3-Isobutil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-isobutil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.473 g). La reacción finalizó en 7 días, y la purificación se llevó a

cabo por cromatografía de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla EtOAc/Hexano 3:2. Sólido blanco. Rendimiento: 67%, (0.307 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 126-8°C; $[\alpha]_D^{25} = -57.2$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3453 (NH_2); 2958 (NH); 1759 (C=O); 1666 (C=O); 1415; MS (70eV, EI)m/z: 204(15); 160(58); 91(100); 70(37), 57(16). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 8.27 (bs, 1H); 7.57 (bs, 1H); 7.36 (m, 5H); 5.49 (bs, 1H); 5.17 (m, 2H); 4.36 (m, 1H); 3.64 (m, 1H); 3.48 (m, 2H); 3.28 (m, 1H); 2.42 (m, 1H); 1.91 (m, 4H); 1.75 (s, 3H); 1.51 (m, 1H); 1.39 (s, 3H); 0.91 (d, 3H, $J = 5.9$ Hz); 0.90 (d, 3H, $J = 5.9$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 176.5; 171.7; 167.9; 156.7; 136.6; 128.6; 128.3; 127.9; 67.6; 60.1; 60.0; 50.7; 47.3; 42.5; 29.7; 27.1; 24.8; 24.5; 24.3; 24.1; 22.6. HRMS (m/z): 458.2529. $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5$ requiere: 458.2525.

(3S)-3-Isobutil-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoil)-isopropil]-azetidin-2-ona

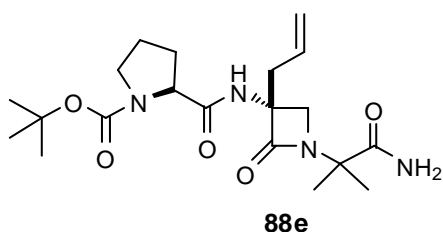


Se siguió el procedimiento general a partir de (3S)-3-isobutil-1-[1-(metoxycarbonil)isopropil]-3-[N-(benciloxycarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.473 g). La reacción finalizó en 7 días, y la purificación se llevó a cabo por

cromatografía de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla EtOAc/Hexano 3:2. Sólido blanco. Rendimiento: 65%, (0.297 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 135°C; $[\alpha]_D^{25} = -113.6$ ($c = 0.5$, CH_2Cl_2); IR(cm^{-1} , KBr): 3453 (NH_2); 2957; 1760 (C=O); 1703 (C=O); 1666 (C=O); 1650 (C=O); 1415; MS (70eV, EI)m/z: 378 (32); 298(10);

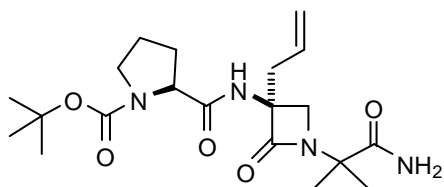
278(13); 267(15); 264(20); 238(15); 219(14); 202(17); 186(28); 181(100); 171(18); 161(48); 133(43); 131(80); 120(37); 108(16); 107(36); 102(13); 95(17); 93(20); 92(59); 84(25); 78(63); 73(41); 70(45); 65(26); 51(43). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.39-7.30 (m, 5H); 5.14-5.12 (m, 2H); 4.37 (m, 1H); 3.56-3.47 (m, 4H); 2.26 (m, 1H); 2.10-1.79 (m, 6H); 1.67 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.00 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz); 0.96 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 178.6; 175.2; 174.5; 169.9; 157.6; 156.5; 138.0; 129.6; 129.1; 68.4; 66.5; 61.7; 61.2; 60.9; 51.4; 42.9; 32.6; 30.7; 30.4; 25.3; 24.8; 24.5; 23.4. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5$ (458.2529): C, 63.41; H, 7.45; N, 8.87. Hallado: C, 63.80; H, 8.02; N, 9.13.

(3R)-3-Alil-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoyl)-isopropil]-azetidín-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-alil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-propilamido]-azetidín-2-ona (1 mmol, 0.423 g). La reacción finalizó en 10 días, y la purificación se llevó a cabo por cromatografía de gel de sílice utilizando como eluyente EtOAc y posteriormente MeOH. Aceite amarillo. Rendimiento: 80%, (0.326 g). *Datos de caracterización*: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -39.7$ ($c = 1.0$, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3419 (NH_2); 2960 (NH); 1759 (C=O); 1723 (C=O); 1686 (C=O); 1675 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 125.2(34); 111.1(69); 109(30); 97(100), 95(53); 85(41); 83(65); 81(37); 71(67); 70(85); 57(96); 55(56). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 8.23 (bs, 1H); 7.59 (bs, 1H); 5.84 (m, 1H); 5.42 (bs, 1H); 5.28 (m, 2H); 4.27 (m, 1H); 3.74-3.65 (m, 3H); 3.38 (m, 2H); 3.31 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz); 2.55(m, 2H); 1.86 (m, 4H); 1.76 (s, 3H); 1.48 (s, 9H); 1.39 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 176.4; 172.6; 167.1; 155.8; 130.3; 120.7; 103.9; 103.1; 80.6; 64.7; 63.7; 59.7; 57.8; 48.4; 47.0; 40.5; 37.9; 29.4; 28.1; 24.5; 24.0; 18.0; 15.1. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$ (408.2373): C, 58.81; H, 7.39; N, 13.72. Hallado: C, 58.10; H, 7.68; N, 13.17. HRMS ($m/z + 1$): 409.2451; $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5$ requiere: 408.2439.

(3S)-3-Alil-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoil)-isopropil]-azetidín-2-ona



88f

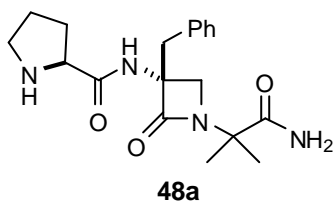
Se siguió el procedimiento general a partir de (3S)-3-alil-1-[1-(metoxicarbonil)isopropil]-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-propil amido]-azetidín-2-ona (1 mmol, 0.423 g). La reacción finalizó en 10 días, y la purificación se llevó a cabo por cromatografía de gel de sílice utilizando como eluyente EtOAc y posteriormente MeOH. Sólido amarillo. Rendimiento: 90%, (0.367 g). *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 182-4°C; $[\alpha]_D^{25} = -63.6$ (c= 0.5, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3419 (NH_2); 2960 (NH); 1759 (C=O); 1675 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 139.2(20); 125.2(50); 123.1(24); 114.1(34); 111.1(87); 109(41); 97.1(100); 95(68); 85(65); 83.1(86); 81(51); 71.1(89); 70.1(83); 67(22); 57.1(67); 55.1(73). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3 , mezcla de conformeros): 8.28 (bs, 1H); 7.52 (bs, 1H); 5.85/5.67 (m, 1H); 5.35 (bs, 1H); 5.29 (m, 2H); 4.31 (m, 1H); 3.67 (d, 1H, J= 5.1 Hz); 3.49-3.32 (m, 3H); 2.54(d, 2H, J= 7.0 Hz); 2.37 (m, 1H); 1.87 (m, 4H); 1.77 (s, 3H); 1.47 (s, 9H); 1.39 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 176.3; 176.1; 175.7; 166.8; 130.5; 120.9; 80.8; 64.2; 64.0; 60.0; 48.7; 47.2; 47.0; 38.4; 28.5; 28.3; 24.7; 24.1. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 58.81; H, 7.39; N, 13.72. Hallado: C, 53.70; H, 7.34; N, 12.26.

5.9.3 Preparación de 3-alquil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidín-2-onas

5.9.3.1 Procedimiento general de preparación de 3-alquil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidín-2-onas

A una suspensión de la correspondiente 3-alquil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxicarbonil)-L-prolilamido]-azetidín-2-ona (1mmol) en MeOH (30mL) se le adicionan 0.2 mmol de Pd/C (20%). La mezcla se agitó durante 2 horas bajo atmósfera de H_2 . Tras comprobar mediante $^1\text{H-RMN}$ la completa desprotección, el crudo se filtró sobre celita y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el producto puro.

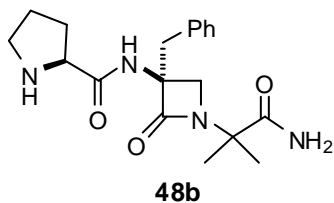
(3R)-3-Bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-(L-prolilamido)-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxi carbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.492 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 93%, (0.332 g). *Datos*

de caracterización: Pto. Fusión: 230-2°C; $[\alpha]_D^{25} = 30.8$ (c= 0.24, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3370 (NH); 1753 (C=O); 1662 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 111.1(26), 97.1(46), 95.1(24), 85.1(36), 83.1(43), 81.1(23), 71.1(55), 70.1(26), 69.1(44), 67.1(16), 57.1(100), 55.1(58). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.36 (m, 5H); 4.35 (dd, 1H, $J_1 = 6.7$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz); 3.64 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz); 3.45 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz); 3.41-3.38 (m, 2H); 3.20 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz); 3.11 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz); 2.50 (m, 1H); 2.16-2.10 (m, 3H); 1.21 (s, 3H); 0.81 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 177.1; 175.5; 168.1; 133.6; 130.4; 128.1; 127.3; 65.5; 59.9; 59.4; 47.2; 46.6; 37.6. HRMS (m/z): 358.2017; $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ requiere: 358.2005.

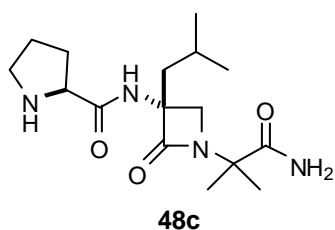
(3S) 3-Bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-(L-prolilamido)azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3S)-3-bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxi carbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.492 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 95%, 0.340 g. *Datos de*

caracterización: Pto. Fusión: 242-4°C; $[\alpha]_D^{25} = -34.5$ (c= 0.20, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 3397 (NH); 1756 (C=O); 1743 (C=O); 1679 (C=O); MS (70eV, EI)m/z: 111.1(13), 97.1(23), 95.1(14), 91.1(22), 85.1(15.5), 83.1(22), 81.1(14), 71.1(28), 70.1(100), 69.1(19.2), 67.1(11), 57.1(40), 55.1(33). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.36 (m, 5H); 4.15 (dd, 1H, $J_1 = 5.9$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz); 3.59 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz); 3.44 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz); 3.22 (m, 2H); 3.17 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz); 3.12 (d, 1H, $J = 13.3$ Hz); 2.37 (m, 1H); 1.98 (m, 3H); 1.25 (s, 3H); 0.86 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD): 177.0; 171.5; 167.7; 133.5; 130.5; 128.2; 127.4; 65.9; 59.8; 59.5; 46.4. HRMS (m/z): 358.1992; $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ requiere: 358.2005.

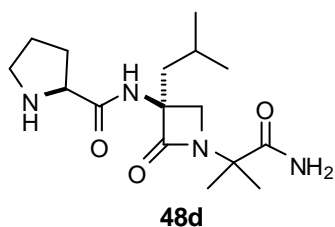
(3R) 3-Isobutil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-isobutil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxi carbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.492 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 100%, 0.324 g. *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 148-9°C; $[\alpha]_D^{25} = -19.4$

(c= 1.25, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 2921(NH); 1753 (C=O); 1693 (C=O); 1653 (C=O). MS (70eV, EI)m/z: 111(15); 97(30); 85(25); 83(32); 71(48); 70(100); 57(89); 55(67). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6): 8.19 (bs, 1H); 7.92 (bs, 1H); 7.14 (bs,); 3.58 (m, 2H); 3.37 (d, 1H, J=5.0 Hz); 2.87 (m, 1H); 2.74 (m, 1H); 1.98 (m, 1H); 1.84 (m, 1H); 1.78-1.59 (m, 3H) 1.50 (s, 3H); 1.28 (s, 3H); 0.98 (d, 3H, J= 6.5 Hz); 0.93 (d, 3H, J= 6.5 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 176.2; 176.0; 167.9; 64.5; 60.6, 60.1; 50.6; 47.4; 42.4; 30.8; 29.8; 26.4; 25.1; 24.9; 24.4; 22.6. HRMS (m/z): 324.2163; $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ requiere: 324.2161.

(3S) 3-Isobutil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil)isopropil]-azetidin-2-ona



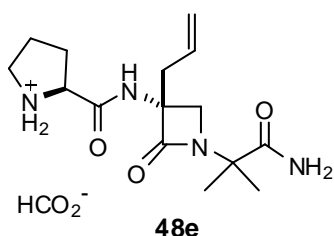
Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-bencil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-[N-(benciloxicarbonil)-L-prolilamido]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.492 g). Sólido amarillo. Rendimiento: 100%, 0.324 g. *Datos de caracterización*: Pto. Fusión: 192-4°C; $[\alpha]_D^{25} = -59.6$ (c=

0.58, MeOH); IR(cm^{-1} , KBr): 2990 (NH); 1755 (C=O); 1657 (C=O). MS (70eV, EI)m/z: : 280(18); 252(13); 70(100). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): 8.46 (bs, 1H); 8.20 (bs, 1H); 5.56 (bs, 1H); 3.75 (m, 1H, $J_1=5.3$ Hz, $J_2= 9.3$ Hz); 3.71 (d, 1H, J= 4.9 Hz); 3.29 (d, 1H, J=4.9 Hz); 3.01 (m, 1H); 2.88 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 1.97-1.88 (m, 4H); 1.77-1.75 (m, 4H); 1.68 (m, 1H); 1.60 (m, 1H); 1.38 (s, 3H), 1.03 (d, 3H, J= 6.2 Hz); 0.99 (d, 3H, J= 6.2 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 176.2; 175.9; 167.6; 64.6; 60.4, 60.1; 50.5; 47.4; 42.7; 30.6; 29.7; 26.4; 24.8; 24.2; 24.0; 22.8. HRMS (m/z): 324.2146; $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ requiere: 324.2161.

5.9.3.2 Procedimiento general para la preparación de 3-alil-3-(L-prolilamido)-1-[1-(carbamoil) isopropil]-azetidin-2-onas

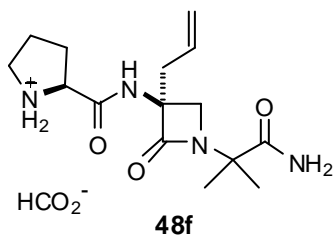
La disolución del correspondiente 3-alil-3-[N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoil)-isopropil]-azetidin-2-ona (1 mmol) en 7 mL de ácido fórmico (97%) se agitó durante 2 horas bajo atmósfera de N₂. La finalización de la reacción se comprobó mediante análisis de alicuotas por ¹H-RMN. El exceso de ácido se evacuó bajo presión reducida para dar lugar a la correspondiente sal fórmica.

(3R)-3-Alil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-(L-prolilamido)azetidin-2-ona



Se siguió el procedimiento general a partir de (3R)-3-alil-3-[N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoil)-isopropil]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.408 g). Aceite amarillo. Rendimiento: 100%, 0.354 g. *Datos de caracterización:* Pto. Fusión: 192-4°C; MS (70eV, EI)m/z: : 125.2(53); 123(30); 111.4(88); 109(48); 97(100); 95.1(75); 85.1(75); 83.1(91); 81.1(62); 71.1(93); 70(29); 67(31); 57(97); 55.1(84). ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD): 8.57 (bs, 1H, HCO₂⁻); 5.89 (m, 1H, CH=CH₂); 5.35 (d, 1H, CH=CH₂, J= 17.1Hz); 5.29 (d, 1H, CH=CH₂, J=10.2Hz); 3.71 (m, 1H, CHCONH); 3.69 (d, 1H, CH₂NC(CH₃)₂, J= 5.4Hz); 3.52 (d, 1H, CH₂NC(CH₃)₂, J= 5.3Hz); 2.98 (m, 1H, NHCH₂CH₂); 2.61 (d, 1H, NHCH₂CH₂); 2.1 (m, 1H, CH₂CHCONH), 1.83 (m, 1H, CH₂CHCONH); 1.76 (m, 2H, CH₂CH₂NH); 1.68 (s, 3H, C(CH₃)₂); 1.41 (s, 3H, C(CH₃)₂). ¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD): 177.6; 176.4; 169.4; 168.8; 131.0; 120.1; 64.4; 60.4; 60.0; 37.4; 31.0; 26.1; 23.8; 23.5. HRMS (m/z): 309.1927 C₁₅H₂₅N₄O₃ requiere: 309.1927.

(3S)-3-Alil-1-[1-(carbamoil)isopropil]-3-(L-prolilamido)azetidin-2-ona

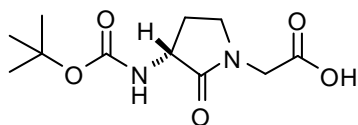


Se siguió el procedimiento general a partir de (3S)-3-Alil-3-[N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-1-[1-(carbamoil)-isopropil]-azetidin-2-ona (1 mmol, 0.408 g). Aceite amarillo. Rendimiento: 100%, 0.354 g. *Datos de*

caracterización: ^1H -NMR (500MHz, DMSO- d_6): 8.16 (bs, 1H, HCO_2^-); 7.90 (bs, 1H, NH_2); 7.22 (bs, 1H, NH_2); 5.83 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.30 (d, 1H, $J=12.2\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.23 (d, 1H, $J=8.9\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 3.60 (m, 1H, CHCONH); 3.50 (d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$); 3.36 (d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_3)_2$); 2.88 (m, 1H, CH_2CH_2); 2.74 (m, 1H, CH_2CH_2); 2.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 1.95 (m, 1H, CH_2CH_2); 1.67 (m, 1H, CH_2CH_2); 1.60 (m, 2H, CH_2CH_2); 1.59 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.27 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD): 176.3; 176.1; 167.6; 136.4; 132.6; 120.8; 64.3; 60.8; 59.7; 49.3; 47.6; 38.2; 31.2; 26.8; 24.9; 24.8. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 54.22; H, 7.39; N, 15.81. Hallado: C, 53.82; H, 7.24; N, 16.26.

5.10 Síntesis de (3R)-(N-L-prolilamino)-2-oxo-1-pirrolidinacetamida (PAOPA)

Ácido (R)-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-2-oxo-1-pirrolidinacético



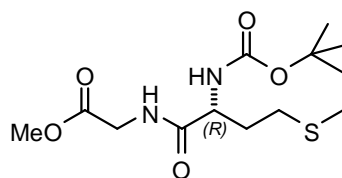
Para la preparación de la PAOPA se combinaron diferentes métodos de la bibliografía de Freidinger y col.¹⁰⁷, Prochazka y col.¹⁰⁸, y Johnson y col.¹⁰⁹ En un primer paso se preparó el ácido (R)-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-2-oxo-1-pirrolidinacético, y para ello se adicionaron Et_3N (80.4 mmol, 11.15 mL) y di-*tert*-butildicarbonato (16 mmol, 3.49 g) a una suspensión de D-metionina (13.4 mmol, 1.99 g) en metanol (150 mL). La mezcla de reacción se agitó 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener un aceite que posteriormente fue disuelto en HCl 1M (60 mL) y extraído con EtOAc (3 x 40 mL). El conjunto de fases orgánicas se secó (MgSO_4) y evaporó. El producto resultante (N-Boc-D-metionina) se utilizó en el siguiente paso sin purificar. Rendimiento: 100%. ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3): 10.3 (bs, 1H); 5.17 (bs, 1H); 4.47 (bs, 1H); 2.61 (t, 2H, $J=7.5\text{Hz}$); 2.20 (m, 1H); 2.13 (s, 3H); 2.02 (m, 1H); 1.48 (s, 9H).

¹⁰⁷ Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 104.

¹⁰⁸ Prochazka, Z.; Lebl, M.; Barth, T.; Hlavacek, J.; Trka, A.; Budesinsky, M.; Jost, K. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1984**, 49, 642.

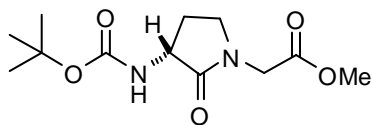
¹⁰⁹ Kuo-Long Y.; Rajakumar G.; Srivastava L.K.; Mishra R.K.; Johnson R.L. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1430.

El ácido (*R*)-2-*terc*-butoxicarbonilamino-4-(metiltio)butanóico (13 mmol, 3.237 g) y el clorhidrato del éster metílico de glicina (19.5 mmol, 2.448 g) se disolvieron en DMF seca (26 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y se le adicionaron sucesivamente Et₃N (26 mmol, 3.6 mL), HOBT·H₂O (19.5 mmol, 2.98 g) y EDC·HCl (19.5 mmol, 6.07 g). La mezcla se agitó durante 8 horas y tras comprobar la total conversión por ¹H-RMN, el disolvente fue evaporado. El sólido se redisolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ y H₂O. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y evaporó a presión reducida para obtener el dipéptido (D)-Boc-Met-Gly-OMe. Rendimiento: 80%. ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 6.90 (bs, 1H); 5.31 (d, 1H, J= 8.5 Hz); 4.33 (m, 1H); 4.03 (t, 2H, J= 5.3 Hz); 3.73 (s, 3H); 3.26 (m, 1H); 2.58 (t, 2H, J= 7.3 Hz); 2.09 (s, 3H); 1.97-1.78 (m, 2H); 1.42 (s, 9H).



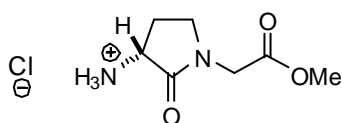
A continuación, una disolución de este intermedio (10 mmol, 3.20 g) en 20 mL de yoduro de metilo (MeI) se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Al finalizar, el exceso de reactivo (MeI) se eliminó a vacío, y se obtuvo así la sal de sulfonio del dipéptido con un rendimiento del 100%. Este producto se disolvió nuevamente en DMF (12 mL) bajo N₂, y la solución se enfrió en un baño de hielo antes de adicionar NaH (20 mmol, 0.048 g). Manteniendo la temperatura a 4°C, se agitó la mezcla 5 min, y 15 min más a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50 mL de H₂O y se agitó la mezcla 1 hora más antes de eliminar el disolvente a vacío. El residuo se disolvió en una disolución acuosa de ácido cítrico al 10% (25 mL), y se extrajo con EtOAc (4 x 70 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (25 mL) y NaCl (sat) y se secó sobre MgSO₄. Después de evaporar el disolvente, el crudo se recrystalizó en CH₂Cl₂/Et₂O para obtener un sólido blanco. Rendimiento: 52%. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆): 12.82 (bs, 1H); 7.14 (d, 1H, J= 8.6 Hz); 4.11 (dd, 1H, J₁= 9.1 Hz, J₂= 18.7 Hz); 4.03 (d, 1H, J= 17.5 Hz); 3.83 (d, 1H, J= 17.5 Hz); 3.33-3.28 (m, 4H); 2.25 (m, 1H); 1.83 (m, 1H); 1.40 (s, 9H).

(R)-3-[N-(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-2-oxo-1-pirrolidinacetato de metilo



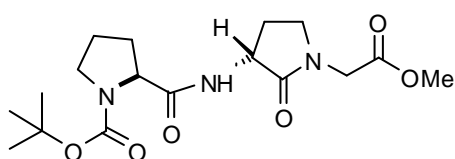
Se disolvió el ácido (R)-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-2-oxo-1-pirrolidinacético (0.87 mmol, 0.224 g) en metanol (10 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió un ligero exceso de una disolución de CH₂N₂ preparado en éter y se dejó agitar durante 5 min. Tras la evaporación del disolvente y el exceso de CH₂N₂, se obtuvo el éster metílico indicado. Rendimiento: 100%. *Datos de caracterización*: ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): 5.10 (bs, 1H); 4.26 (bs, 1H); 4.19 (d, 1H, J= 17.6 Hz); 4.03 (d, 1H, J= 17.5 Hz); 3.77 (s, 3H); 3.51 (dt, 1H, J₁= 6.6 Hz, J₂= 9.7 Hz, J₃= 9.5 Hz); 3.39 (t, 1H, J= 9.3 Hz); 2.68 (m, 1H); 1.97 (m, 1H, J₁= 9.7 Hz, J₂= 19.2 Hz, J₃= 18.9 Hz); 1.48 (s, 9H)).

Clorhidrato de (R)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidineacetato de metilo



Se disolvió (R)-3-[N-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-2-oxo-1-pirrolidinacetato de metilo (1.1 mmol, 0.300 g) en 5 mL de ácido fórmico (97%) y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo atmósfera de N₂. Tras comprobar por análisis de alícuotas vía ¹H-NMR que la reacción hubo finalizado, el ácido fórmico se eliminó a vacío y el residuo restante se trató con 1.1 mL de una disolución de HCl en MeOH¹¹⁰ y CH₂Cl₂ seco hasta eliminar totalmente el ácido residual. Rendimiento: >100%. ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD): 4.21-4.17 (m, 3H); 3.78 (s, 3H); 3.63-3.59 (m, 2H); 2.68 (m, 1H); 2.16 (m, 1H)).

3-[(3R)-N-(*tert*-Butoxicarbonil)-L-prolilamido]-2-oxo-1-pirrolidinacetato de metilo

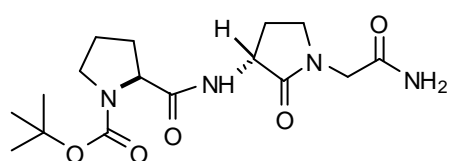


A una disolución de Boc-Pro-PH (1.5 mmol, 0.323 g) y Et₃N (1.67 mmol, 231 mL) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, se le adicionaron BOP-Cl (2.6

¹¹⁰ Preparada disolviendo 630 µL de Me₃SiCl en 5 mL de MeOH.

mmol, 0.661 g) y Et₃N (1.67 mmol, 231 mL) a 0°C. La mezcla se agitó 30 min a la misma temperatura. A continuación, el clorhidrato de (*R*)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidineacetato de metilo (1.05 mmol, 0.387 g), disuelto en 10 mL de CH₂Cl₂ seco y 200 µL de Et₃N y una cantidad adicional de Et₃N (1.67 mmol, 231 mL) se añadieron a la mezcla y se agitó 16 horas, dejando que alcanzara temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la reacción se lavó con HCl 1M (3 x 5 mL), NaHCO₃ (3 x 5 mL), NaCl (sat) (2 x 10 mL), las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para obtener el crudo que se purificó por cromatografía (gel de sílice, EtOAc 100%, luego MeOH). Rendimiento: 96%. *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -14.0$ ($c = 1.50$, MeOH); MS (70 eV, EI): m/z : 125.1(53); 123.1(30); 114.1(27); 111.4(92); 109.1(49); 97.1(100); 95.1(78); 85.1(67); 83.1(86); 81.1 (86); 71.1(58); 70(83); 67(24); 57(64); 56.1(27); 55.1(77). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆, mezcla de confórmeros): 8.18-8.06 (bs, 1H); 4.44-4.32 (m, 1H); 4.17-3.98 (m, 4H); 3.77 (m, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 15.9$ Hz); 3.67 (s, 3H); 3.36-3.32 (m, 4H); 2.30 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 1.92-1.79 (m, 4H); 1.77-1.75 (m, 4H); 1.38 (s, 9H). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): 179.2; 172.9; 168.6; 155.5; 80.5; 61.1; 60.1; 52.3; 50.8; 47.1; 44.7; 44.4; 31.1; 29.7; 28.4; 27.7; 24.5; 23.8. Análisis elemental calculado para C₁₇H₂₇N₃O₆: C, 55.27; H, 7.37; N, 11.37. Hallado: C, 50.85; H, 7.15; N, 10.67.

3-[(3*R*)-N-(*tert*-Butoxicarbonil)-L-prolilamido]-2-oxo-1-pirrolidinacetamida

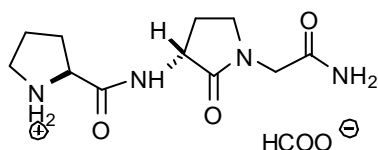


Se disolvió 3-[(3*R*)-N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-prolilamido]-2-oxo-1-pirrolidinacetato de metilo (0.9 mmol, 0.332 g) en 40 mL de una disolución saturada de amoníaco en MeOH y se dejó agitar

16 horas. Tras evaporar el MeOH y NH₃ se obtuvo el producto deseado que se utilizó en el siguiente paso sin purificar. Aceite. Rendimiento: 90%. *Datos de caracterización*: $[\alpha]_D^{25} = -28.0$ ($c = 1.0$, MeOH); IR(cm⁻¹, KBr): 3291(NH₂); 1681(C=O); 1670(C=O); 1409. MS (70 eV, EI): m/z : 139.2(16); 125.2(55); 123.1(22); 114.1(18); 111.1(97); 109.1(40); 99.1(25); 97.1(100); 95.1(70); 85.1(86); 83.1(91); 81.1(52); 71.1(91); 70.1(35); 57.1(55); 55.1(72). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆, mezcla de confórmeros): 8.23-8.13 (bs, 1H); 7.32 (bs, 1H); 7.13 (bs, 1H); 4.1 (m, 1H); 4.12-4.05 (m, 1H); 3.76

(s, 2H); 3.35-3.28 (m, 4H); 2.29 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 1.97-1.89 (m, 1H); 1.81-1.76 (m, 4H); 1.36-1.34 (s, 9H). ^{13}C -NMR (75MHz, CDCl_3): 175.8; 174.5; 172.6; 156.4; 155.9; 81.5; 80.7; 62.7; 61.7; 52.2; 47.9; 46.8; 46.3; 32.4; 31.5; 28.8; 25.3; 24.3; 23.8. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 54.22; H, 7.39; N, 15.81. Hallado: C, 49.95; H, 7.38; N, 11.36.

3*R*-(N-L-Prolilamido)-2-oxo-1-pirrolidinacetamida



Se disolvió la 3-[(3*R*)-N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-prolilamido]-2-oxo-1-pirrolidinacetamida (0.14 mmoles, 0.050 g) en 3 mL de ácido fórmico (97%). La mezcla se agitó durante 2h bajo N_2 y se comprobó mediante análisis de alícuotas por ^1H -NMR la desprotección de la prolina. A continuación el ácido se eliminó a vacío para dar lugar al compuesto PAOPA. Este producto está caracterizado previamente por Johnson (ref. 107).

5.11 Evaluación biológica de análogos de PLG

5.11.1 Material y métodos

Muestras cerebrales

Las muestras cerebrales humanas procedieron de cerebros postmortem pertenecientes a sujetos fallecidos por causas violentas y se obtuvieron en el transcurso de autopsias judiciales realizadas en el Insituto Vasco de Medicina Legal de Bilbao durante el periodo comprendido entre 1991 y 2004. Hasta el momento de la autopsia, los cadáveres de los fallecidos permanecieron a 4°C. Durante la autopsia, se realizó la disección de la cabeza del núcleo caudado, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 2 g de peso que fueron inmediatamente congelados y almacenados a -70°C en un arcón congelador hasta el ensayo. Todo procedimiento en este estudio se realizó siguiendo las normas éticas y los diversos protocolos aprobados para estudios humanos postmortem.

Materiales empleados

Radioligandos: El radioligando antagonista de receptores dopaminérgicos D₂ [³H]-espiperona fue suministrado por Perkin Elmer. Su actividad específica fue de 15.0 Ci/mmol en todos los experimentos del estudio. Este radioligando presenta fijación selectiva, reversible y competitiva al receptor D₂ (Fields et al., 1977¹¹¹; Alexander et al., 2006¹¹²). La solución stock de [³H]espiperona se conservó a -70°C. Para la preparación de las concentraciones estándar del radioligando se realizaron diluciones a partir de la solución stock correspondiente, en agua destilada y purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA) con un 6% de EtOH y 2,5 mM de HCl.

El radioligando análogo no hidrolizable de GTP guanosina-5'-O-(3-[³⁵S]GTPγS) ([³⁵S]GTPγS) fue suministrado por Perkin Elmer. Su actividad específica fue de 1250

¹¹¹ Fields, JZ.; Reisine, TD.; Yamamura, HI. *Brain Res.* **1977**, *136*, 578-584.

¹¹² Alexander, SPH, Mathie, A.; Peters, J.A. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*: S32-33.

Ci/mmol en todos los experimentos del estudio. Se realizaron alícuotas a la concentración adecuada del radioligando en tampón DTT (10 mM), tricina (10 mM), pH 7,6 que fueron congeladas a -70°C hasta el momento del ensayo. La concentración de las muestras utilizadas en los ensayos fue 0.5 nmol/L.

