



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

TESIS DE DOCTORADO

**“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS DE
QUÍMICA ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA PARA LA
GENERACIÓN DE ALTA DIVERSIDAD MOLECULAR”**

PRESENTADA POR PATRICIA G. CORNIER

ROSARIO, ARGENTINA

2013



**“Desarrollo y Aplicación de Metodologías de Química
Orgánica en Fase Sólida para la Generación de Alta Diversidad
Molecular”**

Patricia G. Cornier

Farmacéutica, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Química Medicinal (Departamento de Química Orgánica), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 2007 y 2012, bajo la dirección de Ernesto G. Mata.

Dr. Ernesto G. Mata, Director.....

Dra. Dora B. Boggian, co-Directora.....

Dra. Celina Lamas.....

Dr. Ricardo Daniel Enriz.....

Dr. Luis Bruno Blanch.....

Defendida: 19/04/2013

A MARCE Y FRAN

*AGRADEZCO AL DR. ERNESTO MATA
POR HABERME DADO LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ESTE TRABAJO DE TESIS,
POR HABER DEPOSITADO SU CONFIANZA EN MÍ, POR GUIARME, INSTRUIRME Y
ALENTARME EN EL MUNDO DE LA QUÍMICA CON LA MEJOR DISPOSICIÓN Y PACIENCIA.*

*A LA DRA. DORA. BOGGIAN,
POR SU APOYO, COLABORACIÓN Y CONSEJOS TANTO EN EL
ÁMBITO DE LA QUÍMICA COMO EN EL DE LA VIDA, POR ESTAR SIEMPRE
DISPUESTA A ESCUCHARME Y ACOMPAÑARME EN EL DÍA A DÍA.*

*AGRADEZCO TAMBIÉN A LA DRA. CARINA DELPICCOLO,
POR LA IMPORTANTE Y VALIOSA COLABORACIÓN EN LOS DESAFÍOS QUE SE
FUERON PRESENTANDO, POR HABERME BRINDADO GENEROSAMENTE
SUS CONOCIMIENTOS, SU AYUDA Y SU TIEMPO
CON LA MEJOR DISPOSICIÓN Y CON SU PEDAGOGÍA ÚNICA Y PERSONAL.*



AGRADECIMIENTOS

En este espacio quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido y compartido este período de formación, en especial:

- ☉ A todos y cada uno de los integrantes del Grupo "Fase Sólida", los que están y los que alguna vez pasaron por el lab, especialmente a Nabú, Lu, Hernán, Carla, Noe, Florencia, Paulita, Agustina, Elisandro, un grupo de gente formidable que me ha recibido y acompañado en este período, tanto en los días buenos como en los malos, haciendo del lugar de trabajo casi una familia.
- ☉ A los integrantes del IQUIR con los que he compartido tantos buenos momentos, horas de estudio y trabajos, a los que me han brindado sus conocimientos, consejos y su ayuda desinteresada.... especialmente a Marcela, Valeria, Celeste, Marta, Andrea, "Davides", Germán y Esteban.
- ☉ A Manuel, Pablo y Sergio por todo lo relacionado al RMN, por la colaboración brindada, por responder a mis dudas y tenerme paciencia.
- ☉ A la Dra. Roguín y su grupo de trabajo, por haber realizado los ensayos de actividad antiproliferativa.
- ☉ Al Dr. Guillermo Labadie y al Dr. Sebastian Testero por tener la gentileza de colaborar en los estudios de actividad biológica.
- ☉ A Conicet, ANPCyT, y UNR por haber colaborado en el financiamiento para desarrollar esta tesis.
- ☉ A Marce, por quererme y apoyarme día a día, por darme miles de razones para ser feliz y por construir conmigo una hermosa familia junto a nuestro tesoro...Fran.
- ☉ A mi hermano Norberto y su familia, a mi mamá y abuelos.... la gran familia que ha contribuido en parte a lo que hoy soy y con la que siempre contaré.
- ☉ A mis amigas, especialmente a Vero y a Clau, que han estado presente, compartiendo logros y fracasos, y que me han ayudado a seguir adelante en el camino de la vida.

Parte de este trabajo de Tesis ha dado lugar a la siguiente publicación:

- ④ “Solid-phase based synthesis of biologically promising triazolyl aminoacyl (peptidyl) penicillins”.
Patricia G. Cornier, Dora B. Boggián, Ernesto G. Mata y Carina M.L. Delpiccolo. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53 (6), 8, 632-636.

Parte de este trabajo de Tesis ha dado lugar a la siguiente patente:

- ④ P20120104445, presentada el 27/11/2012.
Titulo: "Síntesis en fase sólida de una biblioteca triazolilpeptidilpenicilinas con actividad antitumoral".
Inventores: Dora Boggian; Ernesto Mata; Leonor Roguin; Patricia Cornier; Carina Delpiccolo; Viviana Blank.
Titulares: CONICET/ UBA/ UNR.

Presentaciones a Congresos

- ④ “ESTUDIO DE LA CICLOADICIÓN 1,3 DIPOLAR EN FASE SÓLIDA PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PENICILINAS DE INTERÉS BIOLÓGICO”
Cornier, P.G.; Delpiccolo, C. M. L.; Boggián, D.B.; Mata, E. G.; Cárdenas, M.G.; Roguin, L.P.
Póster presentado en el XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica. Carlos Paz, noviembre de 2011.
- ④ “APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE QUÍMICA “CLICK” EN LA SÍNTESIS DE DERIVADOS PENICILÁNICOS CONJUGADOS, CON EL OBJETIVO DE MEJORAR Y AMPLIAR SU POTENCIALIDAD BIOLÓGICA”
Cornier, P.G.; Delpiccolo, M.; Mata, E. G.
Presentación oral en el 4to Workshop de Química Medicinal, Lanús, septiembre de 2010.

- ④ “ β -LACTAMS AND THEIR POTENTIAL USE AS ANTICANCER DRUG”
Cornier, P.G.; Boggían, D.B.; Cárdenas, M.G.; Roguin, L.P
Póster presentado en 1ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA), Córdoba, Junio 2010.

- ④ “SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 2 β -METIL PENICILINAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA”
Cornier, P.G.; Boggían, D.B.; Mata, E.G.; Cárdenas, M.G.; Roguin, L.P
Póster presentado en el XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, Mendoza, noviembre de 2009.

- ④ “REACCIÓN DE PETASIS DE TRES COMPONENTES. APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE PROMETEDORES”
Cornier, P.G.; Boggían, D.B.; Mata, E. G.
Póster presentado en el XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, Mendoza, noviembre de 2009.

- ④ “APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS DE QUÍMICA EN SOLUCIÓN Y FASE SÓLIDA DIRIGIDAS AL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS BETA-LACTÁMICAS DE INTERÉS BIOLÓGICO”
Cornier, Patricia G.; Boggían, Dora B. y Mata, Ernesto G.
Póster presentado en el 3er Workshop Argentino de Química Medicinal, Los Cocos, Córdoba, Noviembre de 2008.

Durante este trabajo de Tesis también se invirtió tiempo en trabajos que dieron lugar a la siguiente publicación:

- ④ "Trabajos Prácticos de Química Medicinal." Ernesto G. Mata, María d.I.A. Laborde, Dora B. Bogian, Luciana Mendez, Andrés A. Poeylaut-Palena y Patricia G. Cornier. ISBN: 978-950-673-948-5. UNR Editora (2012).



ÍNDICE

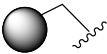
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XV
ÍNDICE	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. QUÍMICA MEDICINAL Y DESARROLLO DE FÁRMACOS	3
1.2. QUÍMICA COMBINATORIA EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS	6
1.2.1 SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA	8
1.2.2 SOPORTES SÓLIDOS	10
1.2.3 SÍNTESIS ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS	15
2. OBJETIVOS Y PLANEAMIENTO DE LA SÍNTESIS	17
2.1. OBJETIVOS GENERALES	19
2.1.1. FUNCIONALIZACIÓN DE MONOBACTAMAS MEDIANTE REACCIÓN DE PETASIS	19
2.1.2. DIVERSIFICACIÓN DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: FUNCIONALIZACIÓN DE MONOBACTAMAS MEDIANTE REACCIÓN DE PETASIS	23
3.1. REACCIÓN DE PETASIS	25
3.2. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE PETASIS	31
3.2.1. Estudio de la reacción de multicomponentes de petasis en solución aplicada a aminas secundarias	31
3.2.2. Estudio de la reacción de multicomponentes de petasis en solución, aplicada a aminas primarias	36
3.2.3. Aplicación de la reacción de petasis para la generación de bibliotecas de β -lactamas monocíclicas por química en fase sólida	37
3.2.4. Comparación de la eficiencia de la reacción de petasis en fase sólida y en solución	44
3.2.5. Síntesis en fase sólida de una biblioteca de β -lactamas monocíclicas altamente funcionalizadas	46
3.2.6. Observación de isómeros debido a la interconversión lenta de rotámeros	52
3.3. CONCLUSIONES	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: DIVERSIFICACIÓN DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR	57

4.1. INTRODUCCIÓN	59
4.2 .DIVERSIFICACIÓN DEL NÚCLEO PENAM DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR	63
4.2.1. Estudio de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar en solución	63
4.2.2. Pruebas de acoplamiento peptídicos en fase sólida	63
4.2.3. Optimización de la cicloadición 1,3 dipolar en fase sólida	65
4.2.4. Síntesis de una biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas en fase sólida	70
4.2.5. Cicloadición 1,3 dipolar catalizada por rutenio	73
4.2.6. Evaluación de actividad biológica	77
4.2.6.1. Actividad antibacteriana	77
4.2.6.2. Actividad antiproliferativa	79
4.3. CONCLUSIONES	89
5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	91
5.1. CONSIDERACIONES GENERALES	93
5.2. INSTRUMENTAL	93
5.3. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA	94
5.3.1. Metodología general para el desarrollo de la síntesis en fase sólida	94
5.3.2. Ensayo de cloranilo en soporte polimérico	95
5.3.3. Test de Kaiser en soporte polimérico	95
5.4. TÉCNICAS DE LABORATORIO REALIZADAS	96
5.4.1. Procedimiento general para la separación de compuestos unidos a resina de Wang	96
5.4.2. Procedimiento general para la esterificación de ácidos con diazometano o trimetilsilildiazometano (TMS- diazometano)	96
5.4.3. Procedimiento general para la desprotección del grupo amina en Fmoc-AA-resina de Wang	97
5.5. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	97
5.5.1. Secuencia sintética para la preparación de β -lactamas en fase sólida, utilizando la reacción de Petasis	97
5.5.1.a. Preparación del cloruro de ácido 19	97
5.5.1.b.Desprotección de Fmoc-glicina-resina de Wang	98
5.5.1.c. Procedimiento para la formación de imina 22	98

5.5.1.d. Procedimiento para la formación de la β -lactama 23 (reacción de Staudinger)	98
5.5.1.e. Desprotección del grupo Fmoc de la resina 23	99
5.5.1.f. Obtención de la β -lactama (25) en fase sólida, utilizando la reacción de Petasis	99
5.5.1.g. Obtención de la β -lactama 26 y/o 27	100
5.5.1.h. Síntesis y caracterización de la biblioteca de β -lactamas monocíclicas obtenidas por reacción de Petasis. Compuestos metilados	100
5.5.1.i. Síntesis y caracterización de la biblioteca de β -lactamas monocíclicas obtenidas por reacción de Petasis. Ácidos libres.	106
5.5.2. Secuencia sintética para la preparación de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas en fase sólida	118
5.5.2.a. Preparación de la azidometilpenicilina 35	118
5.5.2.a.1. Síntesis del alcohol 43	118
5.5.2.a.2. Síntesis del Tosilato 44	119
5.5.2.a.3. Síntesis de la azida 35	119
5.5.2.b. Procedimiento general de acoplamiento peptídico	120
5.5.2.c. Obtención de N-propiolil aminoácidos	120
5.5.2.d. Obtención de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas mediante cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre	121
5.5.2.e. Obtención de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas 46 y/o 47	122
5.5.2.f. Síntesis y caracterización de los compuestos correspondientes a la biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas en fase sólida	122
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	137
7. ESPECTROS SELECCIONADOS	145
8. REFERENCIAS	165



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

	Resina
AA	Aminoácido
Ala	Alanina
AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	ácido acético
ArH	Protones aromáticos
Bn	Bencilo
calc.	Calculado
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CITs	Cloruro de tosilo
CO	Carbonilo
cuant.	Cuantitativo
d	Doblete
DCM	Diclorometano
dd	Doble Doblete
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doble Triplete
EDC.HCl	Clorhidrato de <i>N</i> -(3 Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EEDQ	2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina
equiv.	Equivalente/s
Et-	Etilo
EtOH	Etanol
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Gly	Glicina

h	Hora/s
HF	Ácido fluorhídrico
HBTU	Hexafluorofosfato O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOBt	Hidrato de 1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrometría de Masa de Alta Resolución
Ile	Isoleucina
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Leu	Leucina
m	Multiplete
Me	Metilo
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
Met	Metionina
NR	No se produjo la reacción
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
ppm	partes por millón
Pro	Prolina
PS	Poliestireno
q	Cuarteto
REA	Relación estructura-actividad
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rto	Rendimiento
s	Singlete
SPOS	Síntesis Orgánica en Fase Sólida (de sus siglas en idioma inglés)
T°	Temperatura
t	Triplete

t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
v/v	Concentración porcentual volumen en volumen
δ	Desplazamiento químico
λ :	Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

1

*"THE LARGER THE ISLAND OF KNOWLEDGE,
THE LONGER THE SHORELINE OF MYSTERY."*



1.1. QUÍMICA MEDICINAL Y DESARROLLO DE FÁRMACOS

La Química Medicinal es la ciencia que se ocupa del descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de un compuesto biológicamente activo a nivel molecular. El interés no se restringe solo a fármacos, sino que también se dedica al estudio, identificación y síntesis de productos metabólicos de esas drogas y compuestos relacionados.¹

Se puede definir a la Química Medicinal como un área de investigación interdisciplinaria ya que se nutre de conocimientos de diferentes disciplinas como la Química Orgánica, la Química Computacional, la Biología Molecular, la Farmacología, Microbiología, entre otras, para desarrollar nuevos y mejores fármacos. En los últimos tiempos, la Química Medicinal ha experimentado un cambio revolucionario. Los grandes avances en las ciencias biológicas han ocasionado una mejor comprensión de cómo funciona el cuerpo humano tanto a nivel celular, como molecular, y como resultado de esto, muchos proyectos de investigación de la industria farmacéutica y de la universidades, comienzan por identificar una biomacromolécula objetivo y diseñar posteriormente un fármaco que interactúe con ella.² El conocimiento y comprensión de la estructura y la función de tales biomacromoléculas, tanto como el mecanismo por el cual interactúa con potenciales fármacos, es crucial para este enfoque. Otras áreas que han contribuido al gran desarrollo de la Química Medicinal son la Genómica y Proteómica, que permiten conocer la estructura y la función de los genes y de las proteínas por ellos codificadas.³ Por otro lado, la robotización, automatización y miniaturización de una amplia gama de ensayos *in vitro* ha conducido al desarrollo de ensayos biológicos de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*). Además, para facilitar el diseño racional de nuevos fármacos, cada vez se hace más indispensable la necesidad de aplicar estudios estructurales y computacionales para obtener resultados de relación estructura-actividad (REA), así como analizar el modelo de interacción molécula-objetivo biológico (*docking*). Finalmente, la paulatina introducción de la nanotecnología está produciendo un refinamiento constante de la metodología de síntesis y administración de potenciales fármacos.

En este contexto, durante los años 90, surgió la Química Combinatoria⁴ como respuesta a la gran demanda de nuevos compuestos planteada por la industria farmacéutica, generada por el descubrimiento de un número elevado de objetivos terapéuticos y la automatización de los ensayos para la detección de compuestos con propiedades biológicas.

La investigación sobre nuevas moléculas que amplíen el potencial terapéutico disponible en clínica es una exigencia actual y urgente para muchas patologías. A pesar de los avances producidos, existen numerosas enfermedades que no tienen una terapéutica efectiva, mientras que en otros casos, fenómenos de resistencia o de sensibilidad han cuestionado la que se ha venido utilizando. Son ejemplos las enfermedades neurodegenerativas y las asociadas al cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias o infecciosas.

El proceso de descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo, complejo, costoso y arriesgado. En general podemos distinguir tres fases principales: Descubrimiento, Diseño y Desarrollo (**Figura 1**).



Figura 1

Cada fase presenta diferentes etapas, las cuales pueden llevarse a cabo simultáneamente, pero son, en general, dependientes unas de otras. Por ejemplo, las pruebas preclínicas generalmente se desarrollan en paralelo con el diseño del proceso de manufactura. Aún así, el descubrimiento, diseño y desarrollo de una nueva droga puede tardar quince o más años, involucrando la síntesis de aproximadamente 10.000 compuestos y costar alrededor de 800 millones de dólares.⁵ Asimismo, hay que tener en cuenta que únicamente 3 de

cada 10 fármacos comercializados recuperan la inversión realizada en su etapa de investigación y desarrollo (I+D). Cada día perdido en el proceso de búsqueda de fármacos no sólo genera pérdidas millonarias a las compañías farmacéuticas, sino que trasciende lo económico, ya que el acceso más rápido a nuevos fármacos es un instrumento para mejorar la calidad de vida de la población. Por todo esto es necesario acelerar al máximo posible el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas bioactivas.⁶

Una vez que se ha seleccionado un objetivo terapéutico, el siguiente paso es identificar una droga adecuada para tal objetivo. Para esto es importante conocer que biomacromoléculas están involucradas en esa particular patología, para así identificar si se deben diseñar agonistas, antagonistas o inhibidores de un receptor o enzima en particular. Para encontrar una droga adecuada se sintetizan un gran número de compuestos y se evalúa la actividad biológica de cada uno de ellos con apropiados bioensayos. Esta etapa ha logrado grandes avances gracias a la química combinatoria y a los métodos de HTS. Con los resultados de la evaluación biológica, se seleccionan los compuestos que presentan la actividad farmacológica deseada, también llamados "líderes" y se descartan los inactivos.

Un compuesto líder es una sustancia dotada de la actividad biológica o farmacológica deseada, pero también puede poseer propiedades inconvenientes, tales como alta toxicidad, insolubilidad y efectos biológicos secundarios y/o perjudiciales. La optimización de dicho compuesto líder, a través de transformaciones químicas (modificaciones sintéticas) que eliminan esas características indeseables y mejoren las beneficiosas, conduce a la obtención de un "compuesto candidato" que es aquel seleccionado para la siguiente etapa del proceso.

La etapa de desarrollo, incluye los últimos pasos a llevar a cabo, antes de que una droga prometedora pueda ser comercializada. Esta etapa es la más costosa económicamente hablando y muchos compuestos no llegan a cumplir los requerimientos. Tres cuestiones principales son abordadas en esta etapa. Primero, la droga debe ser testada para asegurarse de que no solo sea segura y efectiva, sino que también pueda ser administrada de una manera adecuada. Esto involucra las pruebas preclínicas y clínicas abarcando toxicidad, metabolismo, estabilidad, formulación y tests farmacológicos. En

segundo lugar se encuentran los trámites legales y de patentamiento. Por último, la droga seleccionada deber ser sintetizada en grandes cantidades tanto para ser utilizada en los diferentes tests, como también luego en la eventual manufactura.



1.2. QUÍMICA COMBINATORIA EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

La química combinatoria se ha convertido en una importante herramienta en el proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco ya que simplifica y acelera el proceso de obtención y optimización de compuestos de interés terapéutico.

La estrategia combinatoria, a diferencia de la síntesis química tradicional, comprende el diseño y la síntesis de gran cantidad de compuestos estructuralmente relacionados, llamadas colecciones o bibliotecas, de forma rápida, eficiente y simultánea, para luego ser evaluados frente a determinados objetivos biológicos (**Figura 2**).

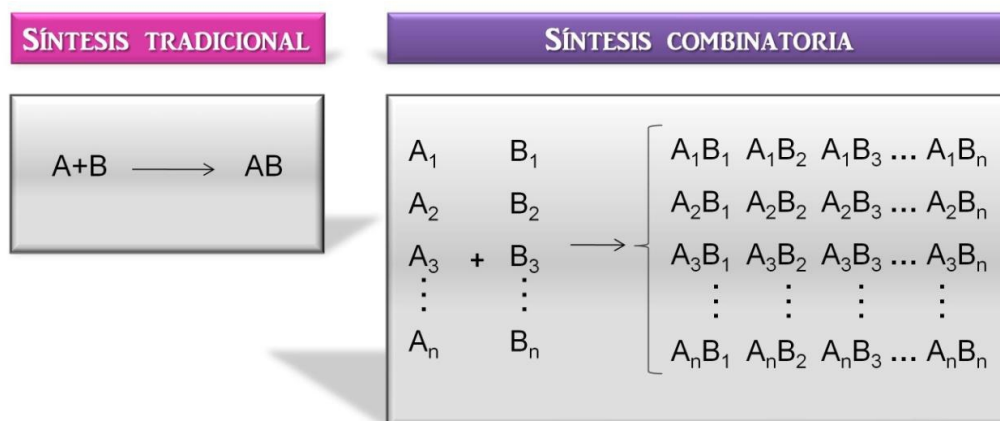


Figura 2



Las técnicas combinatorias son muy diversas, y sus productos, componentes de las bibliotecas, pueden ser preparados individualmente en paralelo o bien en mezclas controladas, aplicando tanto metodologías de síntesis en solución como también las de fase sólida.

Antes del advenimiento de la química combinatoria, la necesidad de encontrar un compuesto líder, se transformaba en la limitante de todo el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Hoy en día, aplicando los principios de esta nueva disciplina, los grupos de investigación pueden sintetizar mayor número de estructuras con el fin de encontrar nuevos compuestos líderes, identificar relaciones estructura-actividad o encontrar análogos que presenten buena actividad y mínimos efectos secundarios.² En la **Figura 3** podemos apreciar las etapas del desarrollo de un fármaco que se han visto beneficiadas con la síntesis combinatoria.



Figura 3

Los orígenes de la química combinatoria los encontramos en el desarrollo de sistemas para la síntesis múltiple y en paralelo de péptidos,⁷ posteriormente extendidos a la síntesis de todo tipo de moléculas.⁸ A partir de aquí, muchas y muy diversas metodologías se han desarrollado para la síntesis de quimiotecas: varillas de polietileno (sistema Multipin),⁹ láminas de vidrio, membrana de celulosa,¹⁰ bolsas de té,¹¹ etc. Otro factor considerado a la hora de diseñar una quimioteca ha sido el formato de síntesis, que ha conducido a la síntesis de compuestos individuales o de mezclas controladas. La generación de mezclas combinatorias puede seguir diversas estrategias, como mezclar y separar (mix and split),¹² o rastreo posicional (positional scanning),⁷ entre las más importantes. La síntesis de una quimioteca combinatoria se puede realizar siguiendo o combinando dos metodologías: la síntesis heterogénea (fase sólida) o bien la síntesis homogénea (disolución o fase líquida).

1.2.1. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

El inicio de la química combinatoria ha estado estrechamente unida a la síntesis en fase sólida, ya que los primeros ejemplos de síntesis combinatoria surgieron de la adaptación de la síntesis clásica de péptidos sobre soporte sólido. Por este motivo, la mayor parte de los trabajos publicados de preparación de quimiotecas siguiendo los preceptos de la química combinatoria se han realizado empleando la síntesis en fase sólida.

La síntesis orgánica en fase sólida (SPOS, *solid-phase organic synthesis*)¹³ es una metodología que permite realizar transformaciones químicas sobre sustratos unidos a un soporte polimérico e insoluble en solventes orgánicos o acuosos.

La selección de la estrategia de síntesis (fase sólida o disolución) a utilizar depende del tipo de reacciones que se aplicarán, el formato de la quimioteca (incluye mezclas o compuestos individuales), y la pureza de los productos deseados. Ambos métodos presentan diferentes ventajas e inconvenientes que se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1

	Síntesis en Fase Sólida	Síntesis en Solución
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ④ Fácil eliminación de excesos de reactivos. ④ Purificación del producto mediante lavados del soporte sólido. ④ Sencilla automatización de las etapas sintéticas de reacción. ④ Aplicación a la síntesis múltiple en paralelo o de mezclas. ④ Posibilidad de usar solventes de alto punto de ebullición. ④ Facilita reacciones químicas difíciles. Efecto de pseudo-dilución. 	<ul style="list-style-type: none"> ④ Amplio repertorio de reacciones orgánicas. ④ No es necesaria la adaptación de las reacciones ya conocidas. ④ No se requieren reacciones adicionales para la unión y escisión de la fase sólida. ④ Se pueden sintetizar cantidades ilimitadas de producto. ④ Tiempos de reacción más cortos. Control de reacción por métodos convencionales.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ④ Necesidad de adaptar los procesos a la fase sólida. ④ Imposibilidad de purificar los productos secundarios unidos. ④ Tiempos largos de reacción-difusión de los reactivos al interior de la resina. ④ Dificultad de control de intermediarios unidos a la fase sólida. ④ Dificultad de uso de reactivos heterogéneos (catalizadores, etc.). 	<ul style="list-style-type: none"> ④ Dificultad en la utilización de excesos de reactivos. ④ Limitado a cortas secuencias de reacción. ④ Dificultad en las etapas de aislamiento y purificación ④ Dificultad de automatización

La síntesis orgánica en fase sólida consiste en la unión de un compuesto de partida sobre un soporte sólido (polímero o resina) convenientemente funcionalizado, mediante un espaciador bifuncional (ligante). Este soporte polimérico es insoluble en disolventes orgánicos o acuosos; de ahí que después de cada etapa sintética, el exceso de reactivo y/o productos secundarios que no quedan unidos a esta resina se eliminan fácilmente por filtración y lavados (**Figura 4**), permitiendo el uso de excesos de reactivos (normalmente 3 a 5 equivalentes). Luego de terminar toda la secuencia sintética el producto final se escinde de la resina.

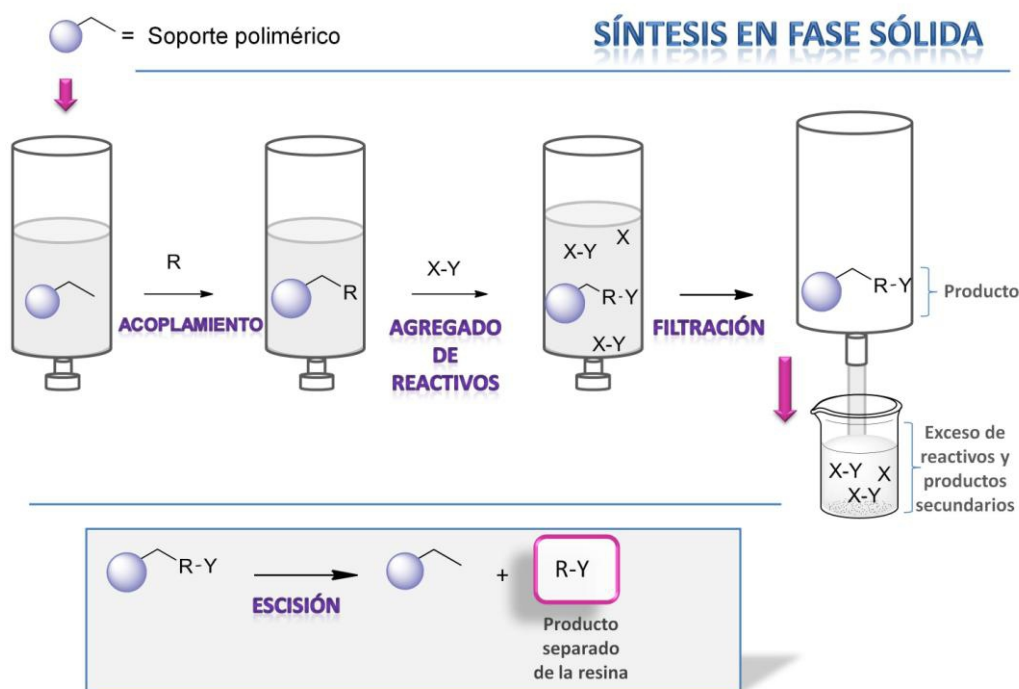


Figura 4

Son tres los requerimientos principales para la utilización de química en fase sólida en síntesis orgánica:

- ① Un soporte polimérico, entrecruzado e insoluble que sea inerte a las condiciones de reacción.

- ⊗ Algún medio de unir el sustrato al soporte sólido que permita la separación selectiva de los productos de interés al final de la síntesis.
- ⊗ Una estrategia de protección química que permita la protección y desprotección selectiva de grupos reactivos. (Principio de Ortogonalidad).

1.2.2. SOPORTES SÓLIDOS

Las matrices poliméricas insolubles tienen como objetivo principal facilitar la separación sólido-líquido por filtración. Los requerimientos generales para un soporte son estabilidad mecánica y química en las condiciones en que van a ser usados, alta carga (carga es el número de sitios de reacción por gramo de resina, normalmente alrededor de 1 mmol/g), buena solvatación, y accesibilidad del grupo funcional a reaccionar. No todos los materiales son compatibles con todos los tipos de disolventes y reactivos; por lo tanto, para cada aplicación se debe elegir el tipo apropiado de soporte.

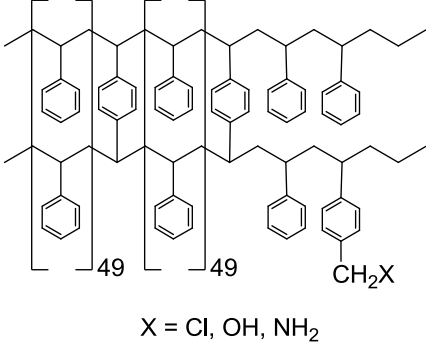
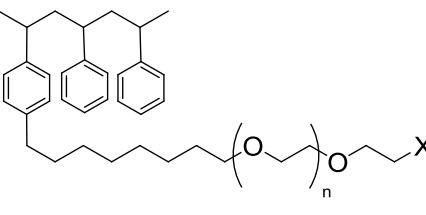
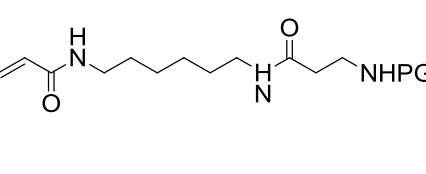
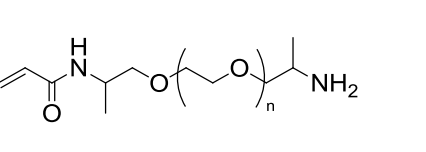
La estructura general de los soportes poliméricos se muestran en la **Figura 5**.



Figura 5

Los soportes sólidos pueden clasificarse en hidrofóbicos o hidrofílicos, siendo los primeros los de uso más común en química orgánica en fase sólida. En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se presenta una clasificación general de los soportes, con algunos ejemplos representativos de cada uno de ellos.

Tabla 2

	EJEMPLOS	ESTRUCTURA GENERAL	CARACTERÍSTICAS
RESINAS DE POLIESTIRENO HIDROFÓBICAS	Poliestireno – Divinilbenceno PS-DVB	 <p style="text-align: center;">X = Cl, OH, NH₂</p>	<p>Aptas para disolventes no próticos de polaridad media-baja.</p> <p>Entrecruzamiento 1-2%.</p> <p>Granos de resina de 90 a 200 µm.</p> <p>Carga general 0,5-1 mmol/g.</p>
	Poli(etilenglicol)- Poliestireno PS-PEG		<p>Aptas para disolventes polares próticos y no próticos incluyendo agua.</p> <p>Carga aproximada de 0,2- 0,6 mmol/g.</p>
	Poliacrilamida		<p>Aptas para disolventes polares no próticos.</p> <p>Aplicabilidad limitada por la reactividad de sus enlaces amida.</p>
RESINAS DE POLIESTIRENO HIDROFÍLICAS	Poli(acrilamida -etilenglicol) PEGA		<p>Aptas para disolventes polares próticos y no próticos.</p> <p>Aplicabilidad limitada por la reactividad de sus enlaces amida..</p>

En la elección del soporte sólido también resulta fundamental la unión entre la resina y el sustrato. Estos ligantes o "linkers"¹⁴ son usualmente moléculas bifuncionales, las cuales contienen un grupo funcional que las une al soporte sólido, y el otro grupo que permite una unión con el compuesto que se está sintetizando, el cual es selectivamente escindido al final de la síntesis. Los ligantes además, deben ser fáciles de preparar y lo suficientemente estables para no producir pérdidas prematuras de compuesto durante la secuencia sintética y, a la vez, poder separarse del producto al final de la síntesis en condiciones que no afecten grupos funcionales sensibles que puedan estar presentes en la molécula. La selección apropiada del ligante a utilizar determinará el éxito de la estrategia sintética en fase sólida. En muchas resinas los ligantes están unidos al soporte por medio de un espaciador flexible que

disminuye en cierta medida la influencia de factores propios de la resina, como efectos estéricos o electrónicos. Para la caracterización de compuestos unidos al soporte sólido por técnicas espectroscópicas, largos espaciadores son una ventaja, ya que aumentan la movilidad del sustrato y reducen el ensanchamiento de los picos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que espaciadores largos pueden producir interferencias entre los sitios de reacción y/o reacciones entre los mismos.

Los ligantes se clasifican en función de las condiciones de ruptura. Los grupos más comunes son: lábiles a ácidos o bases, fotolábiles, del tipo ligante de unión segura (safety-catch), ligante que no deja trazas (traceless), etc. Algunos de ellos se muestran a continuación en la **Figura 6**. Entre paréntesis figuran las condiciones de escisión.

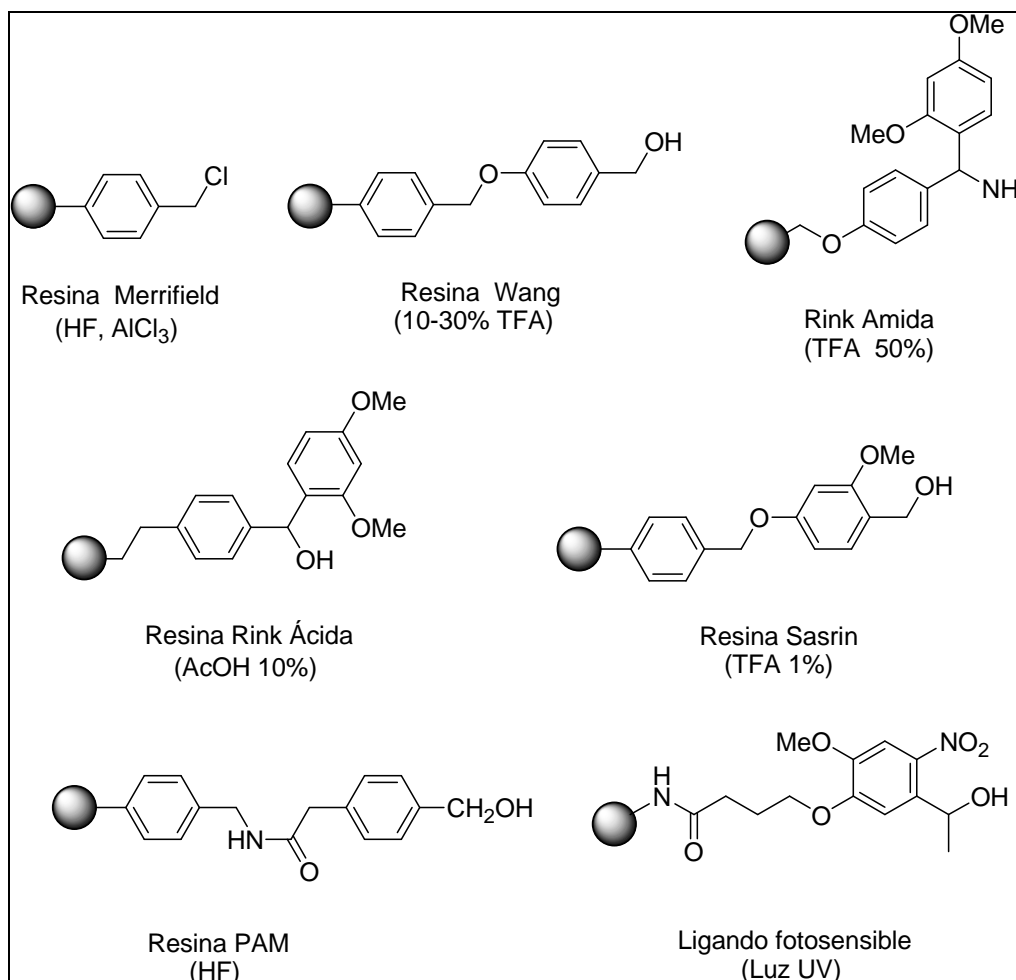


Figura 6



La unión más común al soporte es a través de un enlace éster de un ácido carboxílico del sustrato, esto proviene de la síntesis péptida en fase sólida donde es el ácido carboxílico del aminoácido el que se une al soporte.

La resina de Wang,¹⁵ que es la empleada en todo nuestro trabajo de síntesis, es un polímero funcionalizado con un grupo *p*-alcoxibencilo por lo que se requieren condiciones acídicas suaves (10-30% de TFA) para la separación del sustrato de la resina. Los ligandos derivados de alcoholes bencílicos *p*-alcoxi-sustituídos permiten la ruptura bajo condiciones acídicas suaves.

El monitoreo y seguimiento de las reacciones en fase sólida también es diferente del empleado en la química tradicional. Debido al uso de exceso de reactivos se imposibilita el seguimiento de la reacción por desaparición de los reactivos en solución. Por lo tanto, se han ido desarrollando métodos alternativos para monitorear estas reacciones de manera de lograr identificar las diferentes estructuras inmovilizadas al soporte sólido.

Existen dos tipos generales de métodos de monitoreo, aquellos *fuera del grano*, donde el enlace producto-resina se rompe y se analiza al producto en solución y los métodos *en el grano*, donde se analizan uno o más granos de resina directamente, sin producir la separación. En el caso de los métodos *fuera del grano*, una vez realizada la ruptura de la unión a la resina, los productos pueden ser pesados e identificados empleando los métodos de caracterización de la química orgánica clásica. Existen ciertas limitaciones en el uso de estos métodos. La necesidad de realizar la ruptura de la unión producto-resina, esto puede llevar tiempo y no permitir el rápido monitoreo de la reacción. Los reactivos empleados para la ruptura pueden contaminar la solución y de esta manera requerir una purificación antes de realizar la determinación analítica. Además, algunos intermediarios de reacción pueden ser sensibles a las condiciones de ruptura, impidiendo la interpretación de los resultados. Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado las técnicas *en el grano* que permiten seguir la reacción sin necesidad de realizar la ruptura de la unión a la resina. Los ensayos colorimétricos son empleados en síntesis orgánica en fase sólida para determinar aparición o desaparición de un grupo funcional.¹⁶ Como ejemplos de este tipo de ensayos podemos citar al test de Ninhidrina (Test de Kaiser), de Cloranilo, verde de Malaquita, etc.

La espectroscopía infrarroja (IR)¹⁷ es un método rápido y simple para la detección cualitativa de diferentes grupos funcionales unidos al soporte sólido. Después de la reacción se seca la resina y se usa directamente en la preparación de la pastilla con KBr. La espectroscopía IR no es una técnica analítica muy sensible y por lo tanto no es útil para la detección de bajas concentraciones de material. Sin embargo, si los intermediarios de reacción presentan bandas de absorción intensas y bien resueltas, es posible seguir el progreso de la transformación química por IR.

El uso de espectroscopía de masas para monitorear reacciones en fase sólida se hace a través del empleo de la técnica MALDI-TOF¹⁸ después de la ruptura *in situ* de unos pocos granos de resina. Si bien el compuesto es separado del soporte sólido, la ruptura se realiza directamente en el MALDI, por eso se lo considera como un método *en el grano*. Esta técnica ha sido aplicada con ligandos lábiles a ácidos y fotolábiles. Las limitaciones de esta técnica son el alto costo del equipo y la utilidad restringida de compuestos cuya masa es mayor a 600, pero la ventaja importante es la alta sensibilidad (un solo grano de resina es generalmente suficiente).

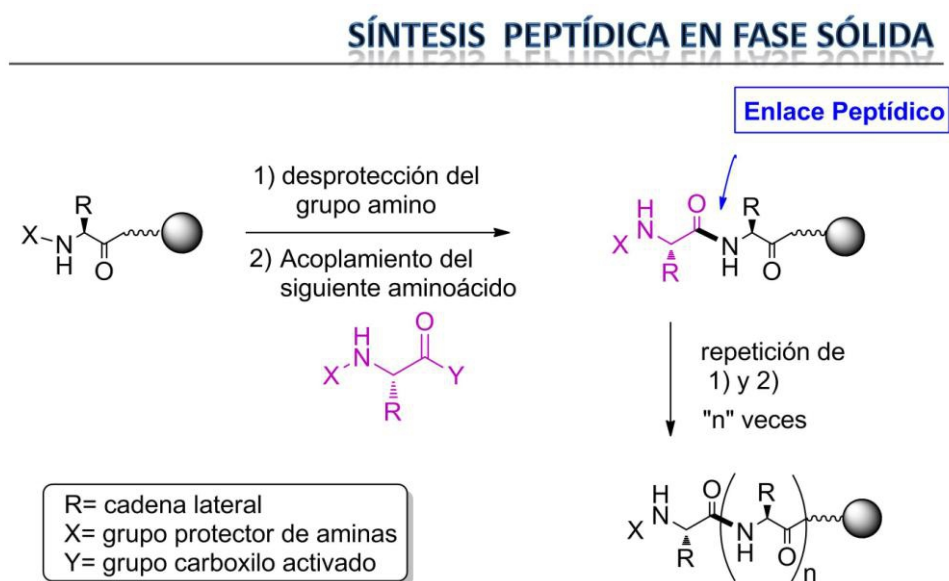
El uso de la resonancia magnética nuclear (RMN) en SPOS es complicado debido al ensanchamiento de las señales provocado por dos factores. El primero es el movimiento restringido al tratarse de muestras sólidas y el segundo, la heterogeneidad de la muestra que produce microambientes, provocando que la susceptibilidad magnética de la muestra no sea uniforme. Sin embargo, es posible realizar un espectro de RMN si se suspende la resina en un solvente adecuado que permita su hinchamiento, para tal fin se utiliza un solvente estándar de RMN, tal como cloroformo deuterado. Esta técnica se denomina *RMN en fase gel*.¹⁹ Se ha encontrado que el RMN en fase gel es especialmente útil en núcleos como ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P, que presentan rangos amplios de desplazamientos químicos y, por lo tanto las amplitudes de las señales son menos importantes, generando espectros suficientemente resueltos. En el caso de los RMN de ¹³C en fase gel, las señales suelen estar lo suficientemente aisladas como para ofrecer la información necesaria para ayudar a la elucidación estructural.²⁰

Como ya se dijo, al aumentar la movilidad del sustrato se reduce el ensanchamiento de los picos y, por lo tanto, mejora la resolución del espectro.

Sin embargo, los espectros en fase gel de protones, aún en los casos de usar soportes bien solvatados y flexibles, presentan muy baja resolución, por lo que no sirven para caracterizar intermediarios unidos a soportes sólidos. Una técnica especialmente útil para compuestos en fase sólida es la del RMN con giro al ángulo mágico (magic-angle spinning, MAS).²¹ Esta técnica requiere un accesorio especial, con el cual se mantiene la muestra precesionando en un ángulo específico con respecto al campo magnético.

1.2.3. SÍNTESIS ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS:

La síntesis en fase sólida de oligómeros, como lo son las cadenas peptídicas, es fácilmente automatizable debido a que se trata de procesos repetitivos. La síntesis de péptidos en fase sólida sigue una pauta general de ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado. Los pasos utilizados comienzan con la unión de un aminoácido, que posee su grupo amino protegido, al soporte sólido mediante una unión éster (**Esquema 1**). El siguiente paso es la desprotección del grupo amino y posteriormente la adición de un nuevo aminoácido con su grupo amino protegido; alternando estos procedimientos se continúa hasta que se alcanza la secuencia deseada.



La automatización de estos pasos requiere solo de unos pocos experimentos de optimización para ser repetidos en ciclos iterativos. En cambio, la automatización en el caso de la síntesis en fase sólida de moléculas pequeñas es más complicada por las características de este tipo de síntesis. La síntesis de moléculas pequeñas, es decir compuestos de bajo peso molecular (< 700), no poliméricos y con estructuras relacionadas a los fármacos conocidos, comprende un amplio rango de reacciones orgánicas, tal es así que hasta en una síntesis corta, los distintos pasos pueden requerir condiciones de reacción completamente diferentes. En la síntesis en fase sólida de moléculas pequeñas se requiere de un soporte sólido y un ligando perfectamente estables bajo todas las condiciones de reacción a ser utilizadas, esto hace que el planeamiento de la síntesis sea más complicado que en el caso de la síntesis en fase sólida de péptidos, por ejemplo. Por estas razones no pueden ser definidos protocolos comunes en SPOS, sino que debe realizarse un estudio específico cada vez que se planea una síntesis de manera de determinar la ruta sintética a emplear y la compatibilidad del soporte sólido, entre otros factores.

OBJETIVOS Y PLANEAMIENTO DE LA SÍNTESIS



*"THE WHOLE POINT OF GETTING THINGS DONE,
IS KNOWING WHAT TO LEAVE UNDONE."*



2. OBJETIVOS Y PLANEAMIENTO DE LA SÍNTESIS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de este trabajo de tesis fue la síntesis en fase sólida de diferentes derivados β -lactámicos para la generación de bibliotecas de compuestos potencialmente activos.

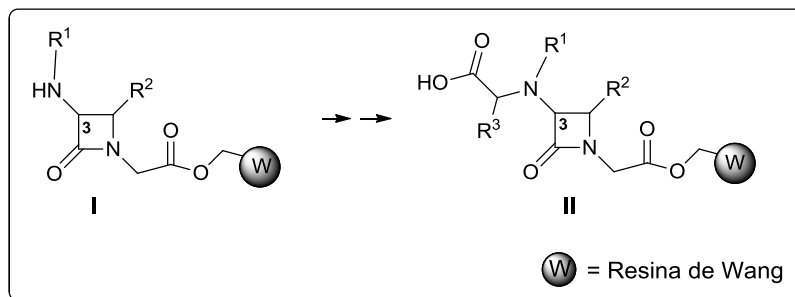
Este trabajo de tesis consta de dos partes. La primera es el desarrollo de una síntesis original de β -lactamas monocíclicas (monobactamas) funcionalizadas aplicando la reacción de multicomponentes de Petasis. La segunda es la síntesis mediante metodologías de hibridación molecular, de penicilinas conjugadas con una porción peptídica, a través de un grupo triazol.

Para generar las bibliotecas por síntesis en fase sólida se tuvieron en cuenta dos aspectos: Primero los antecedentes de este tipo de síntesis en solución, y en segundo término, el desarrollo y optimización de la secuencia sintética en fase sólida. Para desarrollar este tema fue necesario el estudio y aplicación de técnicas originales dado que la química en fase sólida, como ya fuera mencionado, tiene requerimientos y propiedades marcadamente diferentes a los de la química orgánica tradicional en solución. El proceso implicó adquirir experiencia en distintos aspectos de esta química, tal como la manipulación de las resinas, los métodos de monitoreo, la estabilidad de los ligandos y las condiciones de ruptura.

2.1.1. FUNCIONALIZACIÓN DE MONOBACTAMAS MEDIANTE REACCIÓN DE PETASIS

Esta parte de la tesis está relacionada con el estudio y desarrollo de la síntesis en fase sólida de β -lactamas monocíclicas que incorporan una subunidad α -aminoacídica en la posición 3 del anillo β -lactámico, hacia la obtención de bibliotecas de monobactamas altamente funcionalizadas.

Esta síntesis requiere la preparación de 3-amino- β -lactamas unidas a soporte sólido, particularmente a la resina de Wang (**I**, **Esquema 2**). Luego, la aplicación de reacción de multicomponentes de Petasis es la que lleva a la generación de las β -lactamas **II** con tres posiciones de variabilidad (R^1 , R^2 , R^3).



Esquema 2

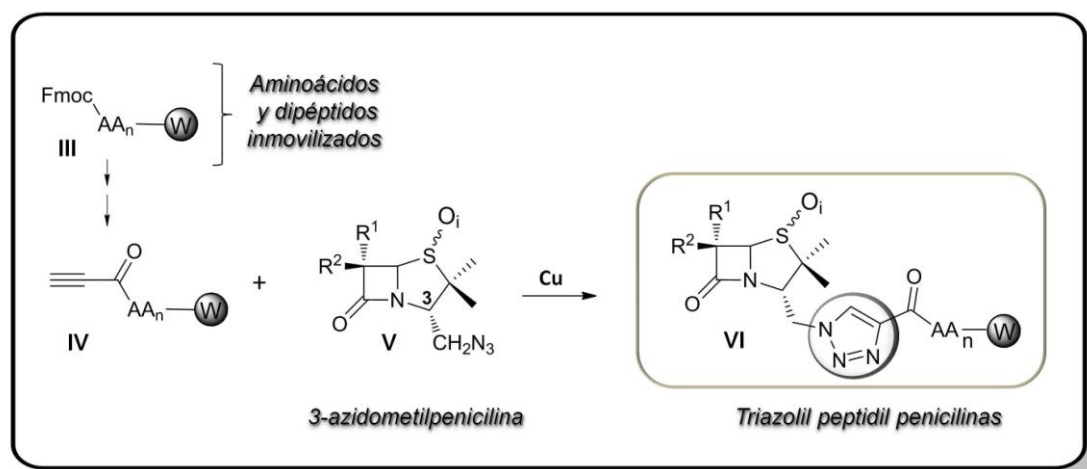
2.1.2. DIVERSIFICACIÓN DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

Las penicilinas, uno de los tipos de compuestos β -lactámicos más difundidos, presentan en su estructura el núcleo penam. Nuestro objetivo en esta parte de la tesis, utilizar metodologías de química en fase sólida para la introducción eficiente de modificaciones en la posición 3 del núcleo penam.

Para esto es necesario conjugar un derivado de penicilina con una porción peptídica, a través de un grupo triazol, dando origen a una serie de compuestos híbridos (**IV**, **Esquema 3**) que presentan varios puntos de diversidad.

La síntesis de esta biblioteca de triazolil-aminoacil (peptidil) penicilinas requiere la utilización como material de partida de diferentes aminoácidos o dipéptidos unidos a resina de Wang (**III**, **Esquema 3**). Luego los aminoácidos o dipéptidos unidos a resina de Wang deben ser acoplados con un alquino para obtener los *N*-propiolilaminoácidos (péptidos) inmovilizados **IV**. Finalmente los compuestos híbridos (**VI**) se generan por la reacción de los diferentes alquinos

unidos a resina de Wang con la azidometilpenicilina **V**, mediante la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre.



Esquema 3

En resumen, nuestro trabajo de investigación se basa fundamentalmente en el desarrollo de nuevas metodologías y estrategias de síntesis en fase sólida dirigidas a la preparación de compuestos de interés biológico. En ese sentido, nos propusimos llevar a cabo dos importantes objetivos que implican el diseño y desarrollo del proceso sintético en fase sólida para la obtención de estructuras orgánicas originales. Esto nos ha permitido generar dos bibliotecas de compuestos de interés biológico, una de las cuales ha producido resultados promisorios en el proceso de evaluación biológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

FUNCIONALIZACIÓN DE MONOBACTAMAS MEDIANTE REACCIÓN DE PETASIS



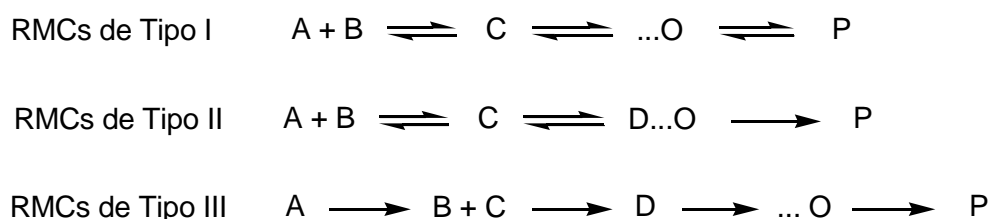
*"THUS IN THE STRATEGY EVERYTHING IS VERY SIMPLE,
BUT NOT NECESSARILY VERY EASY"*



3.1. REACCIÓN DE PETASIS

Las reacciones de multicomponentes (RMCs), se definen como procesos en los que tres o más reactantes se combinan, en un solo paso de reacción, dando lugar a un producto que incorpora porciones sustanciales de cada uno de los reactivos.²² Estas reacciones han adquirido importancia e interés en los últimos años ya que ofrecen productos con diversas características, las cuales son requeridas en la actualidad por las industrias químicas y farmacéuticas.²³ Además de generar complejidad estructural en un solo paso, las RMCs permiten acceder a un gran número de nuevas y variadas estructuras químicas, a un bajo costo de producción y ambiental debido a la alta eficiencia, selectividad y a la elevada economía de átomos. En gran parte, la industria farmacéutica ha impulsado el resurgimiento de este tipo de reacciones, debido a la creciente necesidad de construir bibliotecas de moléculas estructuralmente complejas para su posterior evaluación como compuestos líderes en el proceso de descubrimiento de drogas. Las RMCs representan a la piedra angular de la química combinatoria y de la síntesis orientada a la diversidad (DOS), y esto juega un papel central en el desarrollo de modernas metodologías sintéticas para el ámbito de la investigación farmacéutica y el descubrimiento de drogas.

Las RMCs se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo al número de etapas reversibles que presentan (**Esquema 4**).²⁴



Esquema 4

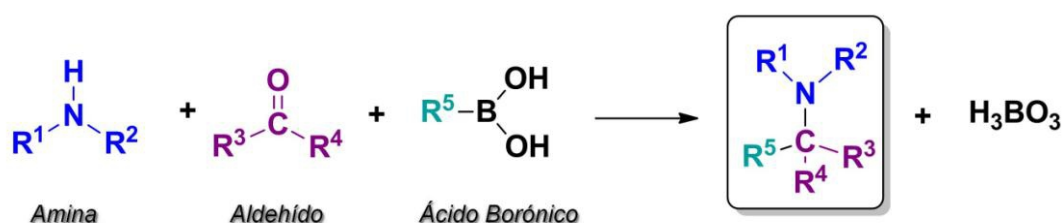


Así, las RMCs de tipo I se caracterizan por presentar múltiples equilibrios entre todos los reactantes y los intermediarios; Las de tipo II presentan una sola etapa irreversible que conlleva a la formación del producto; Y por último,

las de tipo III poseen solamente etapas irreversibles y generalmente se las asocia a las reacciones en cascada o dominó.

Las reacciones de tipo II, que constan de un solo paso de reacción irreversible, son las más convenientes en el ámbito de la síntesis orgánica.

La reacción de Petasis, o también conocida como Petasis Borono-Mannich,²⁵ es una clase de reacción multicomponente de tipo II en donde una amina, un aldehído y un ácido organo-borónico se acoplan (**Esquema 5**), siendo la etapa irreversible de este proceso, la formación de un nuevo enlace carbono-carbono (C-R⁵).



Esquema 5

La reacción de Petasis ha sido muy desarrollada en las últimas décadas y se ha convertido en una importante y eficaz herramienta sintética, ya que permite la síntesis de una gran variedad de interesantes moléculas incluyendo α -aminoácidos no naturales,²⁶ amino cetonas, amino alcoholes, amino azúcares y diversos heterociclos.

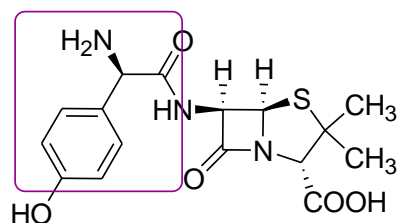
Dentro de las numerosas ventajas sintéticas²⁷ que presenta la reacción, podemos destacar: a) No requiere el uso de solventes desgasificados o anhídros; b) Tratamiento de la reacción (workup) sencillo: el único subproducto, el ácido bórico, es inocuo; c) La reacción es perfectamente tolerada por varios grupos funcionales, (ej: hidroxilos, ácidos carboxílicos, aminas); d) Numerosos ácidos borónicos están disponibles comercialmente, y además, muchos de ellos son estables al aire y al agua, presentan muy baja toxicidad y son seguros para el medio ambiente; d) Es una metodología aplicable a la química sobre soporte sólido.

Recientemente, la reacción de Petasis Borono-Mannich, ha cobrado relevancia en la síntesis de bibliotecas combinatorias, debido a que una gran variedad de aminas y ácidos borónicos pueden ser rápidamente condensados en síntesis en paralelo sobre soporte sólido.²⁸ La reacción de Petasis es especialmente adecuada para la generación de diversidad molecular porque la reacción procede generalmente a temperatura ambiente y en un amplio rango de solventes, siendo además perfectamente adaptable a la automatización.

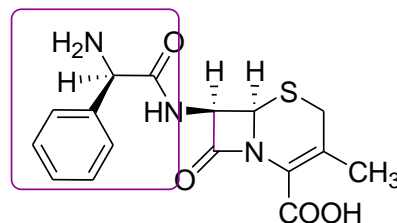
Como se nombró anteriormente, uno de los usos más relevantes de la reacción de Petasis es la síntesis de α -aminoácidos.²⁶ En el ámbito del descubrimiento de drogas, se ha incrementado el interés por los α -aminoácidos no proteínogénicos a causa de sus potenciales propiedades farmacológicas y su utilidad como “bloques de construcción” en la síntesis peptídica y no peptídica de compuestos. Las arilglicinas^{29,30,31} son una clase particularmente importante de α -aminoácidos no proteínogénicos, ya que recientemente se ha descubierto que algunas arilglicinas pueden modular selectivamente la actividad de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) y es por esto que están siendo usadas para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas³². Sumado a esto, las arilglicinas son componentes claves en la estructura de algunos de los antibióticos β -lactámicos mas ampliamente usados,²⁹ como lo son la Amoxicilina, la Cefalexina y el Cefadroxilo (**Figura 7**) como también se encuentran presentes además en otros antibióticos naturales como la Nocardicina G. Las estructuras de Vancomicina y Teicoplanina³³, una clase particular de antibióticos glicopeptídicos, también contienen en su estructura varios tipos de arilglicinas.

Como con otras clases de antibacterianos, existe un continuo interés en el desarrollo de nuevos compuestos β -lactámicos, tanto como de glicopéptidos, ya que estas moléculas son de gran importancia en la lucha contra la emergente resistencia bacteriana a los antibióticos.³⁴ Por esta razón, la necesidad de sintetizar nuevas clases estructurales de arilglicinas está en constante crecimiento.²⁹ De hecho, se han desarrollado diversas metodologías para la síntesis de estas valiosas estructuras incluyendo métodos basados en

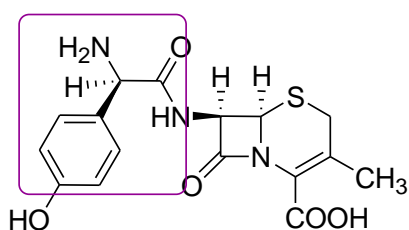
la Reacción de Friedel-Crafts,³⁵ azidación de enolatos,³⁶ fotólisis de complejos de cromo,³⁷ condensación de Ugi,³⁸ síntesis de Strecker³⁹ u otras reacciones.⁴⁰



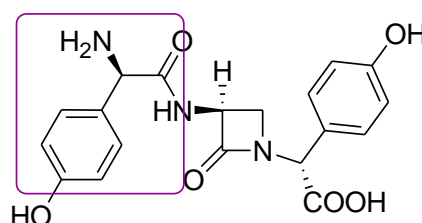
AMOXICILINA



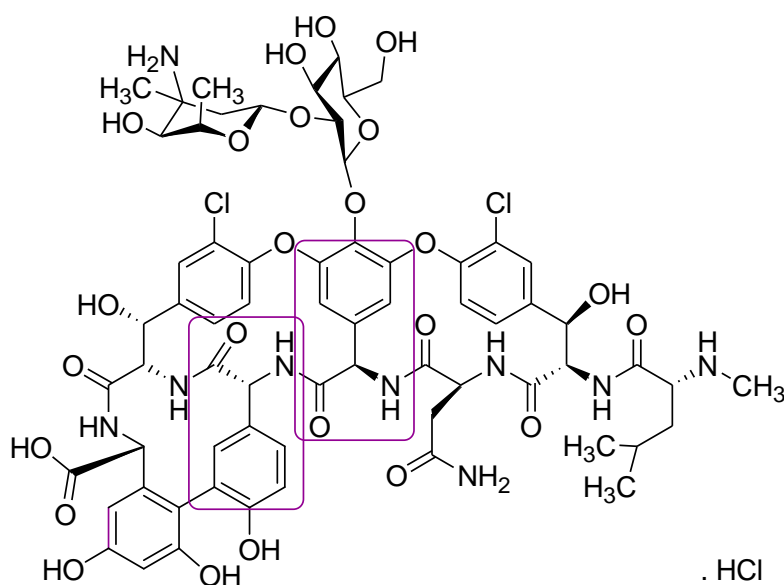
CEFALEXINA



CEFADROXILO



NOCARDICINA G



. HCl VANCOMICINA

Figura 7

Muchos de estos métodos son poco efectivos, están generalmente limitados a determinados patrones de sustitución, requieren de una síntesis de varios pasos, involucran fuertes ácidos de Lewis u otros compuestos altamente

reactivos, o utilizan cianuros muy tóxicos seguidos de fuertes condiciones de hidrólisis. Por todo esto es que la reacción de Petasis, se presenta como una de las mejores alternativas para la síntesis de α -aminoácidos. Como podemos apreciar en el **Esquema 6**, para la obtención de estos compuestos, se emplean diferentes aminas, ácido glioxílico como componente aldehídico, y aplicando la reacción a una variedad de ácidos aril y vinil borónicos, se obtienen los correspondientes derivados aril y vinil-glicina.



Esquema 6

MECANISMO GENERAL:

La reacción de Petasis ha sido objeto de numerosos estudios.^{22,24,41} Mecanísticamente, este proceso de RMCs de tipo II se caracteriza por presentar un complejo equilibrio entre 3 componentes y varios intermediarios que dan como resultado el producto de condensación **d** (**Esquema 7**), vía formación irreversible de un nuevo enlace C-C. De este modo, la condensación entre la amina **a** y el carbonilo **b**, forma el aminol **e** que puede ser convertido a través de la sal de iminio **g**, al aminal **i**. El ácido borónico **c**, mientras coexiste con los componentes amino y carbonilo, puede reaccionar reversiblemente con **e** o **i** como se puede observar en **f** y **j** respectivamente, para simultáneamente generar una especie de iminium electrofílico **g** y una especie de borato nucleofílico **h**. La reacción irreversible de formación del enlace C-C entre **g** y **h** conduce a la formación del producto **d** con la eliminación de ácido bórico como subproducto. Ya que la reacción entre **g** y **h** es el único paso irreversible en el proceso, todos los intermediarios pueden eventualmente conducir a la formación del producto. También, en los casos en que la amina o el compuesto



3.2. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE PETASIS

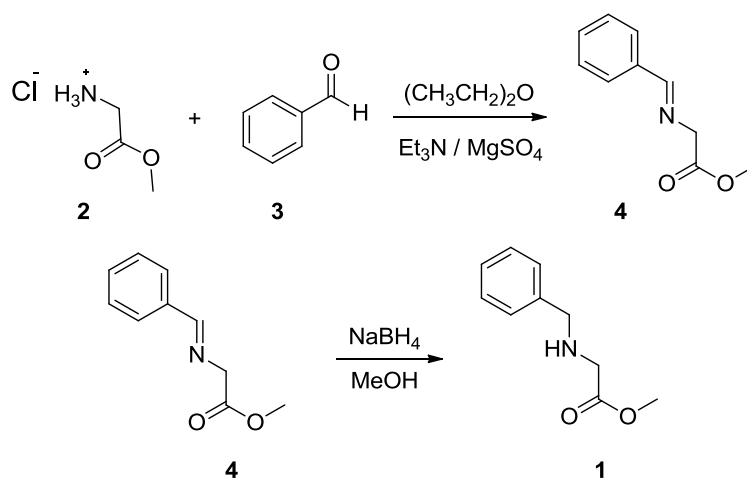
Teniendo en cuenta lo expresado en el punto anterior, la reacción de multicomponentes de Petasis aplicada a estructuras que contengan el anillo β -lactámico, surge como una interesante alternativa en nuestro objetivo general de desarrollar nuevas metodologías y estrategias de síntesis en fase sólida dirigidas a la preparación de compuestos de interés biológico, y su eventual aplicación en la generación de bibliotecas combinatorias.

Considerando las características particulares de las reacciones de multicomponentes y con el fin de reunir información y adquirir experiencia en este tipo de química, llevamos a cabo primeramente una serie de experimentos, tanto en solución como en fase sólida, utilizando diferentes reactivos y condiciones de reacción.

3.2.1. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MULTICOMPONENTES DE PETASIS EN SOLUCIÓN APLICADA A AMINAS SECUNDARIAS.

Presentamos en la **Tabla 3** los resultados obtenidos mediante la aplicación de la reacción de Petasis utilizando distintos reactivos, bajo diversas condiciones de temperatura, tiempo y solvente de reacción.

La amina secundaria utilizada como modelo fue el *N*-bencilglicinato de metilo. El *N*-bencilglicinato de metilo (**1**, **Esquema 8**) se sintetizó por condensa-



Esquema 8



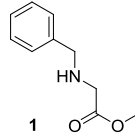
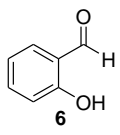
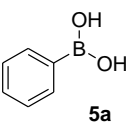
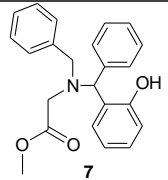
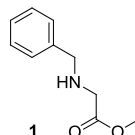
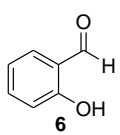
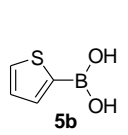
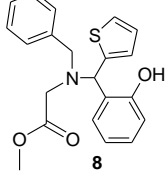
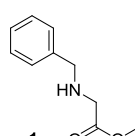
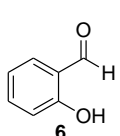
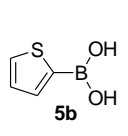
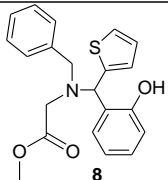
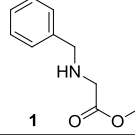
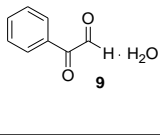
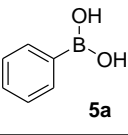
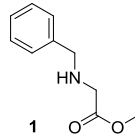
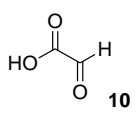
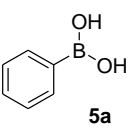
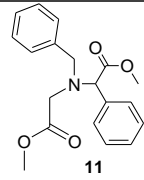
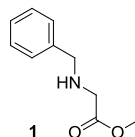
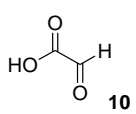
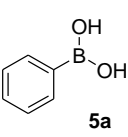
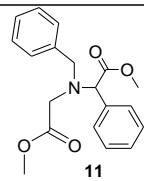
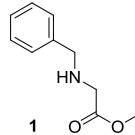
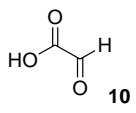
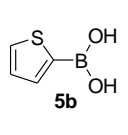
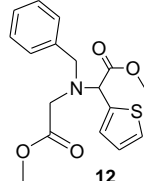
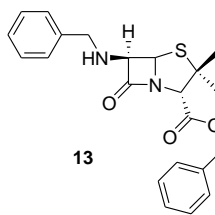
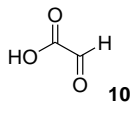
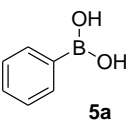
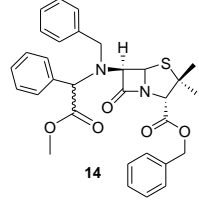
ción del clorhidrato del éster metílico de la glicina (**2**) con benzaldehído (**3**),⁴² obteniéndose la imina **4**.

Las reacciones que figuran en la **Tabla 3**, de manera general, se llevaron a cabo disolviendo la amina secundaria indicada, en el solvente correspondiente, y luego se agregaron el aldehído y el ácido borónico (1 equivalente de cada uno), manteniéndose con agitación durante el tiempo y temperatura especificados. Luego de este período se realizó el workup adecuado seguido de una metilación con diazometano de los correspondientes ácidos obtenidos, para facilitar la purificación de los mismos mediante columna cromatográfica (hexano:AcOEt, gradiente). Los compuestos obtenidos se caracterizaron mediante los espectros de RMN de ¹H y de RMN de ¹³C.

Tabla 3

	Amina 2 ^{da}	Aldehído	Ácido borónico	Solvente T° Tiempo	Producto	Rendimiento %
1				Dioxano 90 °C 17 h	NR	-
2				Dioxano 90 °C 23 h		39
3				Dioxano 90 °C 64 h		18
4				Dioxano 90 °C 1 h		12
5			 (4 equiv.)	Dioxano 90 °C 22,5 h		47

Continuación Tabla 3

6				DCM:HFIP (9:1) t. a. 71 h		28
7				Dioxano 90 °C 20 h		24
8				DCM:HFIP (9:1) t. a. 28 h		26 ^a
9				DCM:HFIP (9:1) t. a. 24 h	NR	-
10				DCM:HFIP (9:1) t. a. 22,5 h		86
11				Dioxano 90 °C 7 h		25
12				DCM:HFIP (9:1) t. a. 17 h		91
13				DCM:HFIP (9:1) t.a. 16 h		75

NR= no se produjo la reacción.

t.a. = temperatura ambiente.

^a se recuperó el material de partida.

HFIP = hexafluoroisopropanol;

En la entrada 1 se hizo reaccionar *N*-benzilglicinato de metilo (**1**), con ácido fenil borónico (**5a**) y como aldehído al benzaldehído (**3**), y en este caso no se produjo reacción. Esto se podría explicar por la falta de un hidroxilo en

posición orto al grupo aldehído tal como lo notaron Wang y col.,⁴³ quienes reportaron que reacciones de Petasis no tenían lugar cuando el aldehído no poseía el grupo hidroxilo, o el mismo estaba posicionado en meta o en para, tampoco si estaba protegido como éster metílico o reemplazado por un halógeno. Un hidroxilo en posición orto, como posee el salicilaldehído, se puede coordinar al boro y ambos pueden activar al nucleófilo para el evento de captura intramolecular y, por consiguiente, hacer más efectiva la reacción.

Como se puede apreciar en la entrada 2, el experimento en el que se empleó salicilaldehído (**6**), se llevó a cabo en dioxano a 90°C por 23 h, obteniéndose el producto esperado **7**, con un rendimiento de 39 %. Al emplear un menor tiempo de reacción (1 h, entrada 4), como era de esperar, el rendimiento mostró una disminución, pero al incrementarse el tiempo de reacción (64 h, entrada 3) también se obtuvo menor cantidad de producto. En la entrada 5, se utilizaron las mismas condiciones que en entrada 2, pero la variante a incorporar en este caso, fue un aumento de los equivalentes de ácido borónico, y esto trajo aparejado un leve aumento del rendimiento (47%).

Nanda y colaboradores⁴⁴ han publicado un análisis sobre los efectos de diferentes solventes, tanto próticos como apróticos, en las reacciones de multicomponentes de Petasis. Ellos encontraron que algunos alcoholes fluorados, como el trifluoroetanol y el aún más ácido hexafluoroisopropanol (HFIP), promovían las reacciones de Petasis, pero presentaban algunos efectos indeseables como ser largos tiempos de reacción. Tratando de solucionar este inconveniente, hallaron afortunadamente que las reacciones de Petasis se veían significativamente aceleradas cuando utilizaban una mezcla de DCM y HFIP en una proporción 9:1. Por este motivo se empleó la mezcla de solventes que se muestra en la entrada 6, aunque la misma no nos resultó sustancialmente beneficiosa.

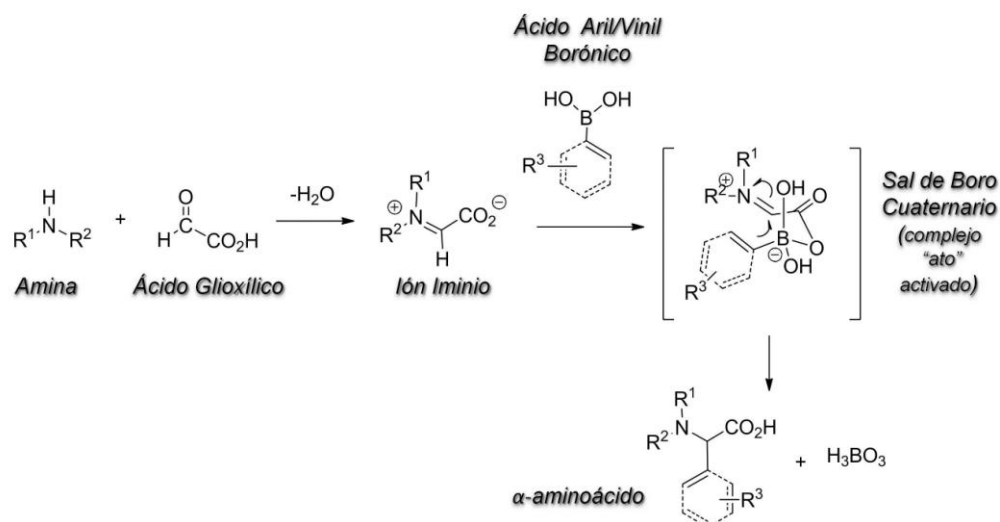
En las entradas 7 y 8 las reacciones se han llevado a cabo empleando otro ácido borónico, el ácido tioenborónico (**5b**). En 7 se utilizaron las mismas condiciones que en la entrada 2 y para 8 se usó la mezcla DCM:HFIP (9:1) y 28 h de reacción. En ambos experimentos se obtuvieron similares resultados, el producto esperado **8** en aproximadamente 25% de rendimiento.

La utilización de fenilgloxal monohidratado^{28a} (**9**) como componente aldehído también fue ensayado. Utilizando la combinación DCM:HFIP (9:1) sin embargo no se detectó la formación del producto (entrada 9).

En las entradas 10 a 13 se empleó como aldehído, al ácido glioilico (**10**) y éste demostró ser muy eficiente para las reacciones que se llevaron a cabo en DCM:HFIP (9:1) (entradas 10 y 12), dando rendimientos casi cuantitativos. Sin embargo, no fue tan eficiente para aquella en que se utilizó dioxano como solvente (entrada 11), demostrando la importancia del solvente ácido para este tipo de aldehídos. En la entrada 13 también se utilizó la mezcla DCM:HFIP (9:1) y ácido glioilico como aldehído, pero aquí decidimos utilizar una estructura más compleja, ya que la amina empleada fue una penicilina derivada del ácido 6-β aminopenicilánico (6-APA) (**13**). En estas condiciones de reacción, se logró obtener el producto deseado **14** con un 75% de rendimiento.

Claramente, el uso del ácido glioilico como componente aldehídico en las reacciones de Petasis,^{45,24} llevó a los mejores resultados en nuestro estudio.

En cuanto al mecanismo de reacción (**Esquema 9**), es muy similar al que cursa con los α-hidroaldehydos.



Esquema 9

Podemos ver que se forma inicialmente el ión iminio y luego, se cree que, la especie órgano-borónica se coordina al grupo ácido carboxílico formando la

sal de boro cuaternario. A continuación, la transferencia intramolecular del grupo arilo o vinilo del complejo “ato” activado da lugar al correspondiente α -aminoácido. Existen evidencias de que la presencia del ácido HFIP, acelera la formación de la especie iminium, la que puede ser luego atacada por la especie organoborónica²⁴ De hecho, cuando se emplea HFIP los rendimientos son más altos que los de las reacciones que cursan en DCM solamente.⁴⁶

3.2.2. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MULTICOMPONENTES DE PETASIS EN SOLUCIÓN, APLICADA A AMINAS PRIMARIAS

A continuación, en la **Tabla 4**, se describen las pruebas con aminas primarias de interés, tal como la penicilina **15**. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la misma metodología general que para las reacciones de la **Tabla 3**.

Tabla 4

	Amina ^{15a}	Aldehído	Ácido borónico	Solvente	T° (°C)	Tiempo (h)	Producto
1				EtOH:HFIP (9:1)	40	70	_a
2				Dioxano	50	65	 + material de partida
3				Dioxano	90	22	NR
4				EtOH	t.a.	65	
5				EtOH:HFIP (9:1)	t.a.	23,5	NR
6				EtOH:HFIP (9:1)	40	72	NR

^a Se obtuvo mezcla de compuestos no identificados.

En la entrada 1, a pesar de emplear condiciones similares a las reportadas en la literatura,⁴⁷ se obtuvo una mezcla de compuestos no identificados. Al cambiar el solvente por dioxano (entrada 2), se obtuvo la imina **16** y se recuperó material de partida. En las entradas 3 y 4, la variante introducida fue el empleo de salicilaldehído (**6**). Como se puede observar, cuando el solvente empleado fue dioxano (entrada 3), no se produjo la reacción y cuando fue etanol (entrada 4) se obtuvo solamente la imina **17**. En las entradas 5 y 6, se utilizó como aldehído el ácido glioxílico (**10**), por la efectividad del mismo en las reacciones con aminas secundarias, y el ácido borónico **5c**, por la evidencia de que los ácidos vinil borónicos son más efectivos que los fenil borónicos. Sin embargo, en ninguno de los casos se produjo reacción.

Por todos los resultados obtenidos, tanto con aminas primarias como secundarias, podemos concluir que existen varios factores que afectan la eficiencia y el rendimiento de la reacción de Petasis, tres de los más importantes se enumeran a continuación.

En primer lugar, los aldehídos con protones ácidos, como el que presenta el ácido glioxílico, son más reactivos que los que no lo poseen.

En segundo lugar, con respecto a las aminas, las secundarias son más reactivas que las primarias, y éstas últimas generalmente llevan a la formación de la imina, no produciéndose reacción con el componente ácido borónico. Y por último, el tercer factor es referido a que el rendimiento de la reacción se ve mejorado significativamente en presencia del HFIP como cosolvente, sumado a la presencia de ácido glioxílico como componente aldehídico.

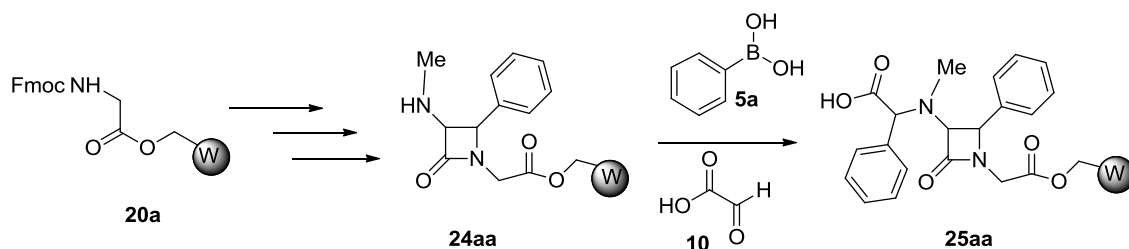
3.2.3. APLICACIÓN DE LA REACCIÓN DE PETASIS PARA LA GENERACIÓN DE BIBLIOTECAS DE β -LACTAMAS MONOCÍCLICAS POR QUÍMICA EN FASE SÓLIDA

Como ya fue mencionado, la reacción de Petasis permite incorporar a moléculas estructuras nitrogenadas tal como α -amino ácidos no naturales. La

utilización de ácido glicólico como componente aldehído de esta reacción lleva a la obtención de aril o vinil glicinas, dependiendo del ácido borónico empleado.

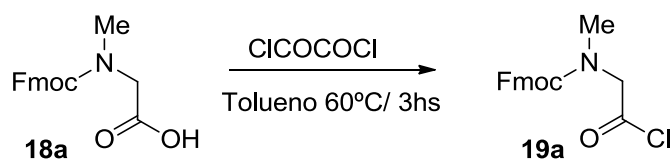
Entonces, una vez adquirida cierta experiencia en esta reacción de multicomponentes, comenzamos a desarrollar un proceso de síntesis de β -lactamas monocíclicas por química en fase sólida, incorporando la unidad arilglicina por reacción de multicomponentes de Petasis.