Fármacos y reactivos: Los fármacos y reactivos utilizados y las entidades suministradoras fueron: N-propilnorapomorfina HCl ((-)-NPA), que se obtuvo de Sigma, ketanserina tartrato de Tocris Cookson, el (+)-butaclamol HCl de Research Biochemicals International y el haloperidol de Latino.

Otros reactivos utilizados y las entidades suministradoras fueron: GDP, GTP, Gpp(NH)p y GTP γ S, seroalbúmina bovina (BSA), Tris[hidroximetil]amino-metano (Tris), polietilenimina, DL-ditiotreitol (DTT), se obtuvieron de Sigma. Cloruro sódico, cloruro magnésico hexahidrato, EDTA disódico, etanol absoluto y sacarosa fueron suministrados por Merck, ácido clorhídrico 37% por Panreac, el reactivo de Bradford por Bio-Rad Laboratories y el líquido de centelleo OptiPhase “Hisafe II” por Perkin Elmer.

5.11.2 Metodología

Preparación de membranas

La preparación de membranas con el fin de obtener la fracción P₂ se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. Cada una de las muestras de caudado fue descongelada (4°C), troceada y colocada en 4 tubos de polietileno con 7 mL de tampón Tris-sacarosa (Tris HCl 5 mM, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) a 4°C. Los fragmentos fueron homogeneizados mediante un homogeneizador Ultra-Turrax durante 15 segundos a máxima velocidad. A continuación, los homogeneizados se centrifugaron a 1100xg (centrífuga Sorvall RC-5 con rotor SM-24) durante 10 minutos a 4°C. Tras esta primera centrifugación, se descartaron los sedimentos (fracción P₁) transfiriéndose los sobrenadantes a otros 4 tubos de polietileno donde fueron centrifugados a 40000xg durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos fueron decantados y los sedimentos (fracción P₂) fueron resuspendidos con una varilla de vidrio y lavados con 4 mL del tampón Tris-incubación (Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM; EDTA 1mM, ácido

ascórbico 0.01% pH 7.6) a 4°C. A continuación, se realizó una incubación de 20 minutos a 36°C para favorecer la eliminación de restos de neurotransmisor endógeno o posibles fármacos y los tubos fueron de nuevo centrifugados a 40000xg durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se decantaron los sobrenadantes y los sedimentos obtenidos se resuspendieron vigorosamente en 2 mL de Tris-incubación. La solución total resultante de cada muestra de tejido (aproximadamente 8 mL) se repartió en 6 alícuotas iguales en tubos Eppendorf que fueron centrifugados a 20000xg durante 10 minutos a 4°C (centrífuga EBA 12R). Los sobrenadantes fueron decantados y los sedimentos congelados a -78°C para su posterior utilización en el experimento correspondiente. Finalmente, el día del ensayo las membranas (3 alícuotas para los experimentos de fijación de [³H]-espiperona y 1 alícuota para los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS) se resuspendieron en el volumen adecuado del tampón de incubación correspondiente y se homogeneizaron con Ultra-Turrax (15 segundos a máxima velocidad). Tanto el inicio como la terminación de las centrifugaciones se realizaron de forma gradual y sin la utilización de freno.

Determinación del contenido proteico en las membranas: La determinación del contenido proteico en las suspensiones de membranas utilizadas en los ensayos de fijación de [³H]-espiperona y [³⁵S]GTPγS, se realizó según el método de Bradford (Bradford, 1976¹¹³). Para ello, se tomaron alícuotas de 100 µl de las diferentes suspensiones de membranas homogeneizadas, a las que se les añadieron 5 mL de reactivo de Bradford previamente diluido 4 veces en agua Milli-Q. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia de las muestras a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic® 20D. Los valores proteicos se extrapolaron a partir de la regresión lineal de una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (BSA) entre 0 y 1 mg/mL, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente.

¹¹³ Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.

5.11.3 Experimentos de fijación de [³H]espiperona a cerebro humano postmortem

La influencia de PLG o los peptidomiméticos sobre los estados de afinidad de los receptores dopaminérgicos D₂ se determinó en membranas de caudado humano postmortem mediante ensayos de competición del radioligando antagonista selectivo [³H]-espiperona por el fármaco agonista selectivo (-)NPA.

La unión de [³H]espiperona a los receptores D₂ fue medida por duplicado en alícuotas de 0.55 mL de membranas de caudado humano (~140 µg de proteína) en tampón de incubación (Tris HCl, 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1mM, ácido ascórbico 0.1%; pH 7.6) con ketanserina (50 nM) para prevenir cualquier posible fijación del radioligando a receptores serotoninérgicos (Leysen et al., 1978¹¹⁴; Creese & Snyder, 1978¹¹⁵).

Se realizaron una serie de ensayos previos de competición de [³H]-espiperona (0,25 nM) con (+)-butaclamol con objeto de determinar la concentración adecuada de este fármaco para definir la fijación no específica del radioligando. A partir de estos experimentos, la fijación no específica del radioligando se determinó en presencia de una concentración saturante de (+)-butaclamol (10 µM) que impide la fijación del radioligando a los receptores D₂, definiéndose la fijación específica como la diferencia entre la fijación total y la fijación no específica.

Asimismo, se realizaron una serie de ensayos previos de saturación con [³H]-espiperona en el intervalo de concentraciones de 0.04 a 5 nM, (8 concentraciones) a fin de determinar la concentración de radioligando más adecuada para los futuros ensayos de competición por (-)NPA, así como la posible existencia de más de un lugar de fijación específica. A partir de estos experimentos, se seleccionó una concentración de 0.75 nM de [³H]espiperona para los ensayos de competición por (-)NPA.

De este modo, los estudios de competición de [³H]espiperona por (-)NPA fueron realizados con una concentración constante de [³H]espiperona (0.75 nM) en ausencia (basal) y en presencia de 18 concentraciones diferentes del fármaco competidor (-)NPA (10⁻¹²-3x10⁻⁴ M). Estos ensayos se llevaron a cabo en diferentes condiciones

¹¹⁴ Leysen, JE.; Niemegeers, CJ.; Tollenaere, JP.; Laduron, PM. *Nature*, **1978**, 272 , 168-171.

¹¹⁵ Creese, I.; Zinder, SH. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, 49, 201-202.

experimentales: en ausencia (control) y en presencia de PLG 1 μ M o el correspondiente mimético. Además, estos mismos ensayos se realizaron también en ausencia y presencia del análogo del GTP no hidrolizable Gpp(NH)p (100 μ M). El contenido de los viales de incubación puede esquematizarse como sigue:

350 μ L suspensión de membranas
50 μ L ketanserina
50 μ L tampón de incubación (o Gpp(NH)p)
50 μ L tampón (o PLG o análogo)
40 μ L (-)NPA (o butaclamol)
10 μ L [3 H]espiperona

Las incubaciones se realizaron a 25°C durante 60 minutos con agitación (~60 rpm) en un baño tipo Unitronic 320 OR. Tras la incubación, la reacción se detuvo por dilución rápida con 5 mL de tampón de incubación a 4°C. La separación entre el radioligando libre y unido a la fracción de membranas se realizó mediante filtración en un equipo Brandel[®] 30R (Biochemical Research and Development), sobre vacío (650 mm Hg) a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman[®] GF/C) previamente humedecidos con polietilenimina al 0,5%. Tras ello, los filtros se lavaron dos veces consecutivas con 5 mL de tampón de incubación a 4°C. Todo el proceso de filtrado y lavado se realizó en un tiempo inferior a 15 segundos para evitar la disociación del complejo radioligando-receptor. Una vez finalizado el proceso de filtración, los filtros fueron transferidos a viales que contenían con 4,5 mL de líquido de centelleo (OptiPhase “HiSafe II”) y su radioactividad se cuantificó mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard[®] 2200CA) con una eficiencia de conteo aproximada del 50%.

5.11.4 Experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS a cerebro humano postmortem

La influencia de PLG o sus análogos sobre la estimulación de la fijación del [³⁵S]GTPγS provocada por el agonista de los receptores dopaminérgicos D₂ se determinó en membranas de caudado humano postmortem siguiendo el protocolo general descrito por González-Maeso et al. (2000¹¹⁶) con modificaciones.

La unión específica de [³⁵S]GTPγS (0.5 nM) en ausencia (basal) y en presencia de (-)NPA (10⁻¹⁴–10⁻⁵ M, 16 concentraciones) fue medida en alícuotas de 0.5 mL de membranas de caudado humano conteniendo una cantidad de 30 μg de proteína. Los ensayos se realizaron en un tampón de incubación que contenía Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, GDP 100 mM, pH: 7,4. Las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 30°C con agitación (~60 rpm) en un baño tipo Unitronic 320 OR en ausencia (control) y en presencia de 1 μM de PLG o análogos. El contenido de los viales de incubación puede esquematizarse como sigue:

320 μL suspensión de membranas
60 μL GDP
30 μL tampón de incubación (o GTPγS)
50 μL tampón (o PLG o análogo)
30 μL (-)NPA
10 μL [³⁵S]GTPγS

Tras la incubación, la reacción se detuvo por dilución rápida con 5 mL de tampón de incubación a 4°C. La separación entre el radioligando unido a la fracción de membranas y libre se realizó mediante una rápida filtración en un equipo Brandel M-24 (Biomedical Research and Development) sobre vacío (650 mmHg) a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C previamente humedecidos con tampón a 4°C. Estos filtros fueron lavados dos veces más con 5 mL de tampón mantenido a 4°C. Todo el

¹¹⁶ González-Maeso, J.; Rodríguez-Puertas, R.; Gabilondo, A.M.; Meana, J. J. *Eur J Pharmacol*, **2000**, 390, 25-36.

proceso de filtrado y lavado se realizó en un tiempo inferior a 15 segundos. Una vez finalizado el proceso de filtración, los filtros fueron transferidos a viales que contenían 4.5 mL de líquido de centelleo (OptiPhase “HiSafe II”). La radioactividad presente en los filtros se cuantificó mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard 2200CA) con una eficiencia de conteo superior al 95%. La fijación no específica del radioligando fue determinada en presencia de 10 μ M GTP γ S no radiactivo. Esta fijación fue restada de la fijación total con el fin de determinar la fijación específica de [35 S]GTP γ S a la fracción de membranas de cerebro humano postmortem.

5.11.5 *Análisis matemático de los datos experimentales*

5.11.5.1 *Análisis matemático de los ensayos de saturación del radioligando [3 H]espiperona*

Los datos obtenidos de los experimentos de saturación con el radioligando [3 H]espiperona fueron analizados mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism (version 4.01). Los datos fueron ajustados a la *ecuación 1* en la que B representa la fijación específica para cada determinada concentración de radioligando, Bmax la densidad máxima de lugares de fijación específica, Kd la constante aparente de disociación y [L] la concentración total de radioligando:

$$B = \sum_{i=1}^{i=2} [(B_{\max_i} \times [L]) / (Kd_i + [L])]$$

(Ecuación 1)

El análisis de los datos se realizó ajustando los datos a un modelo monofásico (1 lugar de fijación, $i=1$) y a un modelo bifásico (2 lugares de fijación, $i=2$). La elección del mejor ajuste entre ambos modelos se realizó estadísticamente a través de un test F,

el cual contrasta la bondad de ajuste de ambos modelos a partir del principio de suma de cuadrados (Munson y Rodbard, 1980¹¹⁷),

$$F = [(SS_1 - SS_2) / (df_1 - g_1)] / (SS_2 / df_2)$$

(Ecuación 2)

donde SS_1 y df_1 corresponden a la suma de cuadrados y los grados de libertad del ajuste monofásico y SS_2 y df_2 los del ajuste bifásico (ecuación 2). Es decir, sólo acepta el modelo de ajuste más complejo (bifásico) en el caso de que suponga una mejora significativa ($p < 0.05$) en la bondad de ajuste de los datos experimentales a la ecuación (DeLean et al., 1978¹¹⁸; Motulsky and Ransnas, 1987¹¹⁹).

5.11.5.2 Análisis matemático de los ensayos de competición del radioligando [³H]espiperona por (-)NPA

Los datos obtenidos de los experimentos de competición de la fijación del radioligando [³H]espiperona fueron analizados mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism (version 4.01). Los datos fueron ajustados a la ecuación 3, en la que B representa la fijación específica del radioligando en presencia de una concentración fija de fármaco competidor no marcado ((+)-butaclamol o (-)NPA) [I], B_0 la fijación específica del radioligando en ausencia de fármaco competidor ([I]=0). “Fraction” es el porcentaje de fijación específica correspondiente a cada lugar de fijación. IC_{50i} es la concentración del fármaco competidor que desplaza el 50% de la fijación específica del radioligando correspondiente a cada lugar de fijación:

¹¹⁷ Munson, P. J. & Rodbard, D. *Anal Biochem*, **1980**, 107, 220-239.

¹¹⁸ De Lean, A.; Stadel, J. M. & Lefkowitz, R. J. *J Biol Chem*, **1980**, 255, 7108-7117.

¹¹⁹ Motulsky, H. J. & Ransnas, L. A. *FASEB J*, **1987**, 1, 365-374

$$B = \sum_{i=1}^{i=2} B_0 * \text{Fraction}_i / (1 + 10^{(\log[I] - \log IC_{50i})}) \quad (\text{Ecuación 3})$$

A partir del parámetro IC_{50} y teniendo en cuenta la constante de disociación del radioligando (K_d , obtenida a partir de los experimentos previos de saturación), el programa calcula automáticamente la constante de inhibición del fármaco competidor (K_i), la cual indica la afinidad del mismo por el lugar de fijación correspondiente, mediante la ecuación descrita por Cheng y Prusoff (1973¹²⁰):

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([\text{radioligando}] / K_d)) \quad (\text{Ecuación 4})$$

Al igual que en el caso de los ensayos de saturación, el análisis de los datos se realizó ajustando los datos a un modelo monofásico (1 lugar de fijación, $i=1$) y a un modelo bifásico (2 lugares de fijación, $i=2$). La elección el mejor ajuste entre ambos modelos se realizó estadísticamente a través de un test F, siendo el modelo más complejo aceptado sólo en el caso de que suponga una mejora significativa ($p < 0.05$) en la bondad de ajuste de los datos experimentales.

5.11.5.3 Análisis matemático de los ensayo de fijación de [35 S]GTP γ S estimulada por (-)NPA

Las estimulación de la fijación de [35 S]GTP γ S por (-)NPA de manera concentración-dependiente se determinó calculando el porcentaje de estimulación sobre el nivel basal de fijación ((fijación estimulada*100/ fijación basal)-100).

¹²⁰ Cheng Y.; Prusoff, WH. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.

Los parámetros farmacológicos de la estimulación producida por (-)NPA en la fijación de [³⁵S]GTPγS se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a curvas concentración-respuesta analizadas por regresión no lineal con el programa GraphPad Prism (*version 4.01*). Los datos fueron ajustados a la siguiente ecuación sigmoidal:

$$E = E_{\text{max}} / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

(Ecuación 5)

, donde E corresponde a la fijación específica de [³⁵S]GTPγS en presencia de la concentración X del agonista (-)NPA, E_{max} corresponde al efecto máximo del fármaco, EC₅₀ corresponde a la potencia del fármaco, descrita como la concentración de fármaco necesaria para obtener la mitad del efecto máximo y “HillSlope” corresponde al coeficiente de Hill, el cual describe la pendiente de la curva.

5.11.6 *Análisis estadístico de los resultados*

Los parámetros obtenidos en los ensayos de fijación de los radioligandos [³H]espiperona y [³⁵S]GTPγS fueron expresados como los valores del mejor ajuste obtenidos en el análisis no lineal de los datos experimentales ± el error standard suministrado por el propio programa GraphPad Prism, estimado a partir de la bondad de ajuste de los datos a la ecuación propuesta. Estos errores estándar no fueron utilizados para posteriores análisis estadísticos.

La comparación de las curvas de fijación de radioligandos ([³H]espiperona y [³⁵S]GTPγS) correspondientes a los grupos de datos obtenidos en las diferentes condiciones experimentales (ausencia (control) vs presencia de PLG o análogo), se realizó a partir de la valoración estadística de la bondad de ajuste a modelos de ecuaciones progresivamente más complejos, basada en el principio de “suma de cuadrados”, aplicando un test F.

Así, los grupos de datos obtenidos en cada condición experimental se analizaron primero separadamente (modelo de ecuación más compleja, con ajuste a dos curvas que no comparten parámetros) obteniéndose un valor total de la suma de cuadrados y de

grados de libertad igual a la suma de los valores obtenidos para cada ajuste individual. Posteriormente, los datos obtenidos en ambas condiciones experimentales se volvieron a analizar obligándolos a compartir uno o más parámetros (ej. EC_{50} y/o E_{max}) (modelo de ecuación más sencillo, con más grados de libertad porque tiene menos parámetros), obteniéndose nuevas curvas y nuevos valores de suma de cuadrados y grados de libertad esas condiciones. El análisis que permitió compartir uno o más parámetros (modelo de ecuación más sencillo, con más grados de libertad) sin incrementar significativamente la suma de cuadrados fue tomado como válido^{118,119} (ecuación 2). La significancia estadística de la mejora en el ajuste de los datos se determinó mediante un test F:

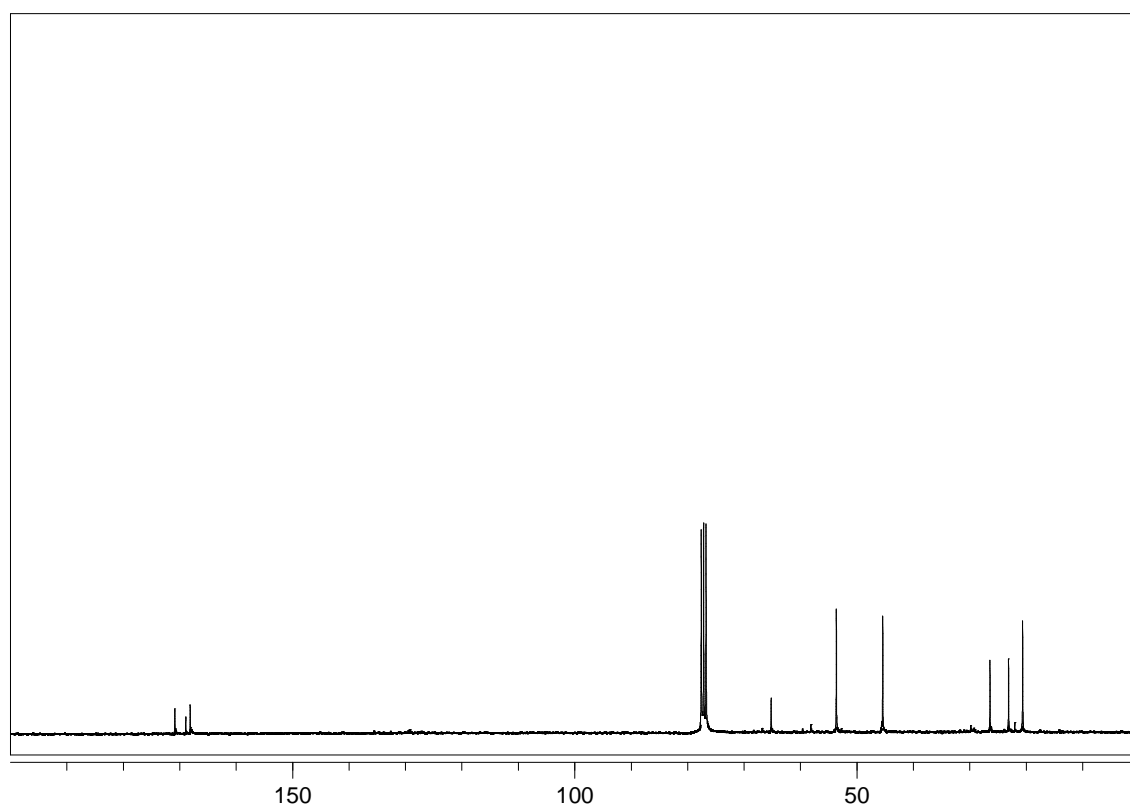
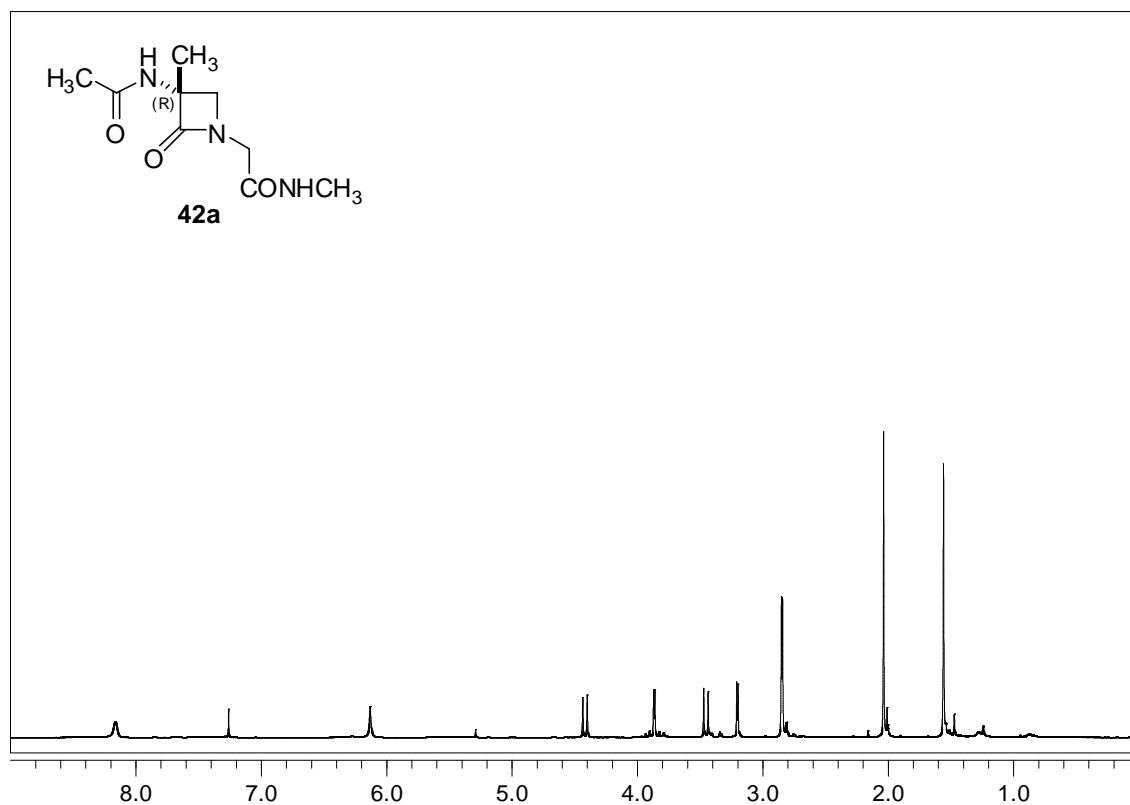
$$F[(df_1-df_2), df_2]=((SS_1-SS_2)/(df_1-df_2))/(SS_2/df_2)$$

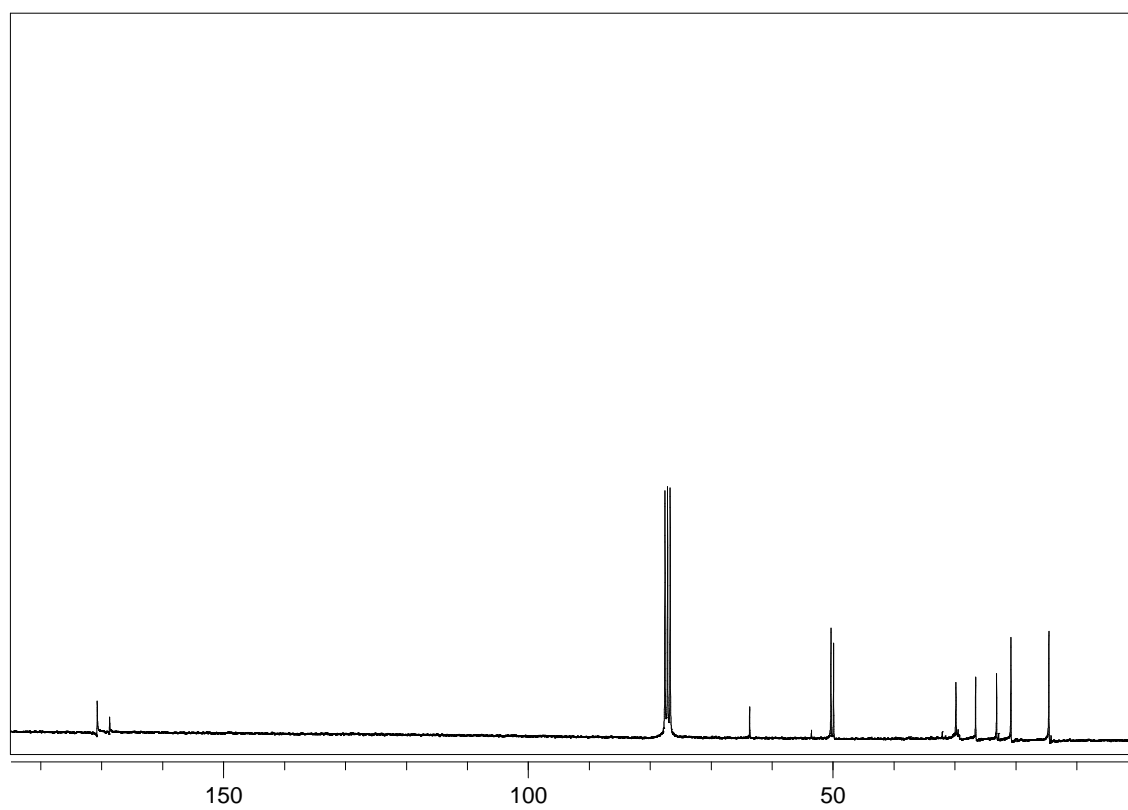
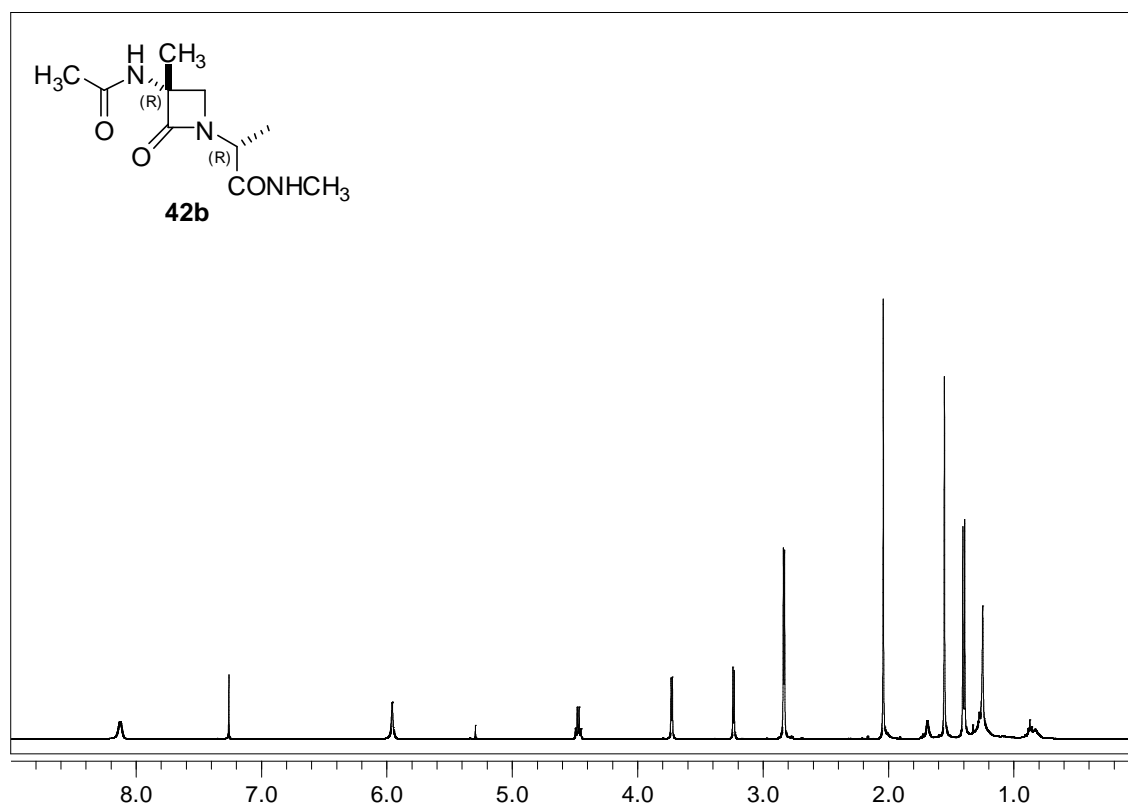
(Ecuación 6)

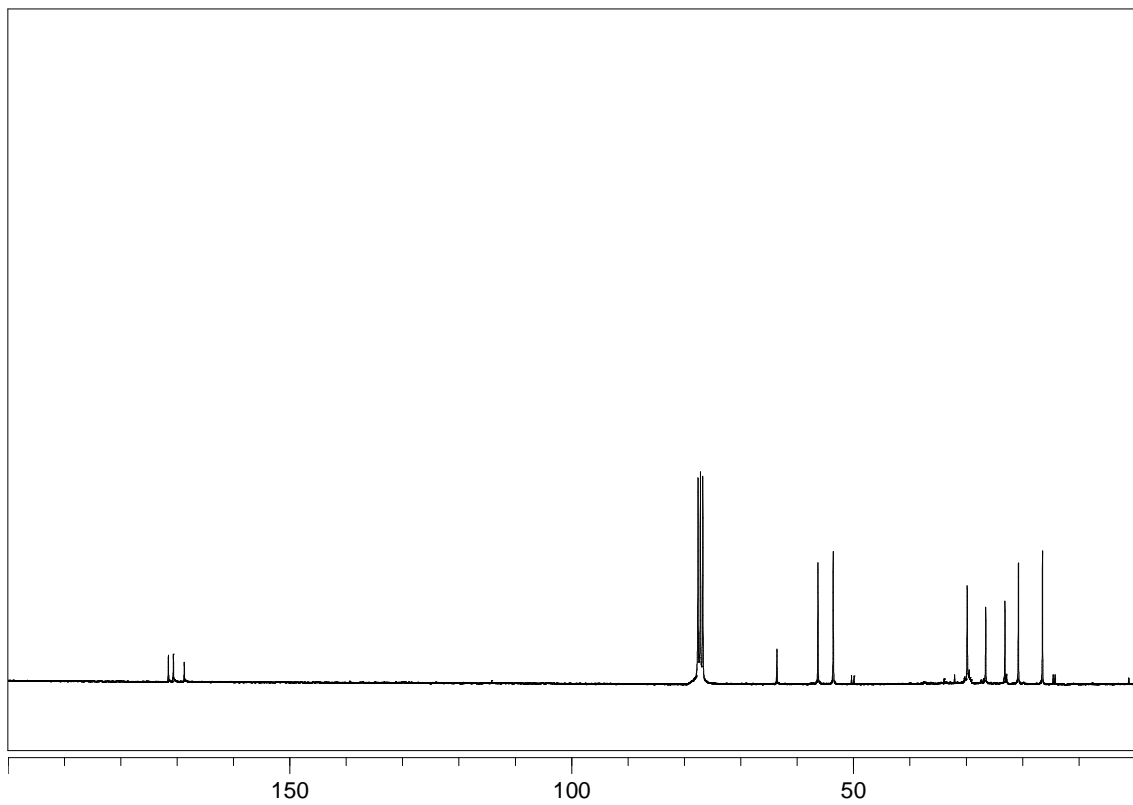
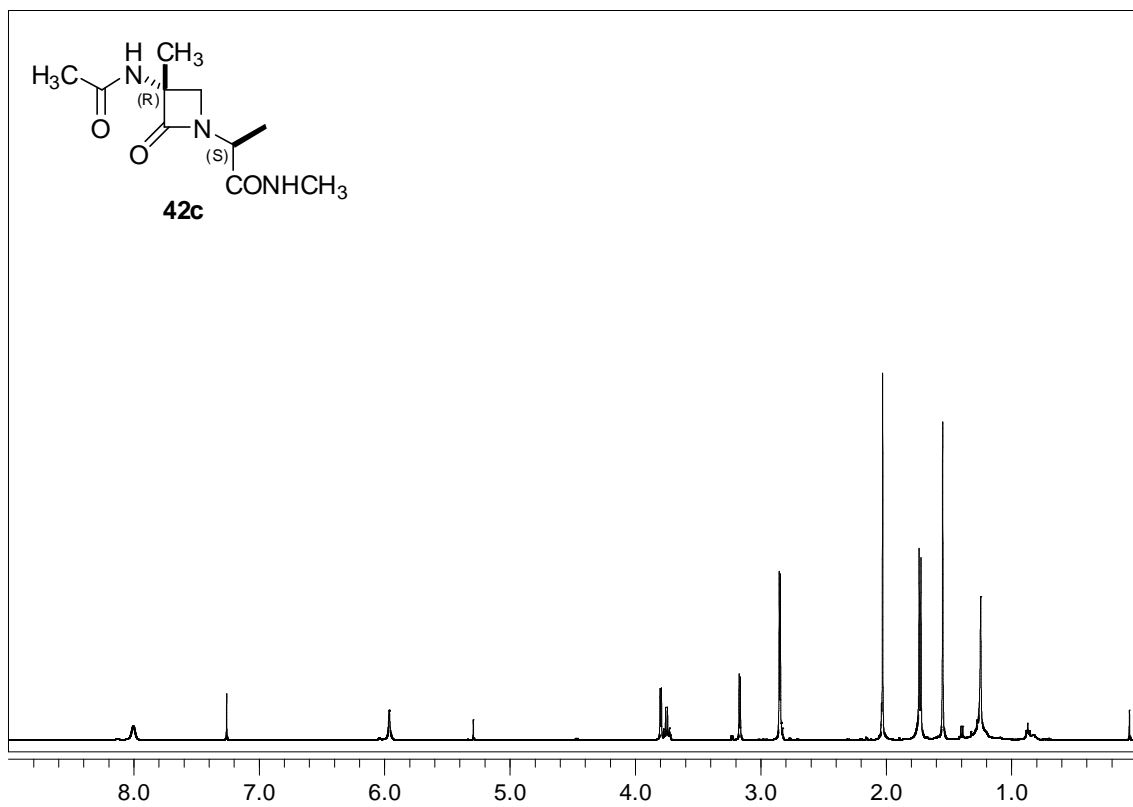
donde SS_1 y df_1 corresponden a la suma de cuadrados y los grados de libertad del ajuste al modelo más sencillo (con parámetros compartidos) y SS_2 y df_2 a los del ajuste al modelo más complejo (sin compartir parámetros). Es decir, sólo en el caso de que el análisis independiente de las series de datos supusiera una mejora significativa en el ajuste de los valores experimentales a las curvas obtenidas puede afirmarse que las curvas definidas por las series de datos son diferentes. En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo un nivel de significancia de $p < 0.05$.