En una secuencia exploratoria, se planteó la síntesis de la β -lactama **25aa** (Esquema 10). La amina secundaria **24aa**, se obtuvo por funcionalización del anillo β -lactámico construido mediante la reacción de Staudinger en fase sólida.⁴⁸



Esquema 10

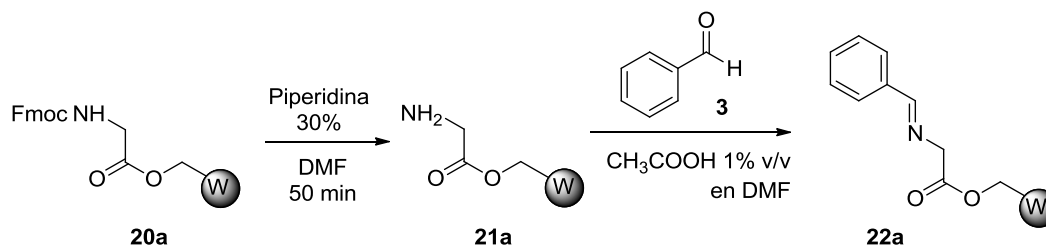
La síntesis de la amina **24aa**, comienza con la preparación del cloruro de ácido **19a** (Esquema 11), a partir de **18a** y utilizando como reactivo al cloruro de oxalilo (ClCOCOCl).⁴⁹



Esquema 11

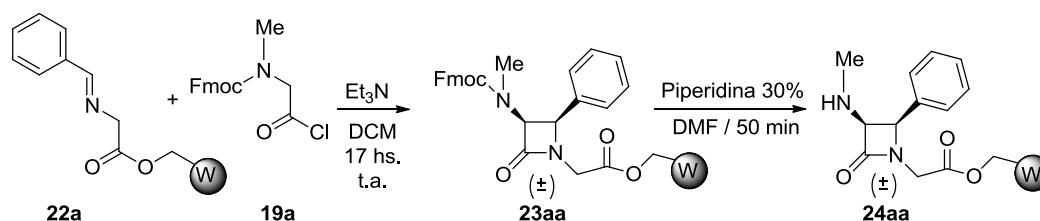
Por otro lado se elimina el grupo protector de la Fmoc-glicina unida a la resina de Wang **20a** (Esquema 12), la cual es comercial, para así obtener la

amina **21a**, que luego se utiliza para sintetizar la imina **22a** por reacción con benzaldehído (**3**).



Esquema 12

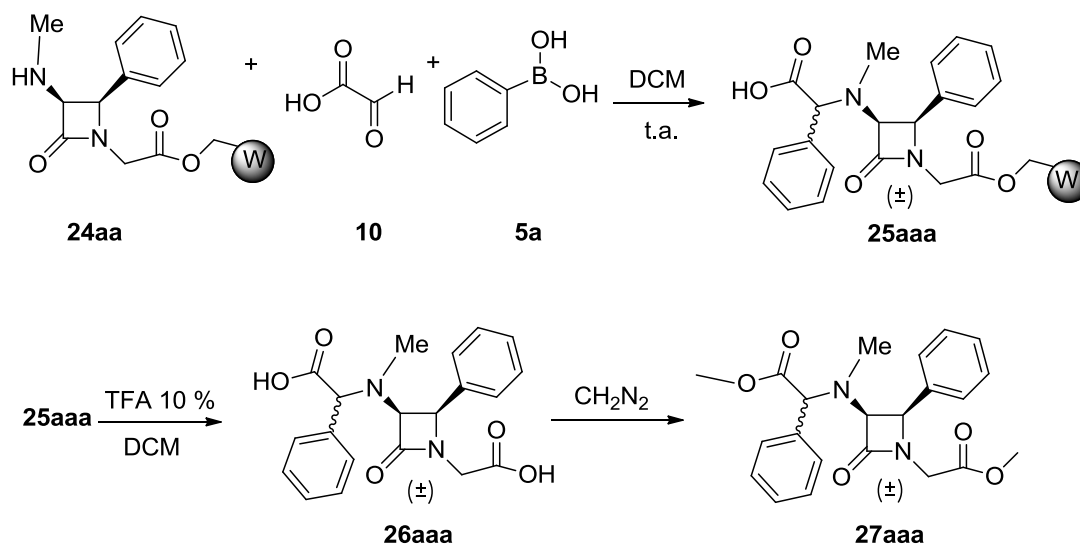
El paso siguiente consiste en la formación de la β -lactama **24aa** (**Esquema 13**), mediante una reacción de Staudinger, al hacer reaccionar la resina **22a** con el cloruro de ácido **19a**. La reacción se lleva a cabo a baja temperatura durante el agregado del cloruro de ácido a la resina y luego se deja 15 horas a temperatura ambiente. La formación del producto **23aa** se comprueba mediante espectroscopía de infrarroja, por la presencia de un pico a 1770 cm^{-1} , característico del carbonilo β -lactámico. Posteriormente, se elimina de la resina **23aa** el grupo Fmoc para obtener **24aa**.



Esquema 13

La resina **24aa** fue entonces el sustrato utilizado para la reacción de Petasis en fase sólida^{28b} (**Esquema 14**). Para esto, se suspende esta resina en DCM junto con exceso (9 equiv.) de ácido glicólico (**10**) y 9 equivalentes de ácido fenilborónico (**5a**), y se agitó a temperatura ambiente durante 78 h. La finalización de la reacción se verificó mediante el test colorimétrico de Cloranilo.¹⁶ Entonces, luego de 72 h a temperatura ambiente, se realizaron los correspondientes lavados, y se trató la resina obtenida **25aaa** con ácido trifluoroacético al 10% en diclorometano para separar el compuesto de la resina.

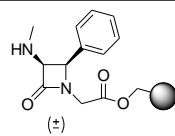

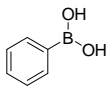
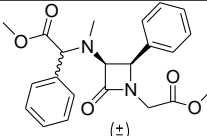
El diácido **26aaa** obtenido fue inmediatamente metilado con diazometano para facilitar la identificación del producto obtenido, y luego, mediante RMN de ^1H y de ^{13}C se analizó el crudo de reacción verificándose la obtención del compuesto **27aaa** con un 96% de rendimiento y una relación diastereoisomérica de 5:1.



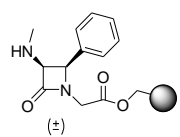

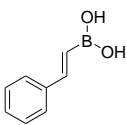
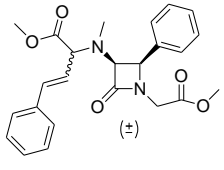
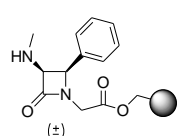

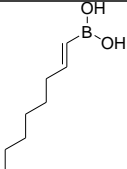
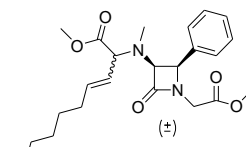
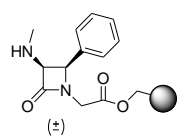

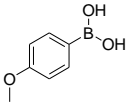
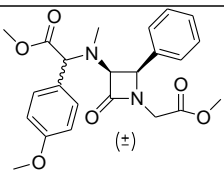
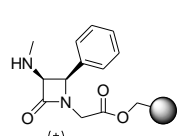

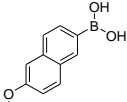
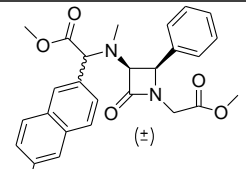
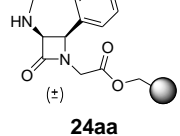

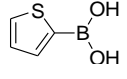
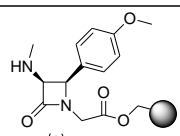

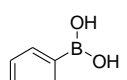
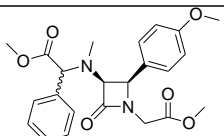
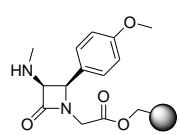

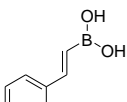
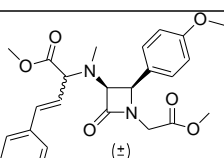
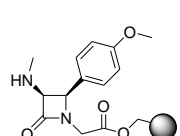

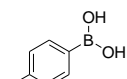
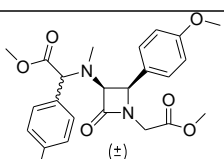
Esquema 14

Con el fin de determinar el alcance de la reacción de multicomponentes de Petasis aplicada a la preparación de derivados de compuestos β -láctámicos, se llevaron a cabo diversas pruebas con diferentes β -lactamas y diferentes ácidos borónicos aplicando la metodología optimizada para el compuesto **27aaa** (Tabla 5).

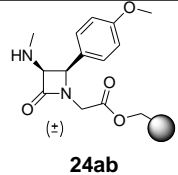
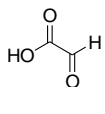
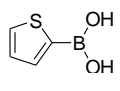
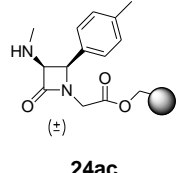
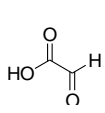
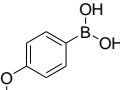
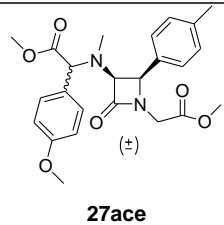
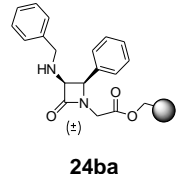
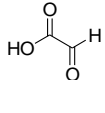
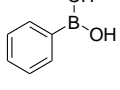
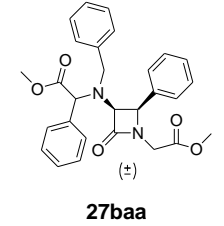
Tabla 5

	Amina	Aldehído	Ácido borónico	Condiciones	Estructura	Rto	Proporción de isómeros ⁱⁱⁱ
1	 24aa	 10	 5a	DCM t.a 72 h	 27aaa	96% ⁱ	5:1

Continuación Tabla 5

2	 24aa	 10	 5c	DCM t.a 72 h	 27aac	87% ⁱ	7:1
3	 24aa	 10	 5d	DCM t.a 72 h	 27aad	76% ⁱ	4:1
4	 24aa	 10	 5e	DCM t.a 72 h	 27aee	34% ⁱ	4:1
5	 24aa	 10	 5f	DCM t.a 72 h	 27aaf	69% ⁱ	4:1
6	 24aa	 10	 5b	DCM t.a 72 h	- ^v	-	-
7	 24ab	 10	 5a	DCM t.a 72 h	 27aba	99% ⁱ	4:1
8	 24ab	 10	 5c	DCM t.a 46 h	 27abc	68% ⁱ	7:1
9	 24ab	 10	 5e	DCM t.a 72 h	 27abe	90% ⁱ	6:1

Continuación Tabla 5

10	 24ab	 10	 5b	DCM t.a 80 h	- ^v	-	-
11	 24ac	 10	 5e	DCM t.a 48 h	 27ace	89% ⁱ	6:1
12	 24ba	 10	 5a	DCM t.a 60 h	 27baa	61% ⁱⁱ	- ^{iv}

ⁱ Rendimiento obtenido en base al crudo de reacción (considerado desde la resina **23**, 4 pasos de reacción).

ⁱⁱ Rendimiento obtenido luego de purificación en columna cromatográfica.

ⁱⁱⁱ Determinado por integración de las señales de RMN de ¹H en el crudo de reacción.

^{iv} Se obtuvo un solo diastereoisómero de configuración aún no determinada.

^v Se observó descomposición

El resultado de este estudio determinó que las β -lactamas monocíclicas que incorporan alfa-aminoácidos se obtienen con buenos rendimientos para toda la secuencia sintética. La única excepción se produce cuando se utiliza el ácido tiofenborónico, ya que en ningún caso se obtiene el producto deseado (entradas 6 y 10).

En lo que se refiere a la configuración de las β -lactamas que figuran en la **Tabla 5**, la misma fue determinada mediante las constantes de acoplamiento entre los protones unidos a C(3) y C(4) del anillo β -lactámico (ver ejemplo en **Figura 8**). De este modo se verificó la presencia de los isómeros *cis*, ya que sus valores de constantes de acoplamiento están comprendidos entre los 4 a 6 Hz.⁵⁰ Además, mediante los espectros de RMN de ¹H se evidenció la obtención de los 2 diastereoisómeros de cada compuesto obtenido en distintas proporciones, excepto en el caso del derivado bencílico **27baa**, donde se obtuvo un sólo de los diastereoisómeros (ver **Tabla 5**).

En los experimentos realizados en solución, habíamos llegado a la conclusión de que el sistema de solventes más adecuado para la reacción de Petasis, era la combinación DCM:HFIP (9:1). En las reacciones llevadas a cabo en fase sólida que figuran en la **Tabla 5** no aparece esta mezcla de solventes,

y esto es porque antes de comenzar con la síntesis de la biblioteca de β -lactamas realizamos una prueba respecto al solvente más adecuado para las reacciones en fase sólida.

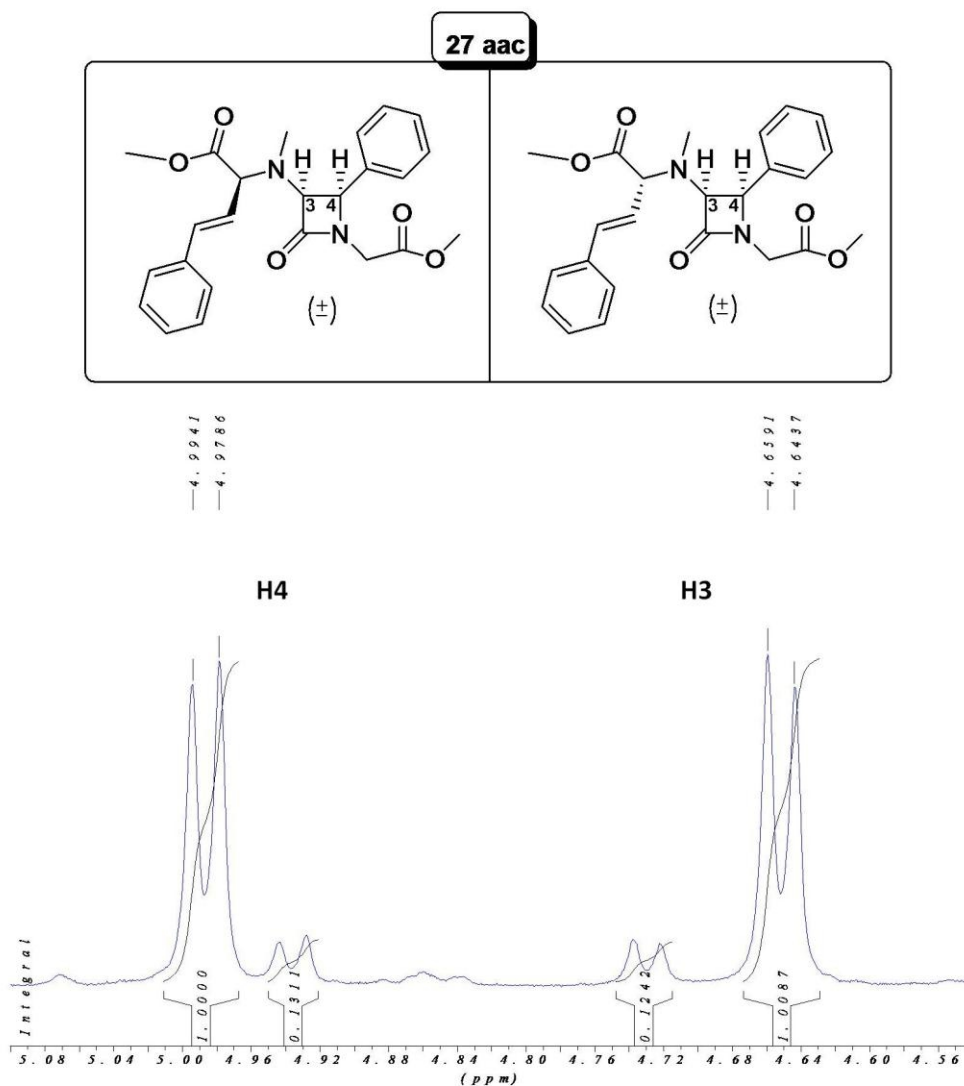
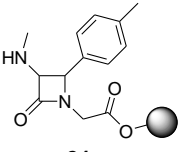

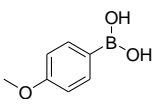
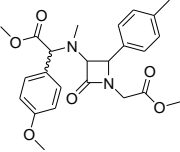
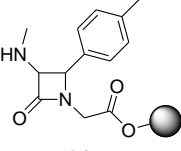

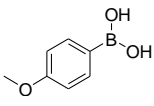
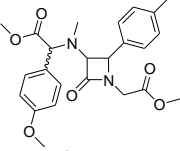


Figura 8

El experimento consistió en la síntesis en fase sólida de **24ace**, empleando la mezcla de solventes DCM:HFIP (9:1), y al mismo tiempo se comparó con la misma reacción de Petasis pero llevada a cabo en DCM solamente (**Tabla 6**).

Tabla 6

	Amina	Aldehído	Ácido borónico	Condiciones	Compuesto obtenido	Rendimiento ¹	Proporción de isómeros
1	 24ac	 10	 5e	DCM t.a. 72 h	 27ace	89%	5.8:1
2	 24ac	 10	 5e	DCM:HFIP (9:1) t.a. 72 h	 27ace	50%	5:1

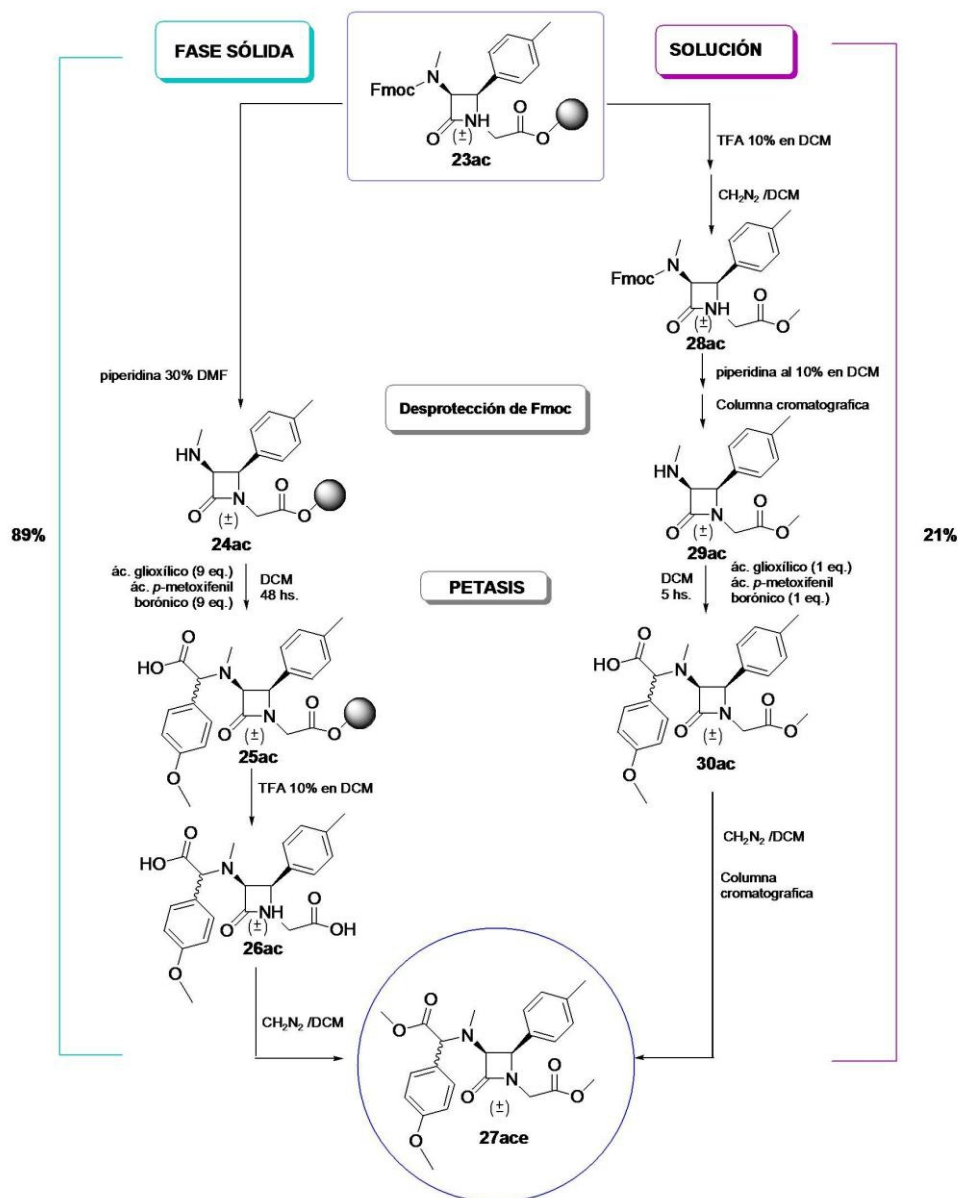
¹ Rendimiento obtenido en base al crudo de reacción.

Lo que pudimos observar a raíz de este experimento, fue que el rendimiento obtenido en la reacción que se llevó a cabo en DCM:HFIP (entrada 2), fue menor que el logrado con DCM. La disminución del rendimiento de la reacción al emplear la mezcla de solventes, podría deberse a que el uso del ácido HFIP en prolongados tiempos de reacción, provoca algo de ruptura de la unión del compuesto a la resina, proceso que ocurre en condiciones ácidas y que en general se emplea al final de todos los pasos de reacción, para obtener el compuesto de interés despegado de la resina. Por tal motivo y debido a estos resultados obtenidos, hemos descartado el uso del HFIP como cosolvente para la reacción de Petasis en fase sólida, ya que éste podría provocar disminución de la carga de la resina por promoción de la separación de la misma.

3.2.4. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA REACCIÓN DE PETASIS EN FASE SÓLIDA Y EN SOLUCIÓN

Con el fin de evaluar la metodología sintética en fase sólida, decidimos realizar una comparación de la reacción de Petasis tanto en solución como sobre soporte polimérico. Para esto se parte de la β -lactama soportada **23ac**, (**Esquema 15**) sintetizada según la metodología general. Luego se divide esta resina en 2 porciones, para realizar con cada una la reacción en distinta fase.

El experimento en fase sólida se desarrolló de acuerdo con la metodología descrita previamente. En primer lugar se desprotege la resina **23ac** de su grupo Fmoc de manera estándar, para luego mediante la reacción de Petasis, obtener al cabo de 48 h la resina **25ac**. Luego se libera el compuesto de su unión a la resina e inmediatamente es metilado con diazometano. El rendimiento total de la reacción, considerado desde la β -lactama **23ac** es del 89%.



Esquema 15

Por otra parte, el experimento en solución constó de los siguientes pasos: primeramente se despegó la β -lactama **23ac** de la resina de Wang. Luego se

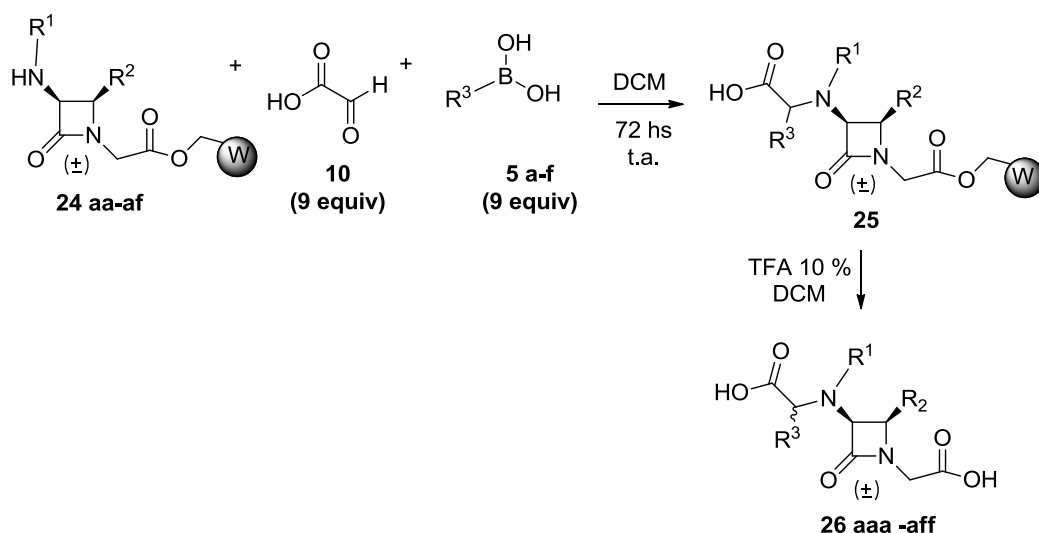
esterificó el ácido libre como éster metílico y posteriormente se procedió a la desprotección del grupo amino con piperidina al 10% en DCM durante 30 minutos. Al cabo de la reacción, se debió realizar una purificación por columna cromatográfica para poder así obtener la β -lactama **29ac**, con la que realizamos a continuación, la reacción de Petasis. Para esta reacción en solución, tanto los equivalentes de ácido glioxílico y borónico (1equiv. de cada uno) y el tiempo de reacción (5 h) utilizados fueron menores. La finalización de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa delgada y al cabo de la misma se metiló el nuevo ácido libre obtenido con diazometano. Por último, una purificación por columna cromatográfica permitió obtener el compuesto **27ace** con un rendimiento total del 21% (5 pasos de reacción).

A raíz de este experimento podemos concluir que si bien la metodología en fase sólida emplea más equivalentes de reactivos y mayor tiempo de reacción para la Petasis, presenta sustanciales ventajas. Por ejemplo, la manipulación es mucho más fácil y práctica, se evitan las columnas cromatográficas de los pasos intermedios de reacción y por último y no menos importante, la reacción es más eficiente siendo el rendimiento significativamente mayor que el proporcionado por la química en solución.

Frente a estos resultados promisorios, nuestro siguiente objetivo se centró en la preparación de una biblioteca de β -lactamas monocíclicas que incorporen α -aminoácidos en la posición 3 del anillo β -lactámico. Ante la posibilidad de probar sus características antibacterianas, los compuestos fueron sintetizados en forma de ácidos libres. Para identificar y evaluar pureza se empleó HPLC-MS.

3.2.5. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE UNA BIBLIOTECA DE β -LACTAMAS MONOCÍCLICAS ALTAMENTE FUNCIONALIZADAS

Para la generación de esta biblioteca de β -lactamas altamente funcionalizadas se siguió la secuencia sintética mostrada en el **Esquema 16**. Como resultado de la misma se obtienen las β -lactamas **26** con tres posiciones de variabilidad (R^1 , R^2 , R^3).



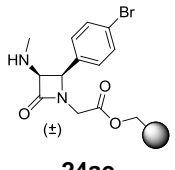
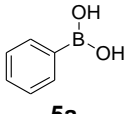
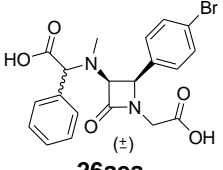
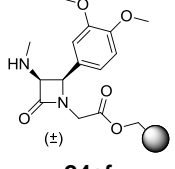
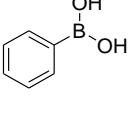
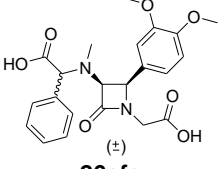
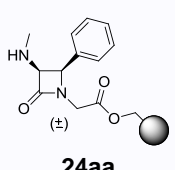
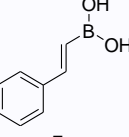
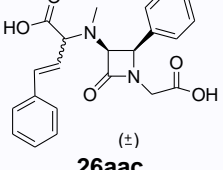
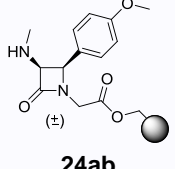
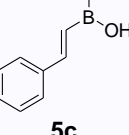
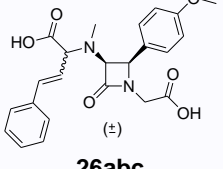
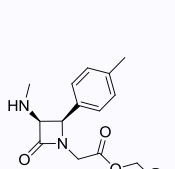
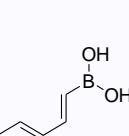
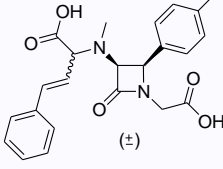
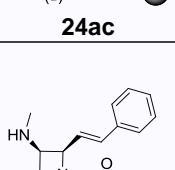
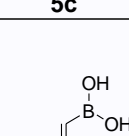
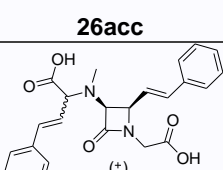
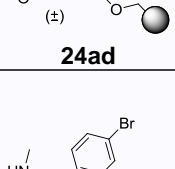
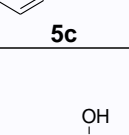
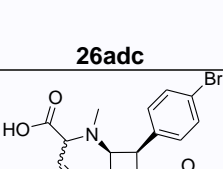
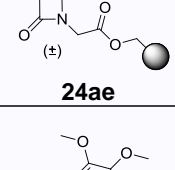
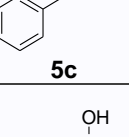
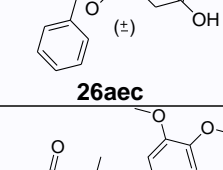
Esquema 16

El material de partida de la reacción de Petasis, la β -lactama **24**, se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito en los Esquemas 11 a 13. En la **Tabla 7** se presentan todos los compuestos obtenidos.

Tabla 7

	Amina	Ácido borónico empleado	Compuesto obtenido	Pureza % ⁱ	Rendimiento % ⁱⁱ	Proporción de isómeros ⁱ
1				95,3	98	3,4:1
2				100	53	5,5:1
3				100	cuant.	2,6:1
4				85	cuant	1 solo isom.

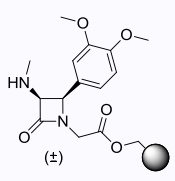
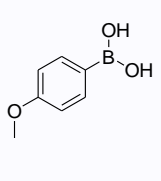
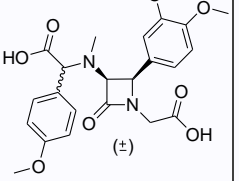
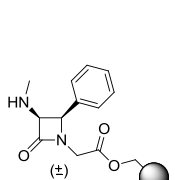
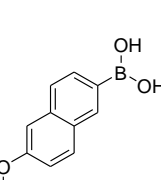
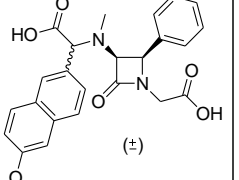
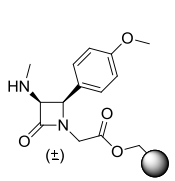
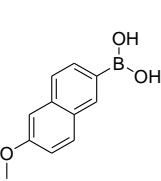
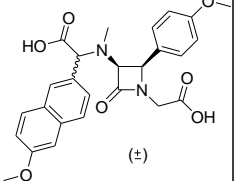
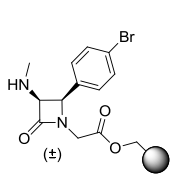
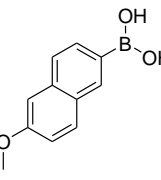
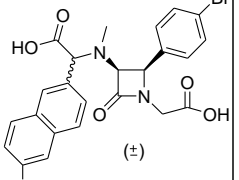
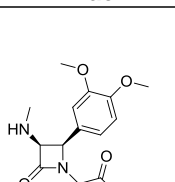
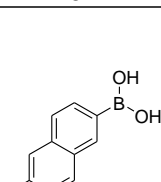
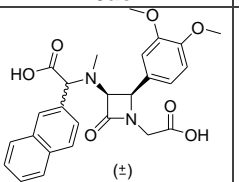
Continuación Tabla 7

5	 <p>24ae</p>	 <p>5a</p>	 <p>26aea</p>	61	74	7:1
6	 <p>24af</p>	 <p>5a</p>	 <p>26afa</p>	100	70	6,2:1
7	 <p>24aa</p>	 <p>5c</p>	 <p>26aac</p>	73,7	86	10:1
8	 <p>24ab</p>	 <p>5c</p>	 <p>26abc</p>	75,6	45	8:1
9	 <p>24ac</p>	 <p>5c</p>	 <p>26acc</p>	100	cuant.	7,5:1
10	 <p>24ad</p>	 <p>5c</p>	 <p>26adc</p>	100	cuant.	6,2:1
11	 <p>24ae</p>	 <p>5c</p>	 <p>26aec</p>	83,8	67	14:1
12	 <p>24af</p>	 <p>5c</p>	 <p>26afc</p>	100	65	3:1

Continuación Tabla 7

13	 24ab	 5d	 26abd	100	55	6,3:1
14	 24ac	 5d	 26acd	100	cuant.	5,3:1
15	 24ad	 5d	 26add	100	cuant.	3,6:1
16	 24ae	 5d	 26aed	84,4	92	1,7:1
17	 24af	 5d	 26afd	98,6	57	4:1
18	 24aa	 5e	 26aae	30	cuant.	5:1
19	 24ab	 5e	 26abe	49	47	9:1
20	 24ae	 5e	 26aee	31,9	54	5:1

Continuación Tabla 7

21	 24af	 5e	 26afe	59,6	30	2,6:1
22	 24aa	 5f	 26aaf	52	46	3,4:1
23	 24ab	 5f	 26abf	47	34	4,5:1
24	 24ae	 5f	 26aef	67,5	45	3,4:1
25	 24af	 5f	 26aff	25	61	3:1

ⁱ Determinados por HPLCⁱⁱ Rendimiento del crudo de reacción en base a la carga teórica de la resina (considerado desde la resina **23**, 3 pasos de reacción).

La construcción de esta interesante biblioteca nos ha permitido sacar algunas conclusiones relevantes. En primer lugar, hemos comprobado que los rendimientos y la aparición de determinadas impurezas dependen del ácido borónico empleado.

En general, los mejores rendimientos y purezas se obtuvieron con los ácidos fenilborónico (**5a**) (entradas 1 a 6), *trans*-2-fenil-vinilborónico (**5c**) (entradas 7 a 12) y *trans*-1-octen-1-il borónico (**5d**) (entradas 13 a 17).

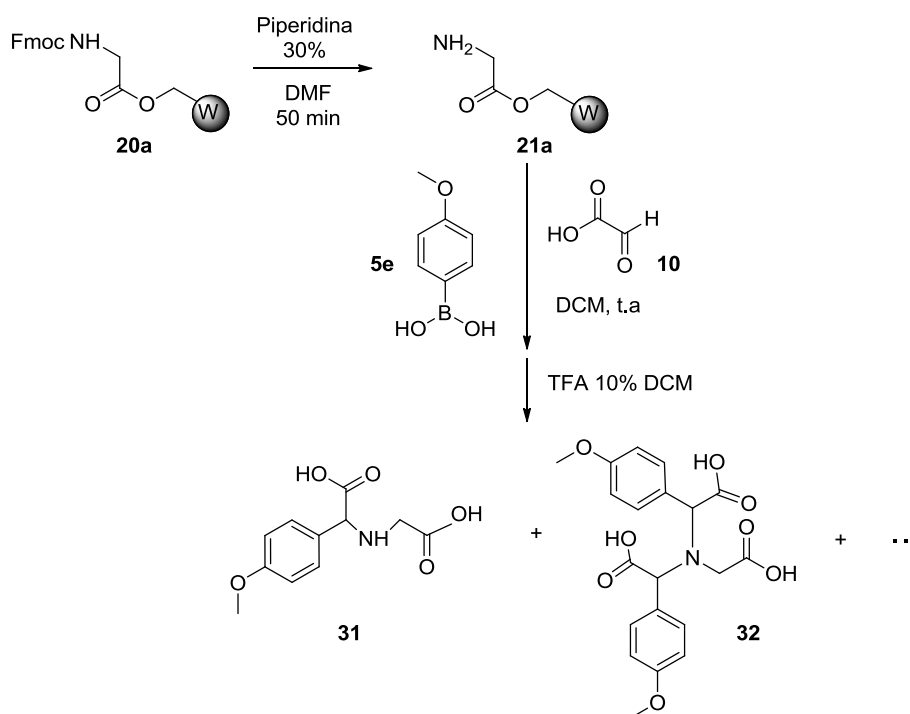
Con los ácidos 6-metoxi-2-naftalen borónico y 4-metoxifenil borónico, ácidos ricos en electrones, se obtuvieron en general rendimientos y purezas más bajos (entradas 18 a 25). Se han analizado detalladamente las impurezas generadas en estas reacciones y se ha visto que las mismas se repetían en cada una de ellas. Para tratar de elucidar estas impurezas, llevamos a cabo algunos estudios.

La formación de algún compuesto que posea boro en su estructura, o el eventual depósito de alguna especie de boro sobre la resina, quedó descartada al verificar la ausencia de este elemento mediante RMN de ^{11}B de los crudos de reacción.⁵¹

Como las impurezas eran constantes al variar los sustituyentes de la β -lactama de partida, hicimos unas pruebas con los precursores comunes a todas ellas. Si recordamos la síntesis general de las β -lactamas (**Esquema 11**), en todos los casos se partía de Fmoc-Glicina unida a la resina de Wang. Suponiendo una síntesis incompleta de la β -lactama, este aminoácido, luego de la eliminación del Fmoc, podría ser el sustrato de la reacción de Petasis, generando impurezas en el crudo final. Por ello llevamos a cabo un experimento empleando el ácido 4-metoxifenil borónico (**5e**) y el ácido glioixílico (**11**) como aldehído (**Esquema 17**). Así, una vez finalizada la reacción de Petasis, se procedió a la separación de la resina y al análisis del crudo de reacción mediante HPLC-MS.

Lo que pudimos observar con este experimento, aparte de la formación del producto esperado **31**, fue la aparición de varias de las impurezas presentes en todas las reacciones de Petasis de β -lactamas que emplearon el ácido 4-metoxifenil borónico. Una de ellas ha podido ser identificada y se trata del compuesto **32**, producto de una consecutiva reacción de Petasis sobre el grupo amino secundario de **31**.

En la bibliografía consultada,^{28a} existen indicios de obtención de bajos rendimientos cuando se utiliza el ácido 4-metoxifenil borónico, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio. Una de las causas de este fenómeno podría ser la desestabilización del intermediario activado debido a la aumentada densidad electrónica de este ácido borónico en particular.



Esquema 17

3.2.6. OBSERVACIÓN DE ISÓMEROS DEBIDO A LA INTERCONVERSIÓN LENTA DE ROTÁMEROS

Durante el desarrollo de la metodología sintética para la reacción de multicomponentes de Petasis, observamos algunas peculiaridades. Al realizar un experimento de RMN de ¹H del compuesto **28ac**, **Figura 9**, observamos la presencia de dos compuestos. Tratándose de una mezcla racémica de los isómeros *cis*, sólo debería observarse un compuesto, por lo que la aparición de señales correspondientes a dos estructuras podría deberse al isomerismo en

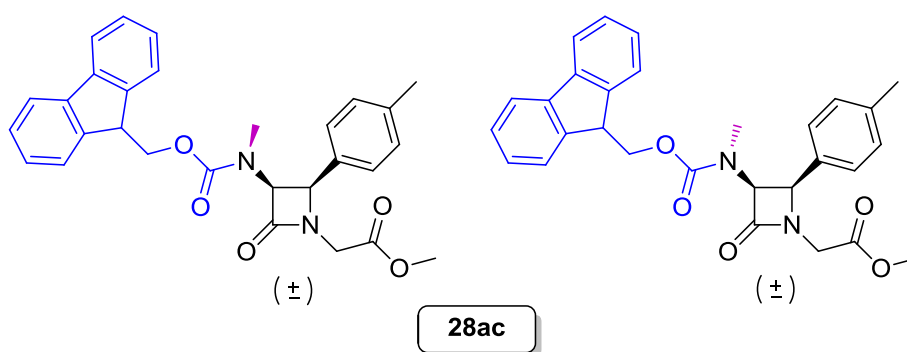


Figura 9

el nitrógeno que no forma parte del anillo azetidiona.

En las aminas alifáticas, el átomo de nitrógeno tiene hibridación sp^3 ; los tres sustituyentes están dirigidos hacia los vértices de un tetraedro, y el par de electrones no compartido ocupa el cuarto vértice. Una característica interesante de esta estructura tetraédrica es que las aminas sufren una inversión piramidal tipo paraguas muy rápida, la cual interconvierte las estructuras (que son imágenes especulares). Este fenómeno se conoce como inversión del nitrógeno y se produce a través de un estado de transición en el que el átomo de nitrógeno presenta hibridación sp^2 y el par de electrones no enlazantes ocupa el orbital p (**Figura 10**). Estas rotaciones alrededor de simples enlaces son generalmente muy rápidas en la escala de tiempo de la RMN, y es por esto que en los espectros aparecen comúnmente señales únicas.

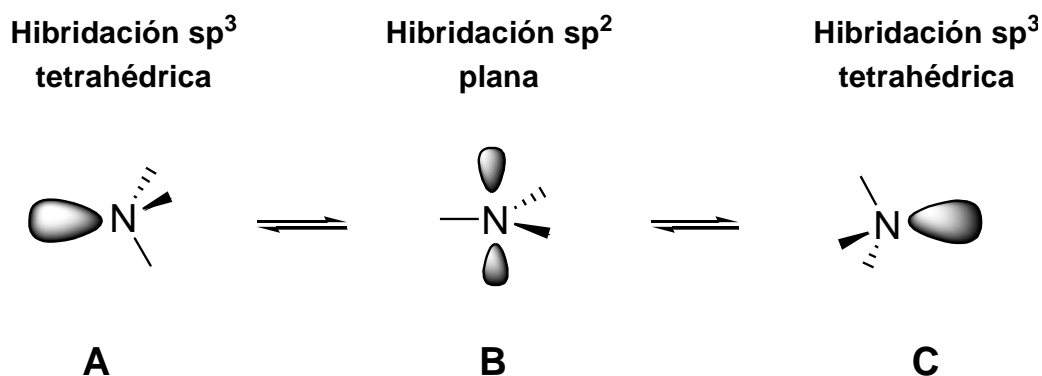


Figura 10

En algunos enlaces con carácter doble parcial pueden presentarse interconversiones lentas. A temperatura ambiente las amidas muestran una velocidad de interconversión entre conformeros (rotámeros) reducida por el carácter doble parcial del enlace $(O=C)-N$. Es por esto que a temperatura ambiente, en el espectro de RMN de 1H en $DMSO-d_6$, se observan, por ejemplo, cuatro señales para los dos grupos metilo señalados en la **Figura 11** (a δ 2.15, 2.24, 2.33, 2.47 ppm) debidas a la no equivalencia por la lenta interconversión.

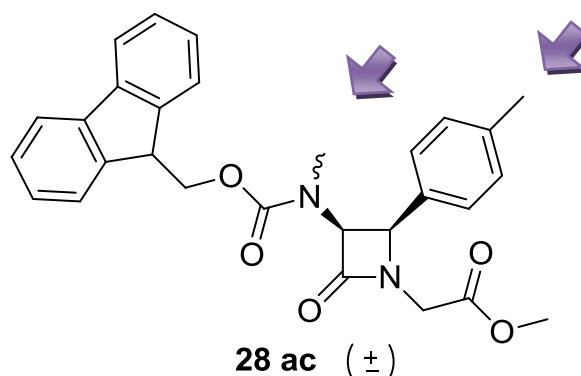


Figura 11

Para comprobar este fenómeno, se realizó un experimento de RMN de ^1H en DMSO-d_6 , registrando los espectros obtenidos al aumentar progresivamente la temperatura. En la **Figura 12** se aprecia la comparación de los espectros obtenidos a 25, 30, 40, 45, 55, 65, 75 y 85 °C respectivamente.

Así pudimos comprobar que a temperaturas superiores a 75°C las 4 señales correspondientes a los metilos colapsan a solo dos, verificándose así la presencia de los dos confórmers del compuesto de la **Figura 11**.

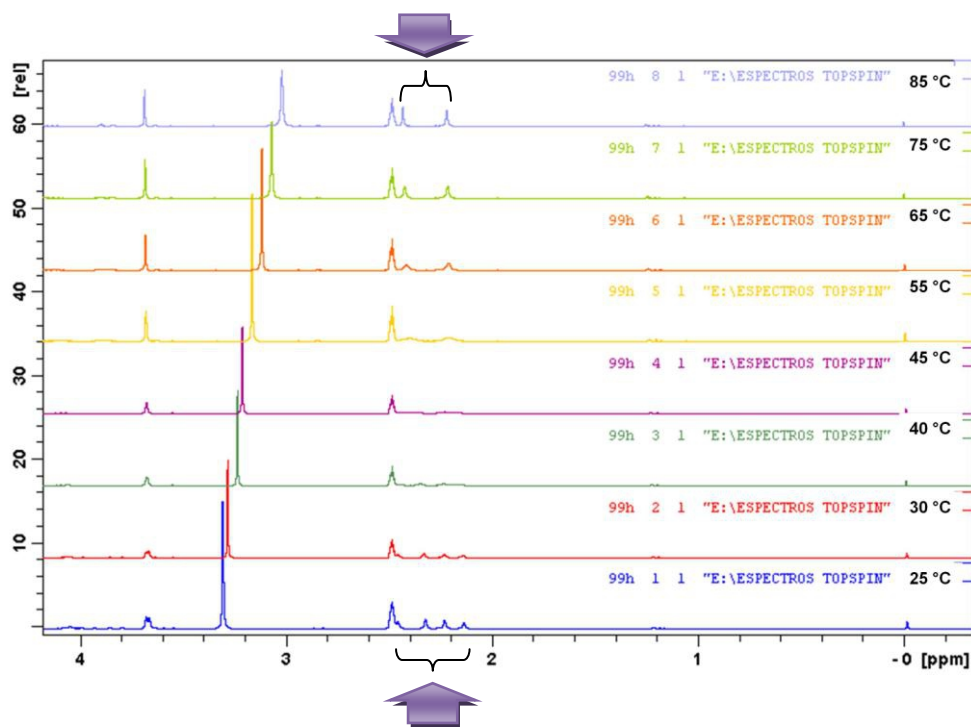
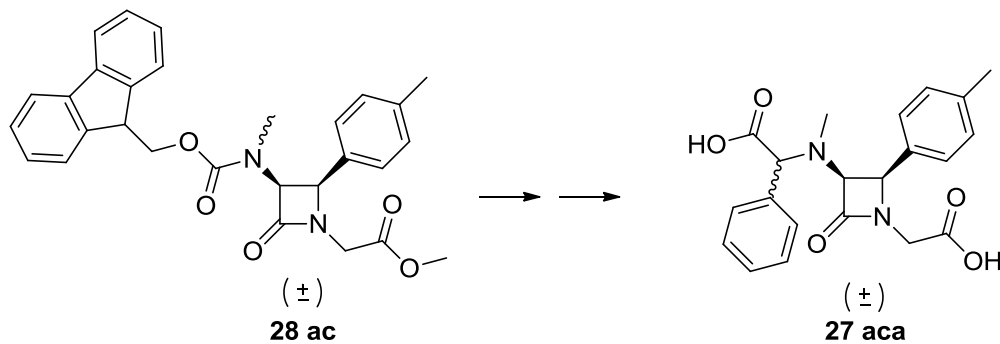


Figura 12

La observación de los dos rotámeros desaparece al continuar la síntesis, ya que el producto de la reacción de Petasis (**27aca**, **Esquema 18**) no presenta diferenciación entre los confórmeros, de acuerdo al espectro de RMN de ^1H .

**Esquema 18**

El compuesto **27aca** es ahora una mezcla de epímeros en el nuevo centro estereogénico formado.



3.3. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado en este capítulo el estudio y la aplicación de la reacción de multicomponentes de Petasis a la síntesis en fase sólida de una biblioteca de compuestos biológicamente prometedores.

Se sintetizó una variada biblioteca de β -lactamas monocíclicas que poseen la funcionalidad aril o vinil glicina, las cuales se lograron obtener con buenos rendimientos.

Se demostró que la síntesis en fase sólida es mucho más conveniente y versátil que la química en solución para la obtención de este tipo de compuestos.

Los compuestos sintetizados están siendo evaluados contra distintos objetivos biológicos (actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, etc).

Sin duda, la metodología desarrollada abre un panorama promisorio en nuestro laboratorio en cuanto a futuras aplicaciones de la reacción de multicomponentes a la preparación de compuestos de interés biológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

DIVERSIFICACIÓN DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR



*"THE WHOLE IS MORE IMPORTANT THAN
THE SUM OF ITS PARTS"*



4.1. INTRODUCCIÓN

La Hibridación Molecular (HM)⁵² es una de las estrategias del descubrimiento de fármacos, que involucra el diseño racional de nuevas entidades químicas mediante la fusión (generalmente a través de una unión covalente) de dos drogas, ambas compuestos activos o bien de reconocidas unidades farmacofóricas que derivan de moléculas bioactivas conocidas. El objetivo de esta unión es la obtención de un nuevo compuesto híbrido que posea una mejorada afinidad y eficacia comparada con las drogas que le dieron origen. Adicionalmente, esta estrategia puede resultar en compuestos que presenten un perfil de selectividad modificado, mecanismos de acción diferentes o duales y reducidos efectos secundarios indeseables.⁵³

Considerando el hecho de que se emplean como material de partida sustancias modelo conocidas, ya evaluadas en lo concerniente a sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, toxicidad, mecanismo de acción, es posible la construcción de grandes bibliotecas químicas, constituidas por cientos o incluso miles de híbridos molecularmente homólogos, que traen consigo un alto nivel de información acumulada, por ejemplo requerimientos estructurales, forma de interacción ligando proteína, interacciones ligando receptor y relación estructura actividad, que transforman el desarrollo de nuevas drogas en un proceso más rápido y eficiente. Por otro lado, si el grado de homología de la nueva molécula híbrida es bajo o inexistente, el descubrimiento de nuevos compuestos líderes se hace mediante *screening* masivo de la biblioteca de compuestos generada.

Teniendo en mente nuestro objetivo de aplicar nuevas metodologías de síntesis en fase sólida para la obtención de moléculas bioactivas, decidimos emplear la estrategia de Hibridación Molecular para la construcción de una biblioteca de compuestos con potencial actividad biológica. Para esto pensamos en conjugar un derivado de penicilina con una porción peptídica

dando origen a una serie de compuestos híbridos que presentan varios puntos de diversidad (**Figura 13**).

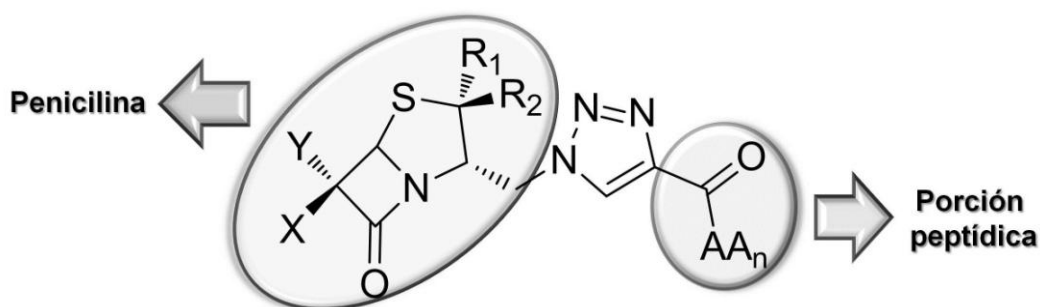


Figura 13

En lo que se refiere a la actividad intrínseca de cada una de estas dos subunidades, podemos enumerar, en primer lugar las relativas a las penicilinas.

Parte de la estructura de las penicilinas está constituida por un anillo β -lactámico, estructura heterocíclica de gran valor en la química orgánica y medicinal, también llamada: "privilegiada", ya que presenta un amplio rango actividades biológicas. Además de su papel fundamental en las terapias antibacterianas gracias a su amplio espectro de actividad y baja toxicidad, también se ha descubierto la actividad de derivados con dicha estructura en la inhibición de: la absorción de colesterol,⁵⁴ del antígeno prostático específico,⁵⁵ de trombina y triptasa,⁵⁶ de la proteasa del citomegalovirus humano,⁵⁷ de cisteína proteasa,⁵⁸ y de la amida hidrolasa de ácidos grasos humana,⁵⁹ así como también actividad anticancerígena⁶⁰ y neuroprotectora.⁶¹

Por otro lado, la porción peptídica que se piensa incorporar en estos híbridos, por su parte podría contribuir a facilitar el transporte a través de las membranas celulares como también a interacciones y reconocimiento proteína-proteína.⁶²

Para la conjugación de estas dos estructuras con propiedades intrínsecas, la penicilina y la porción aminoacídica, se pensó en utilizar la reacción que es en la actualidad la principal representante de las reacciones "Click", la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada por cobre. Para llevar a cabo este objetivo se pensó en realizar la reacción

click entre una penicilinizada y alquinos terminales unidos a soporte sólido que aportarían la porción peptídica (**Figura 14**).

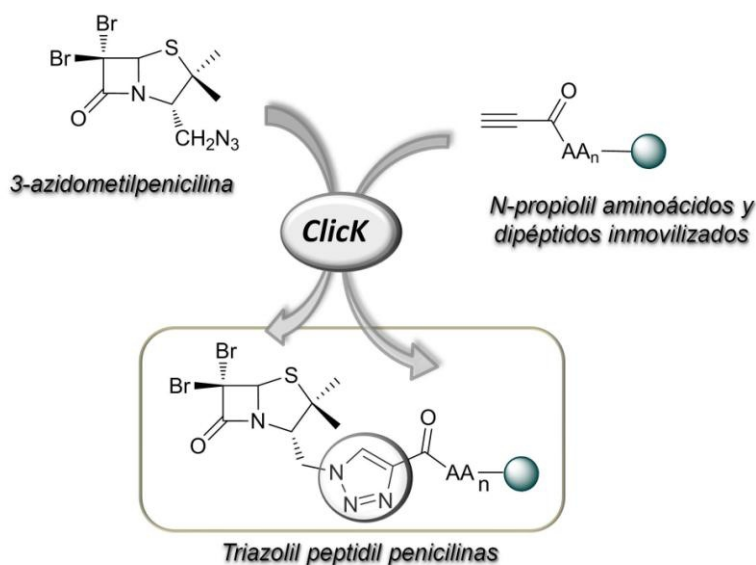


Figura 14

De este modo se lograría obtener una biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, híbridos cuyas subunidades quedan unidas mediante una estructura, un 1,2,3-triazol, que en este caso particular, también posee actividades farmacofóricas importantes.

La síntesis de 1,2,3-triazoles es claramente la reacción “click” más usada en la actualidad,^{63,64} y es de gran importancia en el área del descubrimiento de fármacos no solo por su fiabilidad y potencialidad como reacción de ensamblado, sino también por las propiedades fisicoquímicas favorables de los triazoles.

Los 1,2,3-triazoles poseen una alta estabilidad química frente a agentes hidrolíticos, oxidantes o reductores. Además presentan características aromáticas, son buenos aceptores de enlace hidrógeno y son relativamente resistentes a la degradación metabólica. Esta especial estructura se encuentra en numerosas moléculas biológicamente activas, como ser antimicrobianos,⁶⁵ antialérgicos,⁶⁶ antiinflamatorios, anticancerígenos,⁶⁷ agentes anti HIV,⁶⁸ y también en una nueva serie de agonistas de receptores adrenérgicos β -3.⁶⁹

Sumado a esto, se reportaron algunos peptidotriazoles como nuevos inhibidores del crecimiento de *Leishmania mexicana*.⁷⁰

Desde el descubrimiento de este proceso regioespecífico de obtención de triazoles catalizado por cobre en 2002,^{71,72} se han publicado numerosas aplicaciones biológicas de esta reacción de acoplamiento. Procedimientos experimentales simples, completa conversión, altos rendimientos, especificidad para los 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos, hacen que la purificación del producto sea fácil y se convierte en una excelente herramienta para la síntesis de bibliotecas combinatorias, modificaciones de productos naturales,⁷³ e incluso puede llevarse a cabo *in situ* en medios fisiológicos.

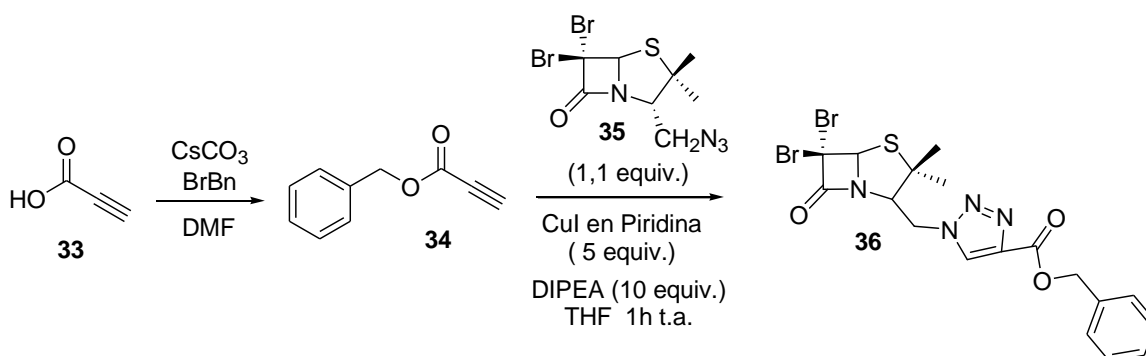


4.2. DIVERSIFICACIÓN DEL NÚCLEO PENAM DE PENICILINAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

4.2.1. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR EN SOLUCIÓN

Para comenzar con el estudio de la cicloadición 1,3-dipolar, y luego poder ser aplicada a la fase sólida, llevamos a cabo un experimento en solución, empleando el alquino **34** (**Esquema 19**) y la azida **35** que es la pensábamos usar para la posterior síntesis de la biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas.

El alquino utilizado para esta prueba (**34**), fue sintetizado a partir del ácido propargílico (**33**), el cual fue esterificado con bromuro de bencilo.⁷⁴ Luego se realiza la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por CuI,⁷⁰ entre el alquino **34** y 1,1 equivalentes de la 3-azidometilpenicilina **35**, cuya síntesis se verá más adelante en este capítulo, obteniéndose luego de 1 hora de reacción y mediante una posterior purificación cromatográfica, el compuesto **36** (65% de rendimiento) de acuerdo a los espectros de RMN de ¹H y de RMN de ¹³C.



Esquema 19



Esta prueba en solución, nos ha proporcionado información sobre varios aspectos de la reacción a tener en cuenta, y además este rendimiento obtenido nos incentivó a realizar nuevos intentos para mejorar luego la síntesis en fase sólida.

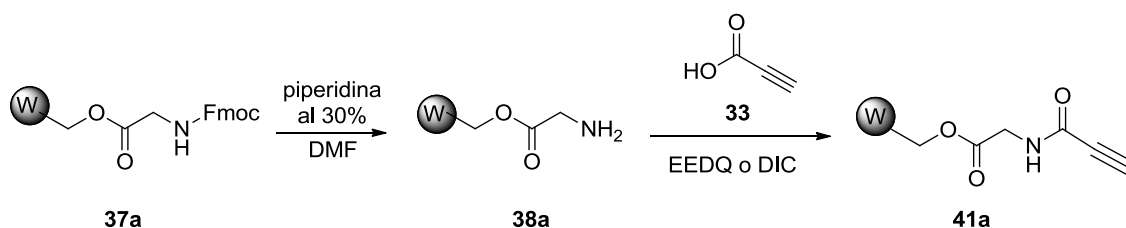
En la entrada **1** se utilizó el aminoácido leucina (Leu) como AA₂, y al verificar que la reacción no se completaba, se decidió utilizar un aminoácido con menor impedimento estérico, en nuestro caso glicina (Gly), para las siguientes pruebas.

Las condiciones de la entrada 5⁷⁶ fueron las óptimas hasta el momento, las cuales deberán ser ahora ensayadas en acoplamientos entre diferentes aminoácidos (incluyendo aquellos en los que el acoplamiento podría ser más dificultoso debido a problemas de impedimento estérico).

4.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CICLOADICIÓN 1,3 DIPOLAR EN FASE SÓLIDA

Antes de comenzar con la síntesis de la biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, se realizó un estudio previo de la cicloadición 1,3 dipolar en fase sólida entre una azidometilpenicilina y un alquino unido a resina de Wang, con el fin de optimizar las condiciones de reacción.

La preparación del alquino unido a la resina de Wang (**41a**, **Esquema 21**), se realizó a partir de glicina unida a resina de Wang (**37a**), a la que luego de ser desprotegida para obtener **38a**, se la utiliza para el acoplamiento con el ácido propargílico (**33**).



Esquema 21

Para realizar esta alquilación se evaluaron dos reactivos acoplantes diferentes: la 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ)⁷⁶ y la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC).⁷⁷ En la **Tabla 9** se muestran las condiciones y

reactivos empleados para cada una. La finalización de la reacción se determinó mediante el test de Kaiser.

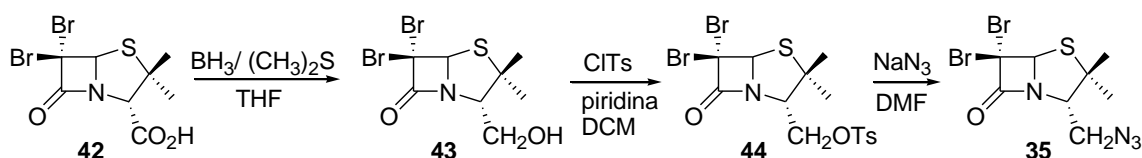
Tabla 9

	Acoplante	Equív de ác. propiónico	Condiciones	Resultado
1	EEDQ (3 equiv)	3	DCM / 5 h. t.a.+ 15 h t.a. ⁱ	reacción completa
2	DIC (10 equiv)	20	DCM/DMF 1:1 / 2 h t.a.	reacción completa

ⁱ luego de las 5 h, se lava la resina y se suspende nuevamente la misma con el solvente y reactivos de reacción.

Si bien ambos reactivos permiten obtener el producto deseado con similar rendimiento, por razones de practicidad, en lo que se refiere a la rapidez de la reacción, generalmente se utilizó DIC (entrada 2), para realizar los acoplamientos con el alquino.

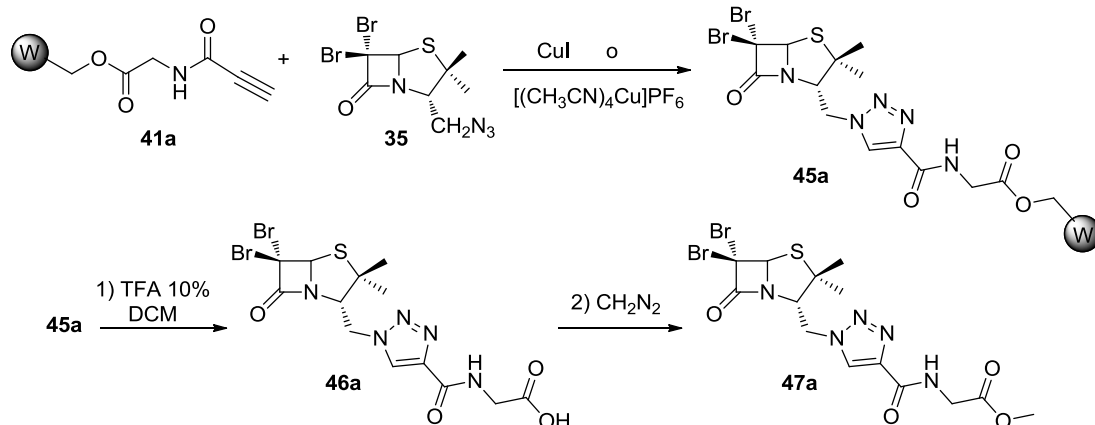
Por otro lado la 3-azidometilpenicilina **35** (Esquema 22), se sintetizó partiendo del derivado del ácido penicilánico **42** que, por reducción con el complejo borano/ sulfuro de metilo ($\text{BH}_3/(\text{CH}_3)_2\text{S}$), se transformó en el alcohol **43**. Posteriormente se transforma el alcohol en el tosilato correspondiente (**44**) y se procede a sintetizar la azida **35** por sustitución con azida de sodio (NaN_3).⁷⁸



Esquema 22

Así, una vez obtenidos **41a** y **35**, se procede a evaluar la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre (I) en fase sólida, empleando diferentes condiciones y reactivos para lograr la optimización de la misma. Como catalizadores de cobre se usaron tanto CuI como $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$.⁷⁹ (Esquema 23). La finalización de la cicloadición 1,3-dipolar, se comprobó mediante espectroscopía de infrarrojo observando la completa desaparición de la señal del alquino a 2110 cm^{-1} . Así, una vez obtenida la resina **45a**, se la trata

con ácido trifluoroacético (TFA) para producir la separación del polímero. Finalmente se metila el ácido libre con diazometano y, mediante una purificación por columna cromatográfica (hexano:AcOEt, gradiente), se logra obtener el compuesto **47a**.



Esquema 23

Las diferentes condiciones empleadas y los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 10**.

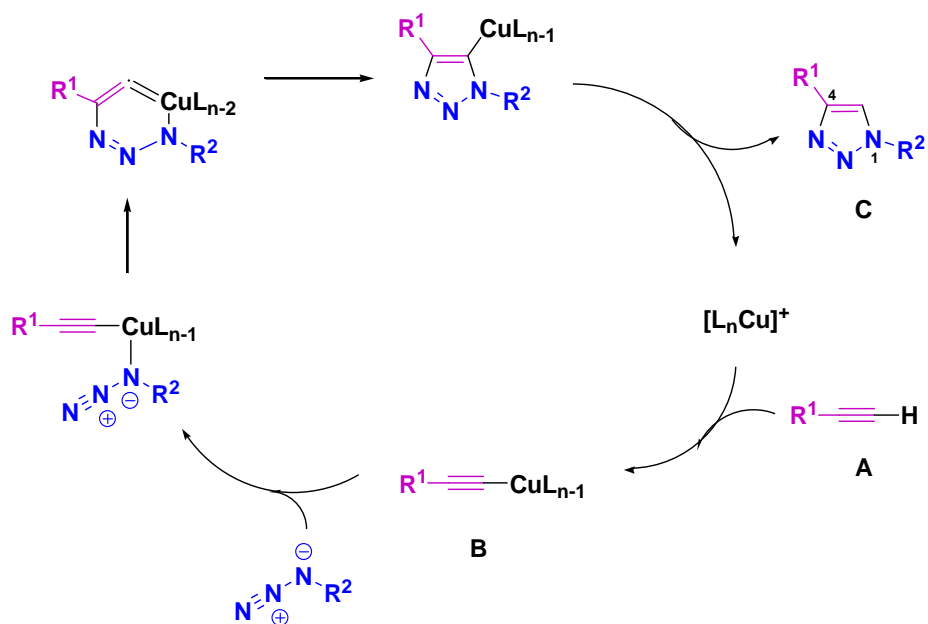
Tabla 10

	Catalizador	Azida (equiv.)	Solvente	Condiciones	DIPEA (equiv.)	Tiempo (h)	Rendimiento(%)
1	0.1 equiv. CuI/ piridina	2	THF	t. a.	10	2	15
2	0.5 equiv. CuI/ piridina	2	THF	t. a.	10	2	43
3	5 equiv. CuI/ piridina	2	THF	t. a.	10	21	9
4	0.5 equiv CuI, 1 equiv. ác. ascórbico 2 equiv. lutidina	2	CH ₃ CN/ DMSO	t. a.	---	2	14
5	5 equiv. CuI/piridina	2	THF	Microondas 85°C,60 W	10	0.07	10
6	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	2	DCM	t. a.	---	2	44

En principio se usaron 0,1 equivalentes de CuI en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina y piridina, ésta última agregada con el fin de disolver y estabilizar el CuI. Luego de 2 h de reacción a temperatura ambiente, se libera el compuesto de su unión a la resina, según el procedimiento expresado anteriormente, y así se logra obtener el producto deseado con un 15 % de rendimiento global (5 pasos de reacción, basado en la carga inicial de la resina) (Entrada 1). Cuando se aumentaron los equivalentes de Cu (I) a 0.5, el rendimiento aumentó significativamente (43%) (Entrada 2). Curiosamente, un posterior incremento de los equivalentes de Cu (I) no mejoró el rendimiento, sino que lo disminuyó a un 9% (Entrada 3). Probablemente, la causa de esta disminución podría deberse al depósito de ciertas especies de cobre sobre la resina.⁸⁰ Por otro lado, la adición de ácido ascórbico para evitar la oxidación del Cu (I) tampoco mejoró el rendimiento (Entrada 4). Los intentos de mejorar el desarrollo de la reacción usando radiación de microondas no fueron exitosos, observándose en estos casos una importante descomposición de los materiales de partida (Entrada 5). Cuando en lugar del CuI se empleó el catalizador de cobre soluble, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, los resultados fueron comparables al mejor obtenido con CuI (44%) (Entrada 6).

La presencia de cantidades catalíticas de Cu (I), que pueden unirse a los alquinos terminales, conduce a una rápida, altamente eficiente y principalmente regioselectiva cicloadición de azidas a alquinos, en contraposición con lo que sucedía con su antecesora, la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen⁸¹ que además de ser bastante lenta, no era regioselectiva, dando origen a mezclas de los triazoles regioisoméricos 1,4 y 1,5 disustituídos.

En la cicloadición de azidas a alquinos catalizada por cobre, también conocida por sus siglas en inglés como CuAAC (copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction), se generan acetiluros de cobre (**B**, **Esquema 24**) debido a la acción de complejos de cobre sobre el alquino terminal, y luego, inmediatamente se acoplan con las azidas en una secuencia muy eficiente dando origen a los heterociclos 1,2,3 triazoles 1,4 disustituídos (**C**).⁸² Para verificar la obtención del producto regioisomérico 1,4 en nuestra reacción, realizamos un experimento espectroscópico ROESY del compuesto **47a**.



Esquema 24

El espectro de ROESY mostró la presencia de picos de cruce entre el protón del triazol y el grupo metileno *N*-sustituido proporcionando así la evidencia de la formación del 1,4-triazol (**Figura 15**).

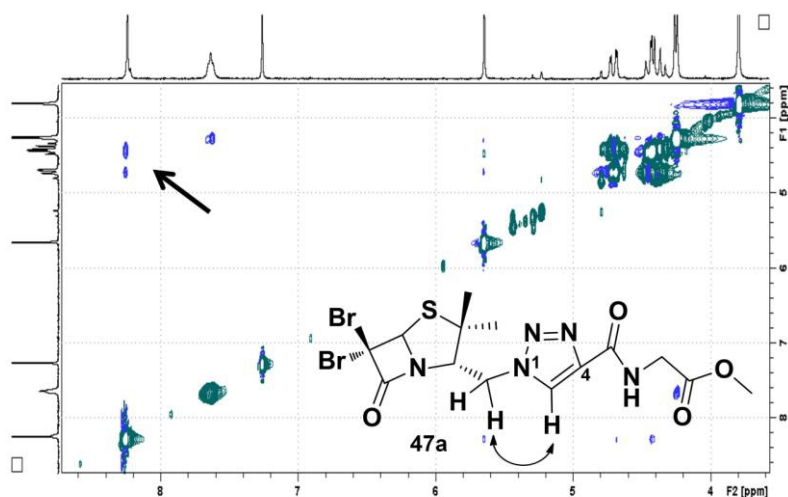
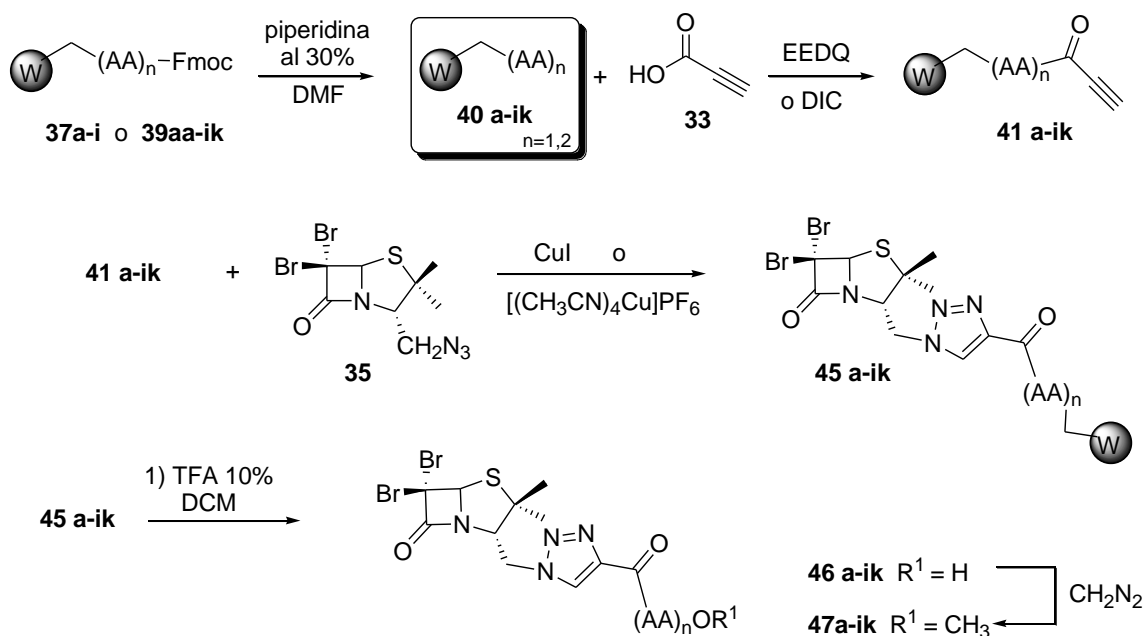


Figura 15

Esta regioselectividad que concuerda con la reportada en la literatura, también puede explicarse debido al elevado impedimento estérico que presenta el alquino unido al soporte sólido, siendo más favorable la obtención del triazol menos impedido.

4.2.4. SÍNTESIS DE UNA BIBLIOTECA DE TRIAZOLIL AMINOACIL (PEPTIDIL) PENICILINAS EN FASE SÓLIDA

Para la síntesis de esta biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, se partió de diferentes aminoácidos o dipéptidos unidos a resina de Wang (**37a-i** o **39aa-ik**, **Esquema 25**) los que luego de ser desprotegidos de sus grupos Fmoc (**40a-ik**), se hicieron reaccionar con el ácido propiólico **33** para obtener los correspondientes alquinos inmovilizados (**41 a-ik**). Luego, estos alquinos se emplearon para la cicloadición 1,3 dipolar con la azidometilpenicilina **35** empleando como catalizadores CuI o $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, según las metodologías optimizadas que se detallan en el apartado anterior (entradas 2 y 6, Tabla 10).

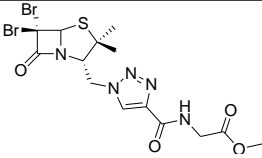
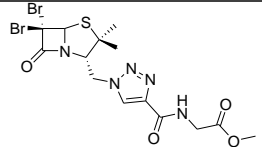
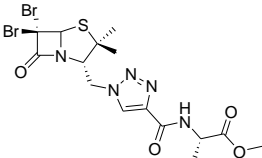
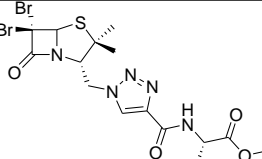
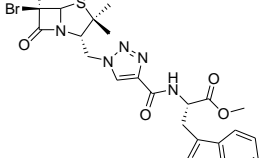
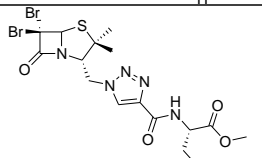
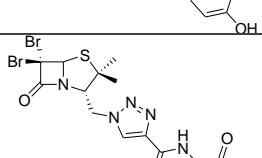
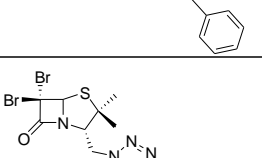


Esquema 25

Una vez obtenida la resina **45**, se la trata con TFA al 10 % en DCM para producir la separación del polímero. Luego, en algunos casos se metila el ácido libre con diazometano y posteriormente se realiza una purificación por columna cromatográfica (hexano:AcOEt, gradiente).

Las condiciones y resultados logrados para cada compuesto obtenido se expresan en la **Tabla 11**.

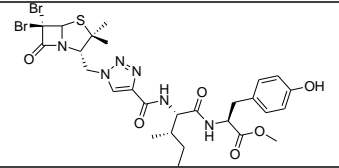
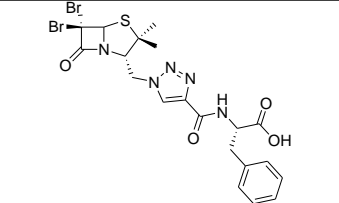
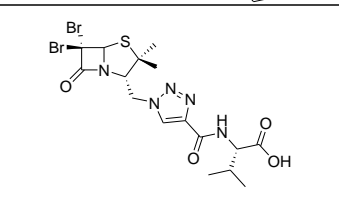
Tabla 11

	Com- puesto	Estructura	AA _n	Método	Tiem- po (h)	R ¹	Ren- di- mien- to (%) ^a
1	47a		Gly	0.5 equiv CuI/ piridina	2	Me	43
2	47a		Gly	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	2	Me	44
3	47b		Val	0.5 equiv CuI/ piridina	1.5	Me	50
4	47c		Ala	0.5 equiv CuI/ piridina	18	Me	35
5	47d		Trp	0.5 equiv CuI/ piridina	2	Me	25
6	47e		Tyr	0.5 equiv CuI/ piridina	18	Me	36
7	47f		Phe	0.5 equiv CuI/ piridina	18	Me	36
8	47g		Met	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	21	Me	17

Continuación Tabla 11

9	47h		Thr	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	21	Me	30
10	47fa		Phe-Gly	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	2	Me	37
11	47ci		Ala-Leu	0.5 equiv Cu/ piridina	18	Me	13
12	47ca		Ala-Gly	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	2	Me	42
13	47ei		Tyr-Leu	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	18	Me	30
14	47fi		Phe-Leu	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	18	Me	49
15	47fj		Phe-Ile	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	4	Me	40
16	47fb		Phe-Val	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	4	Me	38
17	47fk		Phe-Pro	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	4	Me	30
18	47ii		Leu-Leu	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	4	Me	25

Continuación Tabla 11

19	47ej		Tyr-Ile	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	4	Me	29
20	46f		Phe	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	8	H	20°
21	46b		Val	0.3 equiv [Cu(CH ₃ CN) ₄]PF ₆	18	H	38°

^b Rendimiento global luego de separación de la resina, seguida por esterificación, metilación y purificación mediante columna cromatográfica (basado en la carga inicial de la resina). Reacciones llevadas a cabo a escala de 0,1 mmol y monitoreadas mediante la desaparición de la señal del alquino en FT-IR.

^c Casos en los que no se realizó esterificación.

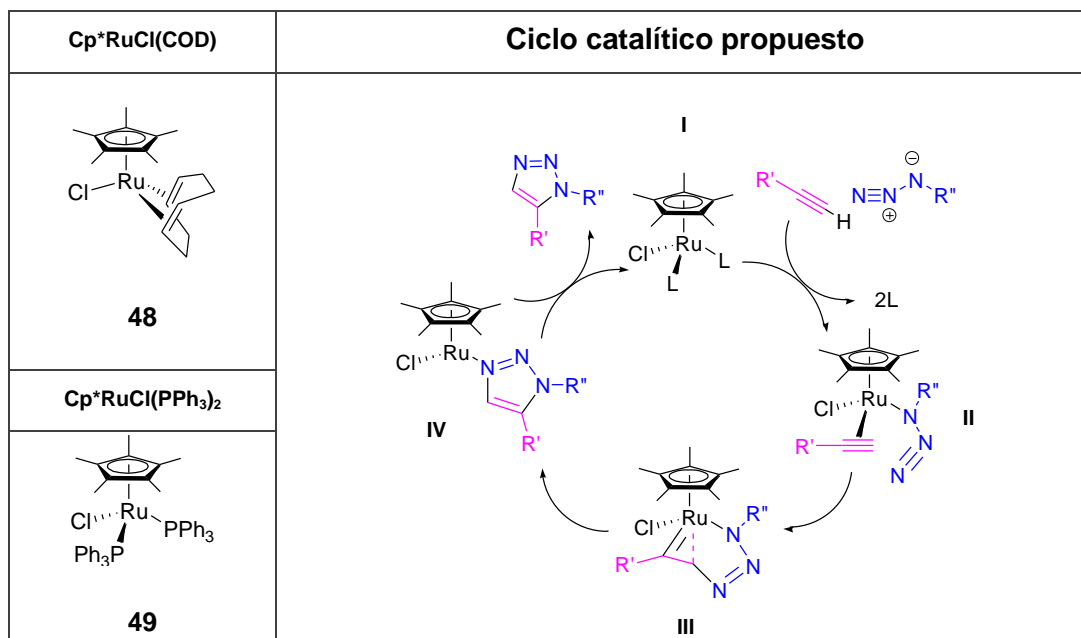
Como se puede apreciar, en general se obtuvieron buenos rendimientos para la secuencia sintética completa y la regioselectividad fue excelente en todos los casos, dando origen exclusivamente al regioisómero 1,4-disustituido.