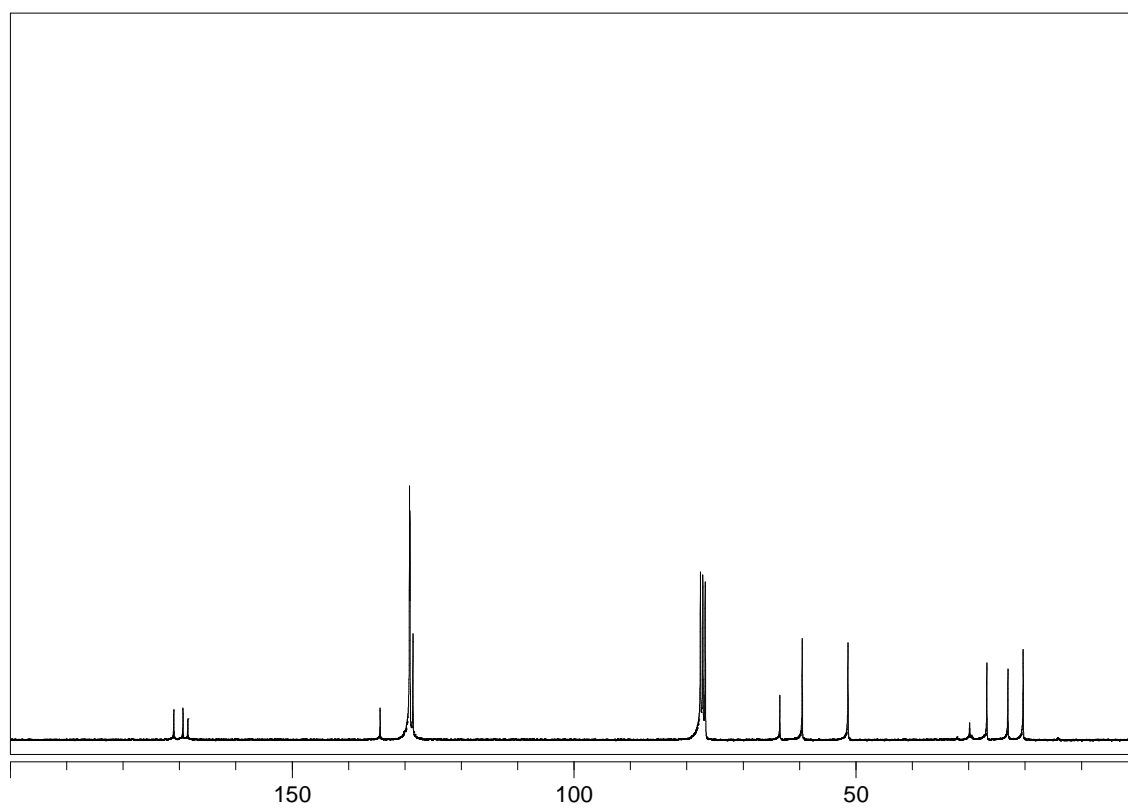
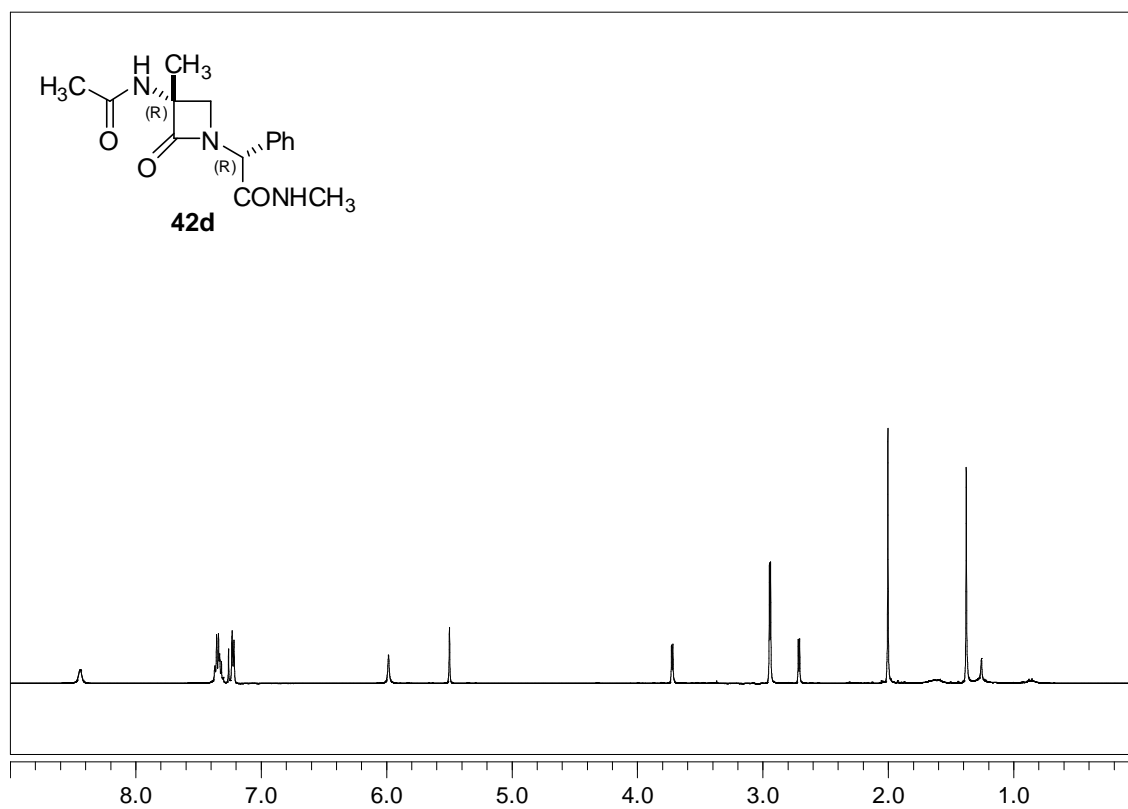
ANEXOS

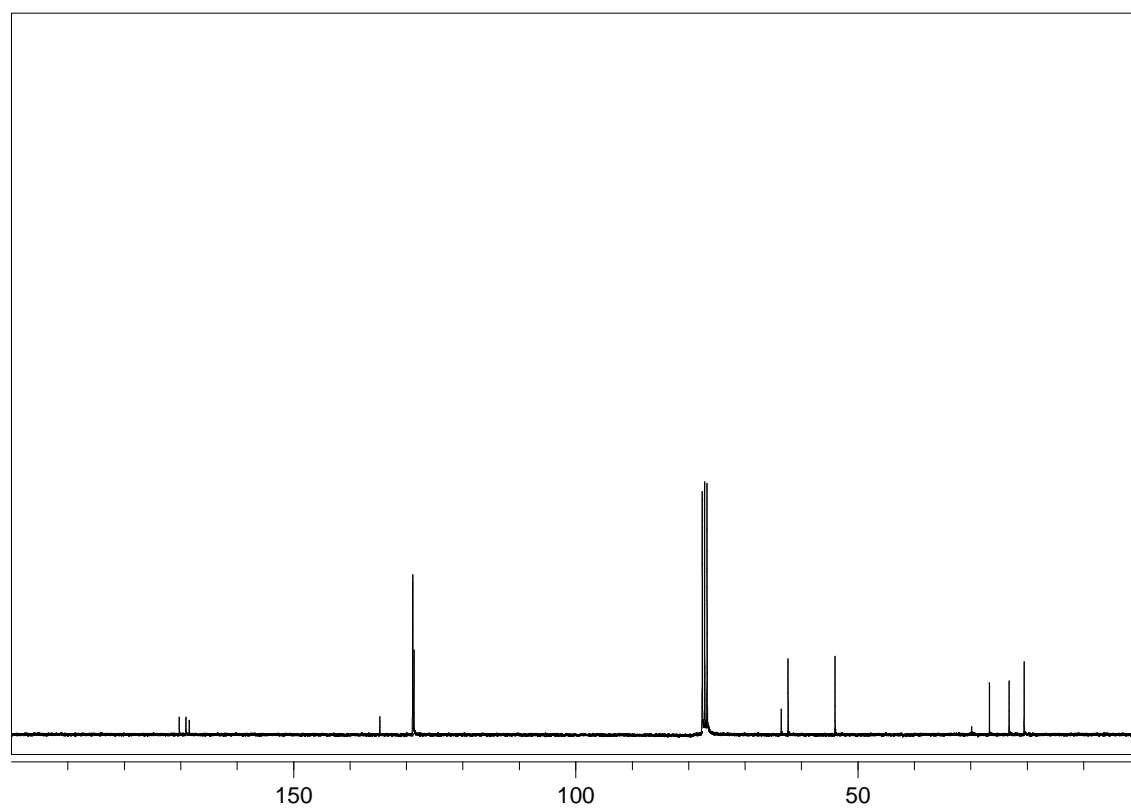
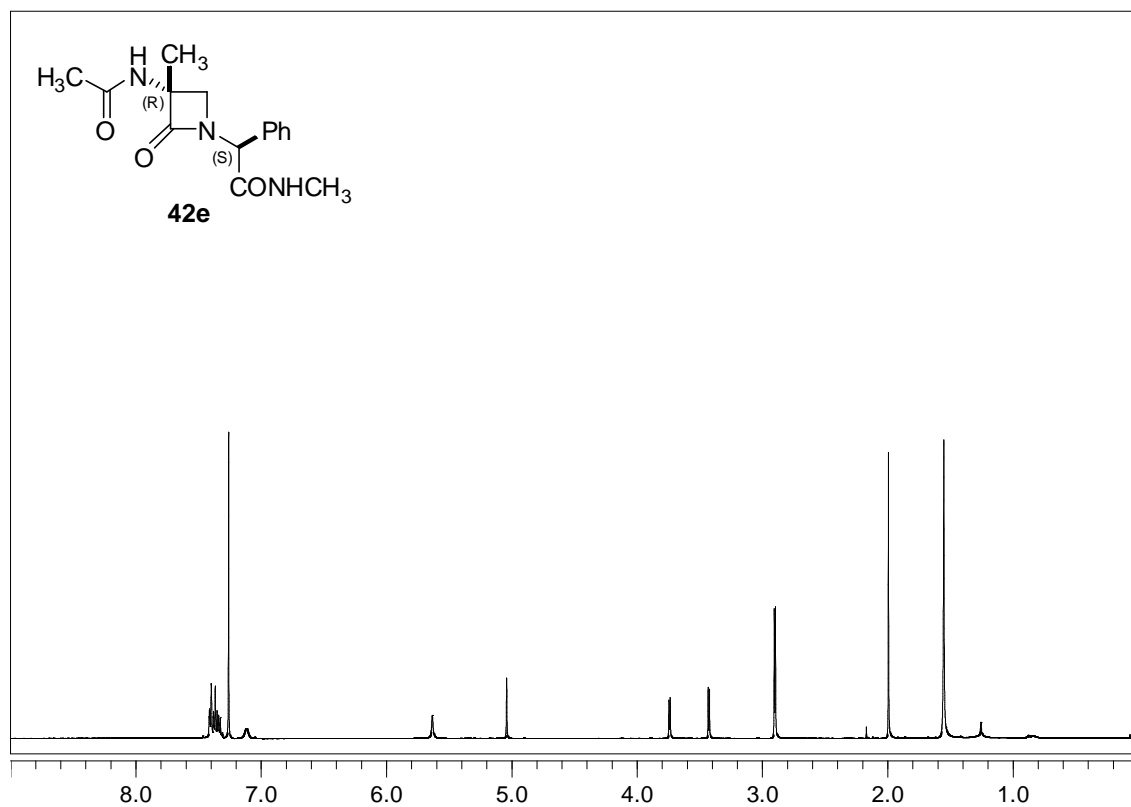
ANEXO A: ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

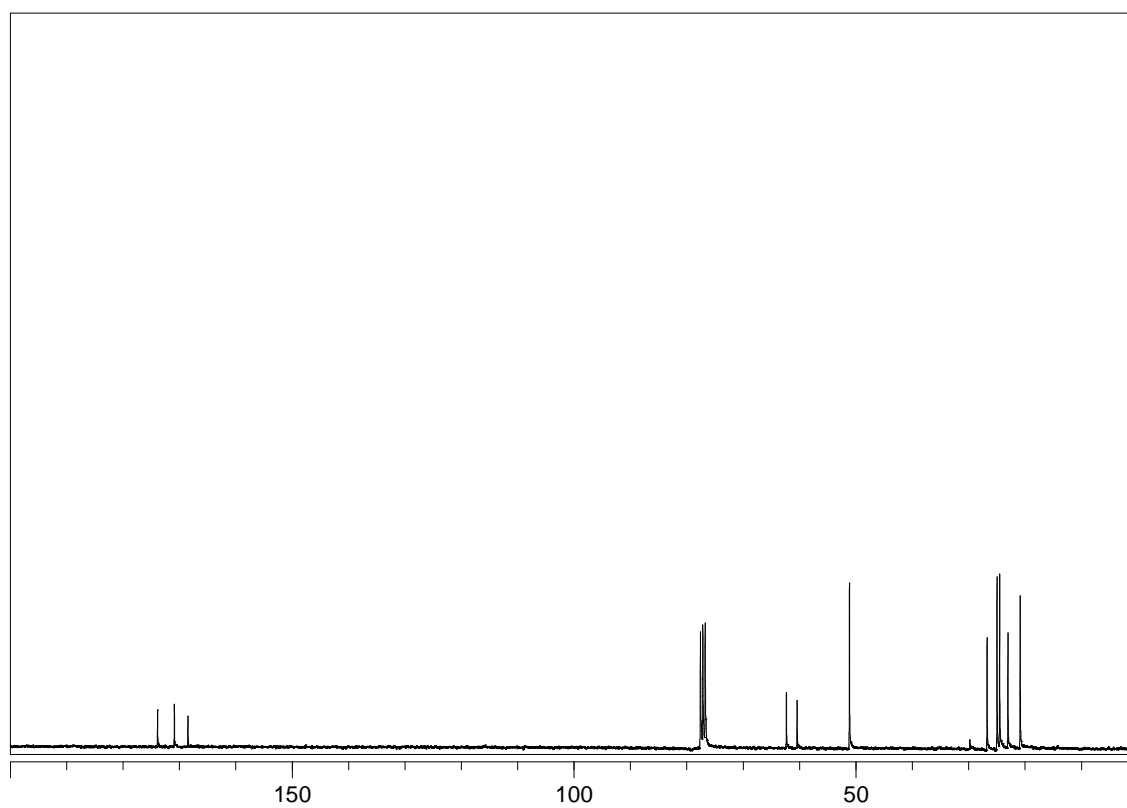
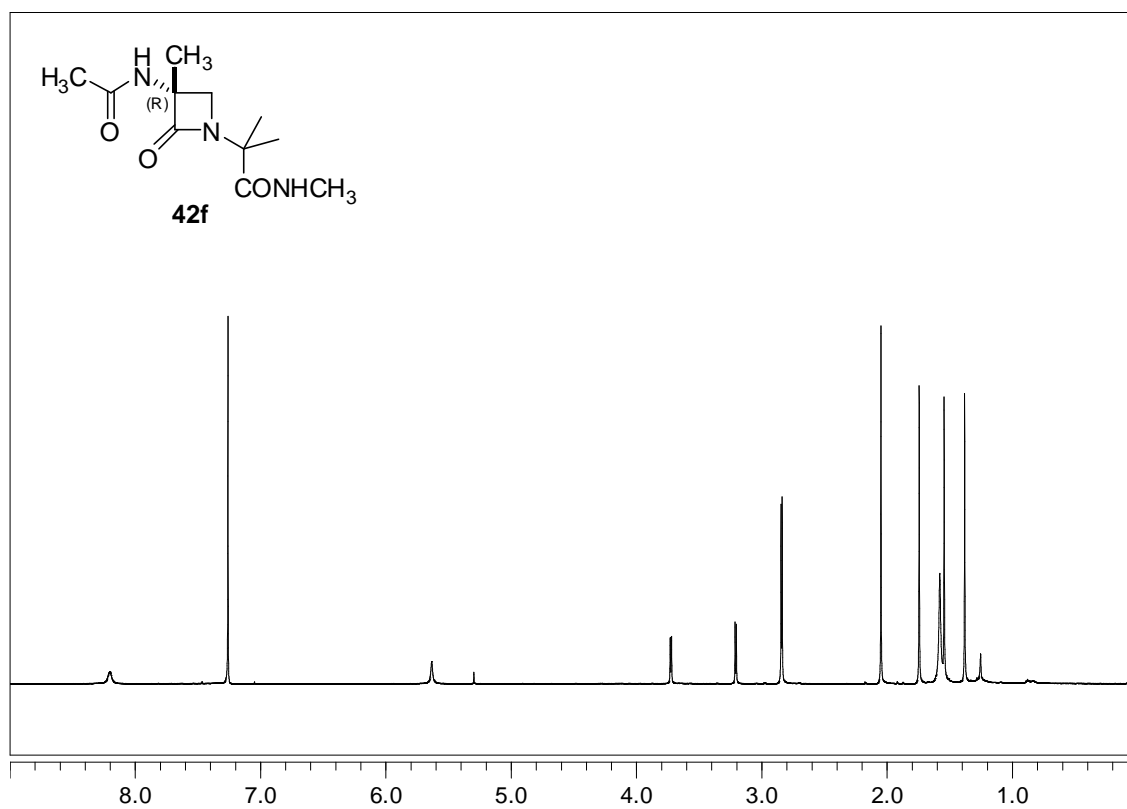


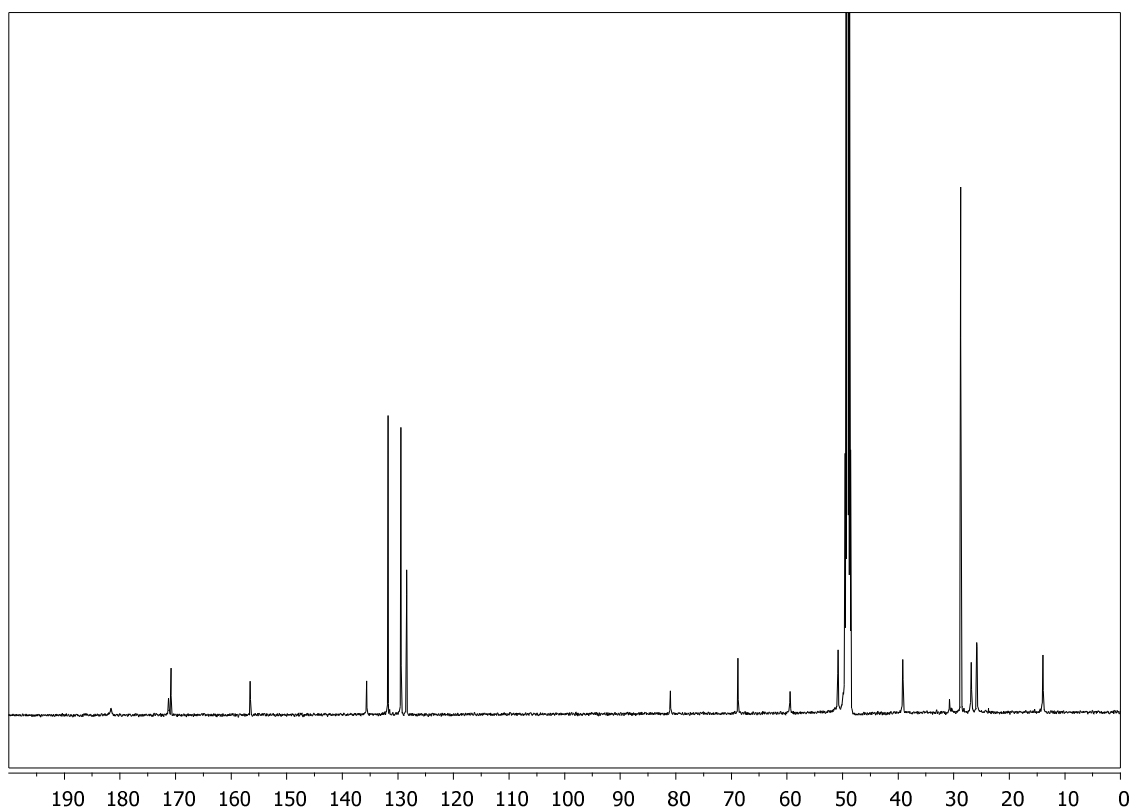
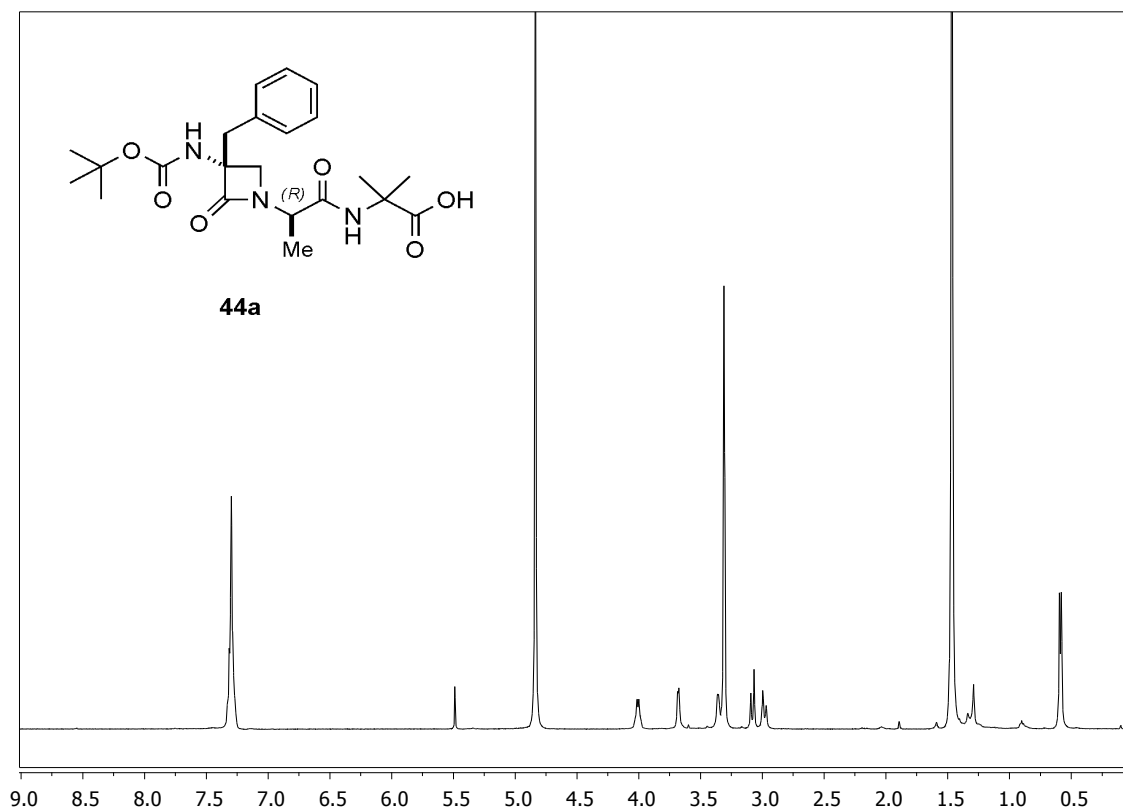


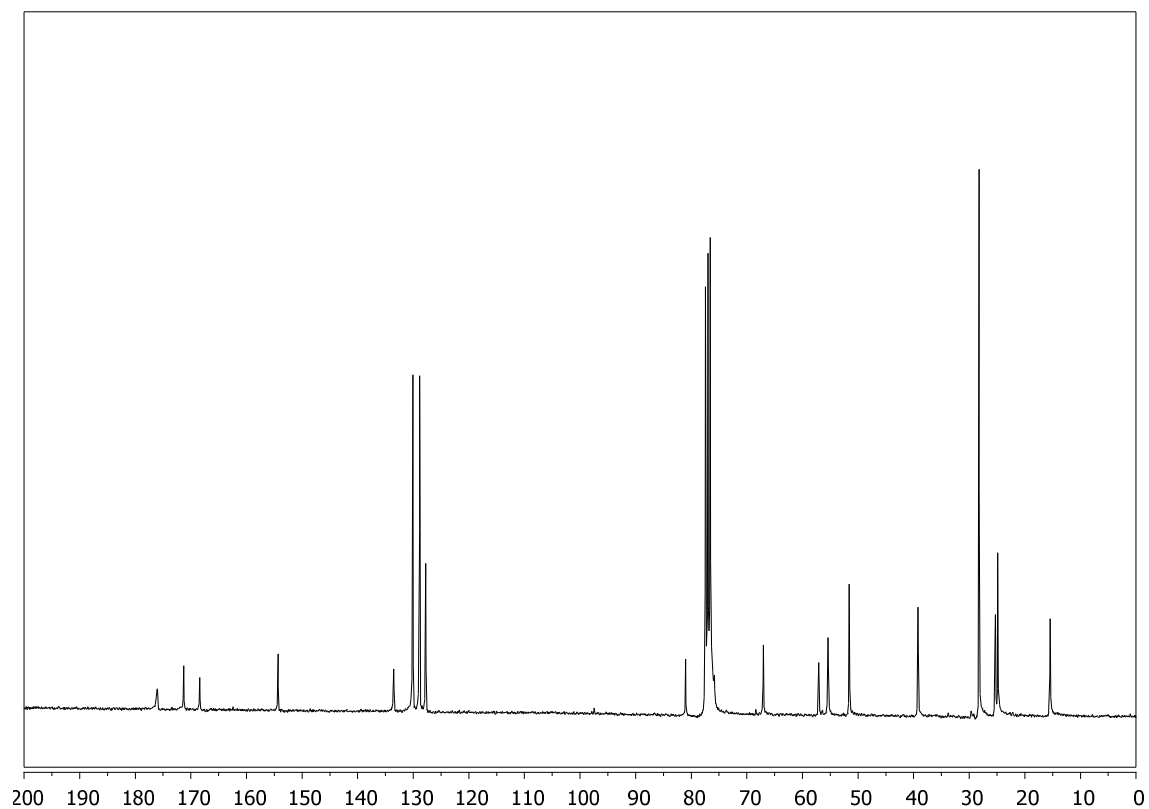
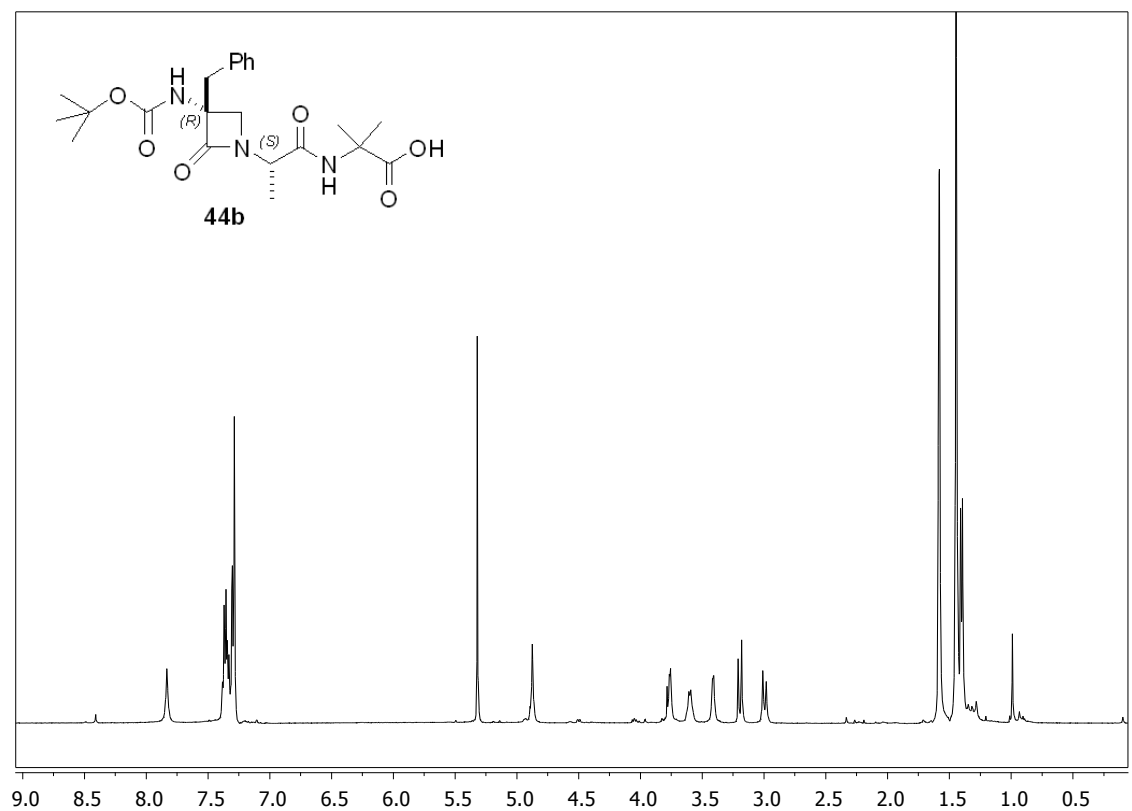