4.2.5. CICLOADICIÓN 1,3 DIPOLAR CATALIZADA POR RUTENIO

Como hemos visto, la cicloadición entre alquinos y azidas catalizada por cobre da origen, exclusivamente a los 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos. Para la obtención del complementario triazol 1,5-disustituido, según lo recientemente reportado en química en solución, las mejores perspectivas se centran en la catálisis por complejos de η^5 -pentametilciclopentadienil rutenio [Cp*₂RuCl].⁸³ Las propiedades catalíticas de estos complejos se deben principalmente a la presencia del ligando Cp* (pentametil-ciclopentadienilo), rico en electrones, que estabiliza altos estados de oxidación en el centro metálico. De ellos, son especialmente interesantes el cloruro de pentametilciclopentadienil(ciclooctadieno) rutenio (II) (**48**, Esquema 26) el cloruro de pentametilciclopentadienil [bis(trifenilfosfina)] rutenio(II) (**49**) ya que son de relativamente fácil obtención, estables y permiten condiciones suaves

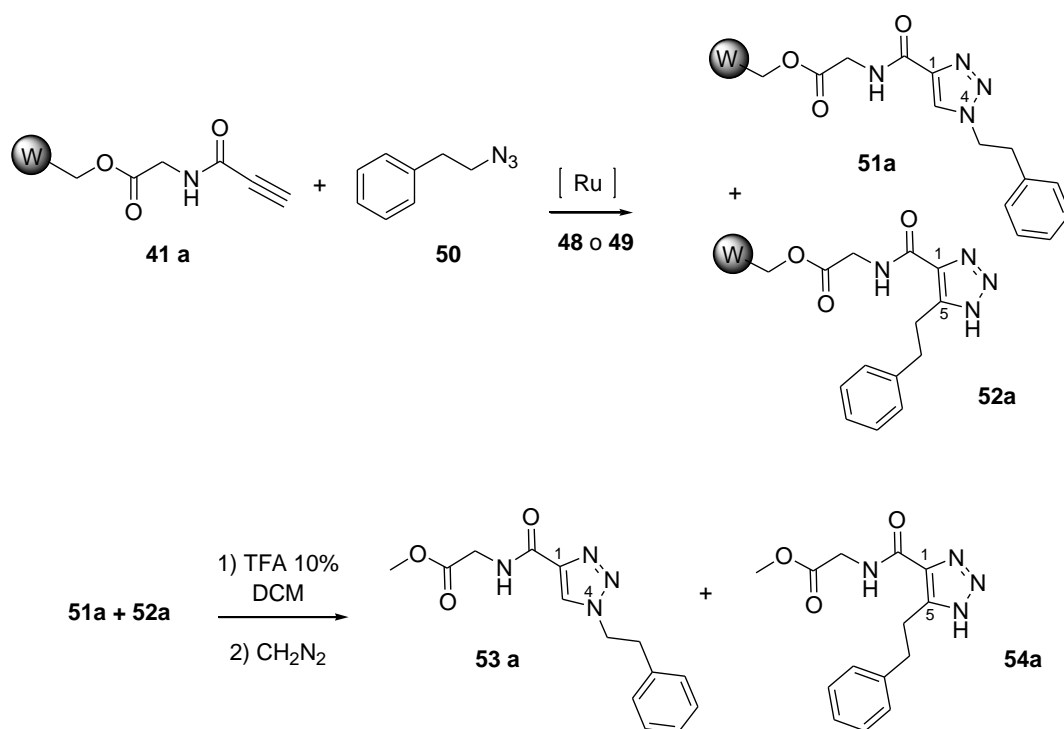
de reacción. Estas dos últimas características son fundamentales para la aplicación de la metodología a procesos de química sobre soporte sólido.

Esta cicloadición catalizada por rutenio se cree transcurre a través del complejo activado **II** (**Esquema 26**), favoreciendo el acoplamiento oxidativo de la azida y el alquino para dar el intermediario de seis miembros **III**. Este paso (**II**→**III**) controla la regioselectividad ya que el primer enlace C-N se forma entre el carbono más electronegativo y menos impedido del alquino y el nitrógeno terminal (electrofílico) de la azida. Es decir que para alquinos monosustituidos este primer enlace será entre el carbono terminal del alquino y el nitrógeno terminal de la azida, obteniéndose triazoles 1,5-disustituidos.



Esquema 26

Con el fin de obtener una nueva variabilidad molecular, llevamos a cabo el estudio de la cicloadición de azidas y alquinos catalizada por complejos de rutenio, con el fin de obtener el regioisómero 1,5-disustituido. Para estas pruebas se empleó primeramente una azida (**50**, **Esquema 27**) más sencilla y de fácil preparación que la 3-azidometilpenicilina **35** empleada anteriormente para la síntesis de los triazoles 1,4-disustituidos. La azida **50** se hizo reaccionar con *N*-propiolilglicina unida a resina de Wang (**41a**), empleando uno de dos diferentes catalizadores de rutenio (**48** o **49**).



Así, una vez finalizadas las reacciones a diferentes tiempos de reacción, se separaron los productos de su unión a la resina, se metilaron los ácidos libres con diazometano y se analizaron los crudos de reacción mediante RMN de ^1H .

Las diversas condiciones experimentales, los catalizadores de rutenio empleados y los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 12**.

Independientemente del catalizador empleado, la mayoría de las reacciones dieron lugar a mezclas de distintas proporciones de los isómeros 1,4 y 1,5-disustituidos (**53a** y **54a**).

Según estos datos obtenidos, las mejores condiciones son las de la entrada 7 y 8. Si bien una de ellas produce los productos con un mayor rendimiento (entrada 7), la otra permite la obtención de una mayor proporción del isómero de interés (el 1,5-disustituido) facilitando así la purificación y aislamiento del mismo. En las entradas 9 y 10, aunque se obtuvo sólo el isómero de interés, no fue posible separarlo de las impurezas no identificadas que también se generaron durante la reacción.

Tabla 12

	AA	Catalizador (0,2 equiv.)	Solvente	Condiciones	Rendimiento ^a (%)	Proporción de isómeros ^c 1,5 : 1,4
1	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	Dioxano	17 h 60 °C +10 h 100 °C	15	1:1,2
2	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	Dioxano	20 min, 80°C, 200 W ^b	9	1:0,16
3	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	Tolueno	17 h 60 °C +10 h 100 °C	15	1:1,2
4	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	Tolueno	55 min, 60°C, 200 W ^b	12	1,6:1
5	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	DMF	17 h 60 °C +10 h 100 °C	15	1:1
6	Gly	Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ (49)	DMF	4min, 120°C, 200 W ^b	16	1:0,8
7	Gly	Cp*RuCl(COD) (48)	Dioxano	2,25 h, 120°C, 200 W ^b	34	1:1
8	Gly	Cp*RuCl(COD) (48)	DMF	18h, 100 °C	15	2:1
9	Gly	Cp*RuCl(COD) (48)	THF	24 h 100°C	15	1:0 ^d
10	Gly	Cp*RuCl(COD) (48)	THF	10 min, 100°C, 200W ^b	5	1:0 ^d

^a rendimiento total luego de separación de la resina, (basado en la carga inicial de la resina de Wang, cinco pasos de reacción).
Las reacciones se llevaron a cabo a escala de 1 mmol y se monitoreó la desaparición de la señal del alquino por FT-IR.

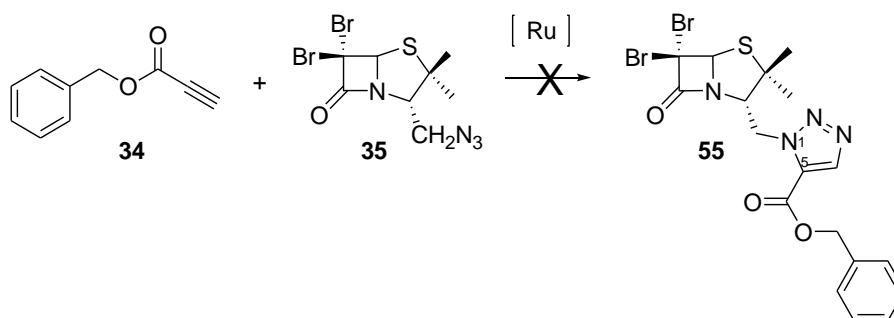
^b calentamiento por microondas

^c Determinado por integración de las señales de RMN de ¹H en el crudo de reacción.

^d solo se obtiene el regioisómero 1,5 junto a productos no identificados

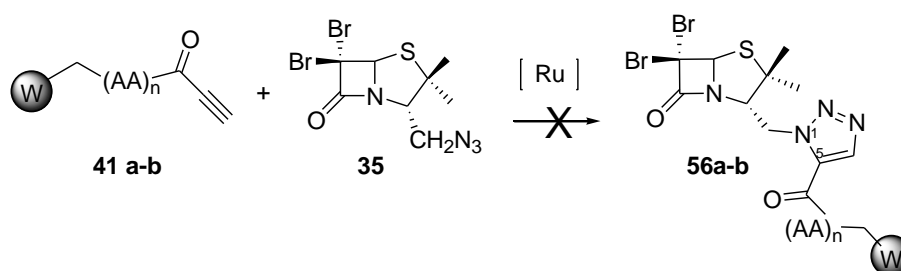
Aunque los resultados con este modelo no fueron excelentes ya que no se pudo obtener exclusivamente el regioisómero 1,5-disustituido y los rendimientos fueron en general bastante bajos, decidimos intentar la formación de las triazolil aminoacil penicilinas 1,5-disustituídas.

Para esto se realizaron entonces, las pruebas correspondientes con la azidometilpenicilina **35** de nuestro interés, tanto en solución como en fase sólida. En el experimento llevado a cabo en solución (**Esquema 28**), se empleó



el alquino **34**, ambos catalizadores de rutenio y distintas condiciones de reacción, pero en ninguno de los casos se pudo obtener el producto deseado **55**, y en general se recuperó en material de partida.

En las pruebas que se realizaron en fase sólida (**Esquema 29**), se emplearon como alquinos la *N*-propiolilglicina (**41a**) y la *N*-propiolilvalina (**41b**). Nuevamente, a pesar de las diferentes condiciones de reacción empleadas, no fue posible la obtención del producto deseado (**56a** o **56b**) presentándose en estos casos, principalmente problemas de descomposición.



Esquema 29

4.2.6. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.2.6.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La resistencia bacteriana es un problema mundial a nivel de la salud pública y necesita del continuo descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Ciertos patógenos, hoy en día conocidos como "ESKAPE pathogens"⁸⁴ (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* sp.) debido a que escapan a los alcances de la terapéutica actualmente disponible, son responsables de un gran porcentaje de las infecciones intrahospitalarias resistentes a antibióticos. Considerando la actividad antibacteriana precedente del núcleo penicilina y la presencia de triazoles en varios agentes antibacterianos, decidimos en primer lugar evaluar la actividad de varias triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas sintetizadas frente a estas cepas de bacterias resistentes. En la **Figura 16** se presentan los compuestos evaluados.

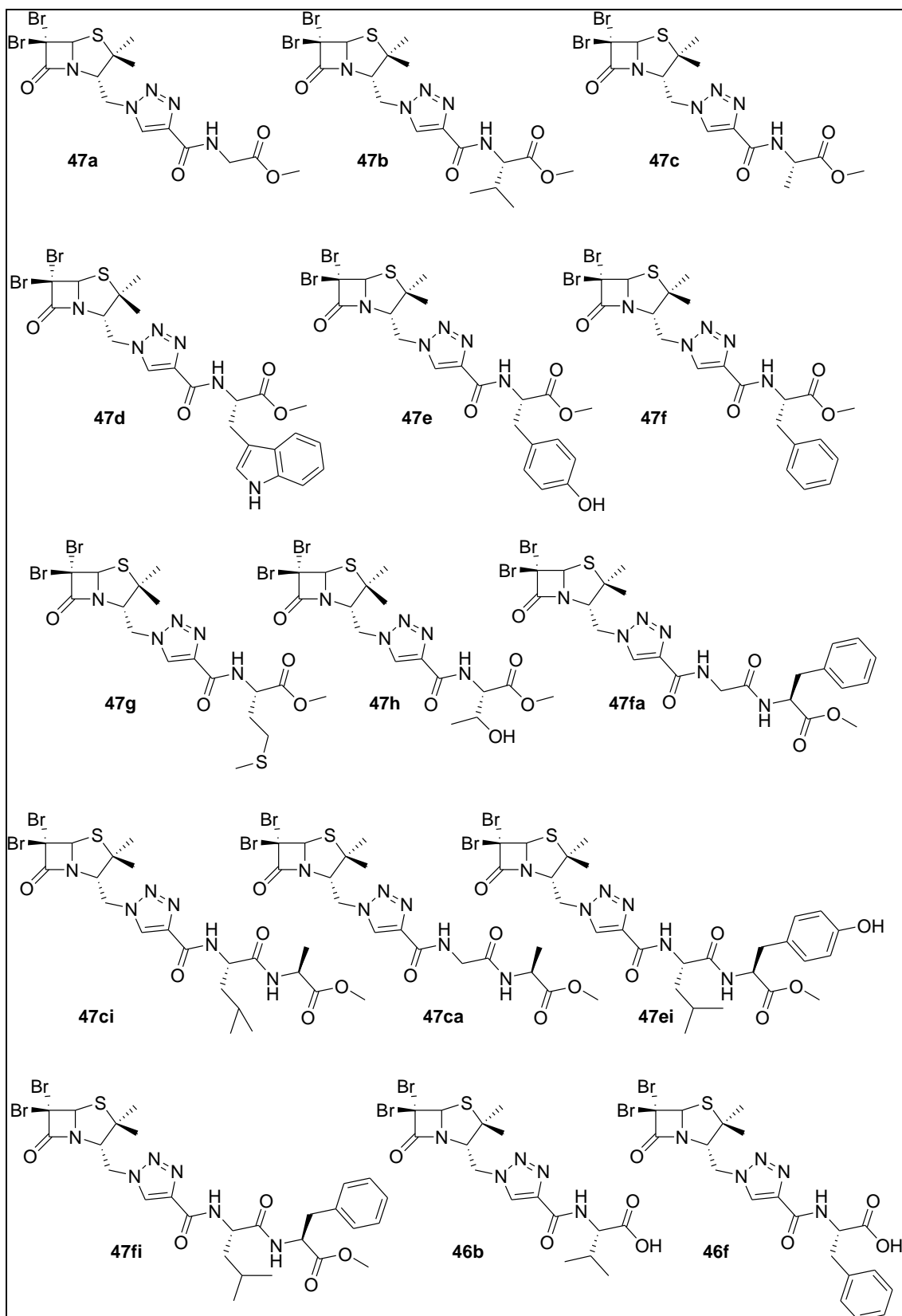


Figura 16



Las cepas empleadas fueron: *Enterococcus faecium* NCTC 7171, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17961, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y según los resultados obtenidos, los compuestos evaluados no mostraron actividad significativa (a una concentración de 128 µg/mlⁱ) frente a ninguna de las cepas resistentes empleadas en el estudio.ⁱⁱ

4.2.6.2. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

"Cáncer" es el término general que se utiliza para denominar a un grupo de enfermedades que producen un exceso de células malignas con rasgos típicos de crecimiento descontrolado. Las transformaciones de esas células resultan de alteraciones en su ADN que se acumulan a través del tiempo. El cambio en la información genética hace que la célula no pueda desempeñar sus funciones apropiadamente.⁸⁵

La característica principal de las células cancerígenas es su habilidad para dividirse rápidamente, y la acumulación de células cancerígenas resultante se denomina tumor. Si el tumor crece y no invade los tejidos circundantes se denomina benigno. De lo contrario, si el tumor se propaga o extiende hacia otros tejidos, cercanos o distantes, entonces se clasifica como maligno. Se conoce como "metástasis" al proceso por el cual se liberan células cancerígenas del tumor primario original y éstas migran localmente hacia sitios más distantes del cuerpo donde se dividirán y formarán tumores secundarios.

ⁱ En un primer *screening*, para que un compuesto sea mínimamente considerado activo y sea candidato a una evaluación más exhaustiva, debe presentar actividad a una concentración de 64 µg/ml o menor).

ⁱⁱ Los estudios se llevaron a cabo en el Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA.

El cáncer no es solo una simple enfermedad, hay más de 100 tipos diferentes de cáncer. La mayoría de los cánceres se clasifican según el tejido y las células de origen. Los diferentes tipos de cáncer se pueden agrupar en categorías más amplias.

Las categorías principales son:

- **Carcinoma:** cáncer que se origina en epitelios como la piel o en aquellos que revisten o cubren los órganos internos.
- **Sarcoma:** cáncer que comienza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- **Leucemia:** cáncer procedente del tejido en el que se forman las células sanguíneas, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células anormales y que circulan por el torrente sanguíneo.
- **Linfoma y mieloma:** cánceres que se producen en las células del sistema inmunitario.
- **Cáncer del sistema nervioso central:** cáncer derivado de los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer. El cáncer es en la actualidad una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama.⁸⁶

Para el tratamiento del cáncer existen tres enfoques tradicionales: cirugía, radioterapia y quimioterapia, y generalmente se emplean conjuntamente para aumentar la efectividad. Más aún, es muy difundido el empleo simultáneo de varias drogas anticancerígenas con diferente mecanismo de acción, ya que se demostró que es más efectivo que el uso de solo una.² Dentro de las ventajas de emplear esta metodología se incluyen el aumento de

la eficiencia de la acción, disminución de la toxicidad, y disminución de la resistencia.

El diseño de la quimioterapia contra el cáncer se ha convertido en un proceso cada vez más sofisticado, y a pesar de la gran variedad de antineoplásicos existente actualmente, no existe un tratamiento 100% efectivo contra un cáncer metastásico, y cerca de la mitad de los pacientes con cáncer sucumben a la enfermedad. Estos problemas de ineficacia sumados a los de la resistencia⁸⁷ a los tratamientos con drogas anticancerígenas, hacen que sea necesario el desarrollo de nuevas metodologías terapéuticas como así también de nuevas y mejores drogas para el tratamiento del cáncer.

Vislumbrando esta problemática, y basados en los antecedentes de actividad biológica de las subunidades que componen las triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, es decir, penicilinas^{60b} y diferentes triazoles^{67a} que presentan actividad anticancerígena, es que decidimos evaluar la actividad antiproliferativa de algunos de los componentes de la biblioteca.

En la **Figura 17** se presentan los compuestos que fueron evaluados.ⁱⁱⁱ En primer lugar, se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* de los 16 derivados sintéticos a una concentración 20 μM en una línea de células no neoplásicas utilizadas como control (NMuMG: células de epitelio mamario murino normal). Los compuestos ensayados no inhibieron o inhibieron menos de un 30% la proliferación celular a una concentración 20 μM (**Gráfico 1**). Sobre la base de estos resultados, todos los derivados fueron posteriormente evaluados como agentes citotóxicos en dos líneas de células tumorales: una línea humana (HeLa: adenocarcinoma de cuello uterino) y una línea murina (B16-F0, melanoma).

ⁱⁱⁱ Los estudios se llevaron a cabo en el Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por el grupo de Investigación de la Dra. Leonor P. Roguín.

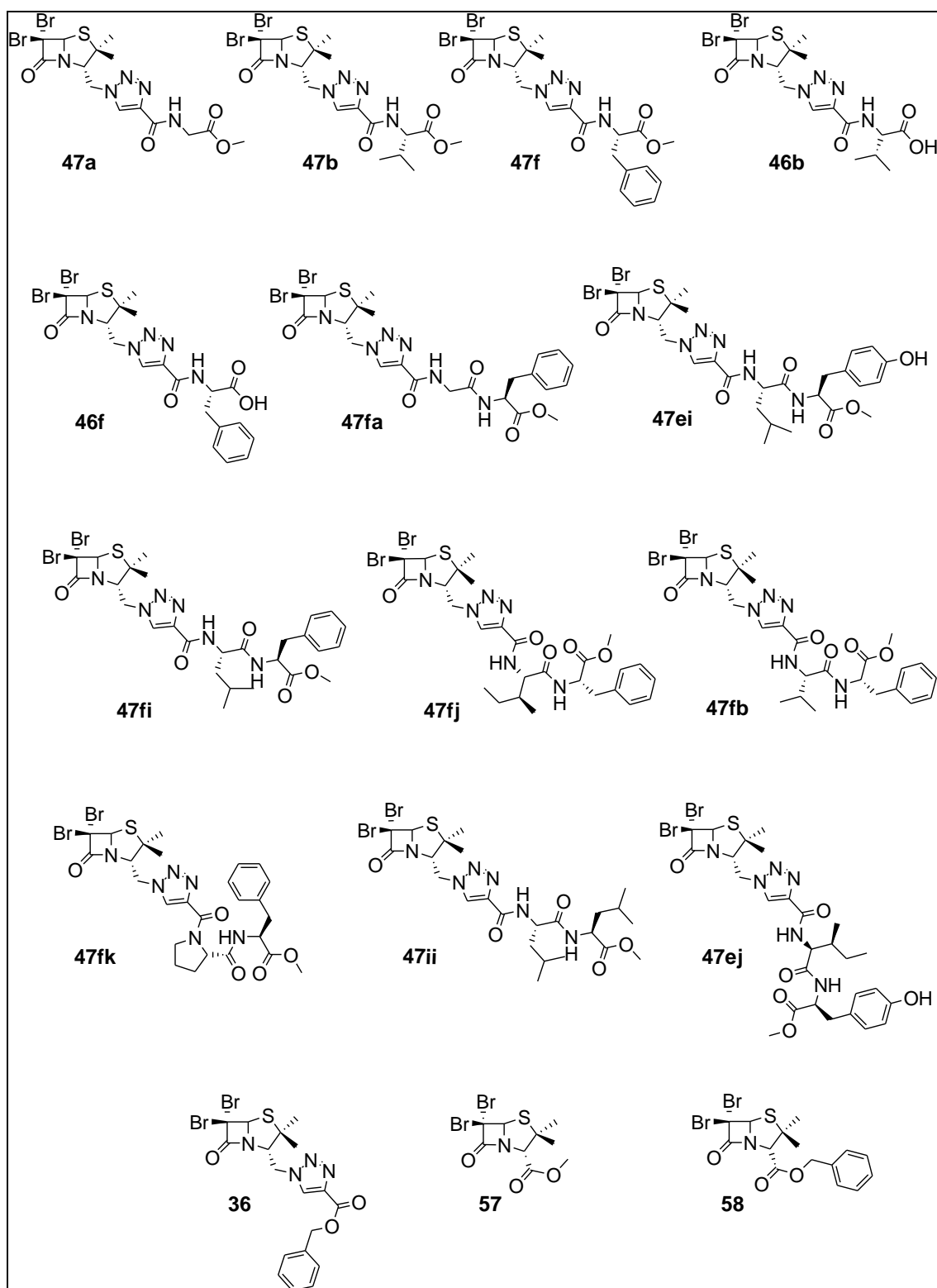


Figura 17



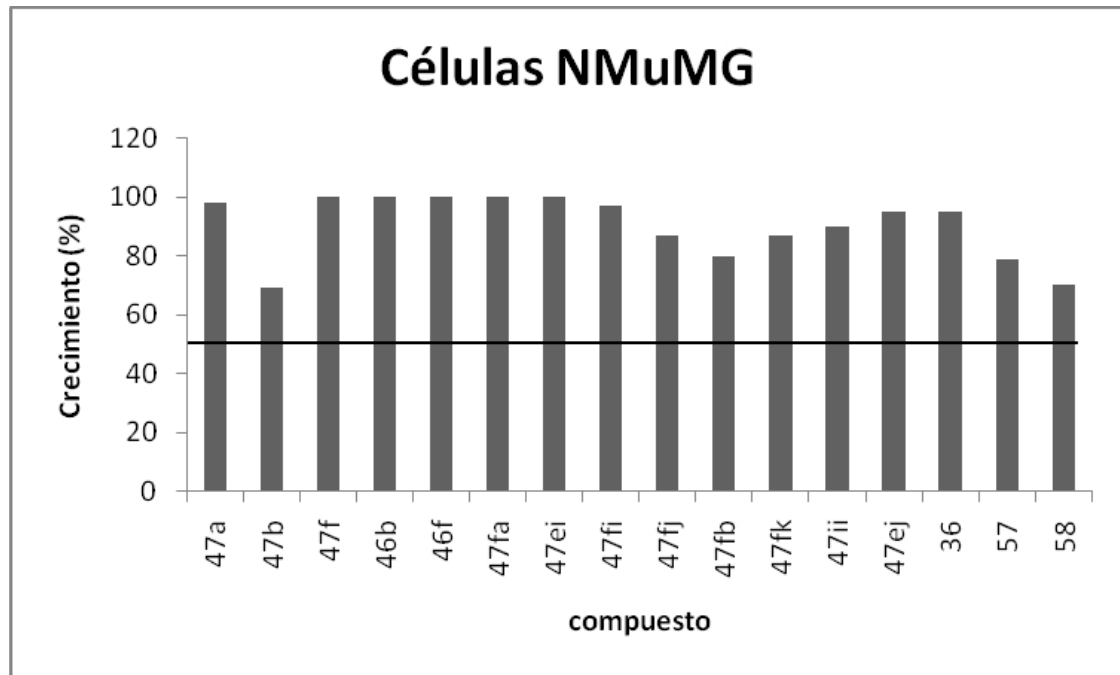


Gráfico 1

En el **Gráfico 2** se presentan los resultados obtenidos para la línea tumoral HeLa, y en el **Gráfico 3** para la línea B16.

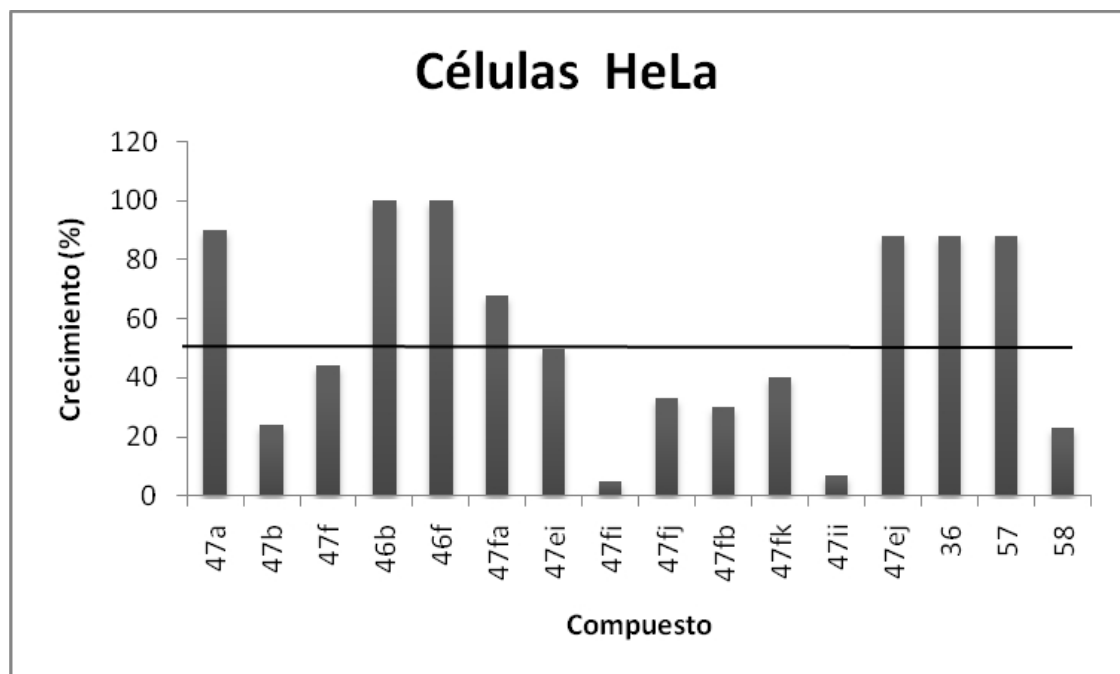


Gráfico 2

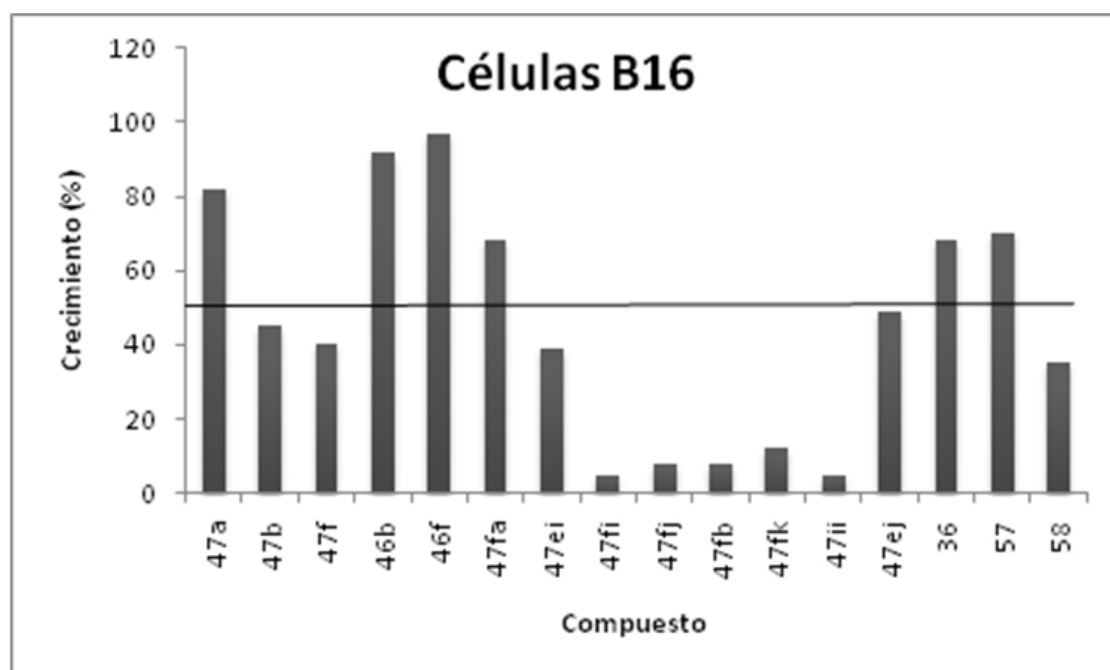


Gráfico 3

Luego se determinaron los valores de IC_{50} (concentraciones molares de compuesto requeridas para inhibir un 50% el crecimiento celular) de aquellos derivados que inhibieron cerca de un 50% o más la proliferación celular a una concentración $20\mu M$ (Tabla 13).

Además, para los compuestos activos en líneas tumorales se determinaron también los valores de IC_{50} en células no neoplásicas NMuMG.

En la siguiente Tabla (Tabla 13) se comparan los valores de IC_{50} determinados en las líneas tumorales con las IC_{50} obtenidas en las células no neoplásicas:

Tabla 13

	Compuesto	Líneas celulares - Valores de IC_{50} (μM) ^a		
		HeLa	B16	NMuMG
1	47b	12±4	18±4	33±4
2	47 f	14±1	10±1	125±7
3	47ei	25±4	22±8	>200

Continuación Tabla 13

4	47fi	3±1	3±1	102±8
5	47fj	15±2	9±1	83±8
6	47fb	16±3	9±1	170±7
7	47fk	16±2	11±1	55±7
8	47ii	9±2	4±1	88±5
9	47ej	ND	20±3	95±7

^aLas concentraciones molares de compuesto requeridas para inhibir un 50% el crecimiento celular se determinaron a partir de curvas dosis-respuesta. Los resultados representan la media ± ES de al menos tres experimentos diferentes.

ND: No determinado, corresponden a compuestos que inhibieron un 30% o menos la proliferación celular a una concentración 20µM.

Sobre la base de las diferencias en los valores de IC₅₀ entre las líneas tumorales y la no tumoral, y para facilitar la interpretación de los resultados, podemos definir el término Potencia Relativa (P_r) de un compuesto como el cociente entre el valor de IC₅₀ determinado en células no tumorales y el valor de IC₅₀ en una determinada línea tumoral.

$$\text{Potencia relativa (P}_r\text{)} = \text{IC}_{50} \text{ NMuMG} / \text{IC}_{50} \text{ línea tumoral}$$

Entonces, según esta fórmula, la potencia relativa nos permite estimar cuántas veces más potente es el compuesto en la línea tumoral respecto a la línea de células no tumorales.

Así, aplicando este concepto, en la **Figura 18** se indica el valor de Pr obtenido tanto en células HeLa como en células B16, solo para los derivados más activos y selectivos, es decir, aquellos que muestran una acción más selectiva frente a células tumorales. Según los datos expresados y considerando que un compuesto es selectivo cuando es aproximadamente de 10 a 15 veces más potente en la línea tumoral respecto a la línea de células no tumorales⁸⁸, los derivados más activos y selectivos son: **47fi**, **47ii**, **47fb** y **47f**.

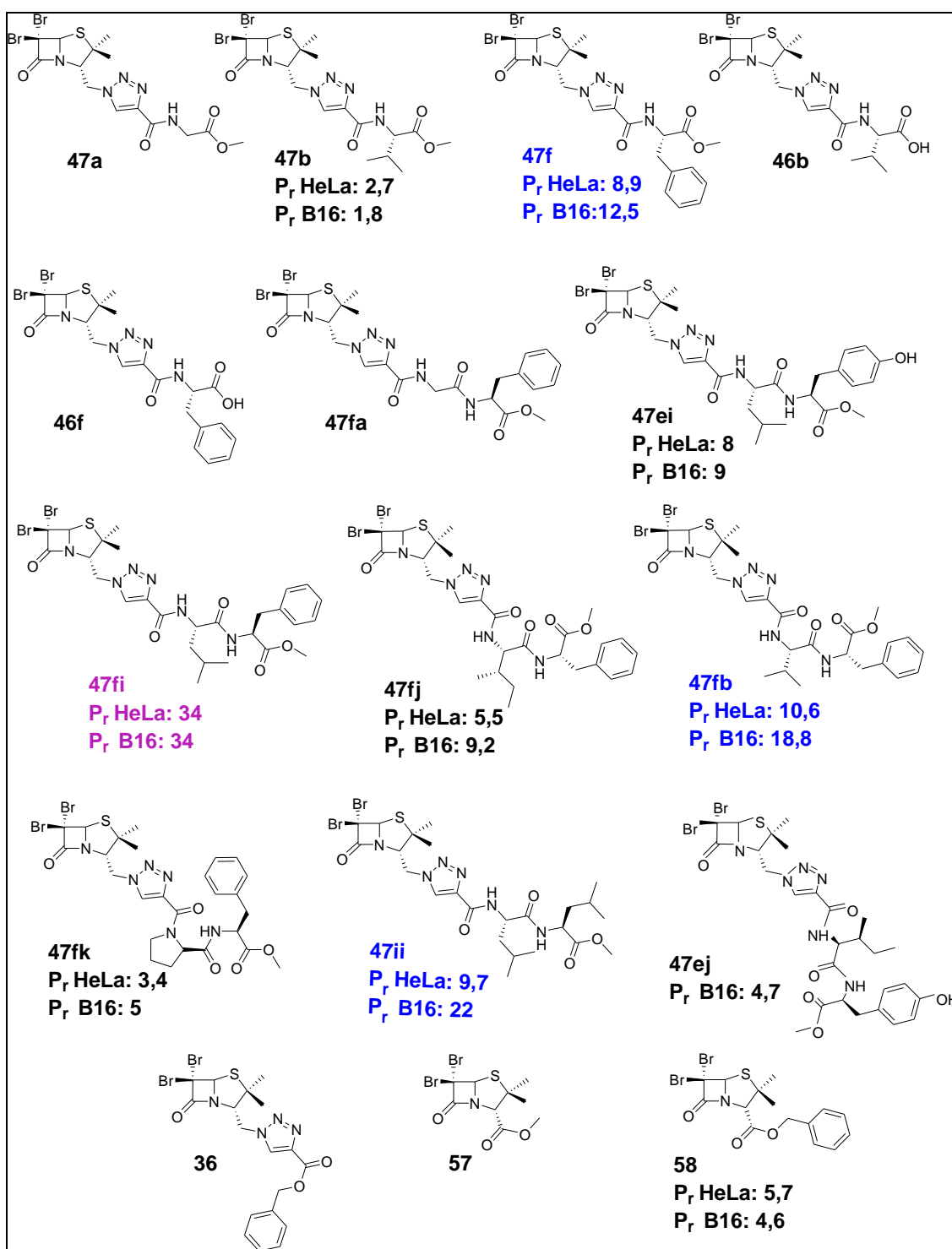


Figura 18

Como resultado más relevante podemos decir que el compuesto más potente y selectivo es el **47fi**, con una P_r de 34 en ambas líneas tumorales (Figura 19).

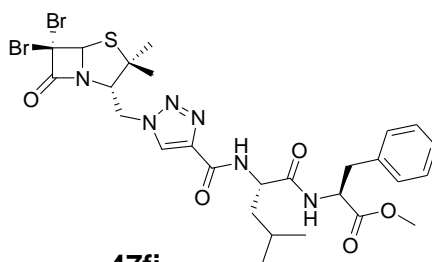
**47fi****P_r HeLa: 34****P_r B16: 34**

Figura 19

Y por último, los derivados con potencia menor a 10 son los compuestos **47b**, **47ei**, **47fj**, **47fk**, **47ej** y **58**.

Con la información obtenida hasta el momento, podemos sacar algunas conclusiones preliminares en cuanto a la Relación Estructura-Actividad de estas triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas.

En primer lugar, podemos decir que la esterificación del grupo ácido carboxílico del aminoácido terminal parece ser importante para la actividad. Esto se deduce de la casi nula actividad obtenida para los compuestos **46b** y **46f** comparados con **47b** y **47f** que están como ésteres metílicos.

En cuanto al aminoácido que está contiguo al grupo triazol, al parecer es necesario que presente un residuo algo voluminoso. Glicina, el menos voluminoso, presente en los compuestos **47a** y **47fa**, resulta desfavorable para la actividad. En cuanto a la voluminosidad, pequeños cambios afectan significativamente la misma. Tomando como referencia al compuesto **47fi**, el más activo, vemos que los aminoácidos que posee son fenilalanina y contiguo al grupo triazol, leucina. Al cambiar el aminoácido leucina por isoleucina (**47fj**) o valina (**47fb**), la actividad disminuyó moderadamente.

Cambios en el segundo aminoácido también resultaron significativos. Nuevamente, tomando como referencia al compuesto **47fi**, el reemplazo de fenilalanina por tirosina, cuya única diferencia es un hidroxilo en posición *para* del anillo aromático (**47ei** y **47ej**), también disminuyó moderadamente la actividad. Esto podría estar relacionado con el hecho de que, si la molécula necesita entrar a la célula para ejercer su actividad, un aumento de la polaridad de la misma, dificultaría su paso a través de la membrana celular lipofílica.

Los compuestos que se sintetizaron como control (**36**, **57** y **58**, **Figura 18**), también nos brindan información interesante. La triazolilpenicilina (**36**), que no posee la porción aminoacídica, al igual que los ésteres metílico y bencílico de la penicilina (**57** y **58**), no presentaron actividad significativa. A raíz de estos datos podemos inferir sobre la importancia de la porción peptídica en los compuestos sintetizados.



4.3. CONCLUSIONES

Hemos desarrollado una metodología versátil y eficiente para la síntesis en fase sólida de una biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, que son factibles de ser evaluadas contra diferentes objetivos farmacológicos. El paso clave es la cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre de aminoacil (peptidil) alquinos a penicilinazidas. Esta reacción demuestra un amplio alcance y una excelente regioselectividad. En la mayoría de los casos, los triazoles se obtuvieron con buenos rendimientos totales para los pasos de reacción involucrados.

Estos resultados abren la posibilidad de futuros estudios para completar el conocimiento sobre la potencialidad anticancerígena de estos derivados, incluyendo la generación de una biblioteca aún más grande de triazolil peptidil penicilinas, la optimización de las estructuras con potente y selectiva actividad antiproliferativa y un análisis exhaustivo de la relación estructura-actividad.

P ROCEDIMIENTOS E XPERIMENTALES



*"JUST AS HOUSES ARE MADE OF STONES, SO IS
SCIENCE MADE OF FACTS; BUT A PILE OF STONES IS
NOT A HOUSE AND A COLLECTION OF FACTS IS NOT
NECESSARILY SCIENCE"*



5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Todos los reactivos químicos empleados fueron obtenidos de fuentes comerciales y se han empleado sin purificación previa, salvo que se indique lo contrario.

Los gases empleados (argón, nitrógeno) fueron secados por pasaje a través de ácido sulfúrico concentrado.

Los solventes utilizados como eluyentes en CCD o cromatografía en columna fueron purificados por destilación.

Los solventes de reacción fueron de calidad "Pro análisis" y en los casos necesarios se sometieron a ulterior purificación siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía.⁸⁹

Las resinas utilizadas se adquirieron a Novabiochem (San Diego, CA, U.S.A.) y Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

5.2. INSTRUMENTAL

Espectrometría IR. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron registrados en un espectrómetro Shimadzu Prestige 21, y los valores de las señales se informan en cm^{-1} para las bandas más significativas y para aquellas bandas de menor intensidad relevantes para el compuesto caracterizado.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance II de 300 MHz, (para ^1H , usando la señal del tetrametilsilano a 0 ppm, como patrón de referencia interno) y a 75 MHz (para ^{13}C , usando la señal central del solvente CDCl_3 a 76,9 ppm como patrón de referencia interno).

Espectrometría de Masas y HPLC-MS. Los espectros de HRMS y de HPLC-MS fueron realizados en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del centro Científico y Tecnológico Rosario, utilizando un espectrómetro de masas Bruker micrOTOF-Q II equipado con fuente de ionización por electrospray (ESI)

y ionización química a presión atmosférica (APCI). Los HPLC realizados durante la tesis se hicieron en el equipo acoplado a dicho espectrómetro, de marca Agilent 1100 equipado con bomba binaria, inyector automático de muestras y detector UV-Vis de longitud de onda variable.

Microondas. Las irradiaciones de microondas fueron realizadas en un reactor monomodo CEM Discover LabMate utilizando el programa de calentamiento *standard* en el cual el operario elige la temperatura y el equipo ajusta automáticamente la potencia suministrada a modo de mantener la temperatura constante.

Cromatografía. Las CCD se realizaron sobre placas comerciales de aluminio cubiertas con silicagel Merck (60 F₂₅₄) y se desarrollaron con sistemas de solventes adecuados a cada muestra. Las placas cromatográficas fueron analizadas mediante radiación UV (254 nm) y/o por rociado con solución de *p*-anisaldehído en EtOH/AcOH/H₂SO₄ (9,2:338:3,75:12,5) con posterior calentamiento para mejorar la sensibilidad de la detección. Ocasionalmente las placas fueron reveladas con solución de ninhidrina al 0,2% en EtOH, yodo o solución de ácido fosfomolibdico al 5% en EtOH.

5.3. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

5.3.1. Metodología general para el desarrollo de la síntesis en fase sólida. Las reacciones en fase sólida realizadas a temperaturas entre -10°C y temperatura ambiente, se llevaron a cabo en cartuchos de polipropileno (Marca Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.) equipados con una placa filtrante de polietileno y un buzo para agitación magnética. Las reacciones que requieren reflujo se llevaron a cabo con material de vidrio convencional. Todas las reacciones en fase sólida se realizaron con una agitación lo más lenta posible para disminuir las posibilidades de ruptura del grano de resina. Aunque es una práctica común en química en fase sólida realizar un “pre-hinchado” de la resina agregándole el solvente 30 minutos antes de agregar otros reactivos, en nuestra experiencia generalmente esto no ha afectado la eficiencia o rendimiento de la reacción. La filtración de la resina se realizó colocando el cartucho de polipropileno en un distribuidor de vacío (*manifold*, marca Watman) o utilizando un kitasato del tamaño adecuado, lavando con los solventes indicados en cada caso.

En las pastillas de IR de muestras en las que el compuesto se encuentra unido al soporte polimérico se usó una concentración de 3 mg de resina y 100 mg de KBr. En la preparación de las muestras para RMN de ^{13}C en fase gel, se colocan 50-80 mg de resina en un tubo de RMN convencional y se agregan unos 0,5 mL de CDCl_3 para obtener un gel, el cual se homogeniza por sonicación. Los espectros fueron realizados de acuerdo a la literatura.²⁰

La carga teórica de la resina (ct) se determinó asumiendo la completa conversión del sustrato unido a la resina, y calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:⁹⁰

$$\text{carga teórica de la resina (mmol/g)} = \frac{\text{sustitución de la resina de partida (mmol/g)}}{1 + \left(\frac{\text{sustitución de la resina de partida (mmol/g)} \times \text{peso ganado o perdido (g/mol)}}{1000} \right)}$$

Para el seguimiento de las reacciones en fase sólida se utilizan una serie de tests que permiten evaluar la progresión de la reacción de manera cualitativa:¹⁶

5.3.2. Ensayo de cloranilo en soporte polimérico. El ensayo sirve para monitorizar de forma cualitativa la presencia de aminas secundarias. Se aplica a unos cuantos granos de resina seca, los cuales se colocan en un tubo de vidrio. Sobre estos se adiciona una gota de una disolución de acetaldehído al 2% en DMF y una gota de una disolución de cloranilo al 2% en DMF. Después de 3 min a t.a., se observa la coloración de la resina.

Test +: aparición de color (azul/verde). Presencia de aminas secundarias.

Test -: resina incolora. Ausencia de aminas secundarias.

5.3.3. Test de Kaiser en soporte polimérico. El ensayo sirve para monitorizar de forma cualitativa la presencia de aminas primarias. Sobre unos cuantos granos de resina seca, los cuales se colocan en un tubo de vidrio, se adicionan 2 gotas de cada una de las soluciones detalladas a continuación.

Solución A: 1g de ninhidrina en 10 mL de Etanol.

Solución B: 80g de fenol disueltos en 20 mL de etanol.

Solución C: 2 mL de solución 0,001M de KCN diluidas en 100 mL de piridina.

Luego se colocan en estufa a 120°C durante 5 minutos.

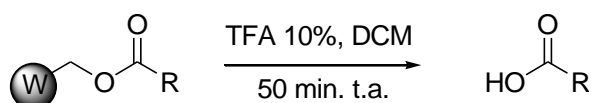
Test +: Los granos de resina toman una coloración azul-violeta oscuro.
Presencia de aminas primarias

Test - : Los granos de resina quedan amarillos o sin color. Ausencia de aminas primarias.

5.4 TÉCNICAS DE LABORATORIO REALIZADAS

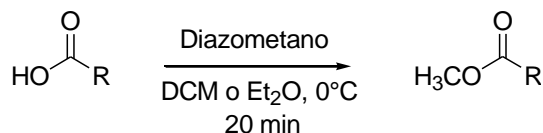
5.4.1. Procedimiento general para la separación de compuestos unidos a resina de Wang

El compuesto unido a la resina de Wang seca, se coloca en un balón y se le adiciona una solución de TFA al 10% v/v en DCM (5 mL). Se agita magnéticamente a temperatura ambiente durante 50 minutos. Luego se filtra a presión reducida y se realizan lavados con DCM (5 x 3 mL). El filtrado se concentra a presión reducida.



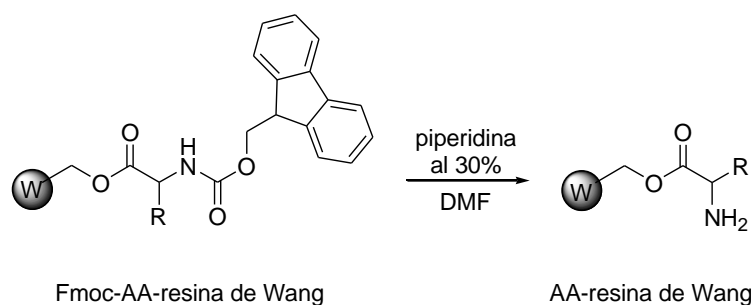
5.4.2. Procedimiento general para la esterificación de ácidos con diazometano o trimetilsilildiazometano (TMS-diazometano)

En una campana de extracción, el ácido se disuelve en DCM (3 mL) o Et₂O (3mL) el crudo de la reacción anterior o cualquier otro ácido y se lleva a 0°C con baño de hielo. Si se empleará TMS-diazometano se deben agregar también unas gotas de MeOH a la solución. Seguidamente se adiciona bajo agitación magnética, una solución de diazometano en éter o una solución de TMS-diazometano en hexano, gota a gota hasta leve coloración amarilla, y se sigue el avance de la reacción por CCD (aproximadamente 20 minutos). El exceso de diazometano se destruye con AcOH o pasando una corriente de gas nitrógeno bajo campana de extracción y luego se elimina el solvente en evaporador rotatorio a presión reducida.



5.4.3. Procedimiento general para la desprotección del grupo amina en Fmoc-AA-resina de Wang

El Fmoc-AA unido a resina de Wang (100 mg, sustitución de partida= 0,70 mmol/g, 0,070 mmoles) se coloca en cartucho de polipropileno, y se agrega una solución de piperidina al 30% (v/v) en DMF (4 mL). Se agita magnéticamente a temperatura ambiente durante 50 minutos. Luego de este tiempo, se filtra y lava la resina sucesiva y alternativamente con DMF (3 x 5 mL), DCM (3 x 5mL) y MeOH (3 x 5 mL), y un último lavado con DCM. Se seca en desecador y se usa directamente en la próxima reacción.

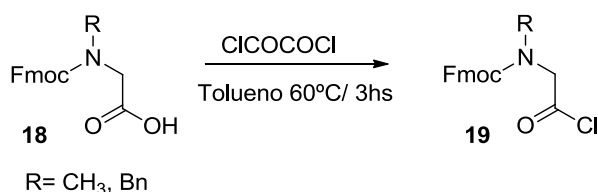


5.5 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

5.5.1 Secuencia sintética para la preparación de β -lactamas en fase sólida, utilizando la reacción de Petasis

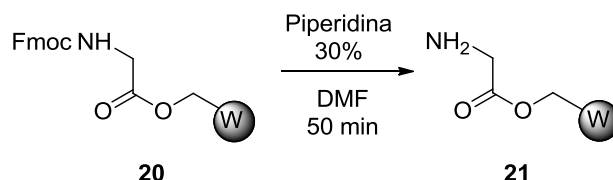
5.5.1.a. Preparación del cloruro de ácido **19**

A una solución de **18** (2,20 mmol) en tolueno seco (6mL), se agrega 1,5 equivalentes de cloruro de oxalilo (3,30 mmol, 0,29 mL) y la mezcla de reacción se agita a 60°C durante 3 h. Luego de esto, el solvente y el cloruro de oxalilo se eliminan por evaporación a presión reducida. El compuesto **18** se usa directamente en la siguiente reacción sin ulterior purificación.



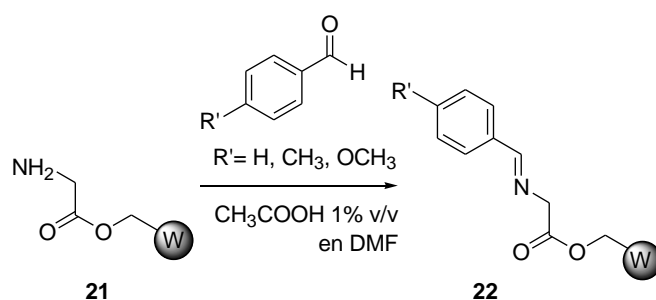
5.5.1.b. Desprotección de Fmoc-glicina-resina de Wang

Fmoc-glicina unida a resina de Wang (**20**) 0,5 g (0,35 mmoles) se desprotege del grupo Fmoc según metodología general **5.4.3**, y se usa directamente en la próxima reacción.



5.5.1.c. Procedimiento para la formación de imina **22**

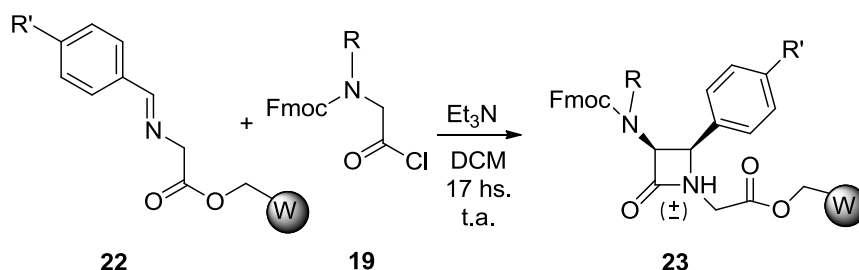
A la glicina-resina de Wang (**21**) proveniente del paso anterior (0,35 mmoles), se le agregan aproximadamente 5 mL de solución de ácido acético al 1% v/v en DMF anhidra, bajo atmósfera inerte. Se adicionan 5 equivalentes del aldehído correspondiente, se agita magnéticamente a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno durante 45 minutos. Luego se filtra y se lava varias veces con DMF. Para asegurar reacción completa, se repite el agregado de reactivos y se agita 45 minutos más en las mismas condiciones. Se filtra y se lava la resina **22** repetidas veces y en forma sucesiva con DMF (3 x 5 mL), DCM (3 x 5 mL) y MeOH (3 x 5 mL). Se realiza un último lavado con DCM y se seca en desecador.



5.5.1.d. Procedimiento para la formación de la β-lactama **23** (reacción de Staudinger)

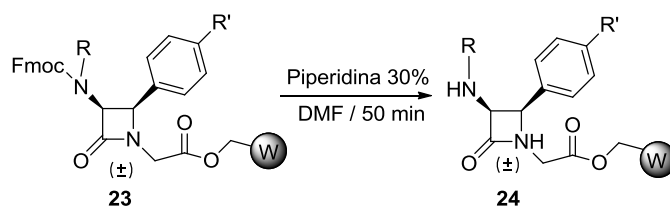
La imina unida a la resina de Wang seca (**22**; 0,35 mmoles), proveniente del paso anterior, se suspende en DCM anhidro (5 mL) y se mantiene en un baño a 0°C bajo atmósfera inerte. Se adicionan 20 equivalentes de trietilamina y, gota a gota, 15 equivalentes del cloruro de ácido **19**. Una vez que han sido adicionados los reactivos se deja alcanzar temperatura ambiente y se deja

agitando toda la noche bajo atmósfera inerte. Luego se filtra y se lava la resina repetidas veces y en forma sucesiva con DCM (3 x 5 mL), AcOEt (3 x 5 mL), y MeOH (3 x 5 mL). Como es habitual, se realiza un último lavado con DCM y por último se seca la resina obtenida **23** en desecador.



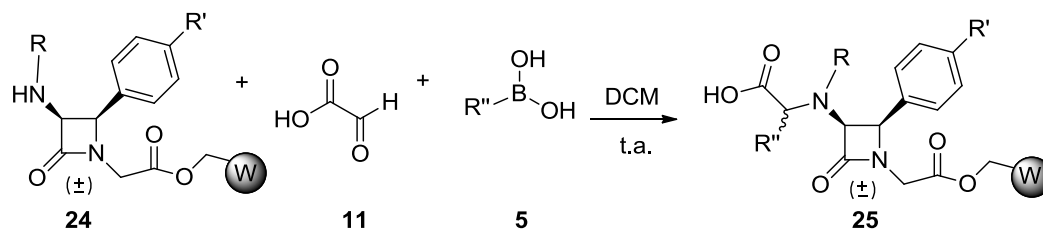
5.5.1.e. Desprotección del grupo Fmoc de la resina **23**

La resina **23** proveniente del paso anterior (0,35 mmoles), se coloca en cartucho de polipropileno, se desprotege del grupo Fmoc según metodología general **5.4.3**, y se usa directamente en la próxima reacción.



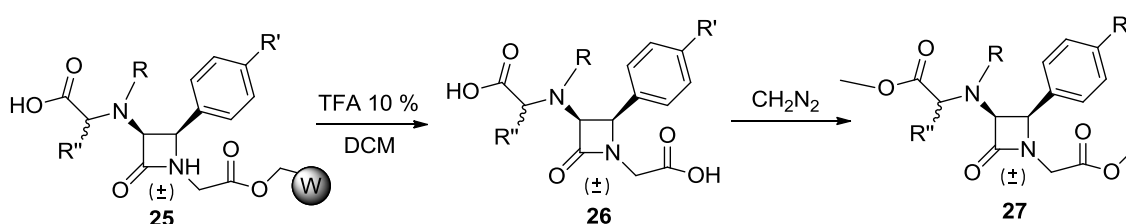
5.5.1.f. Obtención de la β -lactama (**25**) en fase sólida, utilizando la reacción de Petasis

Se coloca en un cartucho 0,35 mmoles de la amina unida a resina de Wang **24**, proveniente del paso anterior, y se agregan 5 mL de DCM. Luego se adicionan 9 equivalentes de ácido glioxílico (**11**) y 9 equivalentes del ácido borónico **5**. La reacción se agita 18 h a temperatura ambiente, luego se filtra y se lava con DCM (3 x 10 mL), y se repite el agregado de los reactivos y se agita durante 60 h más en las mismas condiciones. Al cabo de este tiempo, la resina **25** se filtra y se lava sucesiva y alternadamente con DCM (3 x 10 mL) y MeOH (3 x 10 mL) y se seca en desecador.



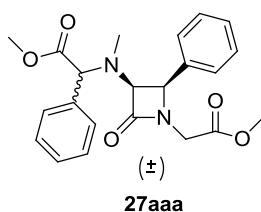
5.5.1.g. Obtención de la β -lactama 26 y/o 27

Se coloca la resina **25** proveniente del paso anterior en un balón y se lleva a cabo la separación del compuesto unido a resina siguiendo el procedimiento general **5.4.1**, para la separación del producto unido a la resina de Wang. Luego de esto, se realiza la metilación de los ácidos libres de **26** según el procedimiento general **5.4.2**, para la esterificación de ácidos con diazometano obteniéndose el éster **27**.



5.5.1.h. Síntesis y caracterización de la biblioteca de β -lactamas monocíclicas obtenidas por reacción de Petasis. Compuestos metilados

[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-fenil-acetato de metilo (27aaa)



La resina **25aa** (110.7 mg, 0,073 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27aaa**) con un 96% de rendimiento (4 pasos de reacción desde la resina **23aa**).

Proporción isomérica: 5:1. **Caracterización:** aceite amarillo.

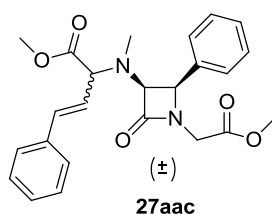
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.28 (s, 3H, CH_3), 3.54 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 4.47 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 4.49 (m, 1H, CH), 4.58 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, CH), 5.01 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, CH), 6.95 (m, 2H, ArH), 7.10-7.49 (8 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.7 (CH_3), 41.0 (CH_2), 51.8 (CH_3), 52.3 (CH_3), 61.8 (CH), 67.4 (CH), 73.5 (CH), 128.3 (CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (C), 133.8 (C), 166.8 (CO), 168.3 (CO), 171.0 (CO).

IR: (film) 1760 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 397.1750 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$: 397.1758.

2-[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-4-fenil-but-3-enoato de metilo (27aac)



La resina **25aac** (206 mg, 0,133mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2** el procedimiento general para luego aislar el producto deseado (**27aac**) con un 87% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23aa**). Proporción isomérica: 7:1.

Caracterización: aceite amarillo.

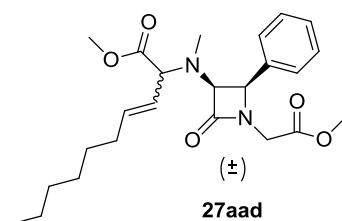
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.26 (s, 3H, CH_3), 3.53 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (m, 1H, CH), 4.45 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 4.65 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, CH), 4.98 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, CH), 6.09 (m, 2H, CH), 7.21-7.38 (10 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.9 (CH_3), 41.0 (CH_2), 51.7 (CH_3), 52.4 (CH_3), 61.9 (CH), 65.8 (CH), 73.8 (CH), 122.7 (CH), 126.5 (CH), 127.8 (CH), 128.3 (CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 134.4 (CH), 134.6 (CH) 136.4 (C), 167.8 (CO), 168.4 (CO), 171.3 (CO).

IR: (film) 1760 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 423.1909 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$: 423.1914

2-[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-dec-3-enoato de metilo (27aad)



La resina **25aad** (172 mg, 0,112 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27aad**) con un 76% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23aa**). Proporción isomérica: 4:1.

Caracterización: aceite incoloro.

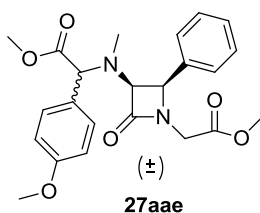
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 0.89 (t, J = 6.4 Hz, 3H, CH_3), 1.23 (s, 10H, CH_2), 1.93 (m, 2H), 2.18 (s, 3H, CH_3), 3.50 (d, J = 17.7 Hz, 1H, CH_2), 3.67 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 4.43 (d, J = 17.7 Hz, 1H, CH_2), 4.54 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH), 4.93 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH), 5.28 (m, 2H, CH), 7.34 (m, 5 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 14.0 (CH_3), 22.6 (CH_2), 28.7 (CH_2), 31.6 (CH_2), 32.3 (CH_2), 35.8 (CH_3), 40.9 (CH_2), 51.5 (OCH_3), 52.3 (OCH_3), 61.9 (CH), 65.6 (OCH_3), 73.6 (CH), 122.7 (CH), 128.2 (CH), 128.5 (CH), 134.5 (C), 136.9 (CH), 167.9 (CO), 168.4 (CO), 171.8 (CO).

IR: (film) 1747 cm^{-1} (β -lactama).

HRMS-ESI (m/z): 431.25312 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$: 431.2551.

[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-(4-metoxi-fenil)-acetato de metilo (27aae)



La resina **25aae** (40.4 mg, 0,026 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27aae**) con un 34 % de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23aa**). Proporción isomérica: 4:1.

Caracterización: aceite amarillo claro.

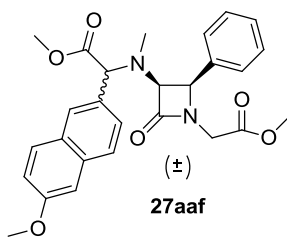
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.17 (s, 3H, CH_3), 3.52 (d, J = 17.8 Hz, 1H, CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.33 (s, 1H, CH), 4.45 (d, J = 17.8 Hz, 1H, CH_2), 4.49 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.75-7.39 (9 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 33.4 (CH_3), 41.0 (CH_2), 51.5 (CH_3), 52.3 (CH_3), 55.2 (CH_3), 62.0 (CH), 66.9 (CH), 73.7 (CH), 113.5 (CH), 114.0 (CH), 126.9 (CH), 127.9 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 130.0 (CH), 134.5 (C), 159.2 (C), 167.7 (CO), 168.4 (CO), 171.8 (CO).

IR: (film) 1750 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 427.1858 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$: 427.1869.

[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-(6-metoxi-naftalen-2-il)-acetato de metilo (27aaf)



La resina **25aaf** (98 mg, 0,061 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27aad**) con un 69% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23aa**).

Proporción isomérica: 4:1. **Caracterización:** aceite amarillo.

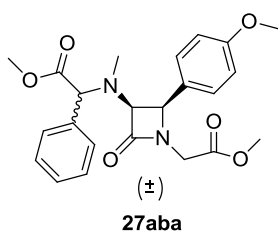
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.24 (s, 3H, CH_3), 3.54 (d, $J = 18$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 4.47 (d, $J = 18$ Hz, 1H, CH_2), 4.49 (s, 1H, CH), 4.57 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.89-7.67 (11 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.6 (CH_3), 41.0 (CH_2), 51.6 (CH_3), 52.3 (CH_3), 55.3 (CH_3), 62.0 (CH), 67.6 (CH), 73.9 (CH), 105.5 (CH), 118.8 (CH), 126.6 (CH), 127.0 (CH), 127.8 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.1 (CH), 134.5 (C), 134.6 (C), 157.9 (C), 167.7 (CO), 168.4 (CO), 171.7 (CO).

IR: (film) 1760 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 499.18332 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6$: 499.1845.

{[1-Metoxicarbonilmetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-fenil-acetato de metilo(27aba)



La resina **25aba** (185 mg, 0,1202 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27aba**) con un 99% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23ab**).

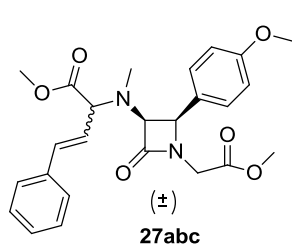
Proporción isomérica: 4:1. **Caracterización:** aceite incoloro. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz)** Isómero mayoritario: δ 2.17 (s, 3H, CH_3), 3.49 (d, $J = 18$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.40 (d, $J = 18$ Hz, 1H, CH_2), 4.41 (m, 1H, CH), 4.42 (s, 1H, CH), 4.43 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 6.88-7.45 (9 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.5 (CH_3), 40.8 (CH_2), 51.6 (OCH_3), 52.3 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 61.4 (CH), 67.3 (CH), 73.6 (CH), 113.8 (CH), 126.0 (C), 127.8 (CH), 128.1 (CH), 128.9 (CH), 129.9 (CH), 134.8 (C), 159.9 (C), 167.5 (CO), 168.4 (CO), 171.7 (CO).

IR: (film) 1750 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 449.16805 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_6$: 449.16831.

2-[[1-Metoxicarbonilmetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino]-4-fenil-but-3-enoato de metilo (27abc)



La resina **25abc** (157 mg, 0,101 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27abc**) con un 68% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23ab**).

Proporción isomérica: 7:1. **Caracterización:** aceite

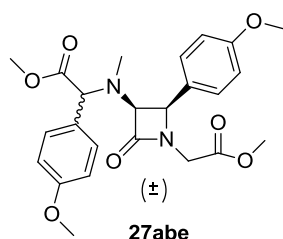
amarillo. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz)** Isómero mayoritario: δ 2.29 (s, 3H, CH_3), 3.48 (d, $J=17.8$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (m, 1H, CH), 4.45 (d, $J=17.8$ Hz, 1H, CH_2), 4.56 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, CH), 4.92 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, CH), 6.08 (m, 2H, CH), 6.87-7.38 (9 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.8 (CH_3), 40.8 (CH_2), 51.7 (OCH_3), 52.3 (OCH_3), 55.2 (OCH_3), 61.2 (CH), 65.5 (CH), 73.4 (CH), 113.7 (CH), 122.6 (CH), 125.9 (CH), 126.5 (CH), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (CH), 130.0 (CH), 134.6 (CH), 136.4 (C), 159.9 (C), 167.6 (CO), 168.4 (CO), 171.3 (CO).

IR: (film) 1760 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 475.18336 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6$: 475.18396.

[[1-Metoxicarbonilmetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino]-(4-metoxi-fenil)-acetato de metilo (27abe)



La resina **25abe** (175 mg, 0,112 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27abe**) con un 90% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23ab**).

Proporción isomérica: 6:1. **Caracterización:** aceite

incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.15 (s, 3H, CH_3), 3.48 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.38 (s ancho, 1H, CH), 4.39 (s ancho, 1H, CH), 4.41 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 4.86 (d, $J=4.6$ Hz, 1H), 6.73-7.34 (8 H, ArH).

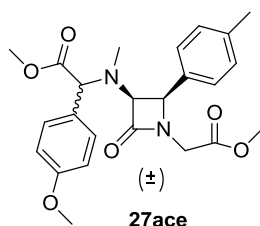
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 35.5 (CH_3), 40.8 (CH_2), 51.6 (OCH_3), 52.3 (OCH_3), 55.2 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 61.4 (CH), 66.7 (CH),

73.5 (CH), 113.5 (CH), 113.8 (CH), 126.0 (CH), 126.8 (CH), 127.9 (CH), 129.9 (CH), 130.1 (CH), 159.2 (C), 159.9 (C), 167.6 (CO), 168.4 (CO), 171.9 (CO).

IR: (film) 1750 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 457.19694 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7$: 457.19693.

[(1-Metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-p-tolil-azetidín-3-il)-metil-amino]-(4-metoxifenil)-acetato de metilo (27ace)



La resina **25ace** (88 mg, 0,048 mmoles) fue tratada los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para luego aislar el producto deseado (**27ace**) con un 89% de rendimiento (4 pasos de reacción desde **23ac**). Proporción isomérica: 6:1. **Caracterización:** aceite amarillo.

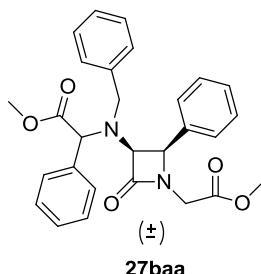
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 2.04 (s, 3H, CH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3), 3.50 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 3.69 (s, 6H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.36 (s, 1H, CH), 4.32 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 4.45 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, CH), 4.89 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, CH), 6.72-7.87 (8 H, ArH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) Isómero mayoritario: δ 21.2 (CH_3), 35.4 (CH_3), 40.8 (CH_2), 51.5 (OCH_3), 52.3 (OCH_3), 55.2 (OCH_3), 61.7 (CH), 66.8 (CH), 73.6 (CH), 113.5 (CH), 126.9 (CH), 128.5 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 131.3 (C), 138.7 (C), 159.2 (C), 167.7 (CO), 168.4 (CO), 171.8 (CO).

IR: (film) 1745 cm^{-1} (β -lactama)

HRMS-ESI (m/z): 441.20151 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$: 441.20201.

[Bencil-(1-metoxicarbonilmetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-amino]-fenil-acetato de metilo (27baa)



La resina **25baa** (534 mg, 1,18 mmoles) fue tratada según los procedimientos generales **5.4.1** y **5.4.2**, para aislar el producto deseado (**27baa**) luego de columna cromatográfica (Hexano:Acetato de Etilo gradiente) con un 61% de rendimiento (5 pasos de reacción desde **23ba**). 1 solo isómero. **Caracterización:** aceite amarillo.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 3.63 (d, $J=18$ Hz, 1H, CH_2), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.67 (m, 1H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (d, $J=14$ Hz, 1H, CH_2),

4.37 (s, 1H, CH), 4.46 (d, $J = 18$ Hz, 1H, CH₂), 5.10 (s, 2H, CH), 6.75 (m, 2H, ArH), 7.12 (m, 5H arom), 7.28-7.44 (8H, ArH).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 300MHz) δ 41.4 (CH₂), 51.6 (CH₃), 52.3 (CH₃), 54.0 (CH₃), 64.0 (CH), 64.6 (CH), 73.4 (CH), 127.0 (CH), 127.0 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (CH), 129.0 (CH), 135.7 (C), 138.5 (C), 167.7 (CO), 168.4 (CO), 169.2 (CO), 172.3 (CO).

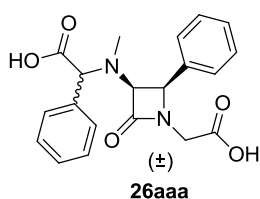
IR: (film) 1760 cm⁻¹(β-lactama)

HRMS-ESI (m/z): 495.18842 [M+Na]⁺; calc. para C₂₈H₂₈N₂NaO₅: 495.18904.

5.5.1.i. Síntesis y caracterización de la biblioteca de β-lactamas monocíclicas obtenidas por reacción de Petasis. Ácidos libres.

El análisis cromatográfico fue realizado en un equipo Agilent RP-HPLC system usando una columna Gemini NX C18 (d 5 μm, 4,6 x 150 mm; temperatura de la columna: 25 °C; flujo: 1 mL/min) detección a 254 nm. Eluyentes A (0,1% ácido fórmico en H₂O) y B (0,1% ácido fórmico en MeCN) se utilizó un gradiente lineal (90% A a 100% B) en un tiempo total de corrida de 25 min. HRMS realizado en instrumento Bruker Micro TOF-Q II - ESI (-). Concentración de las muestras a analizar: 1mg/mL.

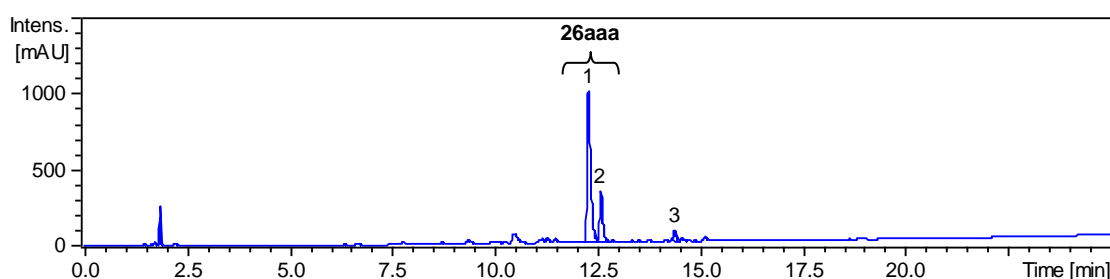
Ácido [(1-carboximetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-fenil-acético (26aaa)



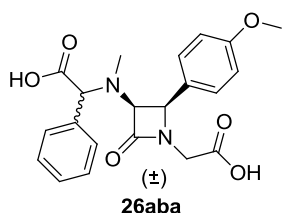
La resina **25aaa** (142 mg, 0,1 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aaa**) con un 98% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23aa**).

Pureza: 95,3 %. Proporción isomérica: 3,4:1. Tiempos de retención: 12.3 y 14.3.

MS-ESI (-) (m/z): 367.12 [M-H]⁻; calc. para C₂₀H₁₉N₂O₅: 367.12.



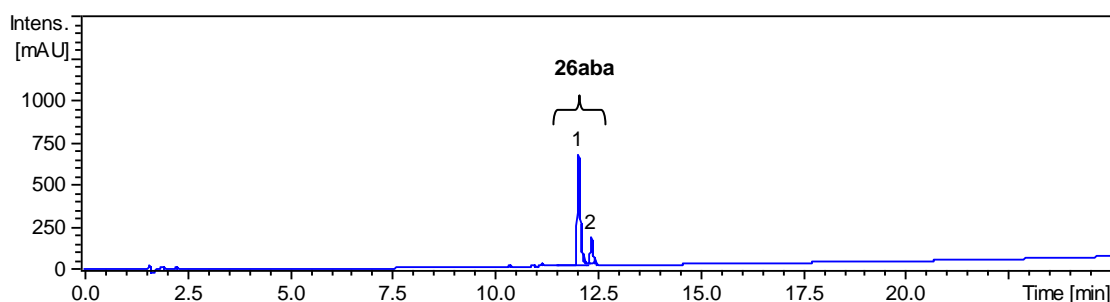
Ácido [(1-Carboximetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il)-metil-amino]-fenil-acético (26aba)



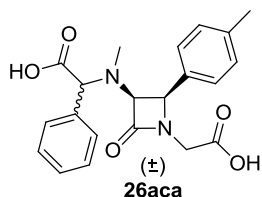
La resina **25aba** (144 mg, 0,1 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aba**) con un 53% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ab**). Pureza: 100%.

Proporción isomérica: 5,5:1. Tiempos de retención: 12 y 12.3.

MS-ESI (-) (m/z): 397.13. $[M-H]^+$; calc. para $C_{21}H_{21}N_2O_6$: 397.14.



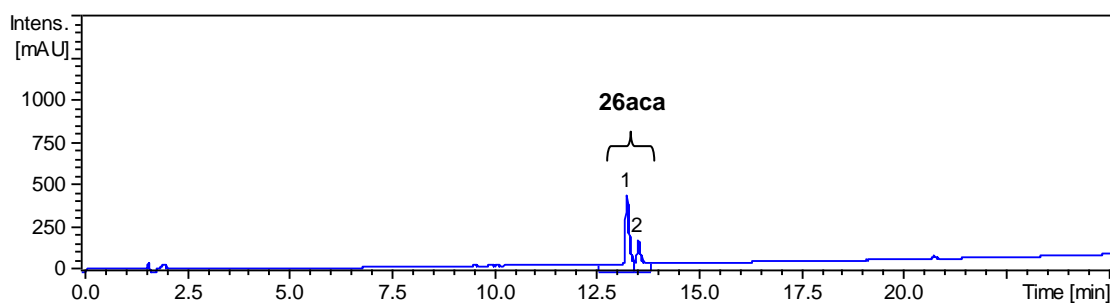
Ácido [(1-Carboximetil-2-oxo-4-p-tolil-azetidín-3-il)-metil-amino]-fenil-acético (26aca)



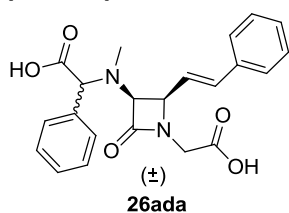
La resina **25aca** (123 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aca**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ac**). Pureza: 100%.

Proporción isomérica: 2,6:1. Tiempos de retención: 13.2 y 13.5.

MS-ESI (-) (m/z): 381.14 $[M-H]^+$; calc. para $C_{21}H_{21}N_2O_5$: 381.14.



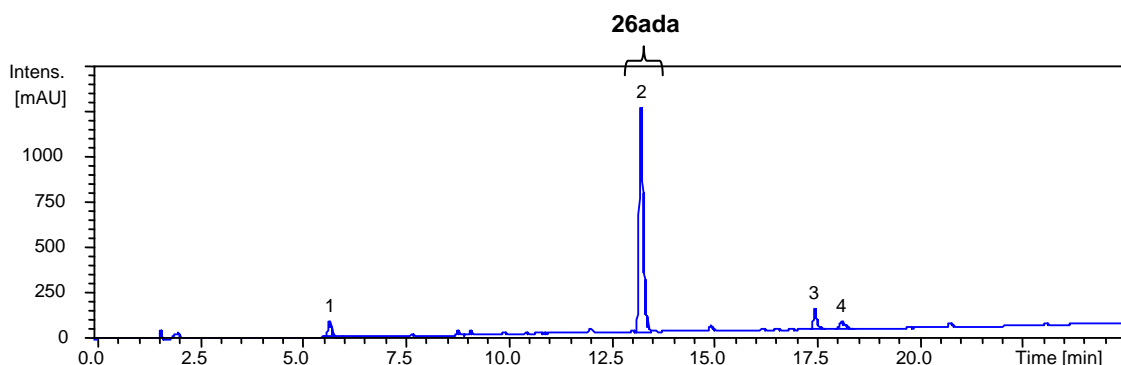
Ácido [(1-Carboximetil-2-oxo-4-stiril-azetidín-3-il)-metil-amino]-fenil-acético (26ada)



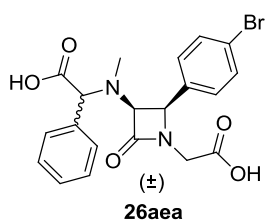
La resina **25ada** (125 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26ada**) con un 100% de

rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ad**). Pureza: 85%. Proporción isomérica: 1 solo isómero. Tiempo de retención: 13.2.

MS-ESI (-) (m/z): 393.14. $[M-H]^+$; calc. para $C_{22}H_{21}N_2O_5$: 393.14.

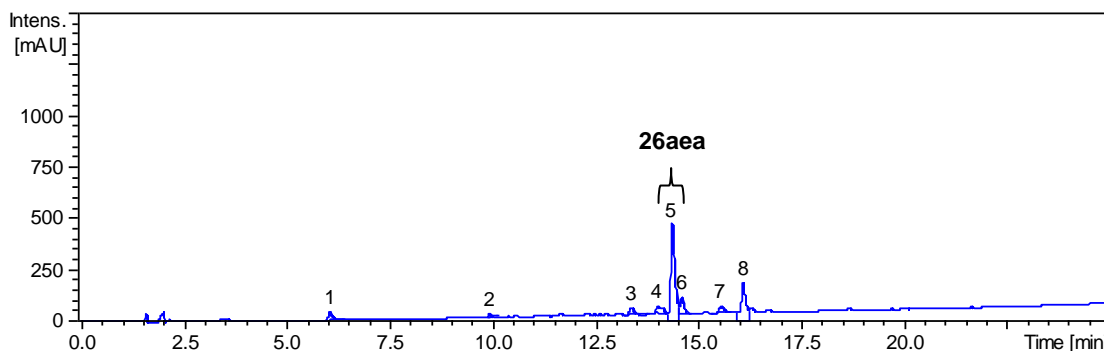


Ácido {[2-(4-Bromo-fenil)-1-carboximetil-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-fenil-acético (26aea**)**

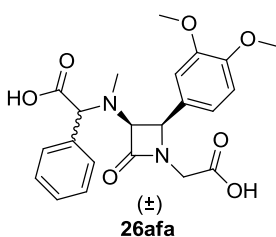


La resina **25aea** (163 mg, 0,094 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aea**) con un 74% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ae**). Pureza: 61%. Proporción isomérica: 7:1. Tiempos de retención: 14.3 y 14.6.

MS-ESI (-) (m/z): 445.04 $[M-H]^+$; calc. para $C_{20}H_{18}BrN_2O_5$: 445.03.



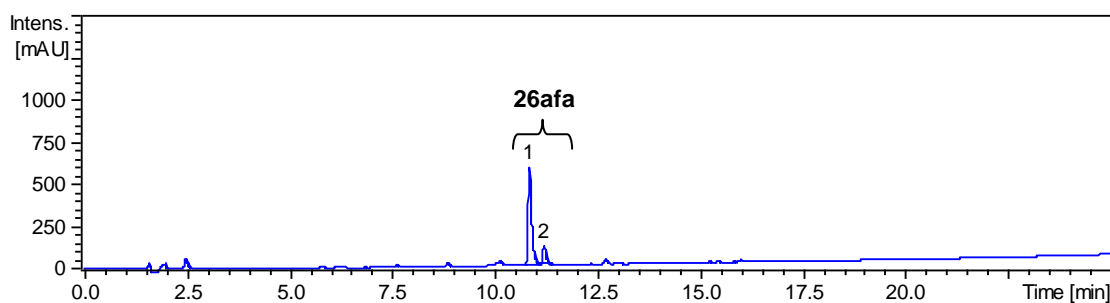
Ácido {[1-Carboximetil-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-fenil-acético (26afa**)**



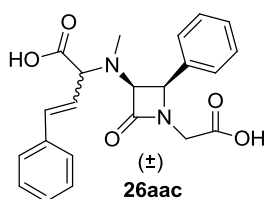
La resina **25afa** (163 mg, 0,095 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26afa**) con un 70% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23af**). Pureza: 100 %. Proporción isomérica: 6,2:1.

Tiempos de retención: 10,8 y 11,2.

MS-ESI (-) (m/z): 427.15 $[M-H]^+$; calc. para $C_{22}H_{23}N_2O_7$: 427.15.