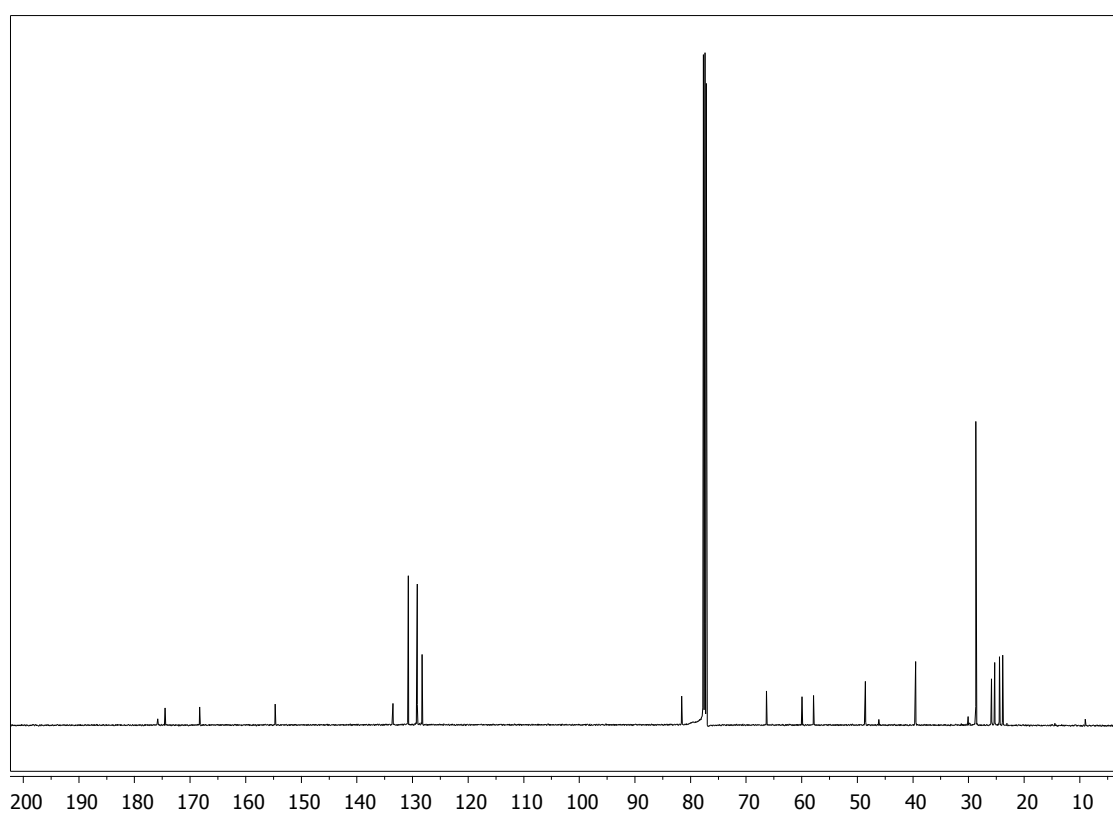
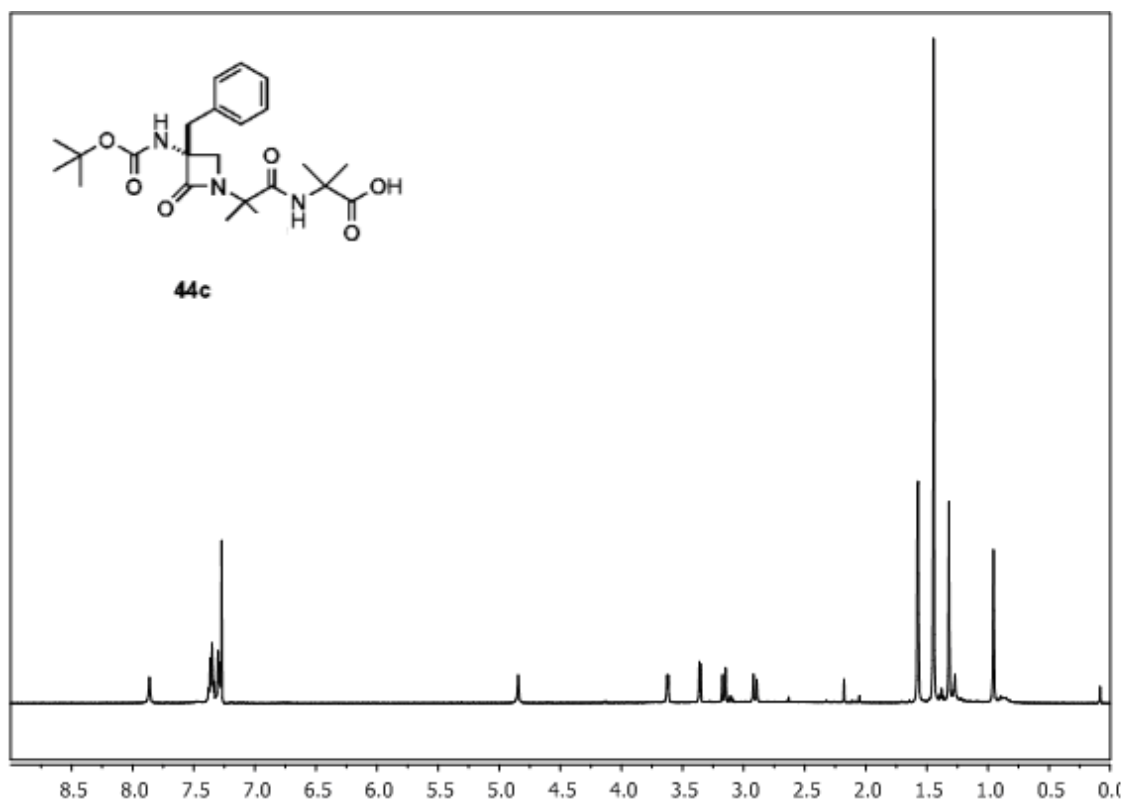


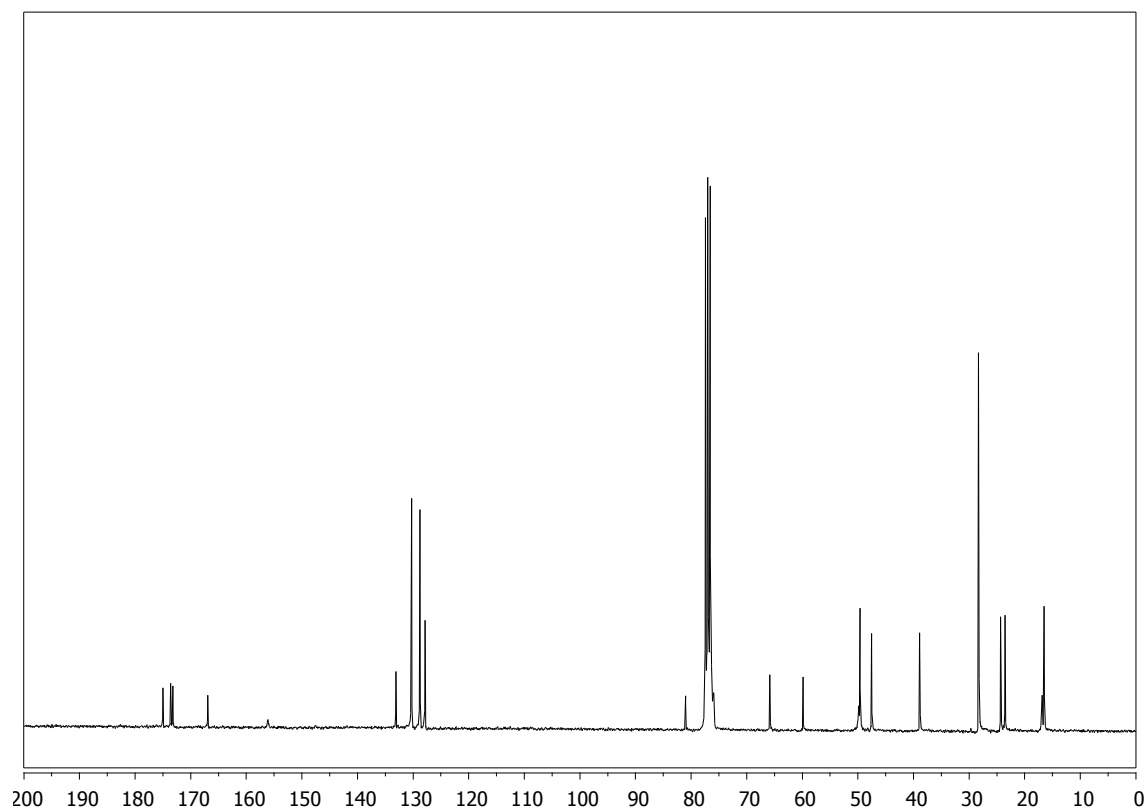
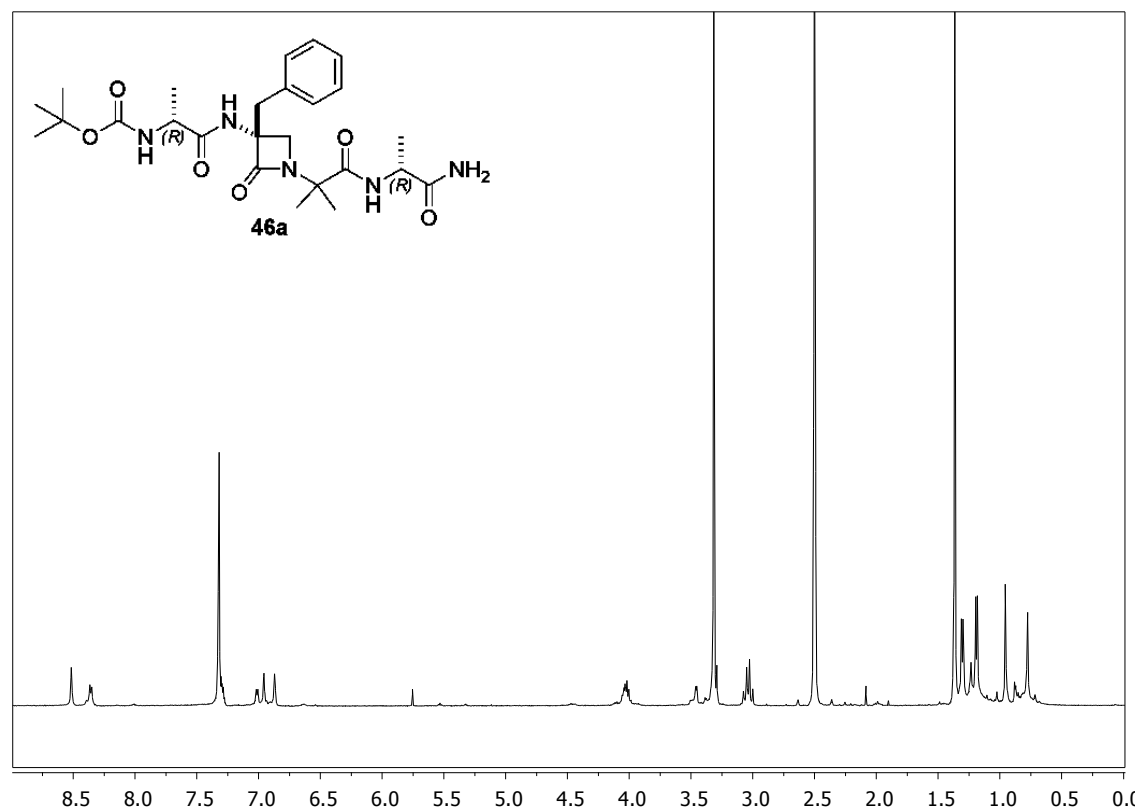


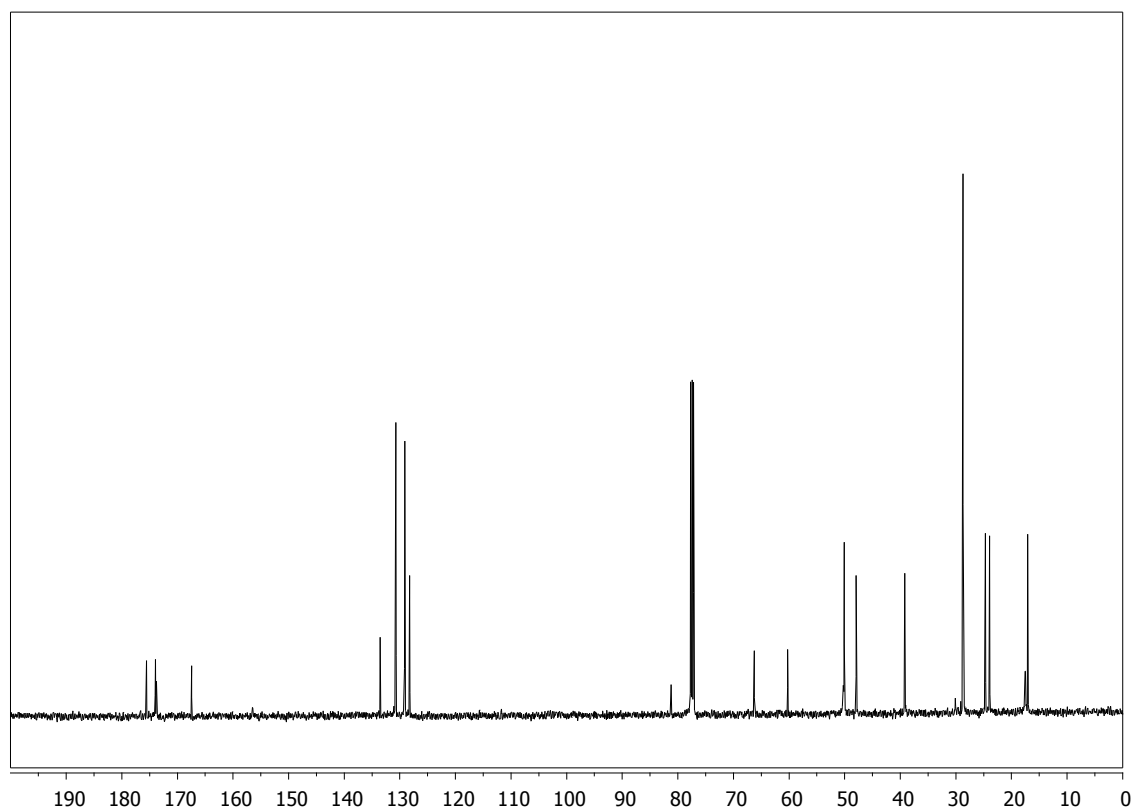
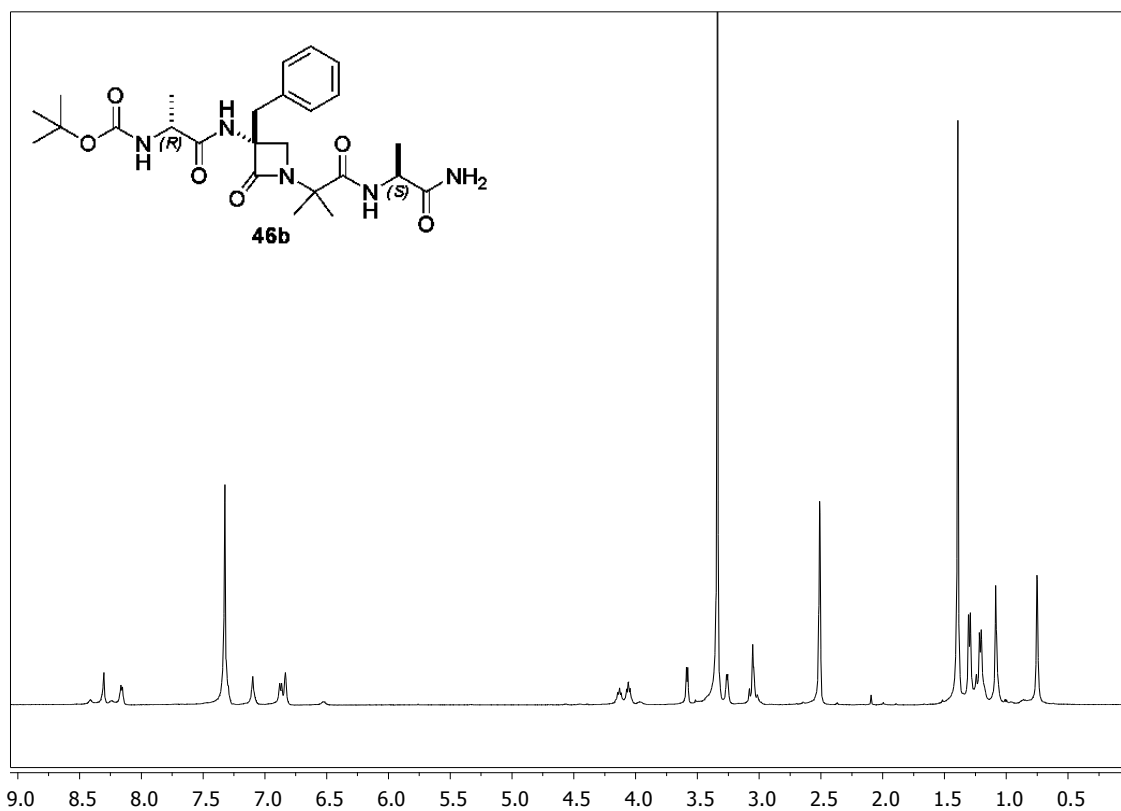


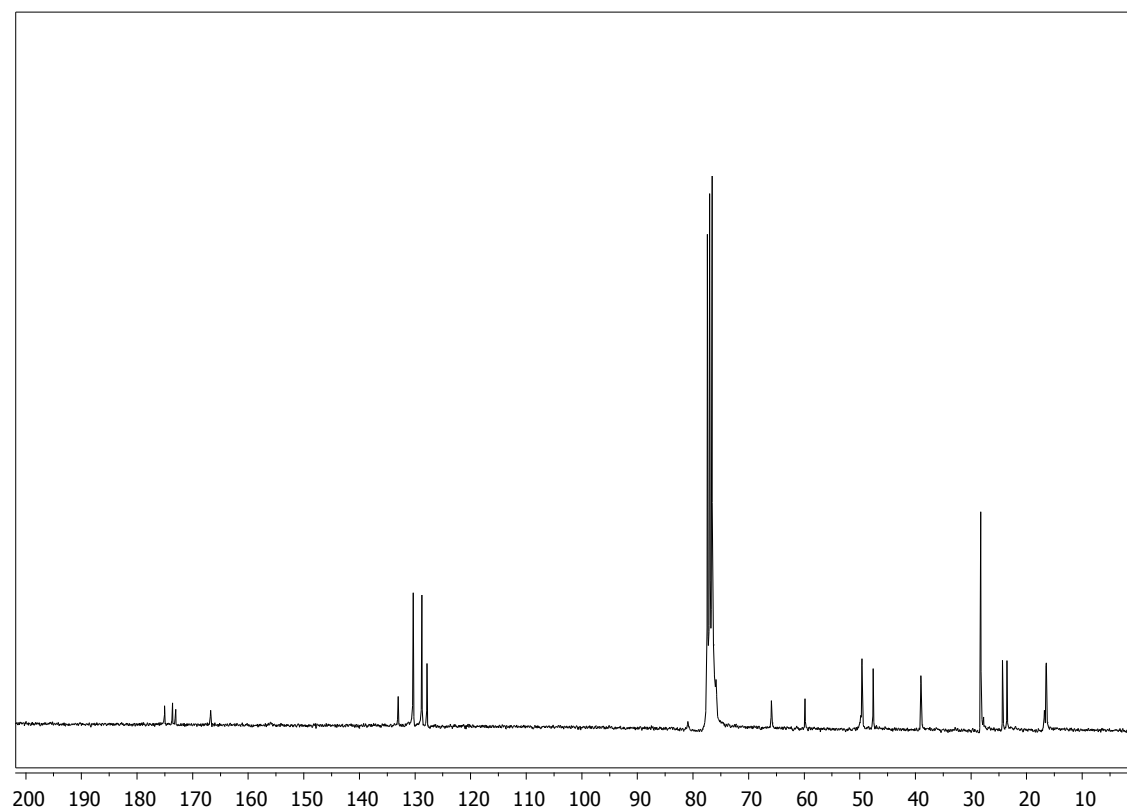
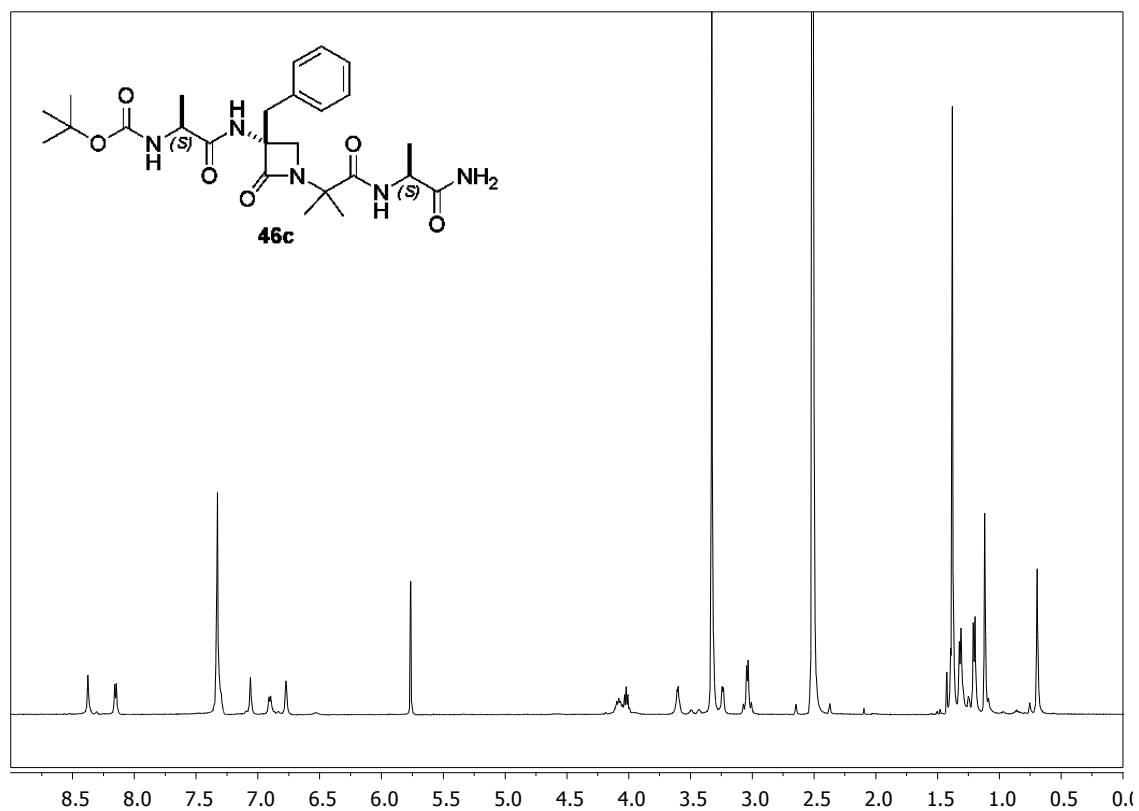


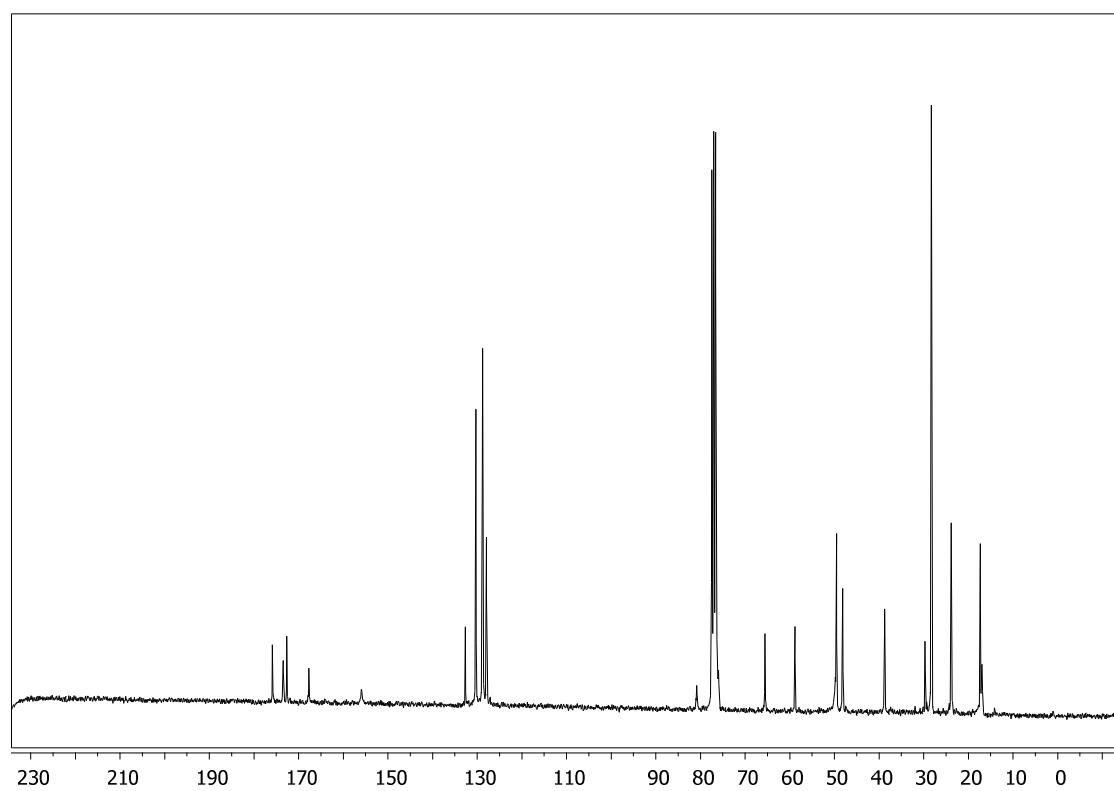
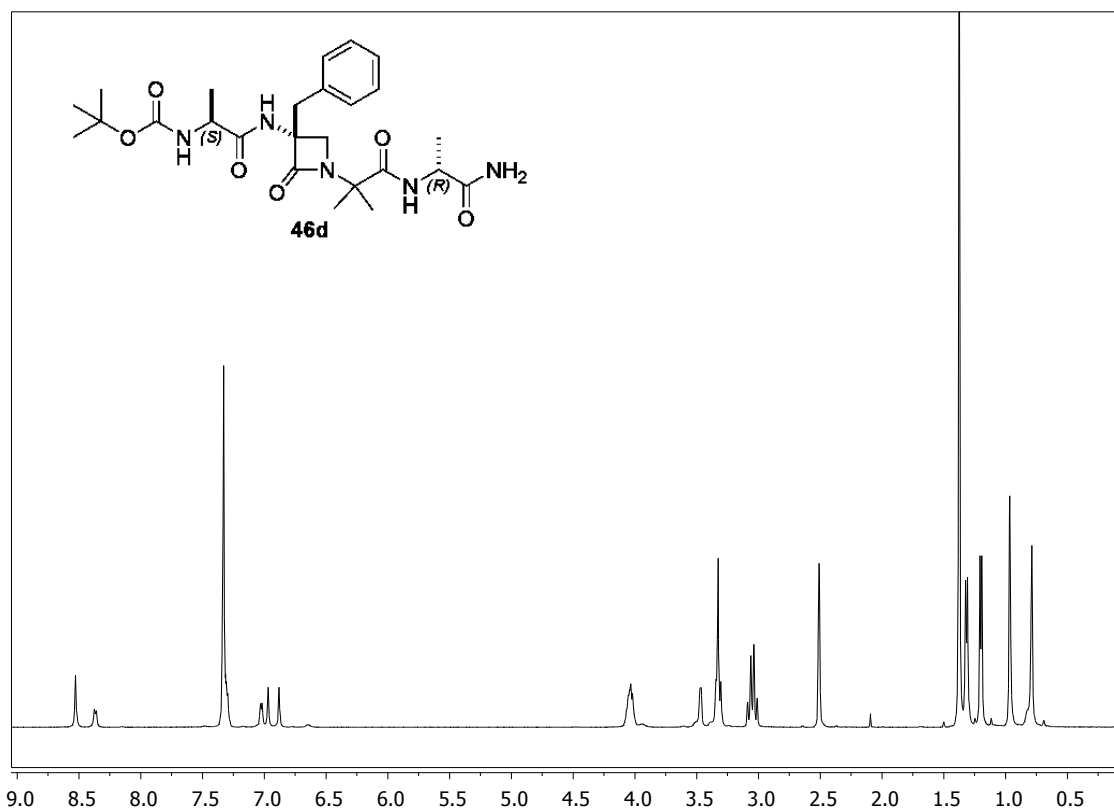


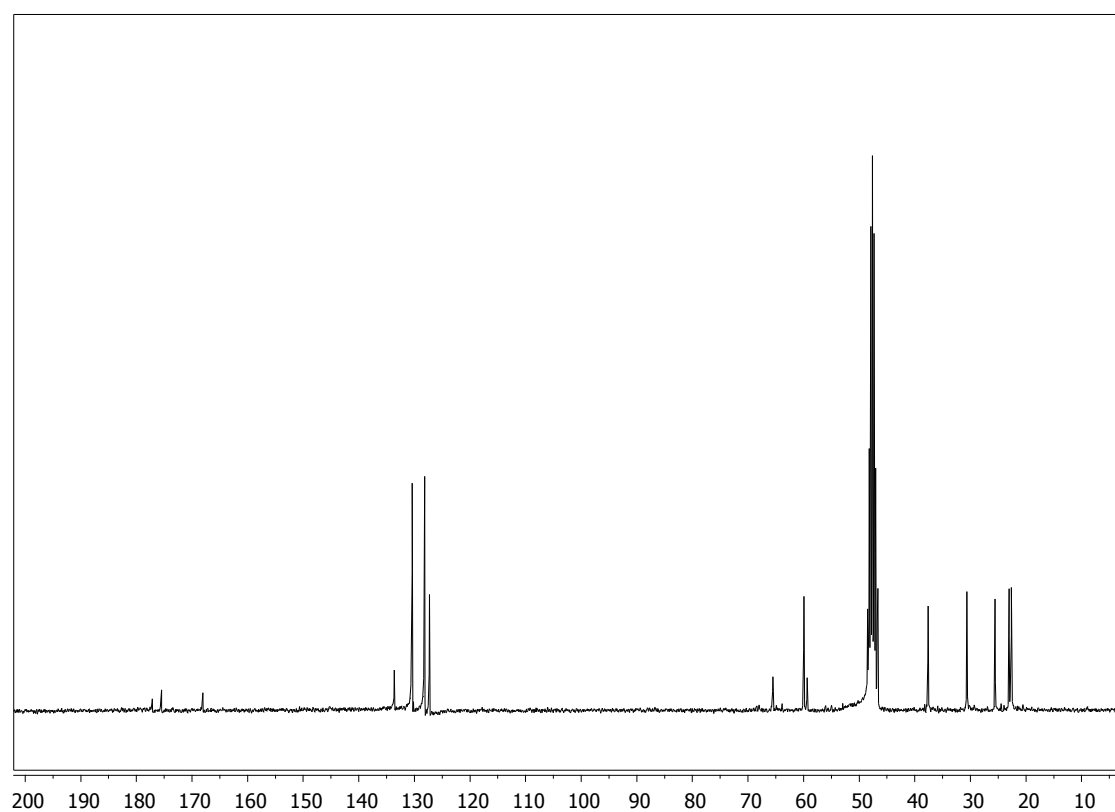
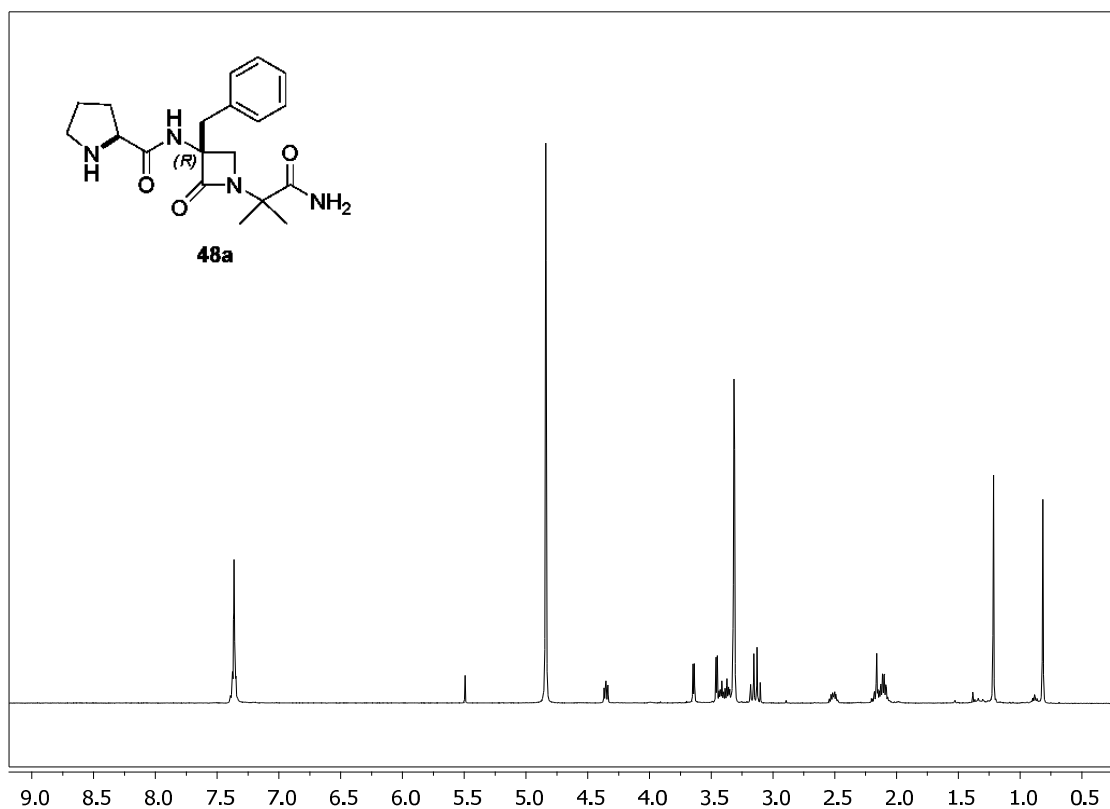