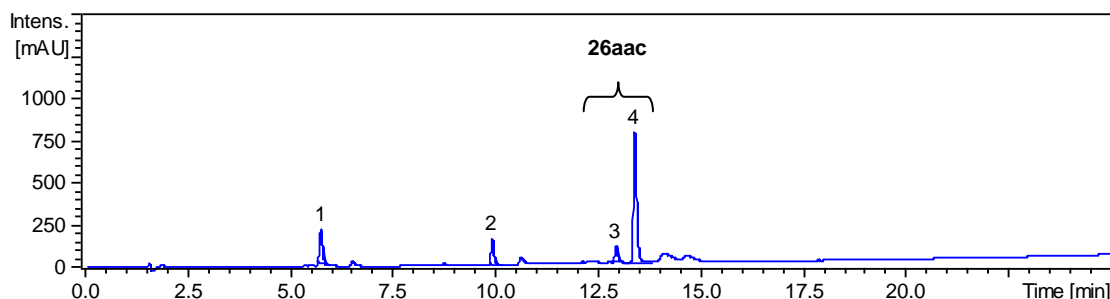
Ácido 2-[(1-Carboximetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-4-fenil-but-3-enoico (26aac)



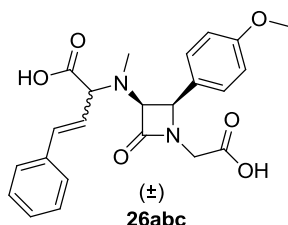
La resina **25aac** (140 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aac**) con un 86% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23aa**). Pureza: 73,7 %. Proporción isomérica: 10:1. Tiempos de retención: 12,9 y

13,4.

MS-ESI (-) (m/z): 393.14 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{22}H_{21}N_2O_5$: 393.14.



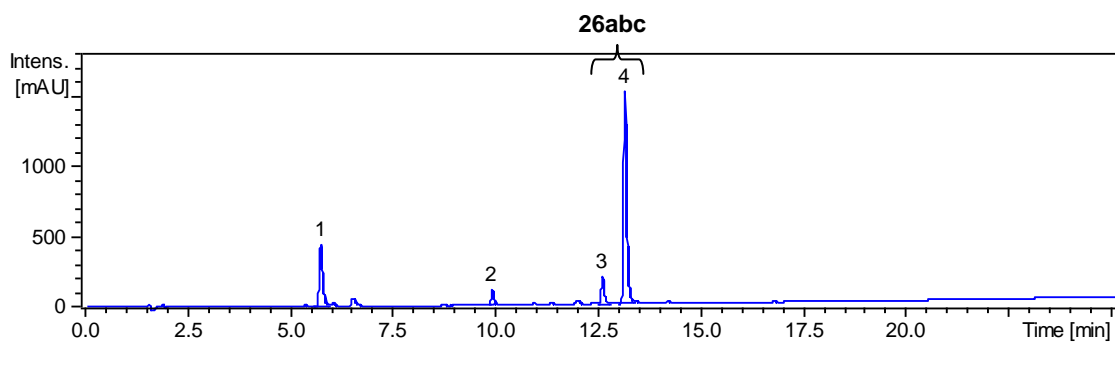
Ácido 2-[(1-carboximetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il)-metil-amino]-4-fenil-but-3-enoico (26abc)



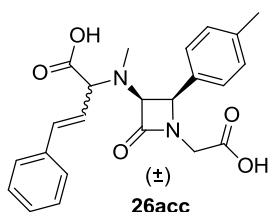
La resina **25abc** (143 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26abc**) con un 45% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ae**). Pureza: 75,6%. Proporción isomérica: 8:1. Tiempos de retención: 12,6 y

13,1.

MS-ESI (-) (m/z): 423.15 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{23}H_{23}N_2O_6$: 423.15.



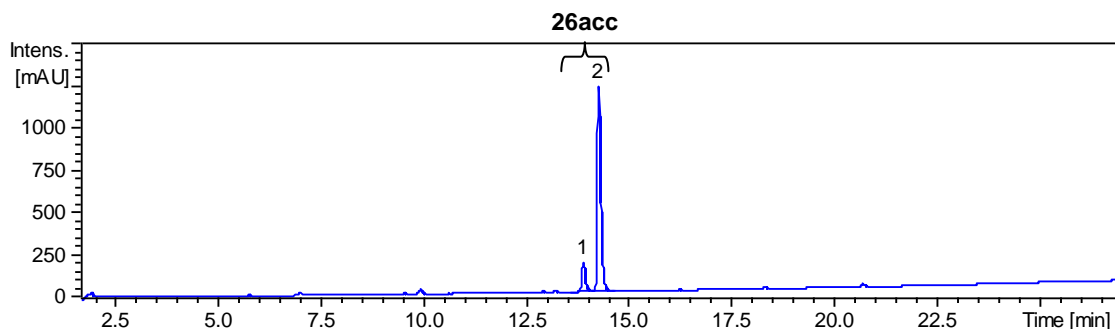
Ácido 2-[(1-carboximetil-2-oxo-4-p-tolil-azetidín-3-il)-metil-amino]-4-fenil-but-3-enóico (26acc)



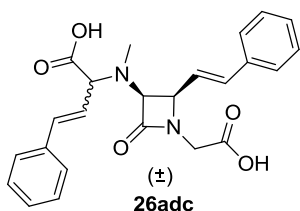
La resina **25acc** (125 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26acc**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ac**). Pureza: 100%.

Proporción isomérica: 7,5:1. Tiempos de retención: 13,9 y 14,2

MS-ESI (-) (m/z): 407.16 $[M-H]^+$; calc. para $C_{23}H_{23}N_2O_5$: 407.16.



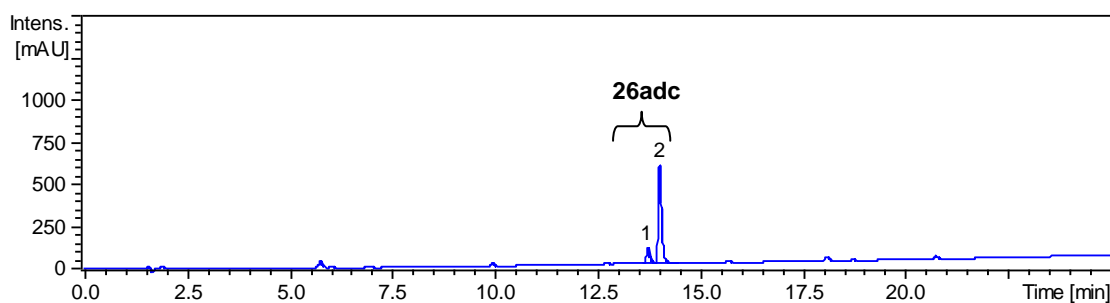
Ácido 2-[(1-carboximetil-2-oxo-4-stiril-azetidín-3-il)-metil-amino]-4-fenil-but-3-enóico (26adc)



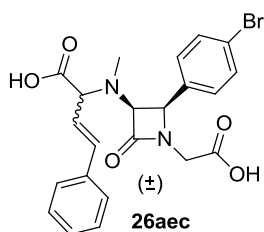
La resina **25adc** (126 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26adc**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ad**). Pureza:

100%. Proporción isomérica: 6,2:1 Tiempos de retención: 13,7 y 14.

MS-ESI (-) (m/z): 419.15 $[M-H]^+$; calc. para $C_{24}H_{23}N_2O_5$: 419.16.



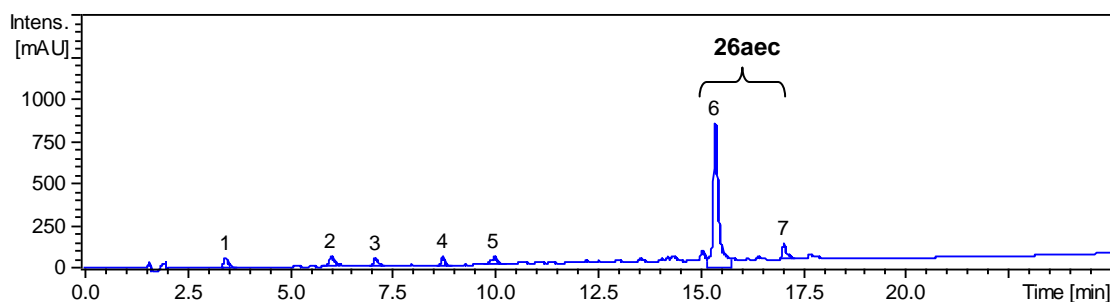
Ácido 2-([2-(4-bromo-fenil)-1-carboximetil-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino)-4-fenil-but-3-enoico (26aec)



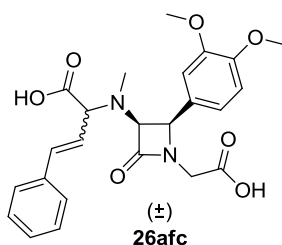
La resina **25aec** (165 mg, 0,094 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aec**) con un 67% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ae**). Pureza: 83,8%. Proporción isomérica: 14:1.

Tiempos de retención: 15,3 y 17,0.

MS-ESI (-) (m/z): 471.06 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{22}H_{20}BrN_2O_5$: 471.05.



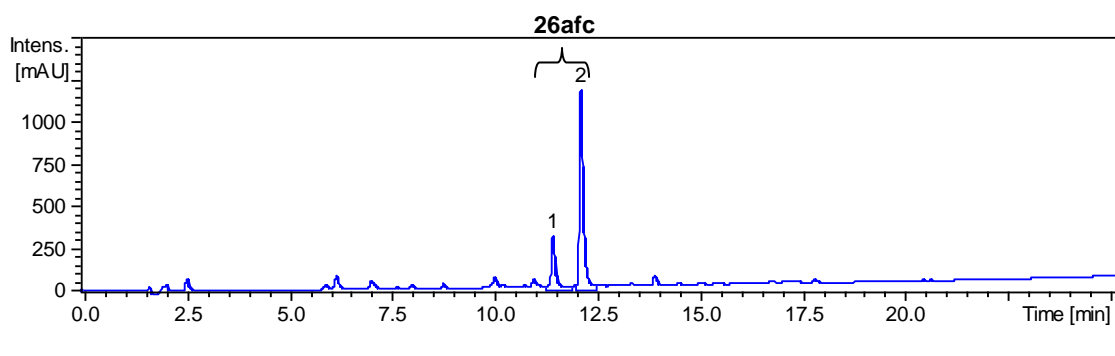
Ácido 2-([1-Carboximetil-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino)-4-fenil-but-3-enoico (26afc)



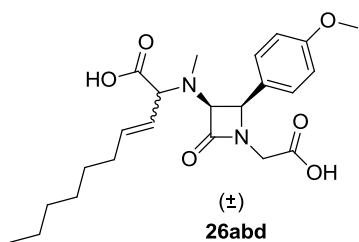
La resina **25afc** (163 mg, 0,095 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26afc**) con un 65% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23af**). Pureza: 100%. Proporción isomérica: 2,9:1. Tiempos de retención: 11,4 y

12,1.

MS-ESI (-) (m/z): 453.17 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{24}H_{25}N_2O_7$: 453.16.

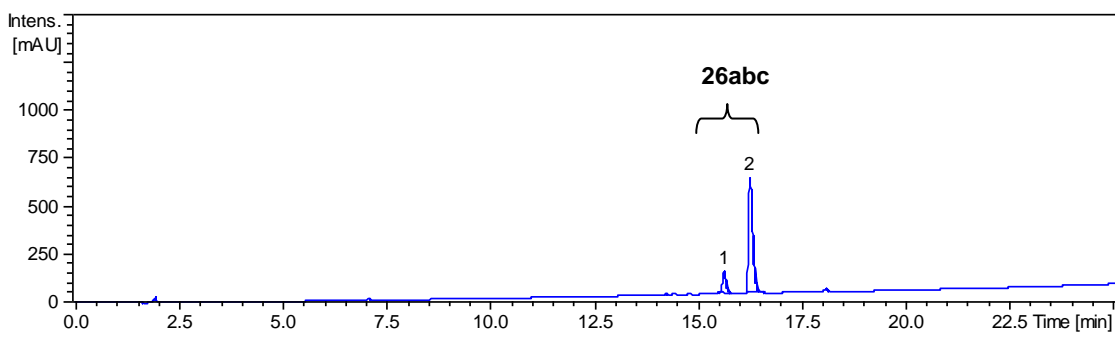


Ácido 2-([1-Carboximetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino)-dec-3-enoico (26abd)

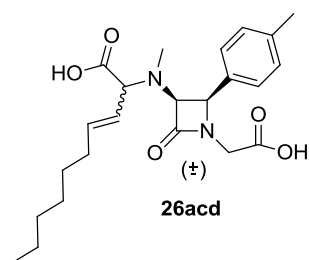


La resina **25abd** (145 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26abd**) con un 55% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ab**). Pureza: 100%. Proporción isomérica: 6,3:1. Tiempos de retención: 15,6 y 16,2.

MS-ESI (-) (m/z) 431.21 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{23}H_{31}N_2O_6$: 431.21.

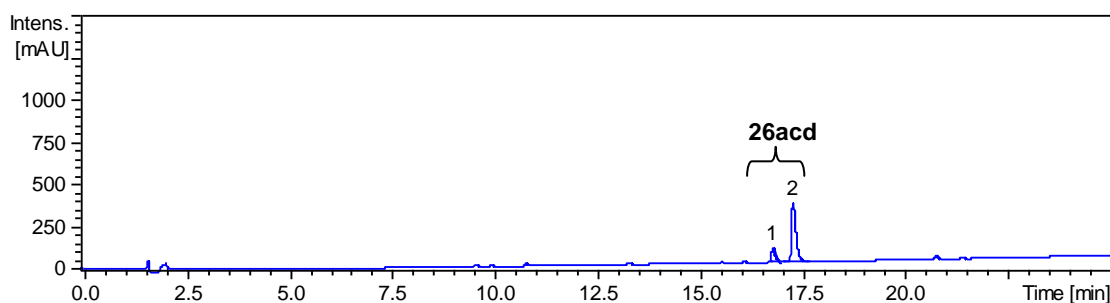


Ácido 2-[(1-Carboximetil-2-oxo-4-p-tolil-azetidín-3-il)-metil-amino]-dec-3-enoico (26acd)

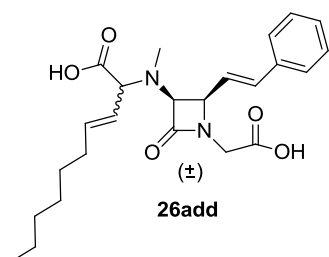


La resina **25acd** (124 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26acd**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ac**). Pureza: 100%. Proporción isomérica: 5,3:1. Tiempos de retención: 13,9 y 14,2

MS-ESI (-) (m/z): 415.22 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{23}H_{31}N_2O_5$: 415.22.



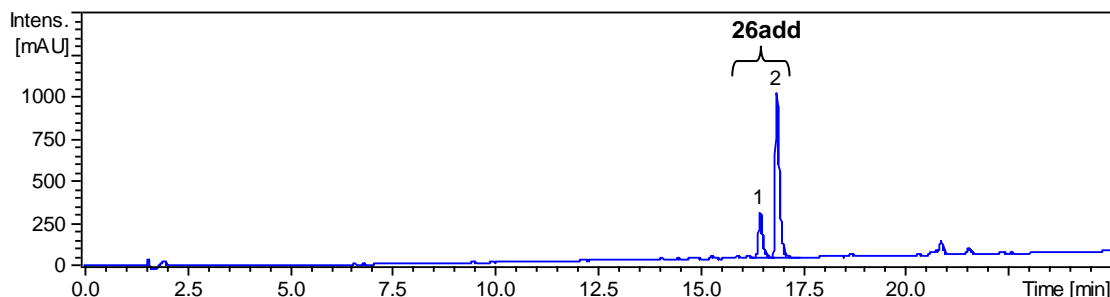
Ácido 2-[(1-Carboximetil-2-oxo-4-stiril-azetidín-3-il)-metil-amino]-dec-3-enoico (26add)



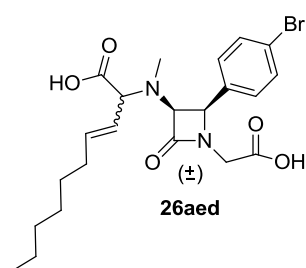
La resina **25add** (127 mg, 0,086 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26add**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ad**). Pureza: 100%. Proporción isomérica: 3,6:1

Tiempos de retención: 16,4 y 16,8.

MS-ESI (-) (m/z): 427.22 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{24}H_{31}N_2O_5$: 427.22.



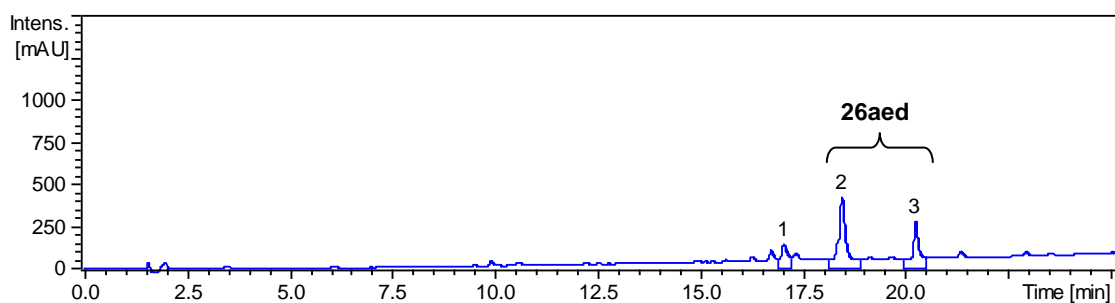
Ácido 2-[[2-(4-bromo-fenil)-1-carboximetil-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino]-dec-3-enoico (26aed)



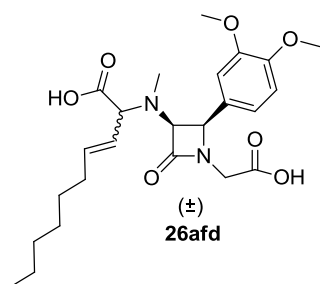
La resina **25aed** (166 mg, 0,094 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aed**) con un 92% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ad**). Pureza: 84,4 %. Proporción isomérica: 1,7:1.

Tiempos de retención: 18,4 y 20,2.

MS-ESI (-) (m/z): 479.11 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{22}H_{28}BrN_2O_5$: 479.11.



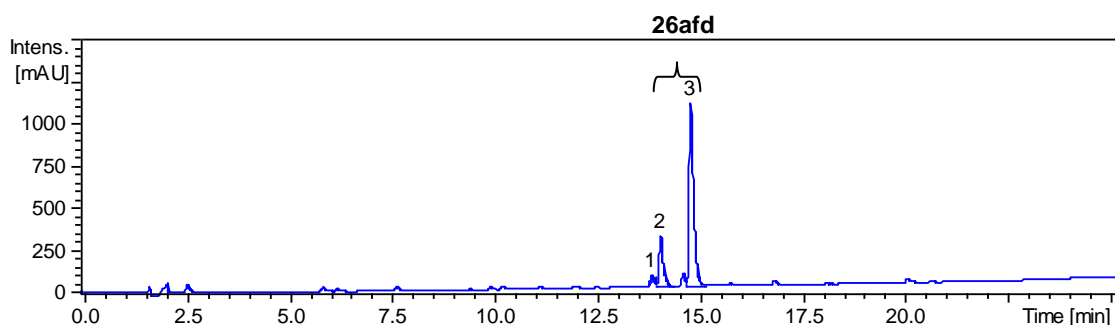
Ácido 2-([1-carboximetil-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino)-dec-3-enoico (26afd)



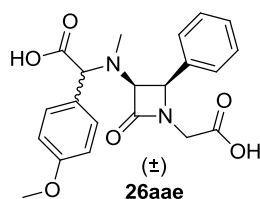
La resina **25afd** (164 mg, 0,095 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26afd**) con un 57% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23af**). Pureza: 98,6%. Proporción isomérica: 4:1.

Tiempos de retención: 11,4 y 12,1.

MS-ESI (-) (m/z): 461.23 [M-H⁺]⁻; calc. para C₂₄H₃₃N₂O₇: 461.22.



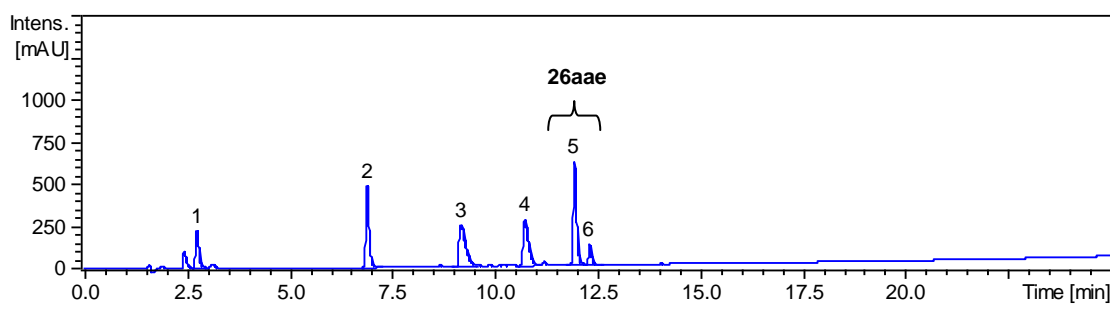
Ácido [(1-carboximetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-(4-metoxi-fenil)-acético (26aae)



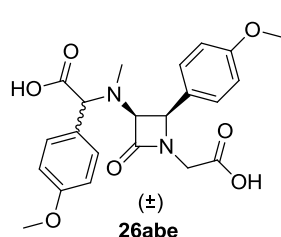
La resina **25aae** (142 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aae**) con un 100% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23aa**). Pureza: 30 %.

Proporción isomérica: 5:1. Tiempos de retención: 11,9 y 12,3.

MS-ESI (-) (m/z): 397.13 [M-H⁺]⁻; calc. para C₂₁H₂₁N₂O₆: 397.14.



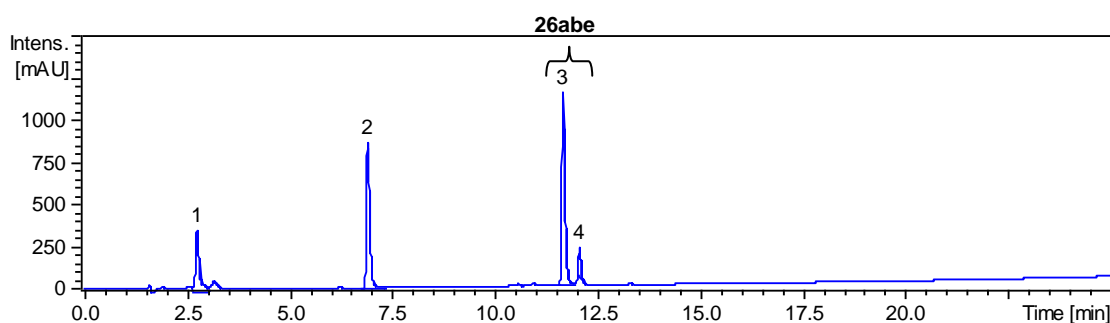
Ácido {[1-carboximetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(4-metoxi-fenil)-acético (26abe)



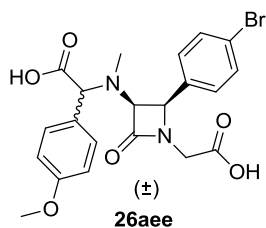
La resina **25abe** (146 mg, 0,1 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26abe**) con un 47% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ab**). Pureza: 49%. Proporción isomérica: 9:1. Tiempos de retención: 11,6 y

12.

MS-ESI (-) (m/z): 427.14 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{22}H_{23}N_2O_7$: 427.15.



Ácido {[2-(4-bromo-fenil)-1-carboximetil-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(4-metoxi-fenil)-acético (26aee)

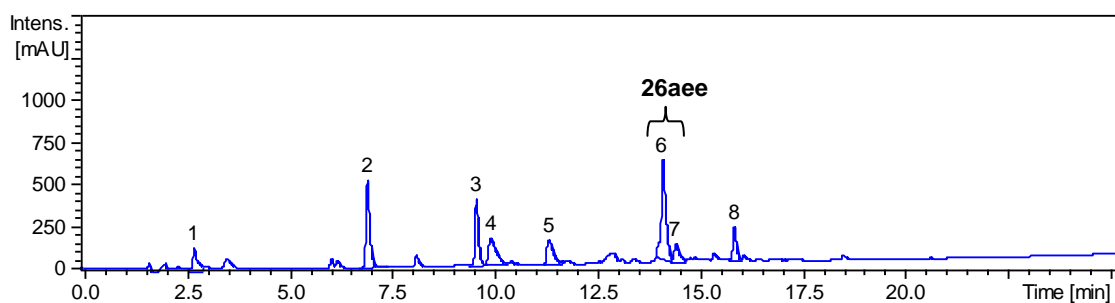


La resina **25aee** (161 mg, 0,094 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aee**) con un 54% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ae**).

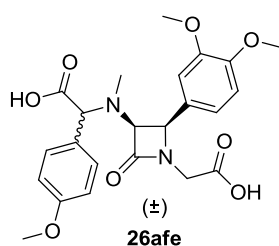
Pureza: 31.9%. Proporción isomérica: 4,9:1

Tiempos de retención: 14,1 y 14,4

MS-ESI (-) (m/z): 475.06 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{21}H_{20}BrN_2O_6$: 475.05.



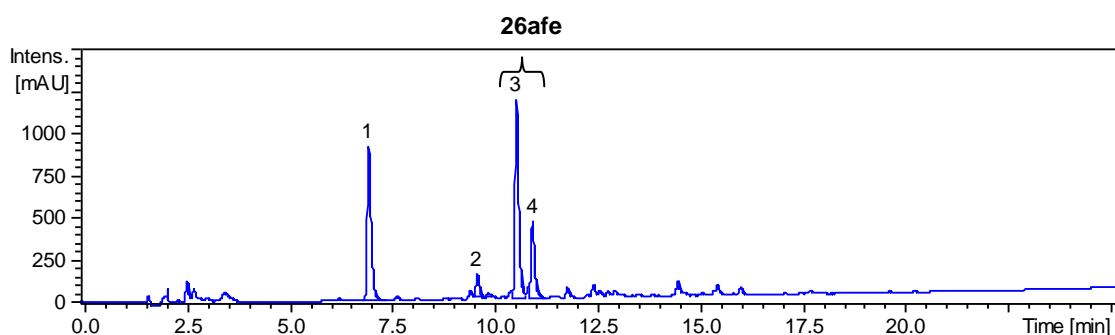
Ácido {[1-carboximetil-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(4-metoxi-fenil)-acético (26afe)



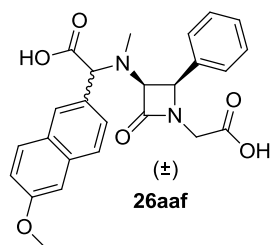
La resina **25afe** (165 mg, 0,095 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26afe**) con un 30% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23af**). Pureza: 59,6%. Proporción isomérica: 2,6:1.

Tiempos de retención: 10,5 y 10,9.

MS-ESI (-) (m/z): 457.17 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{23}H_{25}N_2O_8$: 457.16.



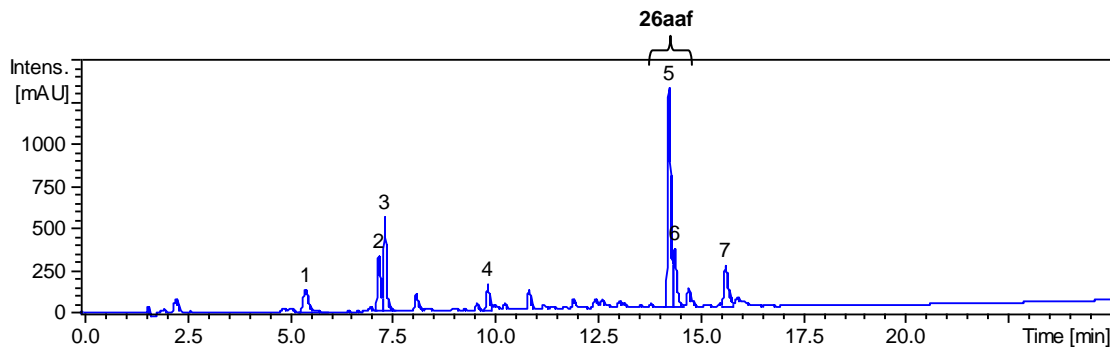
Ácido [(1-Carboximetil-2-oxo-4-fenil-azetidín-3-il)-metil-amino]-(6-metoxi-naftalen-2-il)-acético (26aaf)



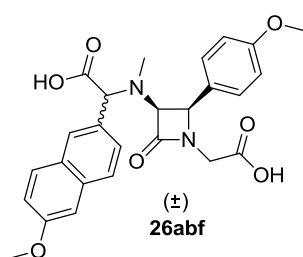
La resina **25aaf** (142 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aaf**) con un 46% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23aa**).

Pureza: 52%. Proporción isomérica: 3,4:1. Tiempos de retención: 14,2 y 14,3

MS-ESI (-) (m/z): 447.15 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{25}H_{23}N_2O_6$: 447.15.



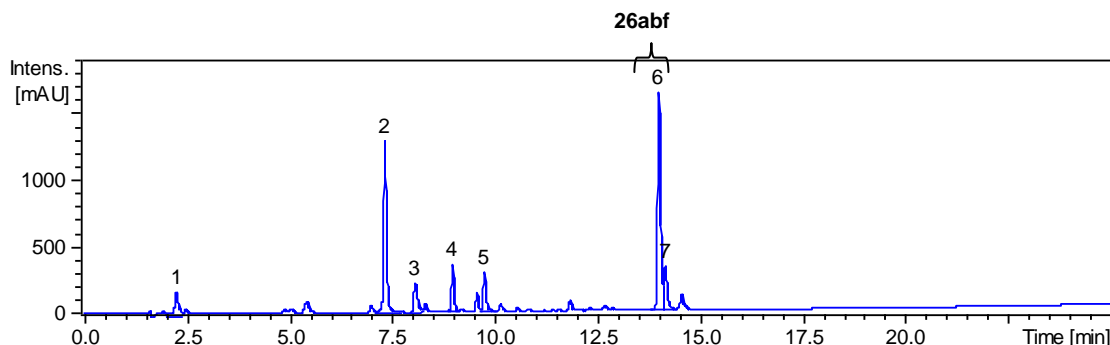
Ácido {[1-carboximetil-2-(4-metoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(6-metoxi-naftalen-2-il)-acético (26abf)



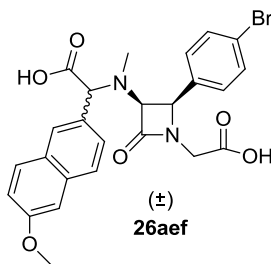
La resina **25abf** (145 mg, 0,10 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26abf**) con un 34% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ab**). Pureza: 47%. Proporción isomérica: 4,5:1. Tiempos de

retención: 14 y 14,1

MS-ESI (-) (m/z): 477.16 $[M-H]^+$; calc. para $C_{26}H_{25}N_2O_7$: 477.16.



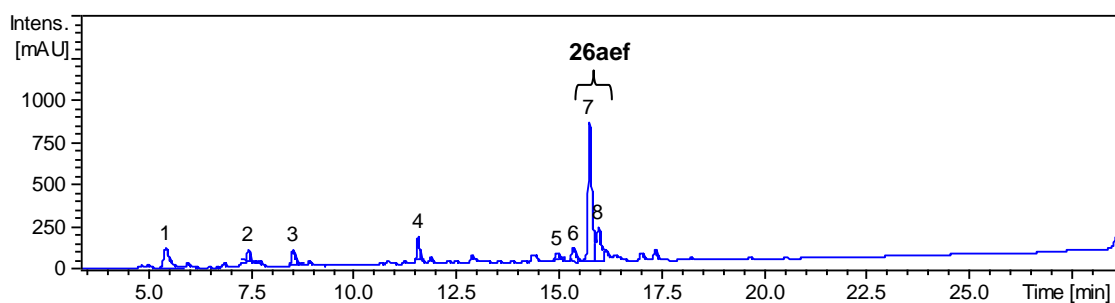
Ácido {[2-(4-bromo-fenil)-1-carboximetil-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(6-metoxi-naftalen-2-il)-acético (26aef)



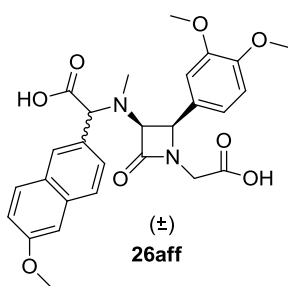
La resina **25aef** (161 mg, 0,094 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aef**) con un 45% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23ae**). Pureza: 67,5%. Proporción isomérica: 3,4:1

Tiempos de retención: 15,7 y 16.

MS-ESI (-) (m/z): 525.07 $[M-H]^+$; calc. para $C_{25}H_{22}BrN_2O_6$: 525.06.

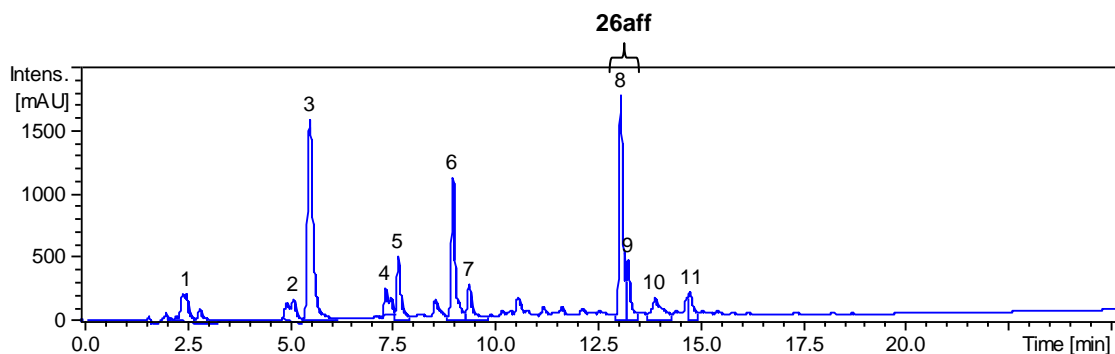


Ácido {[1-carboximetil-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4-oxo-azetidín-3-il]-metil-amino}-(6-metoxi-naftalen-2-il)-acético (26aff)



La resina **25aff** (165 mg, 0,095 mmoles) fue tratada según el procedimiento general **5.4.1**, para luego obtener el producto deseado (**26aff**) con un 61% de rendimiento (3 pasos de reacción desde **23af**). Pureza: 25%. Proporción isomérica: 3:1. Tiempos de retención: 13,0 y 13,2.

MS-ESI (-) (m/z): 507.18 [$M-H^+$]⁻; calc. para $C_{27}H_{27}N_2O_8$: 507.17.



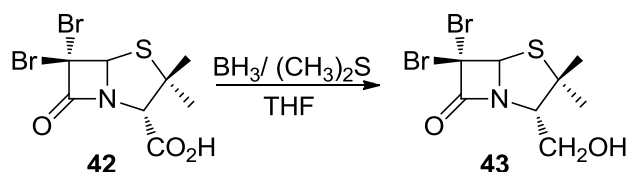
5.5.2. Secuencia sintética para la preparación de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas en fase sólida

5.5.2.a. Preparación de la azidometilpenicilina 35

5.5.2.a.1. Síntesis del alcohol 43

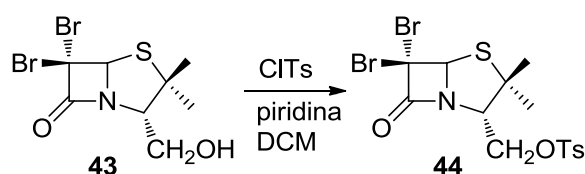
A un balón secado en estufa y mantenido bajo atmósfera de nitrógeno seco, se agregan 3,2 mmol, (1,148 g) de ácido penicilánico **42** y se disuelven en 8 mL de THF anhidro. Posteriormente se añaden, gota a gota y a temperatura

ambiente, 1,5 equivalentes del complejo borano/sulfuro de metilo (solución 10,1 M en THF) bajo una fuerte agitación. La mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente por 40 h. Pasado este tiempo, se agregan, gota a gota 0,6 mL de agua destilada, se evapora el solvente y se purifica mediante columna cromatográfica (hexano:AcOEt, 60:40) obteniéndose 904 mg (2,62 mmoles) del producto deseado **43** (82% de rendimiento).



5.5.2.a.2. Síntesis del Tosilato **44**

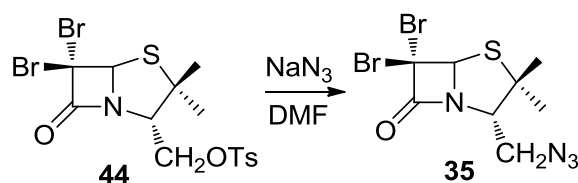
Se disuelven 2,62 mmol (904 mg) de **43** en 0,47 mL (5,27 mmol) de piridina y 3 mL de DCM. Luego se agregan gota a gota, 1,004 g (5,27 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo disueltos en 10 mL de DCM durante un período de 25 minutos. Se deja a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se lava con bicarbonato de sodio al 5% (2 x 5 mL), HCl 2N (5 mL) y solución saturada de NaCl (2 x 5 mL). La capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y el residuo obtenido, luego de la evaporación a seco, se purifica mediante columna cromatográfica (hexano:AcOEt,70:30) obteniéndose 1,68 g (3,73 mmoles) de **44** (64% de rendimiento).



5.5.2.a.3. Síntesis de la azida **35**

Se colocan en un balón 0,86 mmol (429 mg) del tosilato **44**, 5 mL de DMF anhidra y 3,5 equivalentes (3,01 mmol, 195,65 mg) de NaN₃. La mezcla de reacción se calienta a 50°C y se agita por 12 horas. Luego se diluye con 25 mL de éter y se lava con agua destilada (5 x 10 mL) y con Brine (10 mL). La capa orgánica se seca con sulfato de magnesio, se evapora el solvente y se purifica

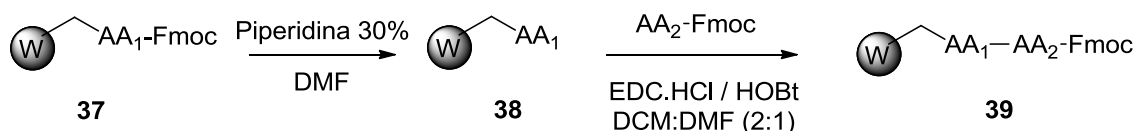
por cromatografía en columna (hexano: AcOEt, 80:20) obteniéndose 233 mg (0,63 mmoles) de **35** (74% de rendimiento).



5.5.2.b. Procedimiento general de acoplamiento peptídico

Se toman 0,073 mmoles del Fmoc-aminoácido unido a resina de Wang (**37**) y se desprotege del grupo Fmoc según metodología general **5.4.3**, para obtener la resina **38**.

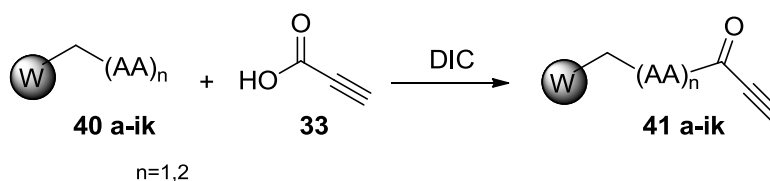
Luego, la resina **38** (0,073 mmoles) se suspende en 3 mL de una mezcla de DCM:DMF (2:1). Por otro lado, en un tubo de ensayo se disuelven 3 equivalentes del AA₂-Fmoc, 3 equivalentes de EDC.HCl y 3 equivalentes de HOBT en 3 mL de DCM:DMF (2:1), transcurridos 5 minutos de agitación se agrega esta solución sobre la resina. La mezcla se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se toman unos granos de resina, se lavan con DCM (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL), y se realiza con ellos el test de Kaiser (**5.3.2.**) para verificar la finalización de la reacción. En el caso de que el resultado del test sea positivo, se continúa agitando la mezcla de reacción por 3 horas más y luego se repite el test. Cuando el resultado de dicho test es negativo (indica la finalización de la reacción), se filtra y se lava la resina repetidas veces y en forma sucesiva con DMF (3 x 5 mL), DCM (3 x 5 mL), y MeOH (3 x 5 mL). Luego se seca en desecador. Se obtiene así el dipéptido **39** que se utiliza directamente en el siguiente paso de síntesis.