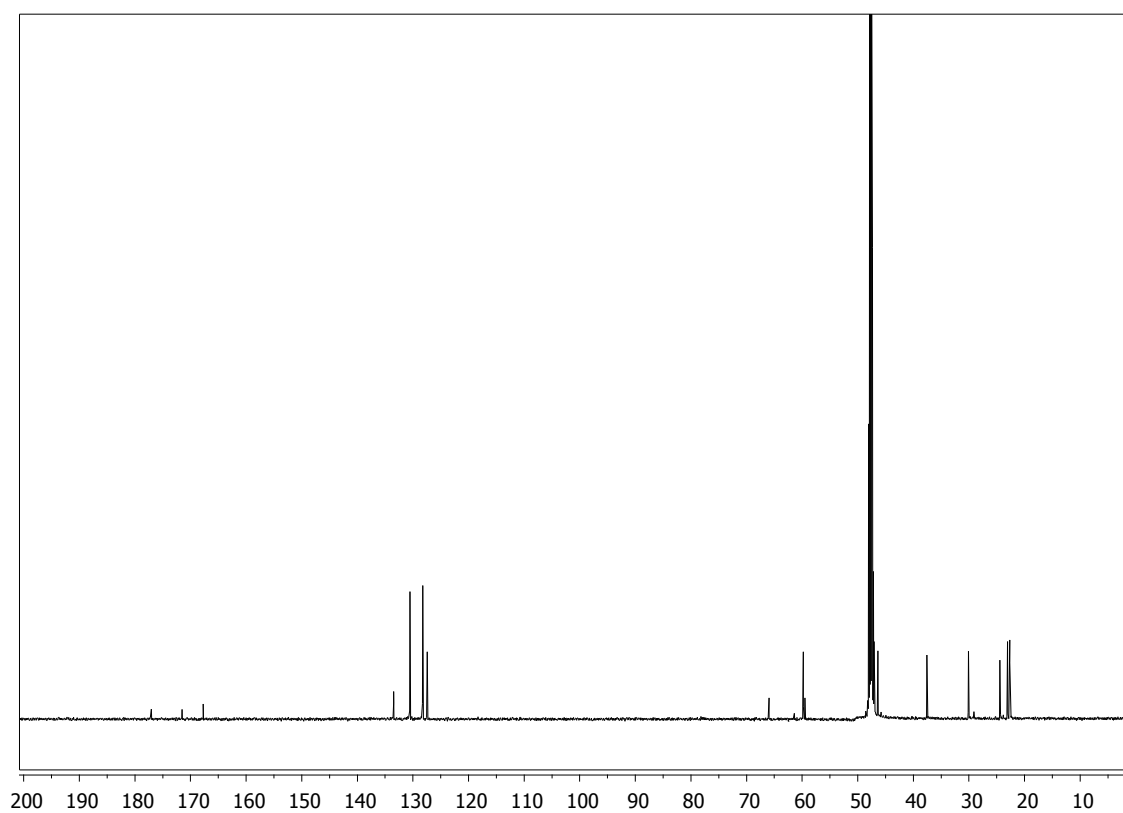
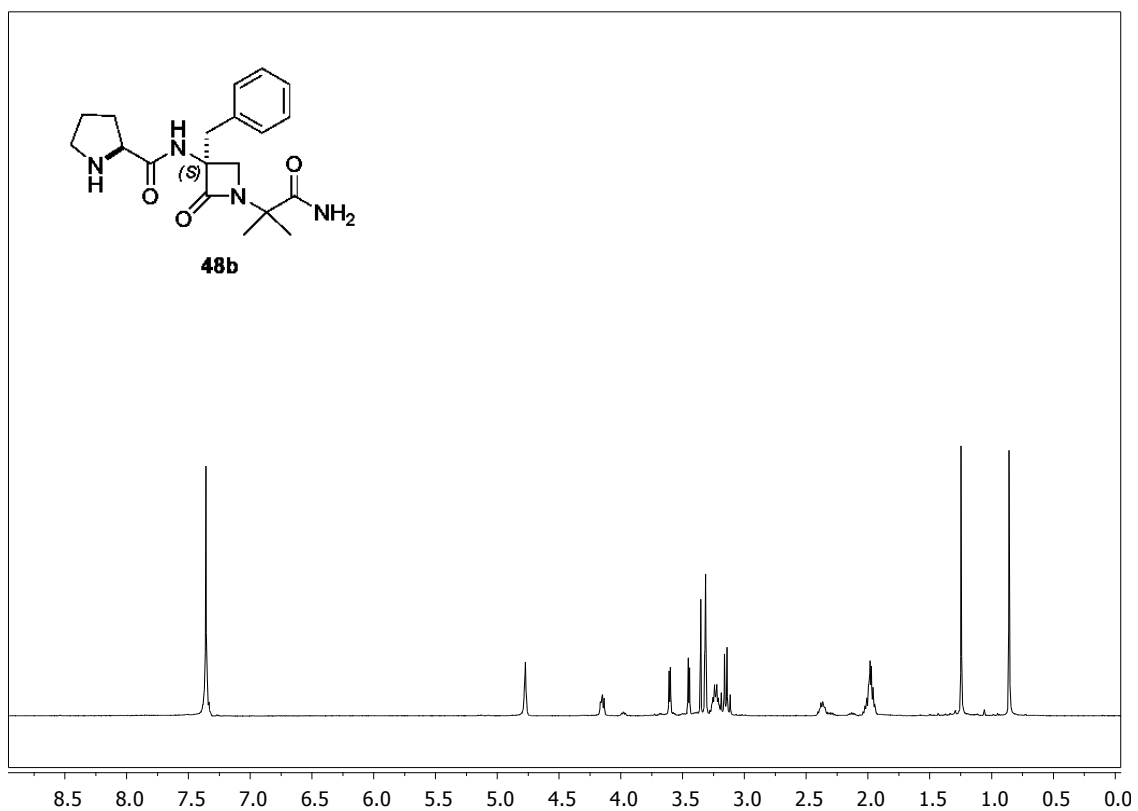


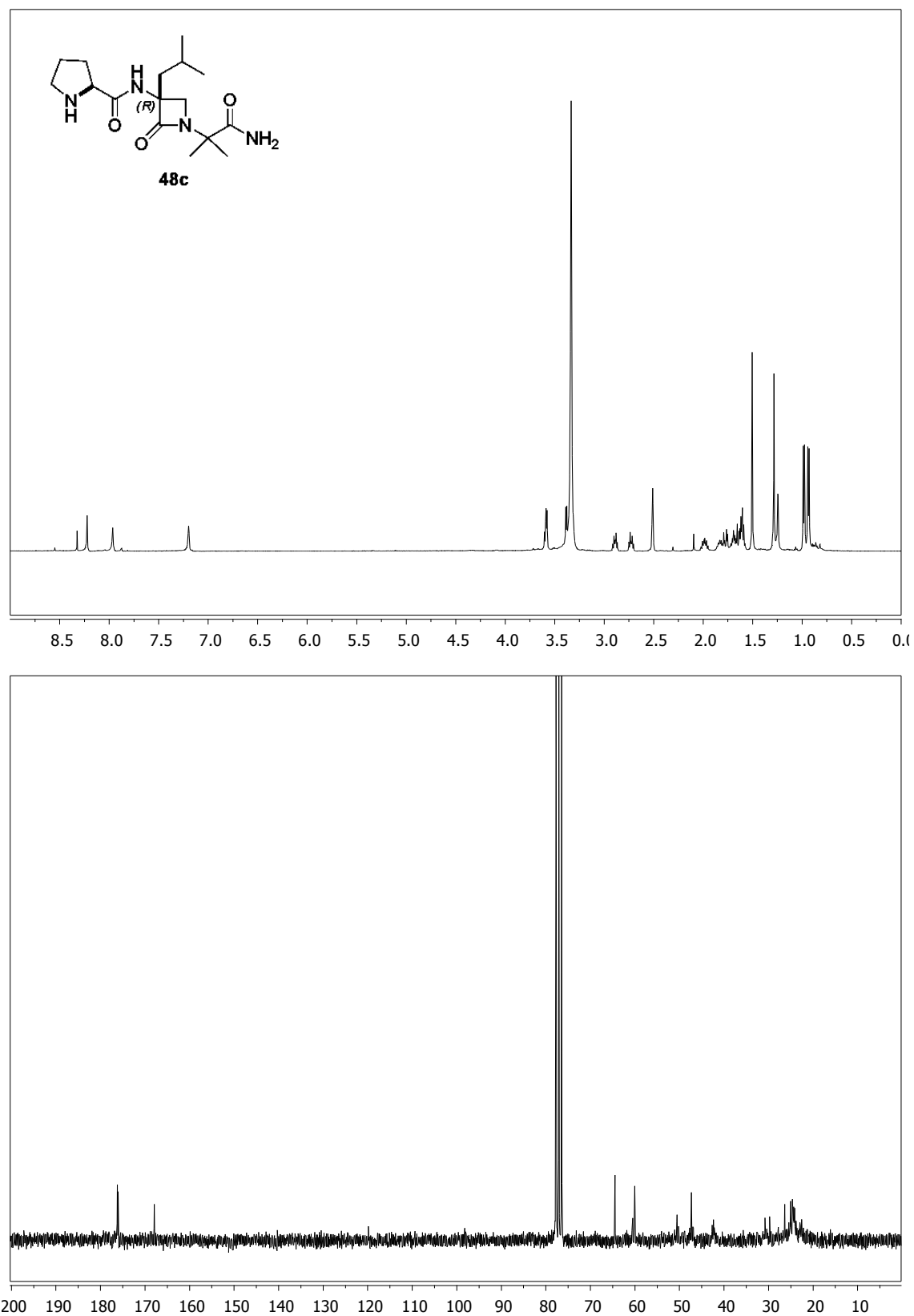


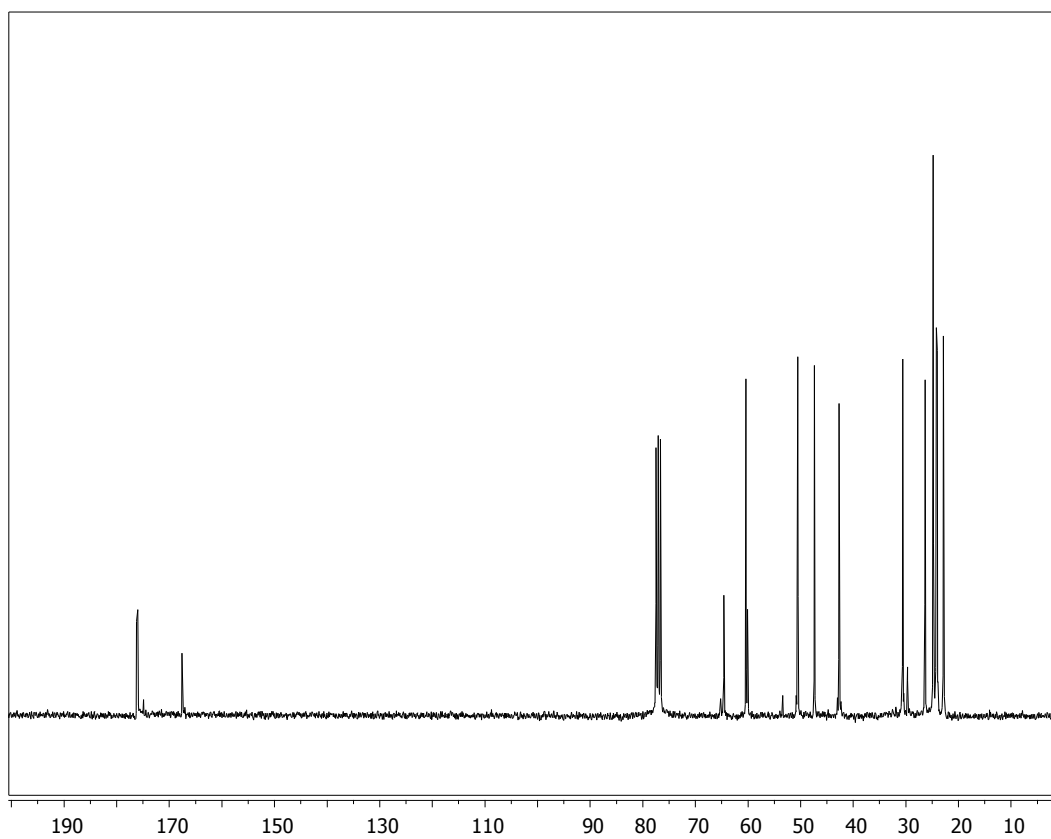
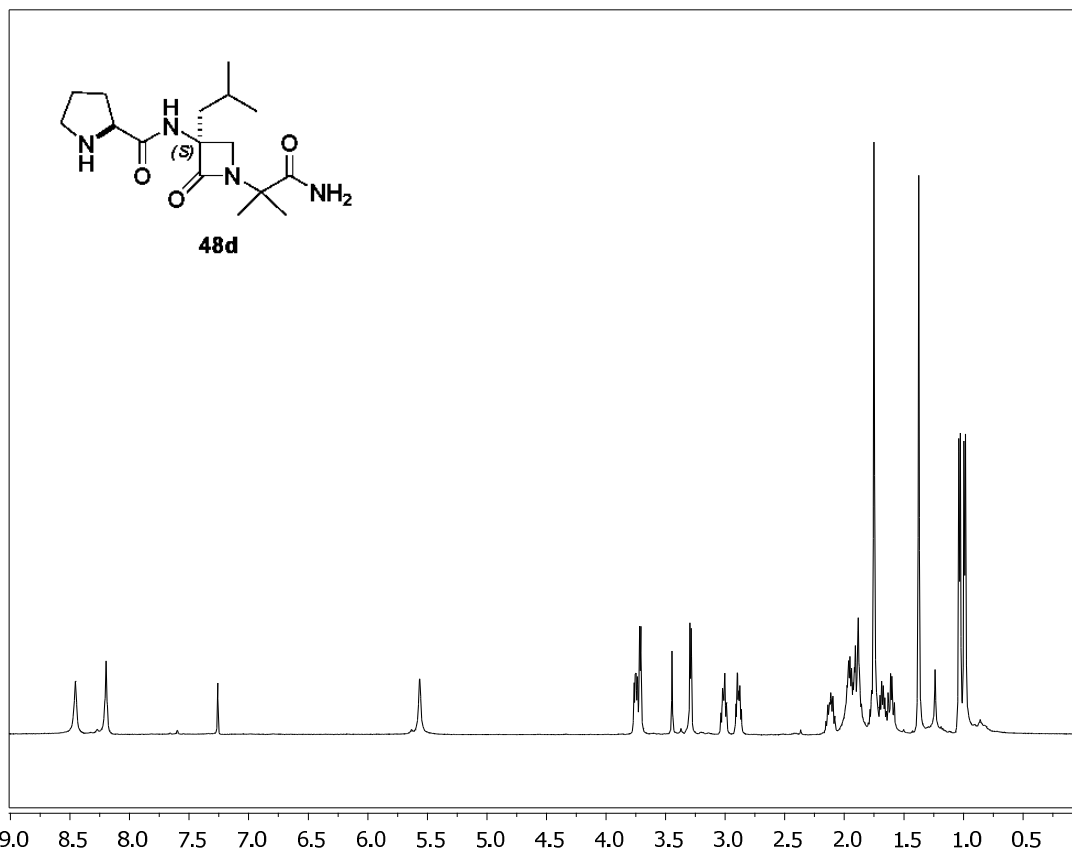


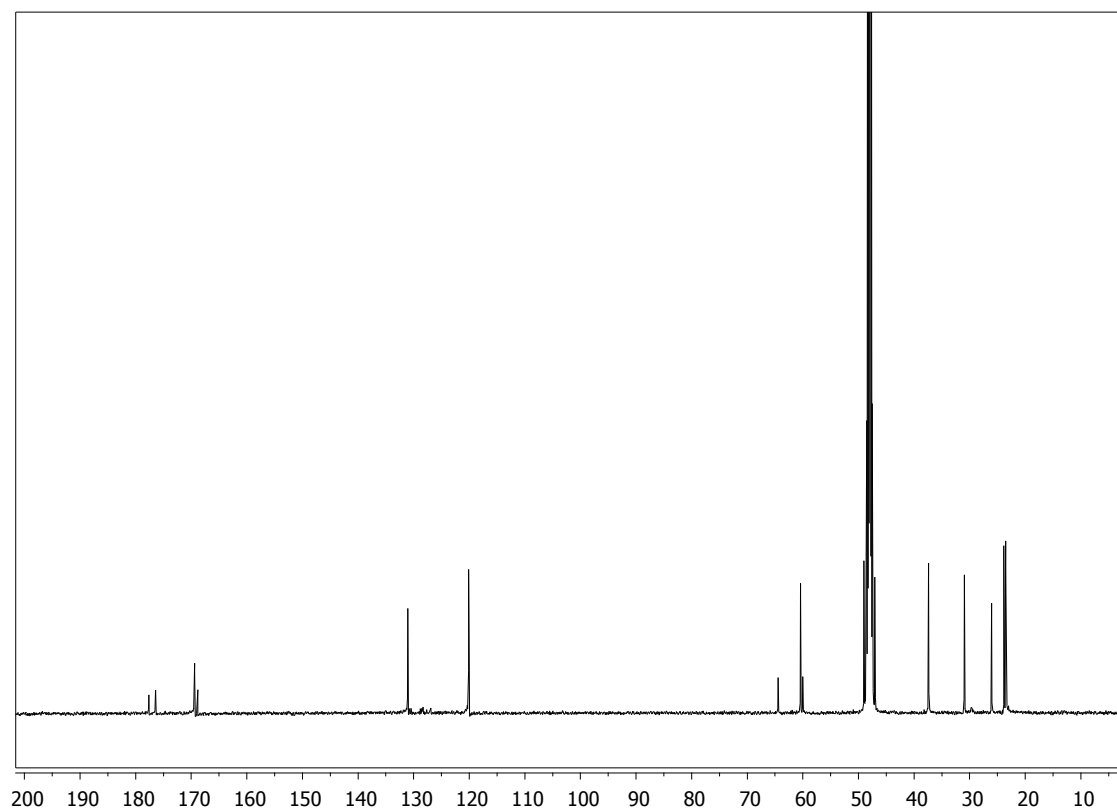
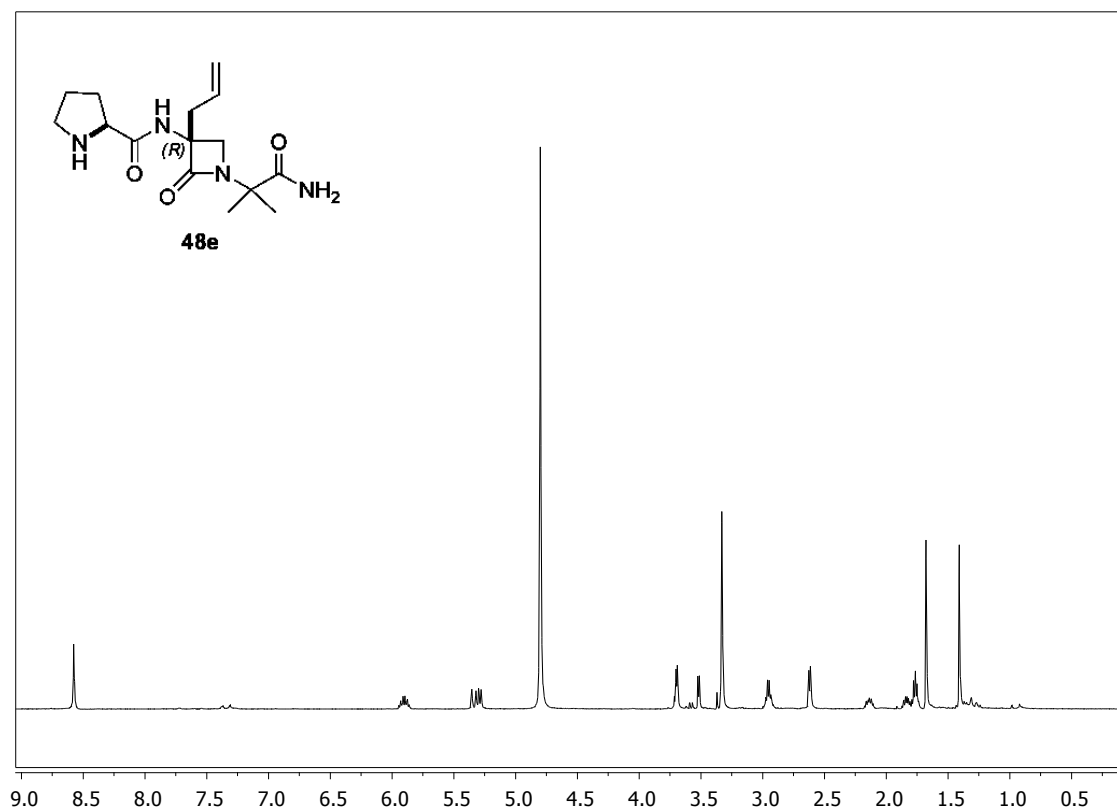


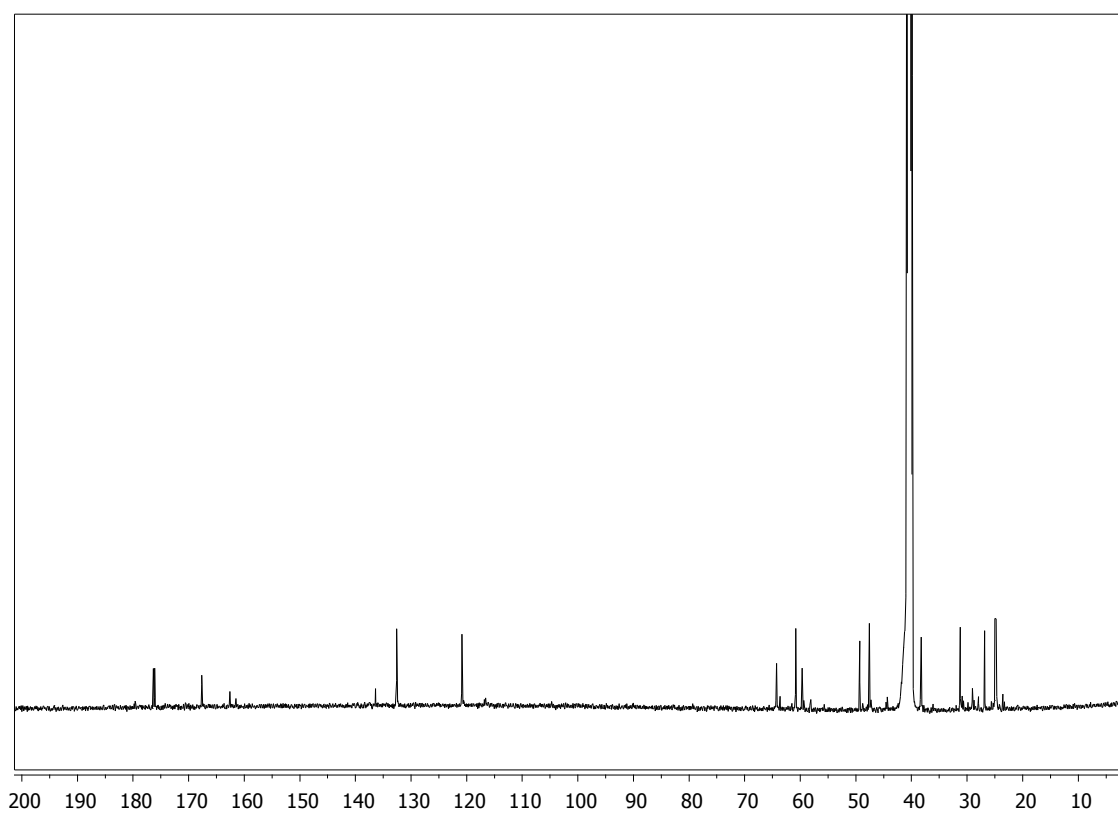
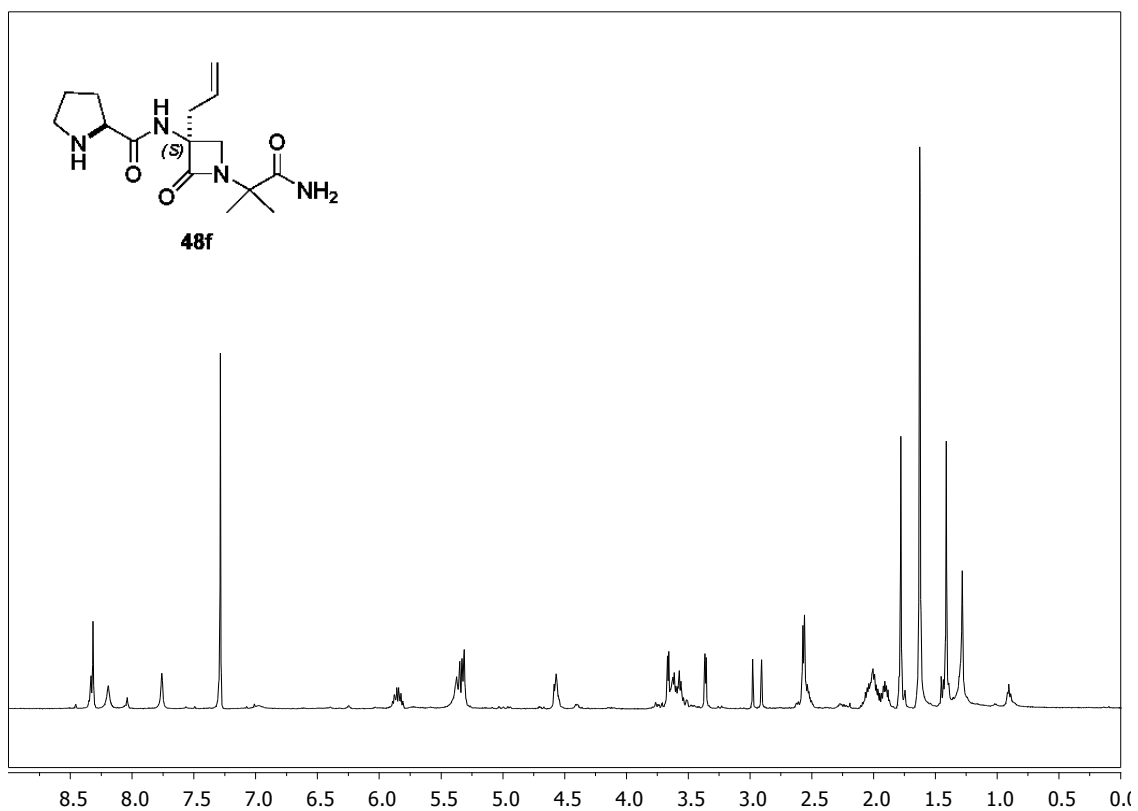








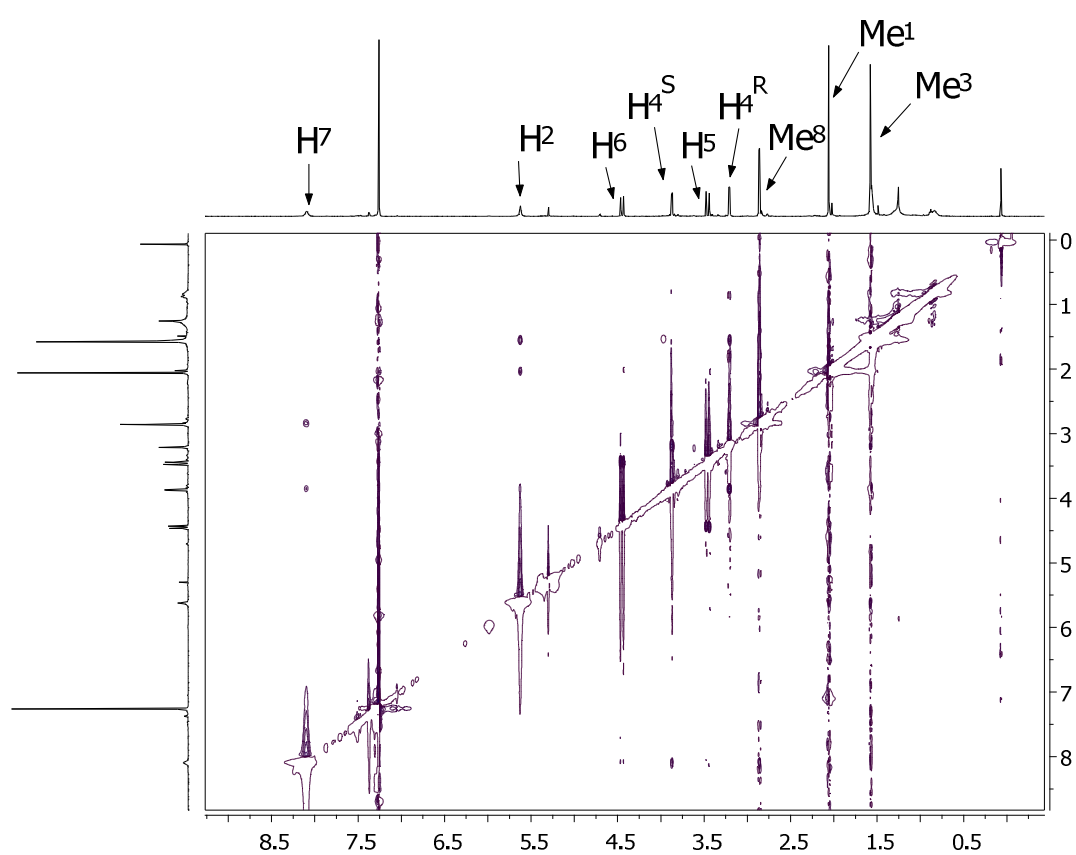




ANEXO B:

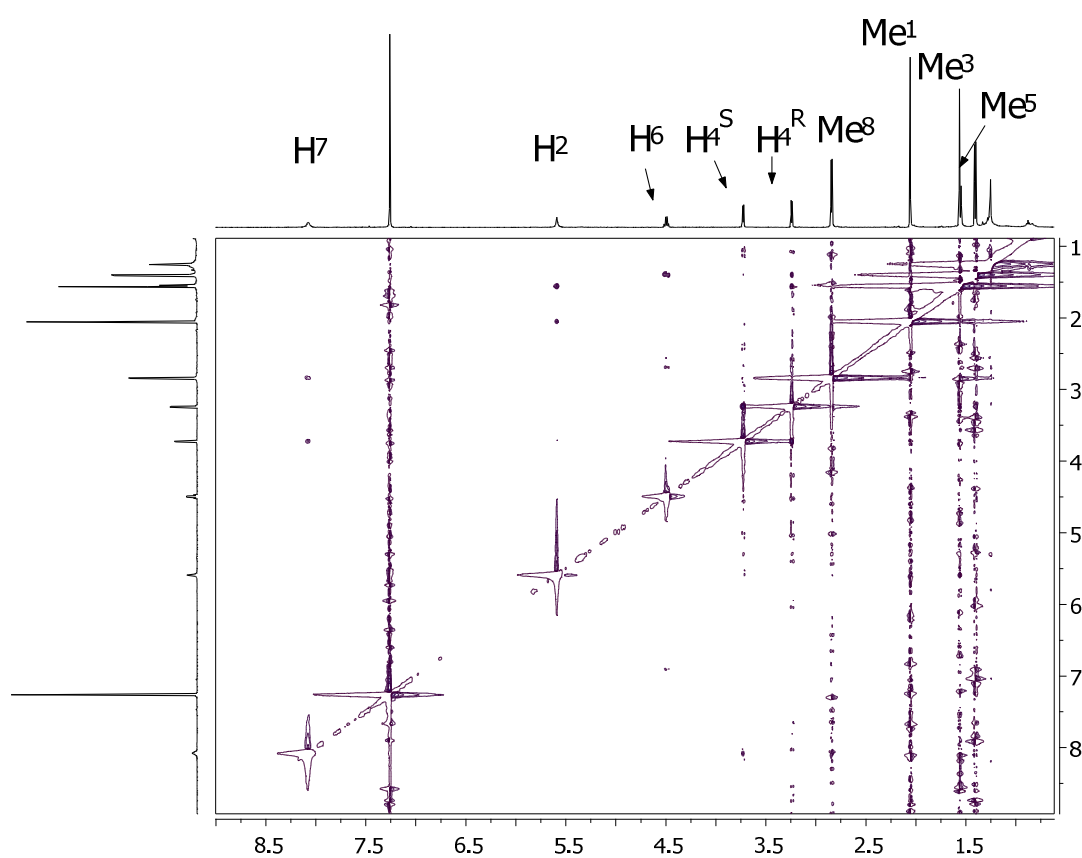
ESPECTROS BIDIMENSIONALES: ROESY/NOESY

42a



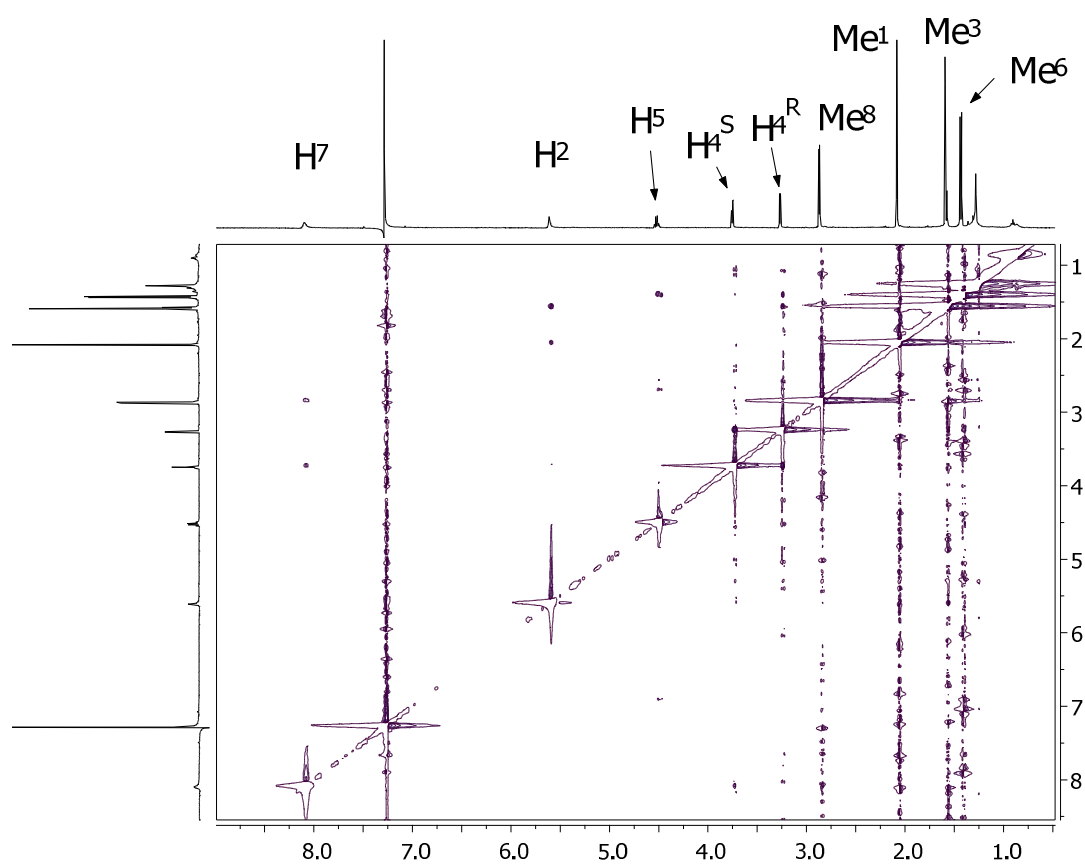
Espectro NOESY, CDCl_3 , 500MHz, mixing time: 400ms

42b



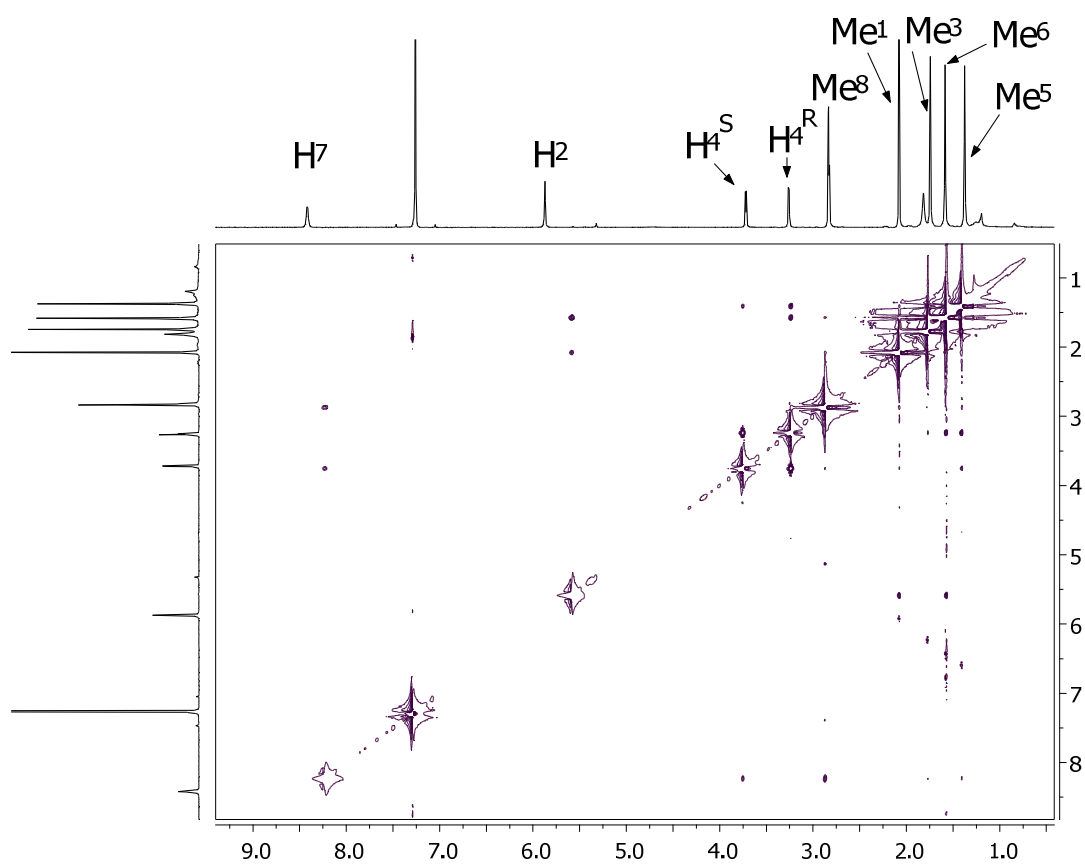
Espectro NOESY, CDCl₃, 500MHz, mixing time: 400ms

42c



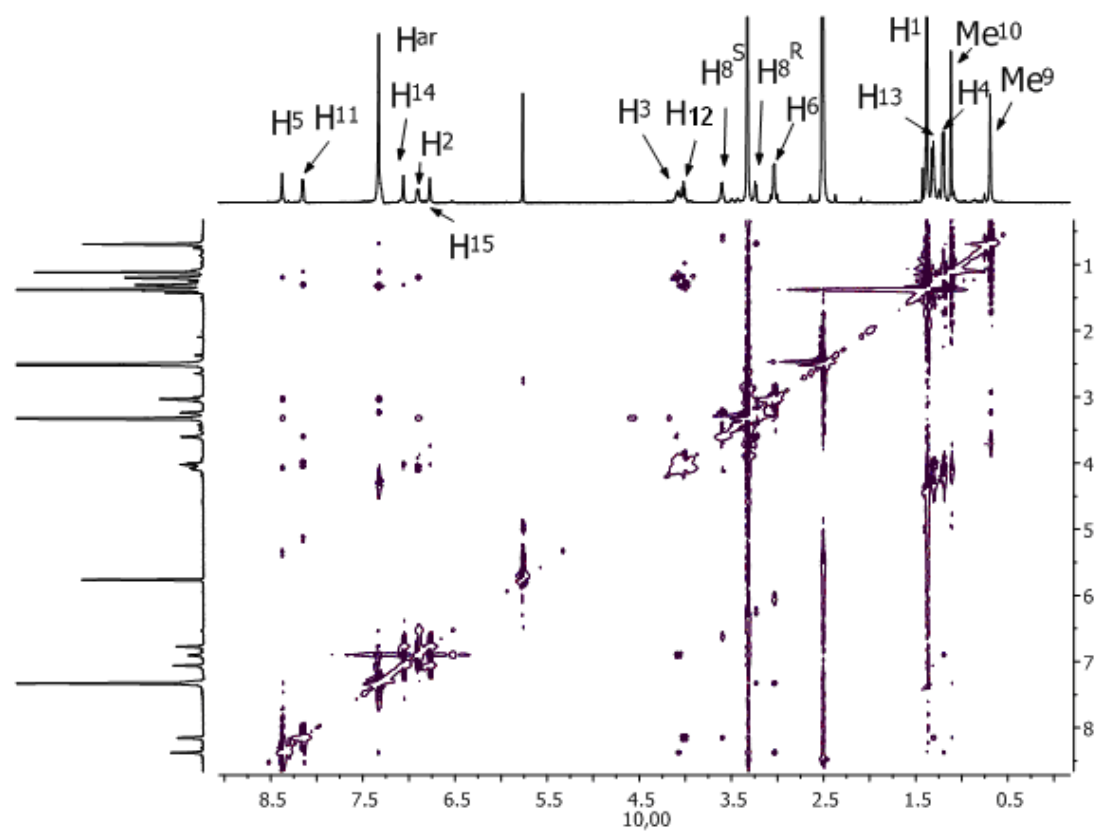
Espectro NOESY, CDCl₃, 500MHz, mixing time: 400ms

42f



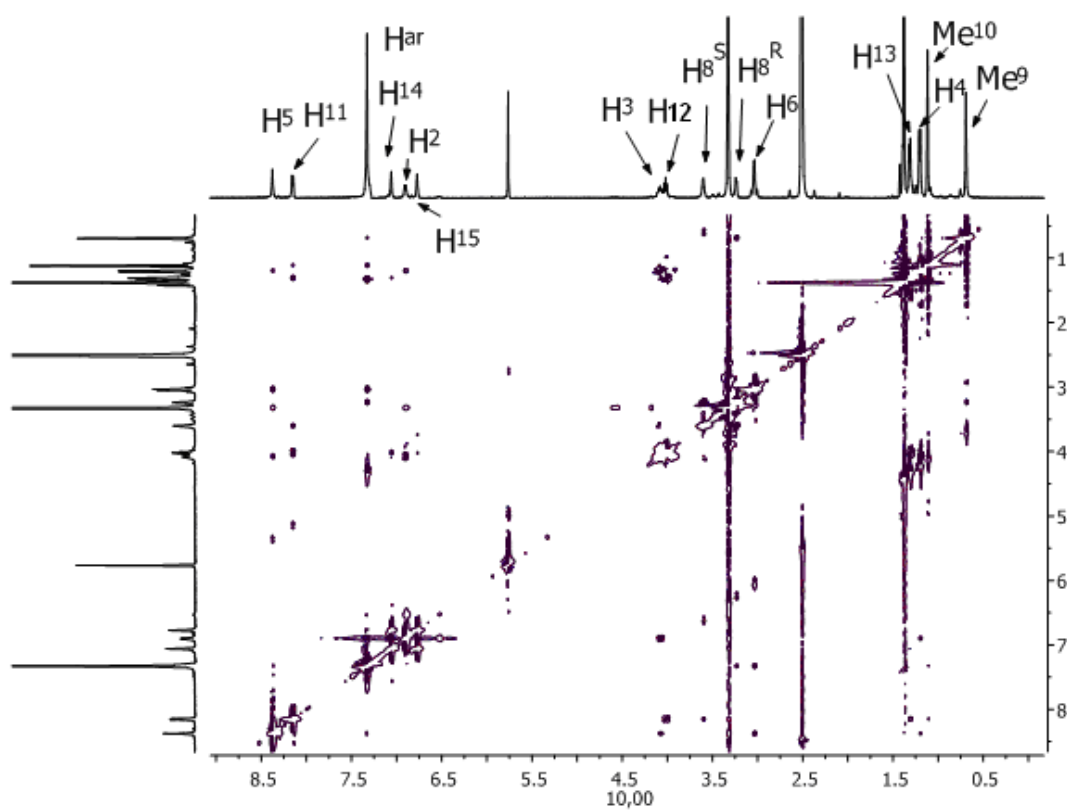
Espectro NOESY, CDCl₃, 500MHz, mixing time: 400ms

46b



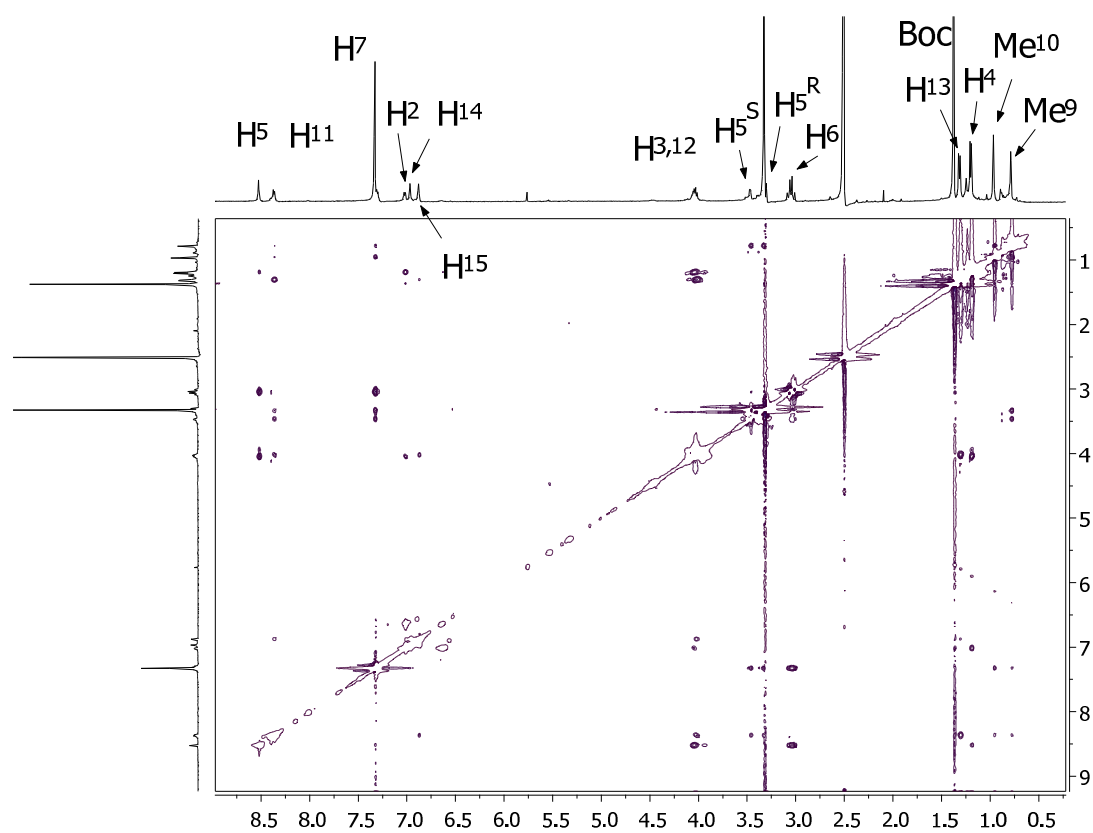
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

46c



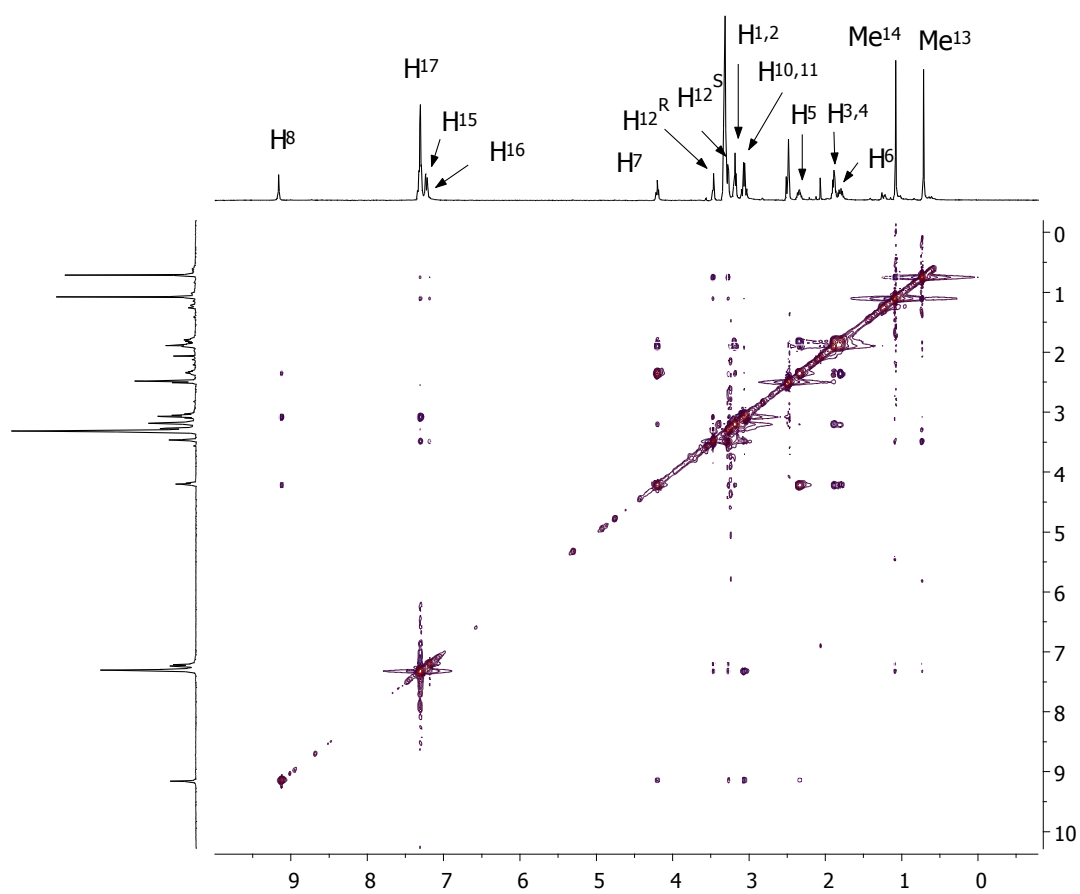
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

46d



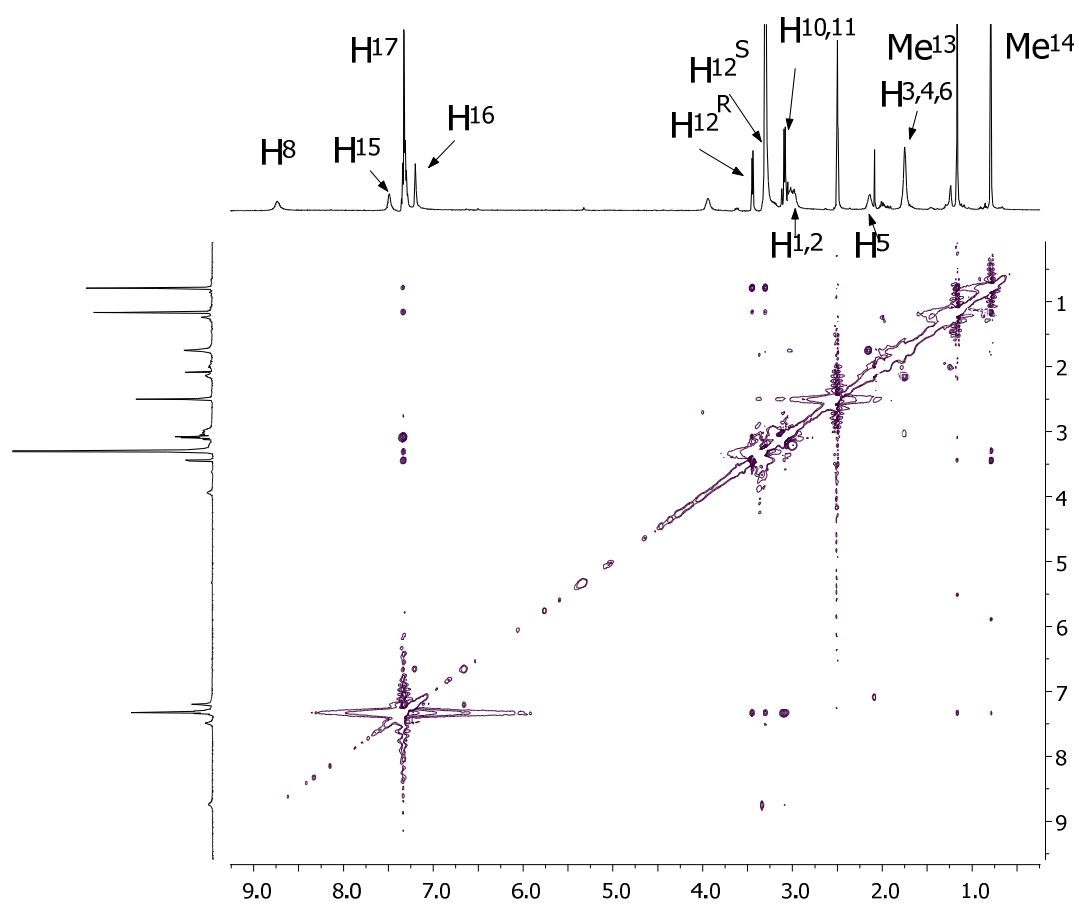
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48a



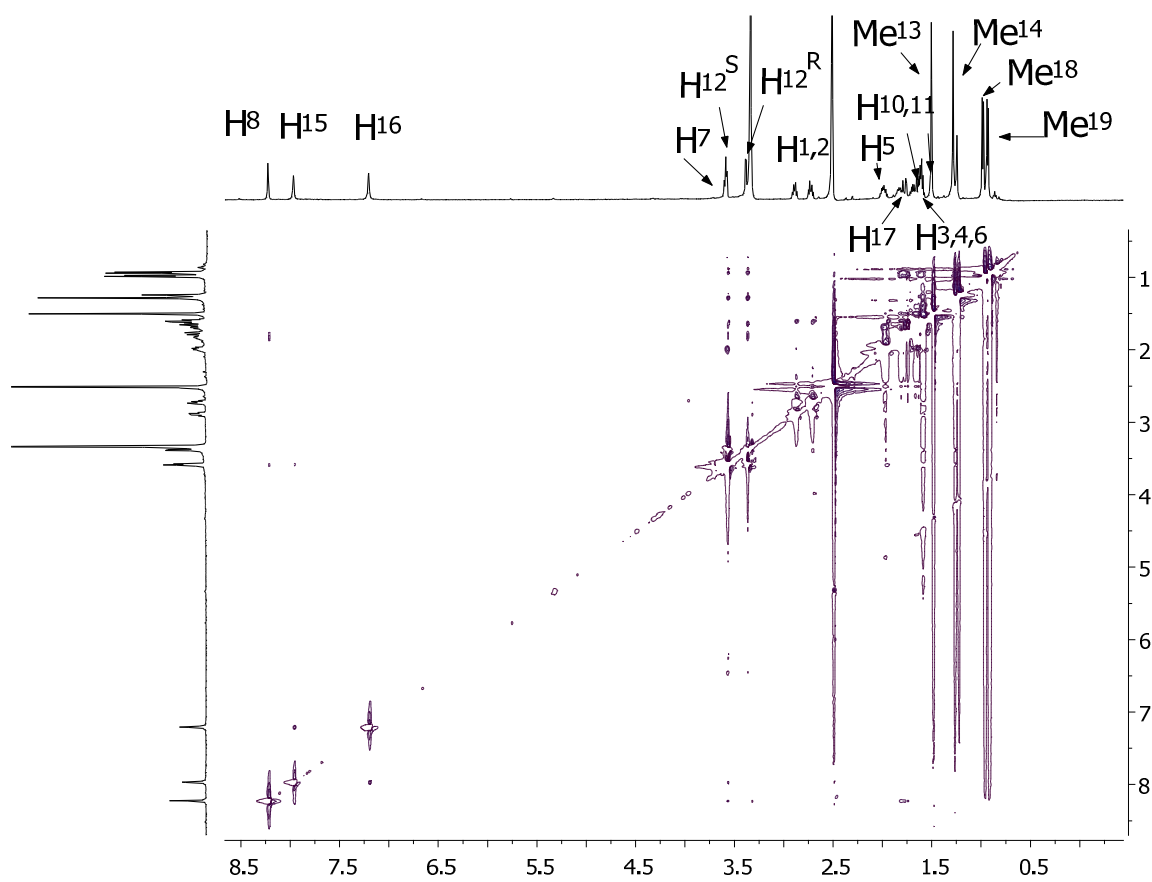
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48b



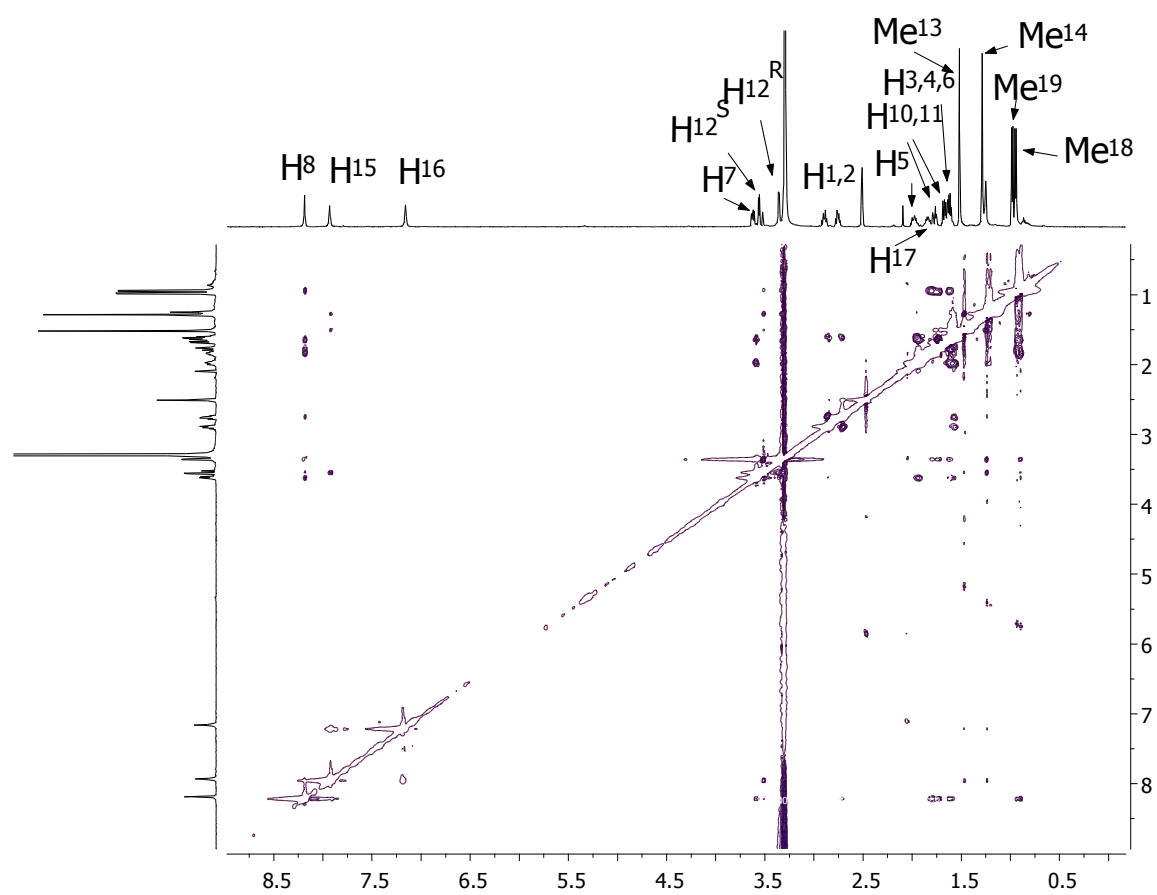
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48c



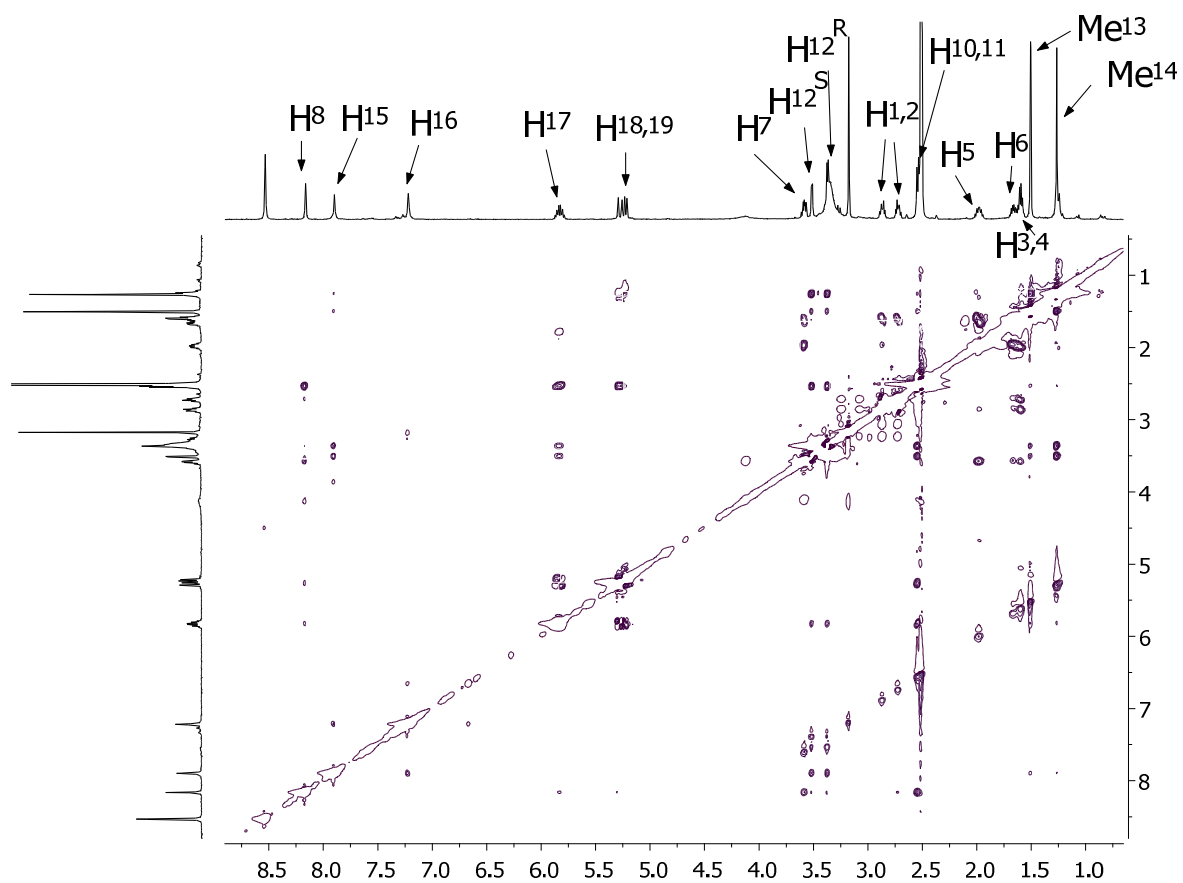
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48d



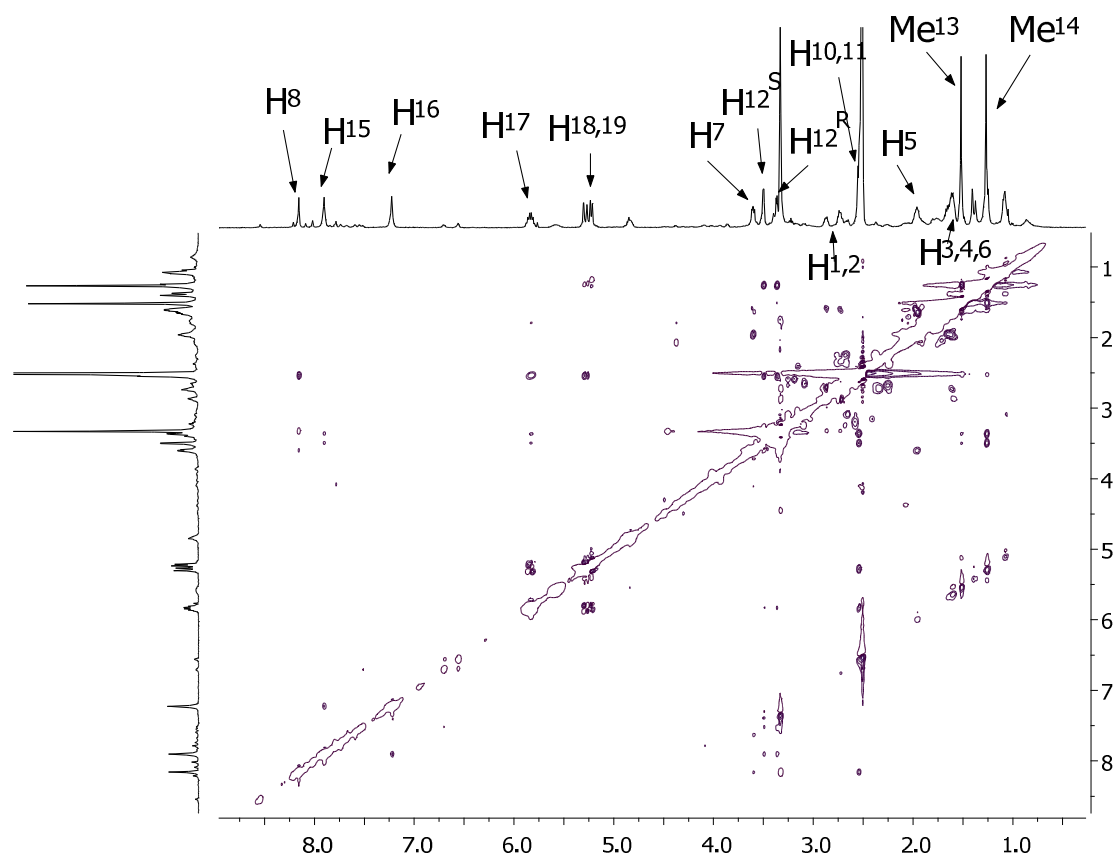
Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48e



Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

48f



Espectro ROESY, DMSO-d₆, 500MHz, mixing time: 400ms

ANEXO C: Distancias interprotónicas compuestos **46a-f**

| ROE | Ha-Hb | Distancia (Å) | | | |
|-----|--|---------------|-----------|-----------|------------|
| | | 46a | 46b | 46c | 46d |
| 1 | H ₈ ^R -H ₈ ^S | 1.80 (ref) | --- | 1.80(ref) | --- |
| 2 | H ₃ -H ₅ | 2.83 | 2.52 | 2.53 | 2.42 |
| 3 | H ₄ -H ₂ | 3.19 | 3.23 | --- | 2.86 |
| 4 | H ₆ -H ₅ | 3.13 | 2.73 | 2.35 | 2.40 |
| 5 | H ₆ -H ₈ ^R | 3.48 | --- | --- | 3.66 |
| 6 | H ₈ ^R -H ₇ | 2.68 | 2.89 | 2.76 | 3.07 |
| 7 | H ₈ ^S -H ₇ | --- | 3.91 | --- | 3.87 |
| 8 | H ₈ ^S -H ₁₁ | 3.12 | 3.62 | 2.59 | 3.39 |
| 9 | H ₉ -H ₇ | --- | 3.62 | --- | 4.62 |
| 10 | H ₉ -H ₈ ^R | 3.36 | --- | 2.29 | --- |
| 11 | H ₉ -H ₈ ^S | --- | --- | 2.40 | 3.02 |
| 12 | H ₉ -H ₁₀ | 3.01 | 2.50(ref) | 2.06 | 2.50(ref.) |
| 13 | H ₁₀ -H ₇ | 3.73 | --- | 4.27 | 3.36 |
| 14 | H ₁₀ -H ₈ ^R | --- | 2.87 | --- | 2.96 |
| 15 | H ₁₀ -H ₈ ^S | --- | 3.27 | --- | --- |
| 16 | H ₁₂ -H ₁₄ | 3.18 | --- | --- | 3.06 |
| 17 | H ₁₂ -H ₁₁ | 3.39 | 3.50 | --- | 3.01 |
| 18 | H ₁₂ -H ₁₅ | --- | 2.92 | --- | --- |
| 19 | H ₁₃ -H ₁₁ | 3.16 | 2.98 | 2.43 | --- |
| 20 | H ₁₃ -H ₁₂ | 2.19 | 2.20 | --- | 2.39 |
| 21 | H ₁₃ -H ₁₅ | --- | --- | 4.26 | --- |

ANEXO D:

Experimentos de estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem

En condiciones control (ausencia de PLG o análogos) el agonista (-)NPA provocó una estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS concentración-dependiente, con un efecto máximo de ~43% sobre la fijación basal y con elevada potencia (EC₅₀~18 nM). El efecto estimulador de (-)NPA fue totalmente bloqueado por el antagonista de los receptores D₂ haloperidol (1 μM).

Los valores de los parámetros de las curvas concentración-efecto obtenidos en membranas de núcleo caudado humano son compatibles con los descritos para el receptor D₂ en otros sistemas como el estriado de rata para este tipo de experimentos^{88,121}. Ni PLG ni ninguno de los análogos estudiados provocó alteraciones significativas en ninguno de los parámetros de las curvas concentración-efecto de (-)NPA con respecto a la curva control (*tabla 31*), como puede observarse en la práctica superposición de las curvas en ausencia (*control*) y presencia de PLG o análogo (*figuras 81A-F*).

Esta falta de efecto modulador de PLG y análogos en estos ensayos *in vitro* realizados en cerebro humano no descarta la posible relevancia funcional de estos compuestos. De hecho, el efecto modulador de PLG a nivel funcional ha sido previamente descrito en otros sistemas (no humanos) tanto en ensayos *in vitro* como la actividad adenilil ciclasa y la actividad GTPasa en membranas de estriado de rata¹²², como en ensayos comportamentales en roedores como el modelo de enfermedad de Parkinson de ratas con lesión unilateral de la sustancia negra con 6-hidroxidopamina¹²³ o modelos de efectos extrapiramidales (transtornos de movimiento) inducidos por fármacos

¹²¹ Rinken, A.; Finnman, U.B.; Fuxe, K. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *390*, 25-36.

¹²² Mishra, R.K.; Makman, M.H.; Costain, W.J.; Nair, V.D.; Johnson, R.L. *Neurosci. Lett.* **1999**, *269*, 21-24.

¹²³ a) Baures, P.W.; Ojala, W.H.; Costain, W.J.; Ott, M.C.; Pradhan, A.; Gleason, W.B.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3594-3600. b) Evans, M.C.; Pradhan, A.; Venkatraman, S.; Ojala, W.H.; Gleason, W.B.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1441-1447. c) Castellano, J.M.; Batrynychuk, J.; Dolbeare, K.; Verma, V.; Mann, A.; Skoblenik, K.J.; Johnson, R.L.; Mishra, R.K. *Peptides* **2007**, *2*, 105-111.

neurolépticos como el parkinsonismo valorado frente la catalepsia en roedores¹²⁴ o la discinesia tardía valorada mediante la aparición de movimientos masticatorios en la rata^{123b}.

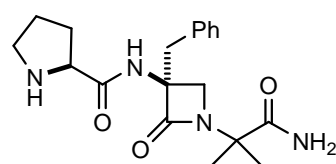
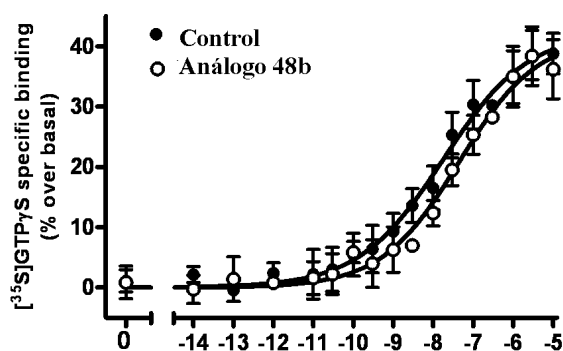
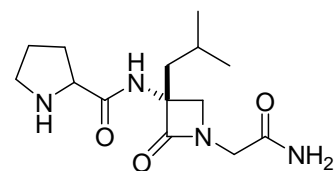
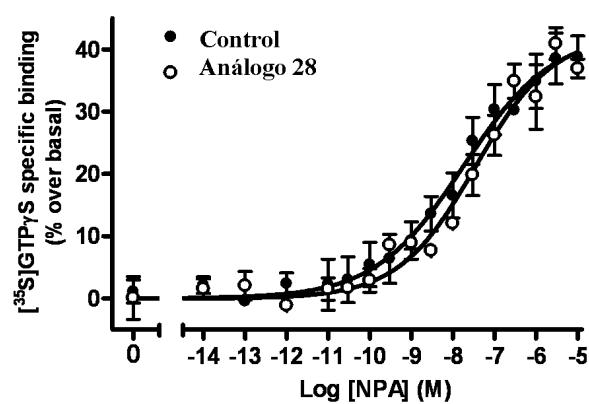
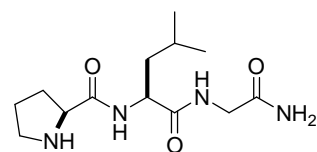
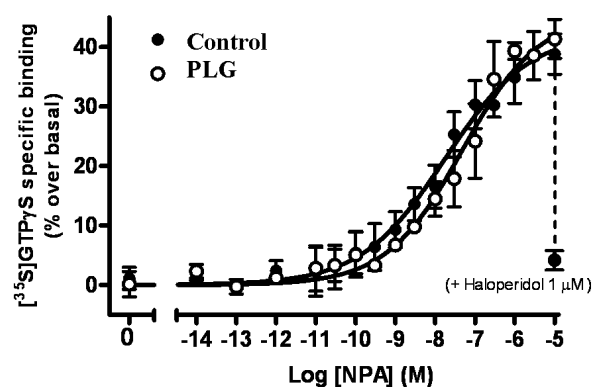
Existen diferentes consideraciones sobre las condiciones experimentales de los ensayos de fijación de [³⁵S]GTPγS en cerebro humano que podrían haber contribuido a estos resultados negativos sobre la actividad de PLG y análogos en este tipo de ensayo funcional.

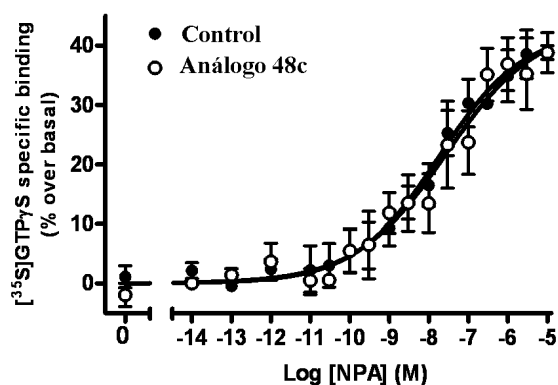
Tabla 31: Parámetros de la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS producida por (-)NPA en membranas de caudado humano postmortem.

| Condición | n | pEC ₅₀ | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (% sobre basal) | n _H |
|----------------------|---|-------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------|
| Control | 4 | 7.75 ± 0.32 | 17.8 | 42.5 ± 4.4 | 0.41±0.08 |
| + PLG | 4 | 7.31 ± 0.29 | 48.7 | 45.5 ± 4.6 | 0.45±0.09 |
| + análogo 28 | 3 | 7.46 ± 0.23 | 35.1 | 42.4 ± 3.3 | 0.47±0.08 |
| + análogo 48c | 4 | 7.57 ± 0.57 | 26.9 | 43.5 ± 7.8 | 0.38±0.11 |
| + análogo 48d | 3 | 7.71 ± 0.46 | 19.4 | 39.5 ± 5.4 | 0.40±0.10 |
| + análogo 48b | 3 | 7.36 ± 0.35 | 44.2 | 41.6 ± 4.7 | 0.45±0.10 |
| + PAOPA | 3 | 7.48 ± 0.47 | 33.4 | 41.1 ± 5.8 | 0.39±0.10 |

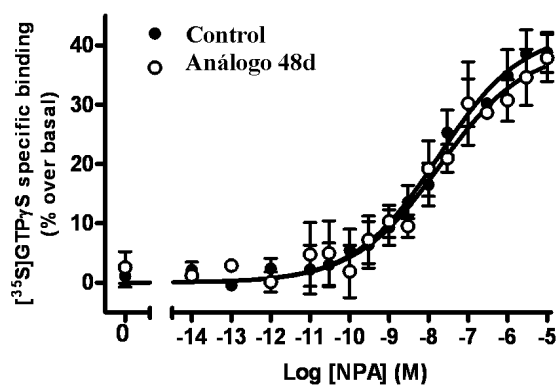
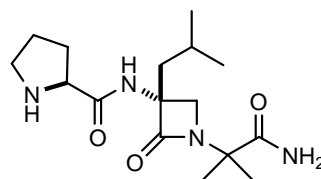
Los parámetros de la curva concentración-respuesta fueron calculados a partir del ajuste no lineal de los datos experimentales que se muestran en la figura 79, mediante el programa GraphPad Prism 5. Los valores de pEC₅₀, E_{max} y n_H se expresan como el valor del mejor ajuste ± error standard de n experimentos realizados por duplicado. La concentración de PLG o análogo empleada fue de 1 μM. La comparación de las curvas obtenidas en ausencia (control) y en presencia de PLG o análogo se realizó mediante análisis simultáneos con parámetros compartidos utilizando un test F.

¹²⁴ Chiu, S.; Paulose, C.S.; Mishra, R.K. *Peptides* **1981**, 2, 105-111.

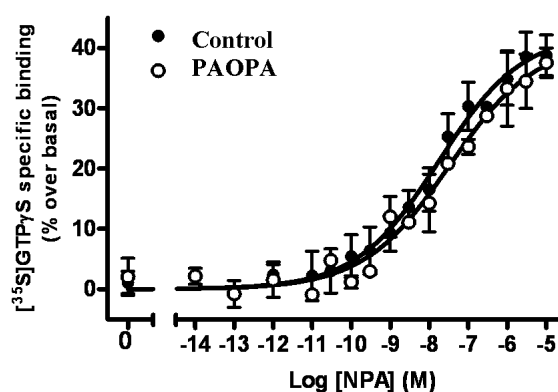
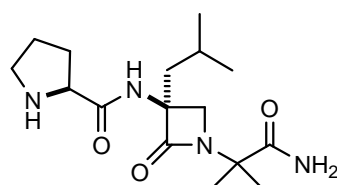




D



E



F

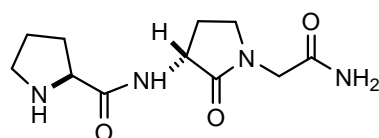


Figura 81: Curvas concentración-respuesta para la fijación del $[^3\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ estimulado por (-)NPA en membranas de caudado humano en ausencia (control) (○) y en presencia (●) de 1 μM de PLG (A) o del análogo 28(B), 48b (C), 48c (D), 48d (E) o PAOPA (F). Los puntos representan medias \pm SEM de 3-4 experimentos realizados en duplicado. Al lado de las gráficas se representan las estructuras químicas del compuesto correspondiente. Los valores de los parámetros de inhibición se muestran en la tabla 31.

Discusión de resultados:

a) Por una parte, por limitaciones de acceso al material de estudio (muestras de cerebro humano), estos ensayos se han realizado con una única concentración de PLG o análogos y, como ya se ha adelantado, la PLG y otros miméticos activos muestran un efecto modulador dosis-dependiente en forma de campana¹²⁵. Es posible que la concentración de PLG y análogos utilizada (1 μ M), activa en los experimentos de fijación de [³H]espiperona, no haya sido la adecuada para observar su efecto modulador en las condiciones experimentales de los ensayos de fijación de [³⁵S]GTP γ S.

b) Por otra parte, como ensayo funcional para el receptor D₂ se ha utilizado la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S por fármacos agonistas ya que esta metodología permite valorar la actividad de receptores acoplados a proteínas G inhibitorias en cerebro humano postmortem¹²⁶. Sin embargo, estos experimentos requieren la inclusión de GDP y NaCl en el medio de incubación ya que, en ausencia de estos compuestos, la fijación basal del [³⁵S]GTP γ S a las proteínas G es demasiado elevada, lo cual impide observar el efecto estimulador por fármacos agonistas¹²⁶. Tanto el GDP como el NaCl, al igual que ocurría con el Gpp(NH)p, promueven el estado de baja afinidad por agonistas de los receptores D₂, condiciones en las que el efecto modulador de PLG y análogos en membranas de núcleo caudado humano no pudo observarse en los experimentos bioquímicos de fijación de [³H]espiperona. En este sentido, otros autores estudiando otros sistemas receptores, han sugerido que la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S por fármacos agonistas estaría relacionada con la ocupación de los receptores que se encuentran en estado de afinidad, pero no con los de alta afinidad¹²⁷.

c) Además, otro factor a considerar es que la estimulación de los receptores D₂ pone en marcha diferentes mecanismos efectores a nivel celular que pueden ser mediados por distintos subtipos de subunidad α de las proteínas G inhibitorias. No está claro el subtipo

¹²⁵ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoniero, G.; Castellano, J.M.; Skoblenik, K.; Gupta, S.K.; Pristupa, Z.; Niznik, H.B.; Johnson, R.L.; Nair, V.D.; Mishra, R.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228-1236.

¹²⁶ Gonzalez-Maeso, J.; Rodriguez-Puertas, R.; Gabilondo, A.M.; Meana, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *399*, 25-36.

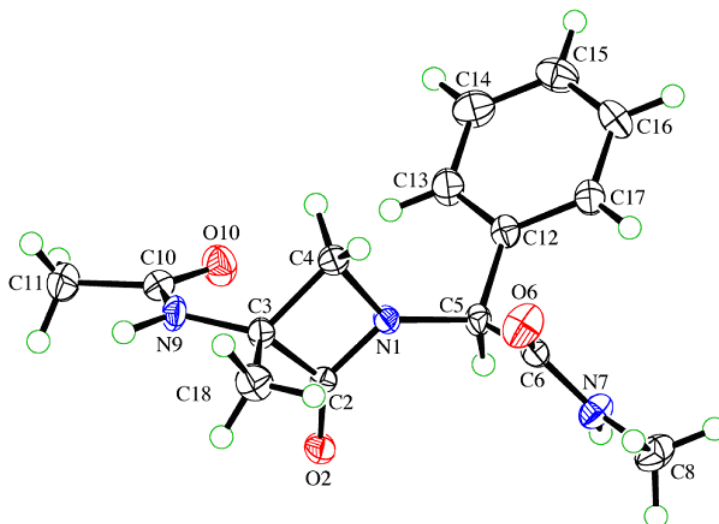
¹²⁷ a) Maher, C.E.; Selley, D.E.; Childers, S.R. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1395-1401. b) Breivogel, C.S.; Childers, S.R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 328-336.

de subunidad α implicada en cada mecanismo efector de los receptores D_2 , aunque existen estudios que sugieren que el efecto inhibitorio sobre la actividad adenilil ciclasa estaría mediada por proteínas $G_{i2\alpha}$ y $G_{i3\alpha}$, el efecto de apertura de canales de salida de potasio por proteínas $G_{i3\alpha}$ y el cierre de canales de calcio por proteínas G_o ¹²⁸. Tampoco está claro el subtipo o subtipos de subunidades α cuya activación se detecta en los experimentos de fijación de [³⁵S]GTP γ S. En cualquier caso, es posible que en el efecto modulador de PLG y análogos observado en los experimentos bioquímicos de fijación del radioligando [³H]espiperona, pudiera intervenir algún subtipo de proteína G cuya activación no se detectara bien en los experimentos funcionales de fijación de [³⁵S]GTP γ S.

Por todo ello, sería de interés la realización de otro tipo de ensayos *in vitro* o *in vivo* en otros sistemas biológicos que permitieran una mejor valoración de la potencialidad funcional de estos compuestos.

¹²⁸ Missale, C.; Nash, S.R.; Robinson, S.W.; Jabber, M.; Caron, M.G. *Pharmacol. Rev.* **1998**, 78, 189-223.

42e



| | |
|--|---|
| Fórmula empírica | C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₃ |
| Peso Molecular [g mol ⁻¹] | 241.29 |
| Dimensiones del cristal [mm] | 0.08 × 0.22 × 0.28 |
| Temperatura [K] | 160(1) |
| Sistema cristalino | triclinico |
| Grupo | <i>P</i> 1 (#1) |
| <i>Z</i> | 1 |
| Parámetros de celda | |
| <i>a</i> [Å] | 5.7004(2) |
| <i>b</i> [Å] | 7.3619(3) |
| <i>c</i> [Å] | 8.3143(3) |
| <i>α</i> [°] | 108.938(2) |
| <i>β</i> [°] | 90.932(2) |
| <i>γ</i> [°] | 104.803(2) |
| <i>V</i> [Å ³] | 317.19(2) |
| <i>F</i> (000) | 130 |
| <i>D_x</i> [g cm ⁻³] | 1.263 |
| <i>μ</i> (Mo <i>Kα</i>) [mm ⁻¹] | 0.0928 |
| Scan type | <i>φ</i> and <i>ω</i> |
| Total de reflexiones medidas | 9183 |
| Reflexiones simétricas independientes | 1832 |

| | |
|--|---------|
| Parámetros refinados; restricciones | 168; 3 |
| Pesos: $w = [\sigma^2(F_o^2) + (0.0664P)^2 + 0.0241P]^{-1}$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ | |
| Goodness of fit | 1.091 |
| Coeficientes de extinction secundarios | 0.37(5) |

TABLA 2. Distancias interatómicas (Å) con las desviaciones standard estimadas entre paréntesis.

| | | | | | |
|-------|--------|----------|-------|--------|----------|
| O(2) | -C(2) | 1.215(2) | N(9) | -C(3) | 1.449(2) |
| O(6) | -C(6) | 1.238(2) | C(2) | -C(3) | 1.549(2) |
| O(10) | -C(10) | 1.235(2) | C(3) | -C(14) | 1.522(2) |
| N(1) | -C(2) | 1.367(2) | C(3) | -C(4) | 1.561(2) |
| N(1) | -C(5) | 1.462(2) | C(5) | -C(12) | 1.523(2) |
| N(1) | -C(4) | 1.485(2) | C(5) | -C(13) | 1.535(2) |
| N(7) | -C(6) | 1.327(2) | C(5) | -C(6) | 1.553(2) |
| N(7) | -C(8) | 1.456(2) | C(10) | -C(11) | 1.503(2) |
| N(9) | -C(10) | 1.346(2) | | | |

TABLA 3. Ángulos de enlace (°) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | | | | | |
|-------|-------|--------|----------|-------|--------|--------|----------|
| C(2) | -N(1) | -C(5) | 133.6(1) | N(1) | -C(4) | -C(3) | 87.3(1) |
| C(2) | -N(1) | -C(4) | 95.0(1) | N(1) | -C(5) | -C(12) | 108.8(1) |
| C(5) | -N(1) | -C(4) | 131.0(1) | N(1) | -C(5) | -C(13) | 110.0(1) |
| C(6) | -N(7) | -C(8) | 122.5(2) | C(12) | -C(5) | -C(13) | 109.7(2) |
| C(10) | -N(9) | -C(3) | 123.4(2) | N(1) | -C(5) | -C(6) | 111.5(1) |
| O(2) | -C(2) | -N(1) | 133.2(2) | C(12) | -C(5) | -C(6) | 108.2(1) |
| O(2) | -C(2) | -C(3) | 134.8(2) | C(13) | -C(5) | -C(6) | 108.7(1) |
| N(1) | -C(2) | -C(3) | 92.0(1) | O(6) | -C(6) | -N(7) | 123.9(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(14) | 108.5(1) | O(6) | -C(6) | -C(5) | 118.8(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(2) | 115.8(1) | N(7) | -C(6) | -C(5) | 117.3(1) |
| C(14) | -C(3) | -C(2) | 112.8(2) | O(10) | -C(10) | -N(9) | 122.5(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(4) | 119.0(1) | O(10) | -C(10) | -C(11) | 121.4(2) |
| C(14) | -C(3) | -C(4) | 114.3(2) | N(9) | -C(10) | -C(11) | 116.1(2) |
| C(2) | -C(3) | -C(4) | 85.2(1) | | | | |

TABLA 4. Ángulos de torsion (°) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| C(5) -N(1) -C(2) -O(2) | 2.5(3) | C(2) -C(3) -C(4) -N(1) | -5.0(1) |
| C(4) -N(1) -C(2) -O(2) | 175.5(2) | C(2) -N(1) -C(5) -C(12) | -149.9(2) |
| C(5) -N(1) -C(2) -C(3) | -178.7(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(12) | 39.3(2) |
| C(4) -N(1) -C(2) -C(3) | -5.7(1) | C(2) -N(1) -C(5) -C(13) | -29.8(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(14) | -166.2(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(13) | 159.4(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(2) | -38.3(2) | C(2) -N(1) -C(5) -C(6) | 90.8(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(4) | 60.9(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(6) | -80.0(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -N(9) | -55.9(3) | C(8) -N(7) -C(6) -O(6) | -1.0(3) |
| N(1) -C(2) -C(3) -N(9) | 125.4(2) | C(8) -N(7) -C(6) -C(5) | 177.8(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -C(14) | 69.9(2) | N(1) -C(5) -C(6) -O(6) | 176.0(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) -C(14) | -108.9(2) | C(12) -C(5) -C(6) -O(6) | 56.4(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -C(4) | -175.8(2) | C(13) -C(5) -C(6) -O(6) | -62.7(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) -C(4) | 5.4(1) | N(1) -C(5) -C(6) -N(7) | -2.8(2) |
| C(2) -N(1) -C(4) -C(3) | 5.7(1) | C(12) -C(5) -C(6) -N(7) | -122.4(2) |
| C(5) -N(1) -C(4) -C(3) | 179.0(2) | C(13) -C(5) -C(6) -N(7) | 118.5(2) |
| N(9) -C(3) -C(4) -N(1) | -121.8(2) | C(3) -N(9) -C(10) -O(10) | -5.4(3) |
| C(14) -C(3) -C(4) -N(1) | 107.9(2) | C(3) -N(9) -C(10) -C(11) | 173.8(2) |

TABLA 5. Distancias de enlace (Å) y ángulos (°).

| | | | |
|------------------|---------|-------------------|---------|
| N(7) -H(7) | 0.88(3) | N(9) -H(9) | 0.89(3) |
| C(6) -N(7) -H(7) | 123(2) | C(10) -N(9) -H(9) | 120(2) |
| C(8) -N(7) -H(7) | 114(2) | C(3) -N(9) -H(9) | 117(2) |

TABLA 6. Geometría de enlace de hidrógeno (Å, °).

| D | H | A | D-H | H...A | D...A | D-H...A |
|------|------|-------|---------|---------|----------|---------|
| N(7) | H(7) | O(10) | 0.88(3) | 1.92(3) | 2.766(2) | 160(3) |
| N(9) | H(9) | O(6') | 0.89(3) | 2.00(3) | 2.895(2) | 176(3) |

42f

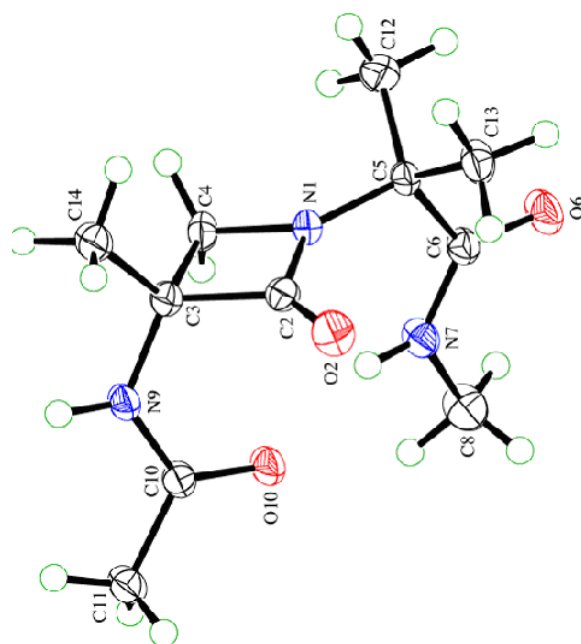


Tabla 1: Datos cristalográficos

| | |
|--|---|
| Fórmula empírica | C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₃ |
| Peso molecular [g mol ⁻¹] | 241.29 |
| Dimensiones del cristal [mm] | 0.08 × 0.22 × 0.28 |
| Temperatura [K] | 160(1) |
| Sistema cristalino | triclinico |
| Grupo | <i>P</i> 1 (#1) |
| <i>Z</i> | 1 |
| Parámetros de la celda unidad <i>a</i> [Å] | 5.7004(2) |
| <i>b</i> [Å] | 7.3619(3) |
| <i>c</i> [Å] | 8.3143(3) |
| α [°] | 108.938(2) |
| β [°] | 90.932(2) |
| γ [°] | 104.803(2) |
| <i>V</i> [Å ³] | 317.19(2) |
| Reflexiones medidas | 9183 |
| Simetría de las reflexiones independientes | 1832 |
| <i>R</i> _{int} | 0.050 |
| Parámetros refinados: restricciones | 168; 3 |
| Coefficiente de extinción secundario | 0.37(5) |

TABLA 2. Distancias interatómicas (Å) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | | | |
|-------|--------|----------|-------|--------|----------|
| O(2) | -C(2) | 1.215(2) | N(9) | -C(3) | 1.449(2) |
| O(6) | -C(6) | 1.238(2) | C(2) | -C(3) | 1.549(2) |
| O(10) | -C(10) | 1.235(2) | C(3) | -C(14) | 1.522(2) |
| N(1) | -C(2) | 1.367(2) | C(3) | -C(4) | 1.561(2) |
| N(1) | -C(5) | 1.462(2) | C(5) | -C(12) | 1.523(2) |
| N(1) | -C(4) | 1.485(2) | C(5) | -C(13) | 1.535(2) |
| N(7) | -C(6) | 1.327(2) | C(5) | -C(6) | 1.553(2) |
| N(7) | -C(8) | 1.456(2) | C(10) | -C(11) | 1.503(2) |
| N(9) | -C(10) | 1.346(2) | | | |

TABLA 3. Ángulos de enlace (°) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | | | | | |
|-------|-------|--------|----------|-------|--------|--------|----------|
| C(2) | -N(1) | -C(5) | 133.6(1) | N(1) | -C(4) | -C(3) | 87.3(1) |
| C(2) | -N(1) | -C(4) | 95.0(1) | N(1) | -C(5) | -C(12) | 108.8(1) |
| C(5) | -N(1) | -C(4) | 131.0(1) | N(1) | -C(5) | -C(13) | 110.0(1) |
| C(6) | -N(7) | -C(8) | 122.5(2) | C(12) | -C(5) | -C(13) | 109.7(2) |
| C(10) | -N(9) | -C(3) | 123.4(2) | N(1) | -C(5) | -C(6) | 111.5(1) |
| O(2) | -C(2) | -N(1) | 133.2(2) | C(12) | -C(5) | -C(6) | 108.2(1) |
| O(2) | -C(2) | -C(3) | 134.8(2) | C(13) | -C(5) | -C(6) | 108.7(1) |
| N(1) | -C(2) | -C(3) | 92.0(1) | O(6) | -C(6) | -N(7) | 123.9(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(14) | 108.5(1) | O(6) | -C(6) | -C(5) | 118.8(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(2) | 115.8(1) | N(7) | -C(6) | -C(5) | 117.3(1) |
| C(14) | -C(3) | -C(2) | 112.8(2) | O(10) | -C(10) | -N(9) | 122.5(2) |
| N(9) | -C(3) | -C(4) | 119.0(1) | O(10) | -C(10) | -C(11) | 121.4(2) |
| C(14) | -C(3) | -C(4) | 114.3(2) | N(9) | -C(10) | -C(11) | 116.1(2) |
| C(2) | -C(3) | -C(4) | 85.2(1) | | | | |

TABLA 4. Ángulos de torsión (°) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| C(5) -N(1) -C(2) -O(2) | 2.5(3) | C(2) -C(3) -C(4) -N(1) | -5.0(1) |
| C(4) -N(1) -C(2) -O(2) | 175.5(2) | C(2) -N(1) -C(5) -C(12) | -149.9(2) |
| C(5) -N(1) -C(2) -C(3) | 178.7(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(12) | 39.3(2) |
| C(4) -N(1) -C(2) -C(3) | -5.7(1) | C(2) -N(1) -C(5) -C(13) | -29.8(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(14) | 166.2(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(13) | 159.4(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(2) | -38.3(2) | C(2) -N(1) -C(5) -C(6) | 90.8(2) |
| C(10) -N(9) -C(3) -C(4) | 60.9(2) | C(4) -N(1) -C(5) -C(6) | -80.0(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -N(9) | -55.9(3) | C(8) -N(7) -C(6) -O(6) | -1.0(3) |
| N(1) -C(2) -C(3) -N(9) | 125.4(2) | C(8) -N(7) -C(6) -C(5) | 177.8(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -C(14) | 69.9(2) | N(1) -C(5) -C(6) -O(6) | 176.0(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) -C(14) | -108.9(2) | C(12) -C(5) -C(6) -O(6) | 56.4(2) |
| O(2) -C(2) -C(3) -C(4) | -175.8(2) | C(13) -C(5) -C(6) -O(6) | -62.7(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) -C(4) | 5.4(1) | N(1) -C(5) -C(6) -N(7) | -2.8(2) |
| C(2) -N(1) -C(4) -C(3) | 5.7(1) | C(12) -C(5) -C(6) -N(7) | -122.4(2) |
| C(5) -N(1) -C(4) -C(3) | 179.0(2) | C(13) -C(5) -C(6) -N(7) | 118.5(2) |
| N(9) -C(3) -C(4) -N(1) | -121.8(2) | C(3) -N(9) -C(10) -O(10) | -5.4(3) |
| C(14) -C(3) -C(4) -N(1) | 107.9(2) | C(3) -N(9) -C(10) -C(11) | 173.8(2) |

TABLA 5. Distancias de enlace (Å) y ángulos (°).

| | | | |
|------------------|---------|-------------------|---------|
| N(7) -H(7) | 0.88(3) | N(9) -H(9) | 0.89(3) |
| C(6) -N(7) -H(7) | 123(2) | C(10) -N(9) -H(9) | 120(2) |
| C(8) -N(7) -H(7) | 114(2) | C(3) -N(9) -H(9) | 117(2) |

TABLA 6. Geometría de enlace de hidrogeno (Å, °).

| D | H | A | D-H | H...A | D...A | D-H...A |
|------|------|-------|---------|---------|----------|---------|
| N(7) | H(7) | O(10) | 0.88(3) | 1.92(3) | 2.766(2) | 160(3) |
| N(9) | H(9) | O(6') | 0.89(3) | 2.00(3) | 2.895(2) | 176(3) |

46a

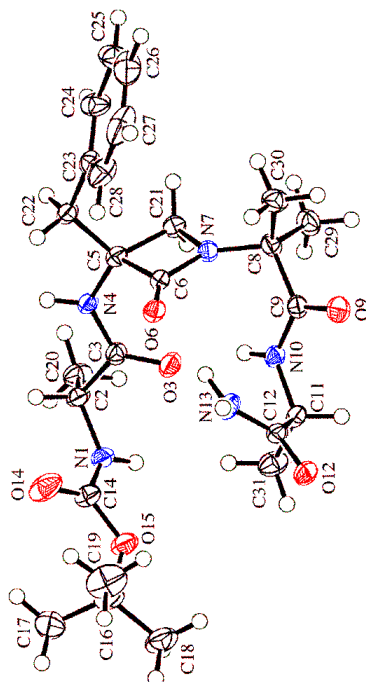


Tabla 1. Datos cristalográficos

| | |
|---|--------------------------------|
| Fórmula empírica | $C_{26}H_{41}N_5O_7$ |
| Peso molecular $[g\ mol^{-1}]$ | 535.64 |
| Dimensiones del cristal $[mm]$ | $0.17 \times 0.17 \times 0.32$ |
| Temperatura $[K]$ | 160(1) |
| Sistema cristalino | monoclinic |
| Grupo | $P2_1$ (#4) |
| Z | 2 |
| Total de reflexiones medidas | 3468 |
| Parámetros de celda unidad a $[\text{\AA}]$ | 9.5901(3) |
| b $[\text{\AA}]$ | 10.9851(3) |
| c $[\text{\AA}]$ | 13.8555(4) |
| α $[\circ]$ | 90 |
| β $[\circ]$ | 96.040(2) |
| γ $[\circ]$ | 90 |
| V $[\text{\AA}^3]$ | 1451.55(7) |
| Total de reflexiones medidas | 31840 |
| Reflexiones simétricas independientes | 3489 |

| | |
|---|---------------|
| Parametros refinados; restricciones | 373; 1 |
| Coefficiente de extincion secundario | 0.072(5) |
| Final Δ_{\max}/σ 0.005 $\Delta\rho$ (max; min) [e Å ⁻³] | 0.27; -0.27 |
| $\sigma(d_{\text{C-C}})$ [Å] | 0.004 – 0.006 |

TABLA 2. Distancias de enlace (Å) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|--------------|----------|--------------|----------|
| O(3) -C(3) | 1.235(3) | C(5) -C(22) | 1.535(4) |
| O(6) -C(6) | 1.216(3) | C(5) -C(6) | 1.544(4) |
| O(9) -C(9) | 1.226(3) | C(5) -C(21) | 1.559(4) |
| O(12) -C(12) | 1.248(3) | C(8) -C(29) | 1.528(4) |
| O(14) -C(14) | 1.216(4) | C(8) -C(30) | 1.534(4) |
| O(15) -C(14) | 1.345(3) | C(8) -C(9) | 1.534(4) |
| O(15) -C(16) | 1.481(3) | C(11) -C(12) | 1.516(4) |
| N(1) -C(14) | 1.339(4) | C(11) -C(31) | 1.526(4) |
| N(1) -C(2) | 1.450(3) | C(16) -C(19) | 1.513(5) |
| N(4) -C(3) | 1.339(4) | C(16) -C(18) | 1.515(5) |
| N(4) -C(5) | 1.448(3) | C(16) -C(17) | 1.516(5) |
| N(7) -C(6) | 1.354(3) | C(22) -C(23) | 1.509(4) |
| N(7) -C(8) | 1.467(3) | C(23) -C(24) | 1.378(4) |
| N(7) -C(21) | 1.481(3) | C(23) -C(28) | 1.389(4) |
| N(10) -C(9) | 1.349(3) | C(24) -C(25) | 1.387(4) |
| N(10) -C(11) | 1.456(3) | C(25) -C(26) | 1.368(6) |
| N(13) -C(12) | 1.319(4) | C(26) -C(27) | 1.373(6) |
| C(2) -C(20) | 1.508(4) | C(27) -C(28) | 1.379(5) |
| C(2) -C(3) | 1.531(4) | O(1) -C(32) | 1.363(5) |

TABLA 3. Ángulos de enlace ($^{\circ}$) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|---------------------|----------|---------------------|----------|
| C(14) -O(15) -C(16) | 120.7(2) | O(9) -C(9) -N(10) | 121.9(2) |
| C(14) -N(1) -C(2) | 121.2(2) | O(9) -C(9) -C(8) | 120.7(2) |
| C(3) -N(4) -C(5) | 123.7(2) | N(10) -C(9) -C(8) | 117.3(2) |
| C(6) -N(7) -C(8) | 132.0(2) | N(10) -C(11) -C(12) | 112.8(2) |
| C(6) -N(7) -C(21) | 95.9(2) | N(10) -C(11) -C(31) | 109.7(2) |
| C(8) -N(7) -C(21) | 132.1(2) | C(12) -C(11) -C(31) | 109.9(2) |
| C(9) -N(10) -C(11) | 119.9(2) | O(12) -C(12) -N(13) | 122.2(3) |
| N(1) -C(2) -C(20) | 109.4(2) | O(12) -C(12) -C(11) | 119.9(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) | 110.1(2) | N(13) -C(12) -C(11) | 117.8(2) |
| C(20) -C(2) -C(3) | 110.4(2) | O(14) -C(14) -N(1) | 124.1(3) |
| O(3) -C(3) -N(4) | 123.3(2) | O(14) -C(14) -O(15) | 124.6(3) |
| O(3) -C(3) -C(2) | 121.2(2) | N(1) -C(14) -O(15) | 111.4(3) |
| N(4) -C(3) -C(2) | 115.4(2) | O(15) -C(16) -C(19) | 110.7(3) |
| N(4) -C(5) -C(22) | 108.5(2) | O(15) -C(16) -C(18) | 102.5(2) |
| N(4) -C(5) -C(6) | 114.9(2) | C(19) -C(16) -C(18) | 111.1(3) |
| C(22) -C(5) -C(6) | 113.7(2) | O(15) -C(16) -C(17) | 109.3(2) |
| N(4) -C(5) -C(21) | 116.4(2) | C(19) -C(16) -C(17) | 112.6(3) |
| C(22) -C(5) -C(21) | 116.6(2) | C(18) -C(16) -C(17) | 110.2(3) |
| C(6) -C(5) -C(21) | 85.5(2) | N(7) -C(21) -C(5) | 86.7(2) |
| O(6) -C(6) -N(7) | 132.8(2) | C(23) -C(22) -C(5) | 115.4(2) |
| O(6) -C(6) -C(5) | 135.3(2) | C(24) -C(23) -C(28) | 118.7(3) |
| N(7) -C(6) -C(5) | 91.9(2) | C(24) -C(23) -C(22) | 120.5(3) |
| N(7) -C(8) -C(29) | 108.3(2) | C(28) -C(23) -C(22) | 120.7(3) |
| N(7) -C(8) -C(30) | 109.2(2) | C(23) -C(24) -C(25) | 120.5(3) |
| C(29) -C(8) -C(30) | 111.4(2) | C(26) -C(25) -C(24) | 120.2(3) |
| N(7) -C(8) -C(9) | 110.7(2) | C(25) -C(26) -C(27) | 119.8(3) |
| C(29) -C(8) -C(9) | 107.8(2) | C(26) -C(27) -C(28) | 120.3(4) |
| C(30) -C(8) -C(9) | 109.4(2) | C(27) -C(28) -C(23) | 120.4(3) |

TABLA 4. Ángulos de torsión (°) con las desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|--------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| C(14) -N(1) -C(2) -C(20) | -153.8(3) | C(29) -C(8) -C(9) -N(10) | -87.9(3) |
| C(14) -N(1) -C(2) -C(3) | 84.8(3) | C(30) -C(8) -C(9) -N(10) | 150.9(2) |
| C(5) -N(4) -C(3) -O(3) | -0.7(4) | C(9) -N(10) -C(11) -C(12) | 67.2(3) |
| C(5) -N(4) -C(3) -C(2) | -178.0(2) | C(9) -N(10) -C(11) -C(31) | -169.9(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) -O(3) | 25.2(4) | N(10) -C(11) -C(12) -O(12) | -158.3(2) |
| C(20) -C(2) -C(3) -O(3) | -95.7(3) | C(31) -C(11) -C(12) -O(12) | 78.9(3) |
| N(1) -C(2) -C(3) -N(4) | -157.4(2) | N(10) -C(11) -C(12) -N(13) | 24.3(3) |
| C(20) -C(2) -C(3) -N(4) | 81.7(3) | C(31) -C(11) -C(12) -N(13) | -98.6(3) |
| C(3) -N(4) -C(5) -C(22) | -168.3(2) | C(2) -N(1) -C(14) -O(14) | 13.7(4) |
| C(3) -N(4) -C(5) -C(6) | -39.7(3) | C(2) -N(1) -C(14) -O(15) | -167.1(2) |
| C(3) -N(4) -C(5) -C(21) | 57.9(3) | C(16) -O(15) -C(14) -O(14) | 11.6(4) |
| C(8) -N(7) -C(6) -O(6) | -2.7(5) | C(16) -O(15) -C(14) -N(1) | -167.5(2) |
| C(21) -N(7) -C(6) -O(6) | 179.1(3) | C(14) -O(15) -C(16) -C(19) | -62.2(4) |
| C(8) -N(7) -C(6) -C(5) | 176.3(3) | C(14) -O(15) -C(16) -C(18) | 179.2(3) |
| C(21) -N(7) -C(6) -C(5) | -2.0(2) | C(14) -O(15) -C(16) -C(17) | 62.3(3) |
| N(4) -C(5) -C(6) -O(6) | -62.2(4) | C(6) -N(7) -C(21) -C(5) | 2.0(2) |
| C(22) -C(5) -C(6) -O(6) | 63.7(4) | C(8) -N(7) -C(21) -C(5) | -176.3(3) |
| C(21) -C(5) -C(6) -O(6) | -179.2(3) | N(4) -C(5) -C(21) -N(7) | -117.3(2) |
| N(4) -C(5) -C(6) -N(7) | 118.9(2) | C(22) -C(5) -C(21) -N(7) | 112.6(2) |
| C(22) -C(5) -C(6) -N(7) | -115.2(2) | C(6) -C(5) -C(21) -N(7) | -1.7(2) |
| C(21) -C(5) -C(6) -N(7) | 1.9(2) | N(4) -C(5) -C(22) -C(23) | 178.2(2) |
| C(6) -N(7) -C(8) -C(29) | 165.0(3) | C(6) -C(5) -C(22) -C(23) | 49.0(3) |
| C(21) -N(7) -C(8) -C(29) | -17.4(4) | C(21) -C(5) -C(22) -C(23) | -48.1(3) |
| C(6) -N(7) -C(8) -C(30) | -73.5(3) | C(5) -C(22) -C(23) -C(24) | 102.5(3) |
| C(21) -N(7) -C(8) -C(30) | 104.1(3) | C(5) -C(22) -C(23) -C(28) | -80.4(3) |
| C(6) -N(7) -C(8) -C(9) | 47.0(4) | C(28) -C(23) -C(24) -C(25) | 0.9(4) |
| C(21) -N(7) -C(8) -C(9) | -135.3(3) | C(22) -C(23) -C(24) -C(25) | 178.0(3) |
| C(11) -N(10) -C(9) -O(9) | 5.0(4) | C(23) -C(24) -C(25) -C(26) | 0.3(5) |
| C(11) -N(10) -C(9) -C(8) | -177.8(2) | C(24) -C(25) -C(26) -C(27) | -0.9(5) |
| N(7) -C(8) -C(9) -O(9) | -152.4(3) | C(25) -C(26) -C(27) -C(28) | 0.3(5) |
| C(29) -C(8) -C(9) -O(9) | 89.3(3) | C(26) -C(27) -C(28) -C(23) | 0.9(5) |
| C(30) -C(8) -C(9) -O(9) | -31.9(4) | C(24) -C(23) -C(28) -C(27) | -1.5(4) |

TABLA 5. Distancias de enlace (Å) y ángulos (°).

| | | | |
|--------------------|---------|----------------------|---------|
| N(1) -H(1) | 0.89(4) | N(13) -H(131) | 1.00(4) |
| N(4) -H(4) | 0.91(3) | N(13) -H(132) | 0.99(4) |
| N(10) -H(10) | 0.85(3) | O(1) -H(111) | 0.84 |
| C(14) -N(1) -H(1) | 123(2) | C(11) -N(10) -H(10) | 120(2) |
| C(2) -N(1) -H(1) | 113(2) | C(12) -N(13) -H(131) | 118(2) |
| C(3) -N(4) -H(4) | 119(2) | C(12) -N(13) -H(132) | 124(3) |
| C(5) -N(4) -H(4) | 117(2) | H(131)-N(13) -H(132) | 115(4) |
| C(9) -N(10) -H(10) | 119(2) | C(32) -O(1) -H(111) | 110 |

TABLA 6. Geometría del enlace de hidrógeno (Å, °).

| D | H | A | D-H | H...A | D...A | D-H...A |
|-------|---------|--------------------------|---------|---------|----------|---------|
| N(1) | -H(1) | ...O(12 ⁱ) | 0.89(4) | 2.17(4) | 3.044(3) | 166(3) |
| N(4) | -H(4) | ...O(12 ⁱⁱ) | 0.91(3) | 1.95(3) | 2.859(3) | 174(3) |
| N(10) | -H(10) | ...O(3) | 0.85(3) | 2.07(3) | 2.902(3) | 167(2) |
| N(13) | -H(131) | ...O(15 ⁱⁱⁱ) | 1.00(4) | 2.15(4) | 3.076(3) | 154(3) |
| N(13) | -H(132) | ...O(6) | 0.99(4) | 1.87(4) | 2.850(3) | 168(5) |
| O(1) | -H(111) | ...O(14 ^{iv}) | 0.84 | 1.93 | 2.766(4) | 176 |

46d

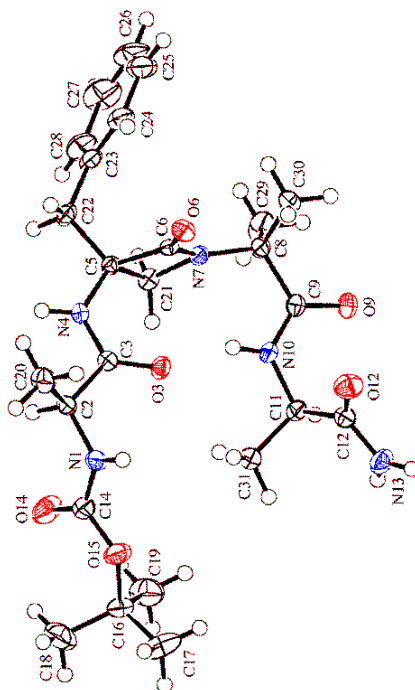


Tabla 1: Datos cristalográficos

| | |
|---|---|
| Fórmula empírica | C ₂₅ H ₃₉ N ₅ O ₇ |
| Peso molecular [g mol ⁻¹] | 521.61 |
| Dimensiones de cristal [mm] | 0.10 × 0.20 × 0.25 |
| Temperatura [K] | 160(1) |
| Sistema cristalino | monoclínico |
| Grupo | <i>P</i> 2 ₁ (#4) |
| <i>Z</i> | 2 |
| Reflexiones para la determinación de la celda | 4335 |
| Parámetros de la celda unidad | |
| <i>a</i> [Å] | 10.4604(2) |
| <i>b</i> [Å] | 9.9778(2) |
| <i>c</i> [Å] | 14.1658(3) |
| α [°] | 90 |
| β [°] | 106.443(1) |
| γ [°] | 90 |
| <i>V</i> [Å ³] | 1418.04(5) |
| Scan type | ϕ and ω |

| | |
|--|--------|
| Total de reflexiones medidas | 41323 |
| Simetría de reflexiones independientes | 4378 |
| Reflexiones y refinamiento | 4373 |
| Parámetros refinados, restricciones | 369; 1 |

TABLA 2. Distancias de enlace (Å) con desviaciones standard entra paréntesis.

| | | | |
|--------------|----------|--------------|----------|
| O(3) -C(3) | 1.224(2) | C(5) -C(22) | 1.534(3) |
| O(6) -C(6) | 1.214(3) | C(5) -C(6) | 1.546(3) |
| O(9) -C(9) | 1.236(3) | C(5) -C(21) | 1.566(3) |
| O(12) -C(12) | 1.229(3) | C(8) -C(30) | 1.531(4) |
| O(14) -C(14) | 1.218(3) | C(8) -C(29) | 1.533(4) |
| O(15) -C(14) | 1.353(3) | C(8) -C(9) | 1.546(3) |
| O(15) -C(16) | 1.475(3) | C(11) -C(31) | 1.526(3) |
| N(1) -C(14) | 1.332(3) | C(11) -C(12) | 1.540(3) |
| N(1) -C(2) | 1.449(3) | C(16) -C(19) | 1.512(5) |
| N(4) -C(3) | 1.343(3) | C(16) -C(18) | 1.524(4) |
| N(4) -C(5) | 1.447(3) | C(16) -C(17) | 1.525(5) |
| N(7) -C(6) | 1.354(3) | C(22) -C(23) | 1.506(3) |
| N(7) -C(8) | 1.464(3) | C(23) -C(28) | 1.381(4) |
| N(7) -C(21) | 1.481(3) | C(23) -C(24) | 1.389(4) |
| N(10) -C(9) | 1.322(3) | C(24) -C(25) | 1.390(4) |
| N(10) -C(11) | 1.465(3) | C(25) -C(26) | 1.371(5) |
| N(13) -C(12) | 1.332(3) | C(26) -C(27) | 1.370(6) |
| C(2) -C(20) | 1.524(3) | C(27) -C(28) | 1.397(5) |
| C(2) -C(3) | 1.531(3) | | |

TABLA 3. Ángulos de enlace (°) con desviaciones standard entra paréntesis.

| | | | |
|---------------------|----------|---------------------|----------|
| C(14) -O(15) -C(16) | 120.1(2) | O(9) -C(9) -N(10) | 123.1(2) |
| C(14) -N(1) -C(2) | 121.4(2) | O(9) -C(9) -C(8) | 118.7(2) |
| C(3) -N(4) -C(5) | 122.8(2) | N(10) -C(9) -C(8) | 118.2(2) |
| C(6) -N(7) -C(8) | 133.9(2) | N(10) -C(11) -C(31) | 109.9(2) |
| C(6) -N(7) -C(21) | 95.7(2) | N(10) -C(11) -C(12) | 112.0(2) |
| C(8) -N(7) -C(21) | 130.4(2) | C(31) -C(11) -C(12) | 110.8(2) |

| | | | |
|--------------------|----------|---------------------|----------|
| C(9) -N(10) -C(11) | 121.0(2) | O(12) -C(12) -N(13) | 123.8(2) |
| N(1) -C(2) -C(20) | 110.9(2) | O(12) -C(12) -C(11) | 123.2(2) |
| N(1) -C(2) -C(3) | 110.8(2) | N(13) -C(12) -C(11) | 113.0(2) |
| C(20) -C(2) -C(3) | 110.1(2) | O(14) -C(14) -N(1) | 124.8(2) |
| O(3) -C(3) -N(4) | 123.5(2) | O(14) -C(14) -O(15) | 124.9(2) |
| O(3) -C(3) -C(2) | 122.6(2) | N(1) -C(14) -O(15) | 110.3(2) |
| N(4) -C(3) -C(2) | 113.9(2) | O(15) -C(16) -C(19) | 108.9(2) |
| N(4) -C(5) -C(22) | 107.1(2) | O(15) -C(16) -C(18) | 111.6(2) |
| N(4) -C(5) -C(6) | 115.5(2) | C(19) -C(16) -C(18) | 111.9(3) |
| C(22) -C(5) -C(6) | 114.5(2) | O(15) -C(16) -C(17) | 101.8(3) |
| N(4) -C(5) -C(21) | 118.3(2) | C(19) -C(16) -C(17) | 111.9(3) |
| C(22) -C(5) -C(21) | 115.6(2) | C(18) -C(16) -C(17) | 110.4(3) |
| C(6) -C(5) -C(21) | 85.0(2) | N(7) -C(21) -C(5) | 86.7(2) |
| O(6) -C(6) -N(7) | 133.8(2) | C(23) -C(22) -C(5) | 115.5(2) |
| O(6) -C(6) -C(5) | 134.1(2) | C(28) -C(23) -C(24) | 118.0(2) |
| N(7) -C(6) -C(5) | 92.1(2) | C(28) -C(23) -C(22) | 121.2(3) |
| N(7) -C(8) -C(30) | 109.8(2) | C(24) -C(23) -C(22) | 120.8(2) |
| N(7) -C(8) -C(29) | 108.2(2) | C(23) -C(24) -C(25) | 120.9(3) |
| C(30) -C(8) -C(29) | 110.4(2) | C(26) -C(25) -C(24) | 120.5(3) |
| N(7) -C(8) -C(9) | 112.1(2) | C(27) -C(26) -C(25) | 119.3(3) |
| C(30) -C(8) -C(9) | 108.8(2) | C(26) -C(27) -C(28) | 120.5(3) |
| C(29) -C(8) -C(9) | 107.5(2) | C(23) -C(28) -C(27) | 120.8(3) |

TABLA 4. Ángulos de torsion (°) con desviaciones standard entre paréntesis.

| | | | |
|--------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| C(14) -N(1) -C(2) -C(20) | 129.5(2) | C(30) -C(8) -C(9) -N(10) | 119.1(2) |
| C(14) -N(1) -C(2) -C(3) | -107.9(2) | C(29) -C(8) -C(9) -N(10) | -121.4(2) |
| C(5) -N(4) -C(3) -O(3) | 0.3(3) | C(9) -N(10) -C(11) -C(31) | -161.2(3) |
| C(5) -N(4) -C(3) -C(2) | 178.6(2) | C(9) -N(10) -C(11) -C(12) | 75.1(3) |
| N(1) -C(2) -C(3) -O(3) | -14.5(3) | N(10) -C(11) -C(12) -O(12) | 19.5(3) |
| C(20) -C(2) -C(3) -O(3) | 108.5(2) | C(31) -C(11) -C(12) -O(12) | -103.6(3) |
| N(1) -C(2) -C(3) -N(4) | 167.2(2) | N(10) -C(11) -C(12) -N(13) | -162.0(2) |
| C(20) -C(2) -C(3) -N(4) | -69.8(2) | C(31) -C(11) -C(12) -N(13) | 74.9(3) |
| C(3) -N(4) -C(5) -C(22) | -169.4(2) | C(2) -N(1) -C(14) -O(14) | -0.7(4) |
| C(3) -N(4) -C(5) -C(6) | -40.6(3) | C(2) -N(1) -C(14) -O(15) | 179.8(2) |

| | | | | | | | | | |
|-------|--------|-------|--------|-----------|-------|--------|--------|--------|-----------|
| C(3) | -N(4) | -C(5) | -C(21) | 57.8(3) | C(16) | -O(15) | -C(14) | -O(14) | 13.1(4) |
| C(8) | -N(7) | -C(6) | -O(6) | -0.5(4) | C(16) | -O(15) | -C(14) | -N(1) | -167.4(2) |
| C(21) | -N(7) | -C(6) | -O(6) | 176.3(2) | C(14) | -O(15) | -C(16) | -C(19) | 63.0(3) |
| C(8) | -N(7) | -C(6) | -C(5) | 178.1(2) | C(14) | -O(15) | -C(16) | -C(18) | -61.0(4) |
| C(21) | -N(7) | -C(6) | -C(5) | -5.1(2) | C(14) | -O(15) | -C(16) | -C(17) | -178.7(3) |
| N(4) | -C(5) | -C(6) | -O(6) | -57.5(3) | C(6) | -N(7) | -C(21) | -C(5) | 5.1(2) |
| C(22) | -C(5) | -C(6) | -O(6) | 67.6(3) | C(8) | -N(7) | -C(21) | -C(5) | -178.0(2) |
| C(21) | -C(5) | -C(6) | -O(6) | -176.6(2) | N(4) | -C(5) | -C(21) | -N(7) | -120.7(2) |
| N(4) | -C(5) | -C(6) | -N(7) | 123.9(2) | C(22) | -C(5) | -C(21) | -N(7) | 110.3(2) |
| C(22) | -C(5) | -C(6) | -N(7) | -111.0(2) | C(6) | -C(5) | -C(21) | -N(7) | -4.4(1) |
| C(21) | -C(5) | -C(6) | -N(7) | 4.8(2) | N(4) | -C(5) | -C(22) | -C(23) | 178.0(2) |
| C(6) | -N(7) | -C(8) | -C(30) | -25.6(3) | C(6) | -C(5) | -C(22) | -C(23) | 48.7(3) |
| C(21) | -N(7) | -C(8) | -C(30) | 158.6(2) | C(21) | -C(5) | -C(22) | -C(23) | -47.8(3) |
| C(6) | -N(7) | -C(8) | -C(29) | -146.2(3) | C(5) | -C(22) | -C(23) | -C(28) | 99.4(3) |
| C(21) | -N(7) | -C(8) | -C(29) | 38.1(3) | C(5) | -C(22) | -C(23) | -C(24) | -82.1(3) |
| C(6) | -N(7) | -C(8) | -C(9) | 95.4(3) | C(28) | -C(23) | -C(24) | -C(25) | 0.0(4) |
| C(21) | -N(7) | -C(8) | -C(9) | -80.3(3) | C(22) | -C(23) | -C(24) | -C(25) | -178.6(2) |
| C(11) | -N(10) | -C(9) | -O(9) | -8.0(4) | C(23) | -C(24) | -C(25) | -C(26) | 1.0(4) |
| C(11) | -N(10) | -C(9) | -C(8) | 170.9(2) | C(24) | -C(25) | -C(26) | -C(27) | -0.8(5) |
| N(7) | -C(8) | -C(9) | -O(9) | 176.4(2) | C(25) | -C(26) | -C(27) | -C(28) | -0.3(5) |
| C(30) | -C(8) | -C(9) | -O(9) | -62.0(3) | C(24) | -C(23) | -C(28) | -C(27) | -1.0(4) |
| C(29) | -C(8) | -C(9) | -O(9) | 57.5(3) | C(22) | -C(23) | -C(28) | -C(27) | 177.5(3) |
| N(7) | -C(8) | -C(9) | -N(10) | -2.5(3) | C(26) | -C(27) | -C(28) | -C(23) | 1.2(5) |

TABLA 5. Distancias de enlace (Å) y ángulos (°).

| | | | | | | | |
|-------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|
| N(1) | -H(1) | 0.82(4) | N(13) | -H(132) | 0.89(4) | | |
| N(4) | -H(4) | 0.91(2) | O(1) | -H(11) | 0.86(5) | | |
| N(10) | -H(10) | 0.92(3) | O(1) | -H(12) | 0.99(7) | | |
| N(13) | -H(131) | 0.87(4) | | | | | |
| C(14) | -N(1) | -H(1) | 120(2) | C(11) | -N(10) | -H(10) | 121(2) |
| C(2) | -N(1) | -H(1) | 118(2) | C(12) | -N(13) | -H(131) | 117(2) |
| C(3) | -N(4) | -H(4) | 123(2) | C(12) | -N(13) | -H(132) | 131(3) |
| C(5) | -N(4) | -H(4) | 114(2) | H(131) | -N(13) | -H(132) | 111(3) |
| C(9) | -N(10) | -H(10) | 118(2) | H(11) | -O(1) | -H(12) | 106(4) |

TABLA 6. Geometría de los enlaces de hidrógeno (Å, °).

| D | H | A | D-H | H...A | D...A | D-H...A |
|-------|---------|-------------------------|---------|---------|----------|---------|
| O(1) | -H(11) | ...O(12 ⁱ) | 0.86(5) | 2.02(5) | 2.792(3) | 148(4) |
| O(1) | -H(12) | ...O(9 ⁱ) | 0.99(7) | 2.08(6) | 2.892(3) | 139(5) |
| N(1) | -H(1) | ...O(9 ⁱⁱ) | 0.82(4) | 2.13(4) | 2.921(3) | 163(3) |
| N(4) | -H(4) | ...O(1) | 0.91(2) | 1.95(2) | 2.857(2) | 174(2) |
| N(10) | -H(10) | ...O(3) | 0.92(3) | 1.97(3) | 2.856(2) | 159(3) |
| N(13) | -H(131) | ...O(6 ⁱⁱⁱ) | 0.87(4) | 2.07(4) | 2.932(3) | 173(3) |
| N(13) | -H(132) | ...O(14 ^{iv}) | 0.89(4) | 2.07(4) | 2.908(3) | 156(3) |