5.5.2.c. Obtención de N-propiolil aminoácidos

En 500 μ L de DMF a 0° se disuelven 20 equiv. de ácido propiólico (**33**, 1.46mmol, 90 μ L) y 10 equiv. de DIC (0.73mmol, 112 μ L). Después de unos

minutos, se forman unos cristales que se redisuelven agregando 500 μL de DCM. La solución resultante se agrega sobre la resina **40** (0.073 mmol) solvatada en DCM y se agita magnéticamente, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Luego de este tiempo, se filtra y se lava la resina sucesiva y alternadamente con DCM (3 x 5 mL), DMF (3 x 5 mL), AcOEt (3x5mL) y un lavado final con DCM, y se seca en desecador. Se obtiene así la resina **41** que se utiliza directamente en el siguiente paso de síntesis



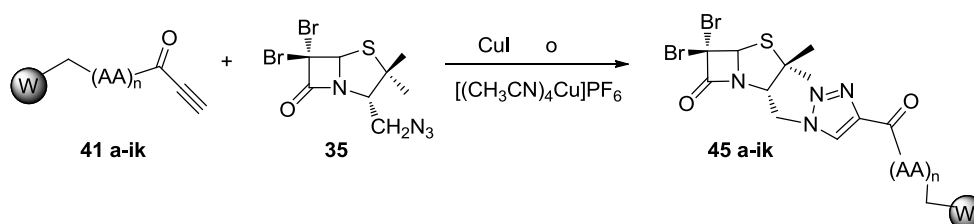
5.5.2.d. Obtención de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas mediante cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre

Método 1

Se agregan a la resina **41** (0.073 mmol, suspendidos en 3 mL de THF) 10 equiv de DIPEA (0.73mmol, 127 μL), 0.5 equiv de CuI solubilizados en piridina y 2 equivalentes de la azida **35** (0.146 mmol, 37.3 mg) y se agita durante 2-18 h a t° ambiente. Luego de este tiempo, se lava la resina obtenida **45** con THF, DMF, Piperidina 10% en DMF, and CH_2Cl_2 .

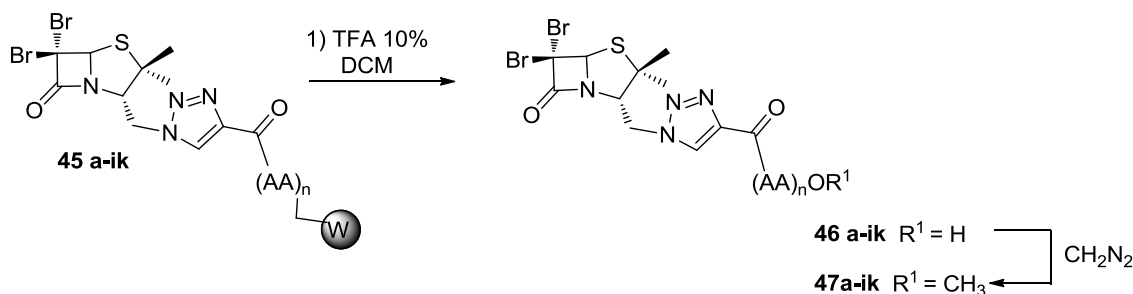
Método 2

Se agregan a la resina **41** (0.073 mmol, suspendidos en 3 mL de DCM) 0.3 equiv de Tetrakis(acetonitrilo)cobre(I)hexafluorofosfato (0.0146 mmol, 6 mg) y 2 equivalentes de la azida **35** (0.146 mmol, 37.3 mg), y se agita durante 2-18 h a t° ambiente. Luego de este tiempo, se filtra y se lava la resina obtenida **45** con THF, DMF, piperidina 10% en DMF, and CH_2Cl_2 .



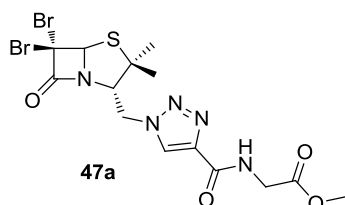
5.5.2.e. Obtención de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas 46 y/o 47

Se toman 0.073 mmol de la resina **45**, se aplica la metodología general **5.4.1** para separar el compuesto de su unión a la misma, obteniéndose **46**. Para la transformación de **46** en su éster metílico, se emplea el procedimiento general **5.4.2**. Por último, luego de una purificación mediante columna cromatográfica (hexano-AcOEt) se aísla el producto deseado **47**.



5.5.2.f. Síntesis y caracterización de los compuestos correspondientes a la biblioteca de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas en fase sólida

2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)acetato de metilo (**47a**)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 25,3 mg (0,049 mmoles) del compuesto **47a** representando un 43%

de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37a**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

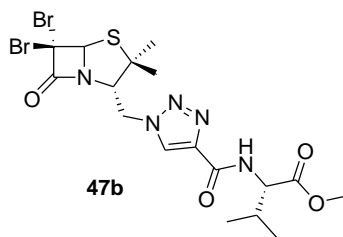
Caracterización: sólido blanco amorfo.

RMN de 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3), 4.25 (d, $J = 5,64$ Hz, 2H, Gly CH_2), 4.37 (m, 1H, CH_2), 4.42 (m, 1H, CH), 4.70 (dd, $J_1 = 12,6$ Hz, $J_2 = 3$ Hz, 1H, CH_2), 5.64 (s, 1H, CH), 7.63 (t, $J = 5,64$ Hz, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 300MHz)** δ 24.5 (CH_3), 33.2 (CH_3), 40.9 (CH_2), 48.3 (CH_2), 52.5 (CH_3), 58.5(C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.1 (CH), 143.1 (C), 159.9 (CO), 165.6 (CO), 169.7 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1747 cm^{-1} (CO éster), 1672 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 531.9260 $[M+Na]^+$ calc. para $C_{14}H_{17}Br_2N_5O_4S$: 531.9265.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-metilbutanoato de metilo (47b)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 19,6 mg (0,035 mmoles) del compuesto **47b** representando un 50% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37b**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

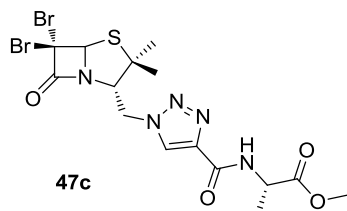
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.00 (d, J = 3.4 Hz, 3H, Val CH_3), 1.02 (d, J = 3.4 Hz, 3H, Val CH_3), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 2.28 (m, 1H, CH), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 4.31 (m, 1H, CH_2), 4.41 (m, 1H, CH), 4.70 (m, 1H, CH_2), 4,72 (m, 1H, CH), 5.68 (s, 1H, CH), 7.57 (d, J = 9Hz, 1H, NH) 8.32 (s, 1H, CH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) δ 17.9 (Val CH_3), 19.1(Val CH_3), 24.5 (CH_3), 31.4 (CH), 33.3 (CH_3), 48.3 (CH_2), 52.3 (OCH_3), 57.1 (CH_3), 58.6(C), 63.5 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.4 (CH), 143.2 (C), 159.7 (CO), 165.6 (CO), 171.7 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1666 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 573.9729 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}$: 573.9735.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida) propanoato de metilo (47c)



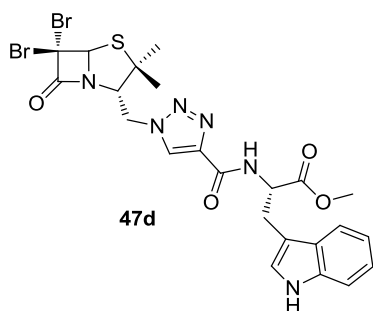
Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 25 mg (0,048 mmoles) del compuesto **47c** representando un 35% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37c**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.54 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, Ala CH_3), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 4.40 (m, 1H, CH_2), 4.40 (m, 1H, CH), 4.68 (m, 1H, CH_2), 4.79 (m, 1H, CH), 5.63 (s, 1H, CH), 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH) 8.15 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 18.4 (CH_3), 24.5 (CH_3), 33.2 (CH_3), 47.8 (CH), 48.3 (CH_2), 52.6 (OCH_3), 58.6 (C), 63.5 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 125.9 (CH), 143.3 (C), 159.2 (CO), 165.5 (CO), 172.7 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1666 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 545.9416 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}$: 545.9422.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-(1H-indol-3-il) propanoato de metilo (47d)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 11,04 mg (0,017 mmoles) del compuesto **47d** representando un 25% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de

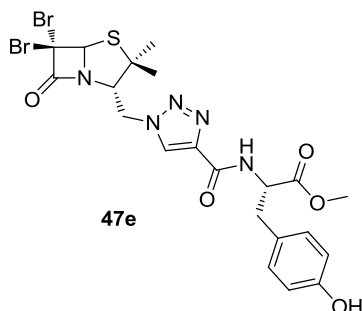
reacción desde **37d**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite amarillento.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.56 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 3.42 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 4.37 (m, 1H, CH_2), 4.39 (m, 1H, CH), 4.64 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH_2), 5.10 (m, 1H, CH), 5.61 (s, 1H, CH), 6.90-7.58 (m, 5H arom), 7.63 (d, $J = 7.8$, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 24.5 (CH_3), 28.1 (CH_2), 31.9 (C), 33.2 (CH_3), 48.3 (CH_2), 52.5 (CH_3), 58.5 (C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 109.9 (C), 111.2 (CH), 118.6 (CH), 119.6 (CH), 122.2 (CH), 122.9 (CH), 126.0 (CH), 127.3 (C), 129.9 (C), 136.1 (C), 143.3 (C), 159.3 (CO), 165.5 (CO), 171.8 (CO). **IR:** (film) 1797 cm^{-1} (β -lactama), 1743 cm^{-1} (CO éster), 1666 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 639.0019. [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$: 639.0025.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de metilo (47e)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 17,4 mg (0,035 mmoles) del compuesto **47e** representando un 36% de rendimiento total basado en la carga

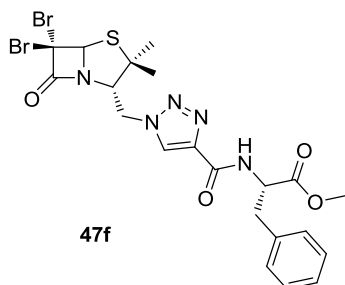
inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37e**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite amarillo claro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.56 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 3.12 (m, 2H, CH_2), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 4.36 (m, 1H, CH_2), 4.38 (m, 1H), 4.65 (q, $J=11$ Hz, 1H, CH_2), 5.01 (m, 1H, CH), 5.62 (s, 1H, CH), 6.69-7.04 (m, 4H, ArH), 7.53 (d, 1H, NH, $J=8.6$ Hz), 8.09 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 24.5 (CH_3), 33.2 (CH_3), 37.6 (CH_2), 48.3 (CH_2), 52.4 (CH_3), 53.3 (CH), 58.4 (C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 115.5 (CH), 126.1 (CH), 127.4 (C), 130.4 (CH), 143.0 (C), 155.0 (C), 159.34 (CO), 165.5 (CO), 171.3 (CO). **IR:** (film) 1795 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1655 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 637.9678 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_5\text{S}$: 637.9684.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-fenilpropanoato de metilo (47f)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 17,1mg (0,028 mmoles) del compuesto **47f** representando un 36% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37f**),

previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

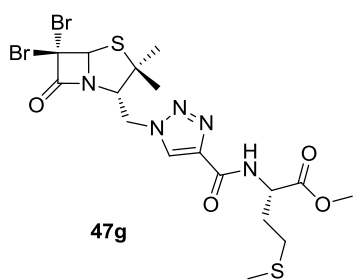
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 3.22 (m, 2H, CH_2), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.38 (m, 1H, CH) 4.68 (dd, $J_1=12,58$ Hz, $J_2=2.7$ Hz, 2H, CH_2), 5.05 (m, 1H, CH), 5.64 (s, 1H, CH), 7.16-7.31 (m, 5H, ArH), 7.54 (d, $J=8.46$ Hz, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 24.5 (CH_3), 33.2 (CH_3), 38.2 (CH_2), 48.3 (CH_2), 52.4 (CH_3), 53.2 (CH), 58.5 (C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.1 (CH), 127.2 (CH), 128.6 (CH), 129.2 (CH), 135.7 (C), 143.0 (C), 159.34 (CO), 165.5 (CO), 171.3 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1672 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 599.9910 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$: 599.9915.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-4-(metiltio) butanoato de metilo (47g)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 6,4 mg (0,01 mmoles) del compuesto **47g** representando un 17% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde

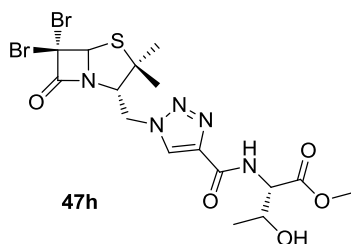
37g), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 2.04-2.33 (m, 2H, CH_2), 2.11 (s, 3H, Met CH_3), 2.6 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.38 (m, 1H, CH_2), 4.40 (m, 1H, CH), 4.69 (dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=1.4$ HZ, 1H, CH_2), 4.93 (m, 1H, CH), 5.64 (s, 1H, CH), 7.67 (d, $J=8.4$ HZ, 1H, NH), 8.17 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 15.4 (CH_3), 24.5 (CH_3), 30.0 (CH_2), 31.9 (CH_3), 33.2 (CH_2), 48.3 (CH_2), 51.2 (CH), 52.6 (CH_3), 58.5 (C), 63.5 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.1 (CH), 143.2 (C), 159.5 (CO), 165.6 (CO), 171.7 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1660 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 605.9450 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}_2$: 605.9456.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-hidroxi butanoato de metilo (47h)



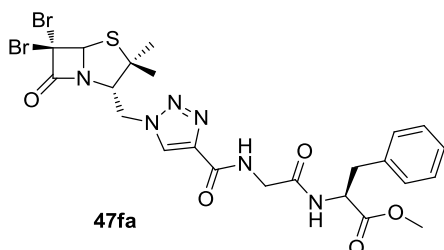
Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología **5.5.2.e.**, se obtuvieron 10,2 mg (0,018 mmoles) del compuesto **47h** representando un 30% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (5 pasos de reacción desde **37h**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite amarillento.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.30 (d, 3H, CH_3 , $J=6.4$ Hz), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.41 (m, 1H, CH_2), 4.45 (m, 1H, CH), 4.47 (m, 1H, CH), 4.70 (dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2.2$ Hz, 1H, CH_2), 4,78 (dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=2.8$ Hz, 1H, CH), 5.64 (s, 1H, CH), 7.82 (d, $J=9$, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 19.9 (CH_3), 24.5 (CH_3), 33.3 (CH_3), 48.3 (CH_2), 52.7 (CH_3), 57.1 (CH), 58.5 (C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 68.1 (CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 143.1 (C), 160.1 (CO), 165.6 (CO), 170.9 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1743 cm^{-1} (CO ester), 1670 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 575.9522 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_5\text{S}$: 575.9528.

(2S)-2-(2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)acetamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**47fa**)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 33,9mg (0,051 mmoles) del compuesto **47fa** representando un 37% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37f**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

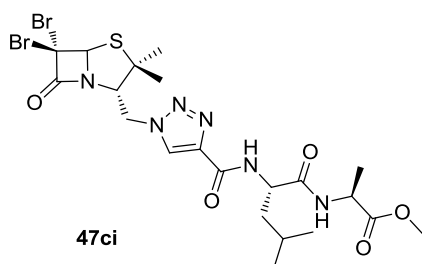
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 3.11 (ddd, $J_1=21$ Hz, $J_2=14$ Hz, $J_3=6$ Hz, 2H, CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 4.11 (d, $J=5.7$ Hz, 2H, CH_2), 4.36 (m, 1H, CH_2), 4.46 (m, 1H, CH), 4.69 (dd, $J_1=13$ Hz, $J_2=3.8$

Hz, 2H, CH₂), 4.89 (m, 1H, CH), 5.65 (s, 1H, CH), 6.70 (d, $J = 7.6$, 1H, NH), 7.07-7.22 (m, 5H, ArH), 7.79 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, CH). **RMN de ¹³C (CDCl₃, 300MHz)** δ 24.5 (CH₃), 33.2 (CH₃), 37.8 (CH₂), 42.9 (CH₂), 48.4 (CH₂), 52.4 (CH₃), 53.2 (CH), 58.5 (C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 127.1 (CH), 128.6 (CH), 129.2 (CH), 135.7 (C), 142.9 (C), 160.2 (CO), 165.6 (CO), 168.14 (CO), 171.8 (CO). **IR:** (film) 1789 cm⁻¹ (β -lactama), 1745 cm⁻¹ (CO ester), 1690 cm⁻¹ (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 678.9943 [M+Na]⁺; calc. para C₂₃H₂₆Br₂N₆NaO₅S: 678.9944.

(2S)-2-(((2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-4-metilpentanamido)propanoato de metilo (47ci)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 5,2mg (0,008 mmoles) del compuesto **47ci** representando un 13% de rendimiento total

basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37c**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

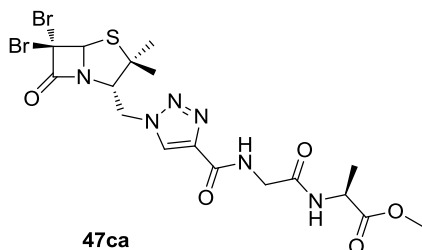
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ 0.95 (m, 6H, Leu CH₃), 1.41 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, Ala CH₃), 1.56 (s, 3H, CH₃), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.68 (m, 2H, CH₂), 1.69 (m, 1H, CH), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.32-4.40 (m, 2 H, CH₂ y CH), 4.59 (m, 1H, CH), 4.66-4.72 (m, 2H, CH₂ y CH), 5.63 (s, 1H, CH), 6.79 (d, $J = 6.8$ HZ, 1H, NH), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, CH). **RMN de ¹³C (CDCl₃, 300MHz)** δ 18.2 (CH₃), 21.9 (CH₃), 22.8 (CH₃), 24.5 (CH₃), 24.6(CH), 33.2 (CH₃), 41.1 (CH₂), 48.0 (CH), 48.4 (CH₂), 51.4 (CH), 52.4 (CH₃), 58.5 (C), 63.7 (C), 67.87(CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 143.1 (C), 159.7 (CO), 165.6 (CO), 171.1 (CO), 173.3 (CO).

IR: (film) 1789 cm⁻¹ (β -lactama), 1745 cm⁻¹ (CO ester), 1660 cm⁻¹ (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 659.0253 [M+Na]⁺; calc. para C₂₁H₃₀Br₂N₆NaO₅S: 659.0257.

(2S)-2-(2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)acetamido)propanoato de metilo (47ca)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 15,6mg (0,026 mmoles) del compuesto **47ca** representando un 42% de rendimiento total

basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37c**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

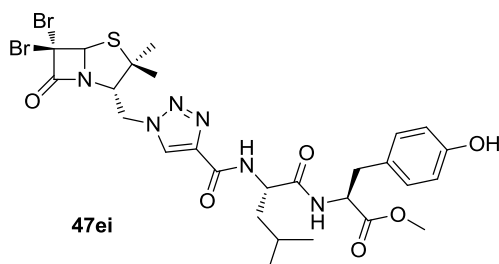
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.43 (d, $J=7$ Hz, 3H, Ala CH_3) 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.17 (m, 2H, CH_2), 4.33-4.80 (m, 2H, CH_2), 4.41 (m, 1H, CH), 5.65 (s, 1H, CH), 6.90 (d, $J=7$ Hz, 1H, NH), 7.85 (m, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 18.2 (CH_3), 24.5 (CH_3), 33.2 (CH_3), 40.9 (CH_2), 42.9 (CH_2), 48.2 (CH_2), 52.5 (CH_3), 58.5(C), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.3 (CH), 153.8 (C), 165.6 (CO), 167.8 (CO), 168.1 (CO), 173.3 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1740 cm^{-1} (CO ester), 1665 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 602.96213 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_6\text{NaO}_5\text{S}$: 602.96313.

(2S)-2-(((2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-4-metilpentanamido)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de metilo (47ei)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 16,1mg (0,022 mmoles) del compuesto **47ei** representando un 30% de

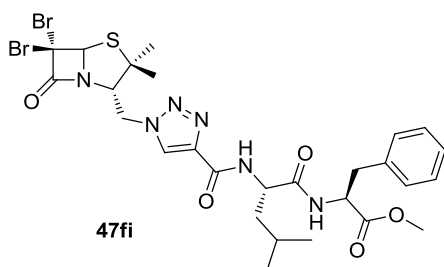
rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37e**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 0.90 (d, J = 6.2 Hz, 3H, Leu CH_3), 0.93 (d, J = 6.2 Hz, 3H, Leu CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.59-1.76 (m, 2H, CH_2), 1.61 (s, 3H, CH_3), 2.97 (dd, J_1 = 14 Hz, J_2 = 6,54 Hz 1H, CH_2), 3,10 (dd, J_1 = 14 Hz, J_2 = 5,4 Hz 1H, CH_2), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.33 (dd, J_1 = 14 Hz, J_2 =10.9 Hz, 1H, CH_2), 4.51 (dd, J_1 = 11 Hz, J_2 =3.4 Hz, 1H, CH), 4.59-4.67 (m, 1H, CH), 4.74-4,86 (m, 2H, CH y CH_2), 5.71 (s, 1H, CH), 6.46 (d, J = 8,4 Hz, 2H arom), 6.76 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 6.84 (d, J = 8,4 Hz, 2H arom), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 21.9 (CH_3), 22.9 (CH_3), 24.7 (CH_3), 33.2 (CH_3), 36.5 (CH_2), 39.9 (CH_2), 48.4 (CH_2), 51.1 (CH), 52.5 (CH), 53.0 (CH) 58.0 (C), 63.6 (C), 68.2 (CH), 78.5 (CH), 115.3 (CH), 126.9 (CH), 130.3 (CH), 142.8 (C), 155.0 (C), 159.8 (CO), 166.7 (CO), 170.8 (CO), 171.9 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1747 cm^{-1} (CO ester), 1670 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 751.05135 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{N}_6\text{NaO}_6\text{S}$: 751.05195.

(2S)-2-((2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-4-metilpentanamida)-3-fenilpropanoato de metilo (**47fi**)



Empleando el **método 1** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 24,3mg (0,034 mmoles) del compuesto **47fi** representando un 49% de

rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37f**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

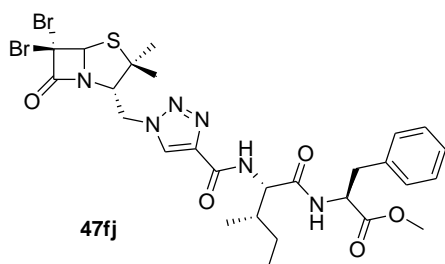
Caracterización: sólido blanquesino amorfo.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 0.91 (d, J = 5.6 Hz, 3H, CH_3), 0.92 (d, J = 5.6 Hz, 3H, CH_3), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 1.59-1.76 (m, 3H, CH y

CH₂), 3.04 (dd, $J_1 = 13,7$ Hz, $J_2 = 6,3$ Hz, 1H, CH₂), 3.14 (dd, $J_1 = 13,7$ Hz, $J_2 = 5,7$ Hz, 1H, CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.37 (dd, $J_1 = 13,3$ Hz, $J_2 = 10$ Hz, 1H, CH₂), 4.49 (dd, $J_1 = 10$ Hz, $J_2 = 3,9$, 1H, CH), 4.60 (m, 1H, CH), 4.70 (dd, $J_1 = 13,3$ Hz, $J_2 = 3,9$, 1H, CH₂), 4.87 (m, 1H, CH), 5.66 (s, 1H, CH), 6.75 (d, $J = 8$ Hz, 1H, NH), 7.04-7.15 (m, 5H arom), 7.38 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, CH). **RMN de ¹³C (CDCl₃, 300MHz)** δ 21.9 (CH₃), 22.9 (CH₃), 24.5 (CH), 24.6 (CH₃), 33.3 (CH₃), 37.9 (CH₂), 40.7 (CH₂), 48.4 (CH₂), 51.3 (CH), 52.3 (CH), 53.2 (CH), 58.5 (C), 63.7 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 127.0 (CH), 128.5 (CH), 129.2 (CH), 135.6 (C), 143.0 (C), 159.7 (CO), 165.6 (CO), 171.0 (CO), 171.8 (CO). **IR:** (film) 1797 cm⁻¹ (β-lactama), 1744 cm⁻¹ (CO ester), 1670 cm⁻¹ (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 735.05518 [M+Na]⁺; calc. para C₂₇H₃₄Br₂N₆NaO₅S: 735.05704.

(2S)-2-(((2S,3S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-metilpentanamida)-3-fenilpropanoato de metilo (47fj)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 28,4 mg (0,039 mmoles) del compuesto **47fj** representando un 40% de rendimiento total

basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37f**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite amarillo claro.

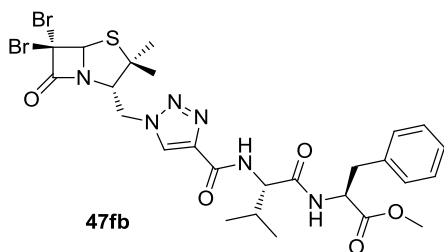
RMN de ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ 0.86 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, lle CH₃), 0.93 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, lle CH₃), 1.13 (m, 1H, lle CH₂), 1.48 (m, 1H, lle CH₂), 1.55 (s, 3H, CH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃), 1.96 (m, 1H, lle CH), 3.05 (dd, $J_1 = 13,8$ Hz, $J_2 = 6,3$, 1H, Phe CH₂), 3.13 (dd, $J_1 = 13,8$ Hz, $J_2 = 5,9$, 1H, Phe CH₂), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 4.39 (m, 1H, CH₂), 4.51 (m, 2H, CH), 4.73 (m, 1H, CH₂), 4.90 (m, 1H, CH), 5.66 (s, 1H, CH), 6.72 (d, $J = 8$ Hz, 1H, NH), 7.06-7.21 (m, H arom.), 7.57 (d, 1H, NH,

$J = 9.2$ Hz), 8.35 (m, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 11.1 (CH_3), 15.5 (CH_3), 24.5 (CH_3), 24.8 (CH_2), 33.1 (CH_3), 37.2 (CH), 38.0 (CH_2), 48.3 (CH_2), 52.4 (OCH_3), 53.1 (CH), 57.4 (CH), 58.2 (C), 63.7 (C), 67.7 (CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 127.0 (C), 128.5 (CH), 129.2 (CH), 135.6 (CH), 143.2 (C), 159.6 (CO), 165.5 (CO), 170.3 (CO), 171.9 (CO).

IR: (film) 1795 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1643 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 751.02874 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{KN}_6\text{O}_5\text{S}$: 751.03097.

(2S)-2-(((2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida)-3-metilbutanamida)-3-fenilpropanoato de metilo (47fb)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 26,8 mg (0,037 mmoles) del compuesto **47fb** representando un 38% de

rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37f**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

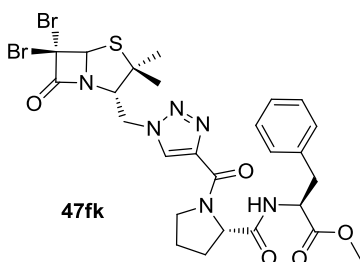
Caracterización: sólido blanco amorfo.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 0.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, Val CH_3), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 2.19 (m, 1H, Val CH), 3.05 (dd, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 1H, Phe CH_2), 3.12 (dd, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 6$ Hz, 1H, Phe CH_2), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 4.37 (dd, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, 1H, CH_2), 4.52 (m, 1H, CH), 4.53 (m, 1H, CH), 4.71 (dd, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 4.2$, 1H, CH_2), 4.91 (m, 1H, Val CH), 5.66 (s, 1H, CH), 6.79 (d, 1H, NH, $J = 8$ Hz), 7.07-7.18 (m, 5H, ArH), 7.60 (d, $J = 9$ Hz, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 18.0 (CH_3), 19.2 (CH_3), 24.4 (CH_3), 31.1 (CH), 33.2 (CH_3), 38.0 (CH_2), 48.4 (CH_2), 52.3 (OCH_3), 53.1 (CH), 58.1 (CH), 58.6 (C), 63.7 (C), 67.7 (CH), 78.4 (CH), 126.3 (CH), 127.1 (CH), 128.5 (CH), 129.2 (CH), 135.6 (C), 143.2 (C), 159.7 (CO), 165.6 (CO), 170.3 (CO), 171.8 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1737 cm^{-1} (CO ester), 1645 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 721.04279 $[M+Na]^+$; calc. para $C_{26}H_{32}Br_2N_6NaO_5S$: 721.04139.

(2S)-2-(((2S)-1-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazole-4-carbonil)pyrrolidina-2-carboxamida)-3-fenilpropanoato de metilo (47fk)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 21,3 mg (0,030 mmoles) del compuesto **47fk** representando un 30% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37f**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 1.9 (m, 2H, CH_2), 2.32 (m, 2H, CH_2), 2.91-3.20 (m, 2H, Phe CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (m, 2H, CH_2), 4.07 (m, 2H, CH_2), 4.40 (m, 1H, CH) 4.44 (m, 1H, CH_2), 4.67 (m, 1H, CH_2), 4.76 (m, 1H, CH), 4.85 (m, 1H, CH), 5.64 (s, 1H, CH), 6.90 (m, 1H, NH), 7.06-7.22 (m, 5H, ArH), 7.45 (t, $J=8$ Hz, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, CH).

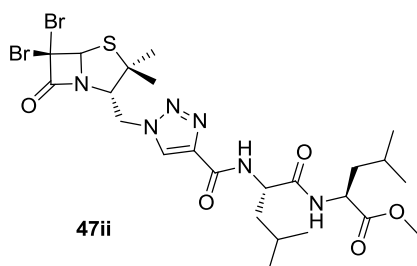
RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 300MHz) δ 24.2 (CH_3), 24.4 (CH_2), 25.1 (CH_2), 25.5 (CH_2), 33.2 (CH_3), 37.9 (CH_2), 48.1 (CH_2), 49.3 (CH_2), 52.2 (OCH_3), 53.1 (CH), 58.5 (C), 60.8 (CH), 63.6 (C), 67.9 (CH), 78.4 (CH), 114.4 (C), 126.8 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 128.7 (CH), 129.1 (CH), 135.9 (C), 144.5 (C), 149.9 (C), 165.5 (CO), 168.4 (CO), 170.5 (CO), 171.9 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1681 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 734.99935 $[M+K]^+$; calc. para: $C_{26}H_{30}Br_2KN_6O_5S$: 734.99967.

(2S)-2-(((2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamida)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoato de metilo (47ii)

Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 16,72



47ii

mg (0,024 mmoles) del compuesto **47ii** representando un 25% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37i**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

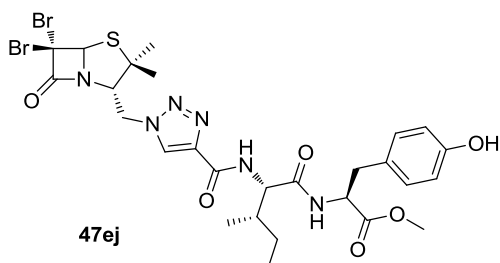
Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 0.82-0.97 (m, 12 H, Leu CH_3), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.50-1.80 (m, 4H, Leu CH_2), 1.63-1.81 (m, 2H, 2CH), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 4.35 (dd, $J_1=13,7$ Hz, $J_2=10$ Hz 1H, CH_2), 4.49 (dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=3,9$ Hz, 1H, CH), 4.60 (m, 1H, CH), 4.68-4.72 (m, 2H, CH y CH_2), 5.65 (s, 1H, CH), 6.80 (d, $J=8$ Hz, 1H, NH), 7.49 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, NH), 8.32 (m, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 21.9 (CH_3), 22.0 (CH_3), 22.6 (CH_3), 22.8 (CH_3), 24.5 (CH_3), 24.7 (CH), 24.8 (CH), 33.2 (CH_3), 41.1 (CH_2), 41.4 (CH_2), 48.4 (CH_2), 50.7 (CH), 51.3 (CH), 52.4 (OCH_3), 58.5 (C), 63.7 (C), 67.8 (CH), 78.4 (CH), 126.2 (CH), 143.1 (C), 159.7 (CO), 165.6 (CO), 171.3 (CO), 173.3 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1651 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 679.08736 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$: 679.09074.

(2S)-2-(((2S,3S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamida)-3-metilpentanamida)-3-(4-hidroxifenil)propanoato de metilo (**47ej**)



47ej

Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 21,2 mg (0,029 mmoles) del compuesto **47ej** representando un 29% de rendimiento total basado en la carga inicial

de la resina de Wang (7 pasos de reacción desde **37e**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

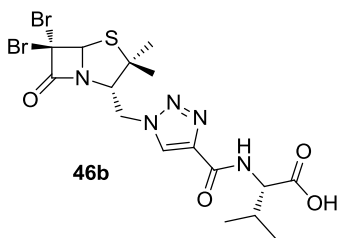
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 0.92 (d, 3H, Leu CH_3 , $J = 6.2$ Hz), 0.93 (d, $J = 6.2$, 3H, Leu CH_3), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.59-1.76 (m, 2H, CH_2), 1.61 (s, 3H, CH_3), 2.91-3.16 (m, 2H, CH_2), 3.76 (s, 3H, CH_3), 4.33 (m, 1H, CH_2), 4.51 (m, 1H, CH), 4.62 (m, 1H, CH), 4.80 (m, 1H, CH), 5.71 (s, 1H, CH), 6.44-6.85 (m, H arom), 6.76 (d, $J = 8$ Hz, 1H, NH), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, CH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) δ 21.9 (CH_3), 22.9 (CH_3), 24.7 (CH_3), 33.2 (CH_3), 36.5 (CH_2), 39.9 (CH_2), 48.4 (CH_2), 51.1 (CH), 52.5 (CH), 53.0 (CH) 58.0 (C), 63.6 (C), 68.2 (CH), 78.5 (CH), 115.3 (CH), 126.9 (CH), 130.3 (CH), 142.8 (C), 155.0 (C), 159.8 (CO), 166.7 (CO), 170.8 (CO), 171.9 (CO).

IR: (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1745 cm^{-1} (CO ester), 1645 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 729.06992 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$: 729.0700.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamida)-3-metilbutanoato de metilo (46b)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 20.3 mg (0.037 mmoles) del compuesto **46b** representando un 38% de rendimiento total basado en la carga inicial de la

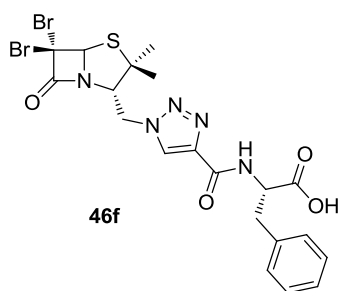
resina de Wang (4 pasos de reacción desde **37b**), previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.05 (m, 3H, CH_3), 1.06 (m, 3H, CH_3), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 2.34 (m, 1H, CH), 4.37-4.50 (m, 2H, CH y CH_2), 4.66-4.71 (m, 2H y CH_2), 5.68 (s, 1H, CH), 7.67 (d, 1H, NH, $J = 8.4$ Hz) 8.42 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 17.9 (CH_3), 19.2 (CH_3), 24.5 (CH_3), 30.9 (CH), 33.3 (CH_3), 48.3 (CH_2), 57.4 (C), 58.6 (CH), 63.7 (C), 67.9 (CH), 78.3 (CH), 126.8 (CH), 142.8(C), 159.9 (CO), 160.3 (CO), 165.7 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1730 cm^{-1} (CO_2H), 1665 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 559.95732 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}$: 559.9579.

(2S)-2-(1-(((2S)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0] heptan-2-il)metil)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamida)-3-fenilpropanoato de metilo (46f)



Empleando el **método 2** de cicloadición 1,3 dipolar y en los pasos subsiguientes aplicando la metodología general **5.5.2.e.**, se obtuvieron 21,4 mg (0,036 mmoles) del compuesto **46f** representando un 20% de rendimiento total basado en la carga inicial de la resina de Wang (4 pasos de reacción desde **37f**),

previa purificación por cromatografía en columna utilizando como solvente de elusión Hexano-AcOEt con polaridad creciente.

Caracterización: aceite incoloro.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ 1.53 (s, 3H, CH_3), 1.56 (s, 3H, CH_3), 3.26 (m, 2H, CH_2), 4.35 (m, 1H, CH_2), 4.47 (m, 1H, CH), 4.63 (1m, 1H, CH), 5.00 (m, 1H, CH), 5.63 (s, 1H, CH), 7.16-7.29 (m, 5H, ArH), 7.44 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, CH). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz)** δ 24.4 (CH_3), 33.2 (CH_3), 37.4 (CH_2), 48.3 (CH_2), 53.4 (CH), 58.6 (C), 63.7 (C), 67.8 (CH), 78.3 (CH), 127.2 (CH), 128.7 (CH), 129.3 (CH), 135.8 (C), 142.6 (C), 160.1 (CO), 165.7 (CO), 173.9 (CO). **IR:** (film) 1789 cm^{-1} (β -lactama), 1740 cm^{-1} (CO_2H), 1670 cm^{-1} (CO amida).

HRMS-ESI (m/z): 607.9573 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}$: 607.9579.

RESUMEN Y CONCLUSIONES





6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Como ya se mencionó a lo largo de este trabajo, la química medicinal se encarga de estudiar y aplicar todos aquellos conceptos de la química orgánica tradicional al desarrollo de sustancias que pudiesen contribuir de una u otra manera a las ciencias farmacéuticas con respecto a los efectos biológicos que las diversas sustancias químicas pudiesen tener sobre el organismo humano. Así, la química medicinal es la ciencia que impulsa la investigación y el desarrollo de nuevos compuestos químicos que sean adecuados para el uso terapéutico.

Los compuestos obtenidos en este trabajo tienen en común la presencia de un anillo β -lactámico. Esta es una estructura heterocíclica de gran valor en química orgánica y medicinal, considerada además como una "estructura privilegiada", dada su ocurrencia en compuestos con un amplio rango de actividades biológicas. Mientras es bien conocida su importancia en terapias antibacterianas, tanto en forma de antibióticos como de inhibidores enzimáticos, la comercialización de compuestos β -lactámicos que inhiben la absorción de colesterol ha dado un nuevo impulso a la investigación de este tipo de estructuras. También se han encontrado estructuras β -lactámicas con actividad anticancerígena y neuroprotectora, así como inhibidores del antígeno prostático específico, de trombina y triptasa, de la proteasa del citomegalovirus humano y de la cisteína proteasa, entre otras.

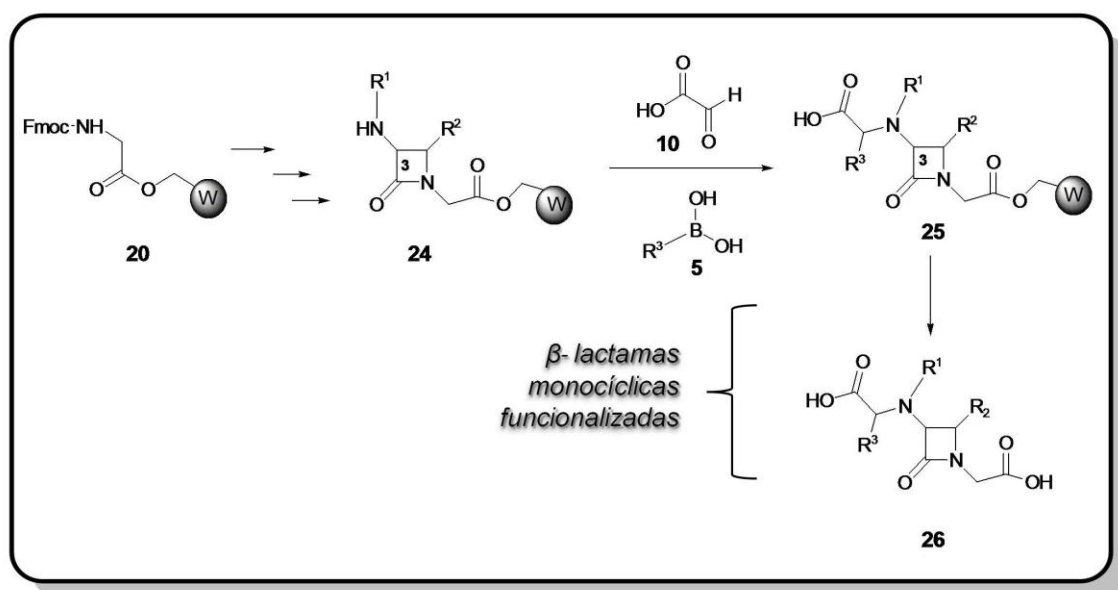
En este marco, este trabajo de tesis tuvo como objetivo la síntesis por técnicas de química en fase sólida de diferentes derivados β -lactámicos con el fin de generar bibliotecas de compuestos potencialmente bioactivos.

La síntesis en fase sólida es una herramienta de gran utilidad para la obtención de compuestos orgánicos con alta eficiencia y para la generación de diversidad molecular en general. El objetivo primordial es acelerar el proceso de síntesis ya que, al estar el producto final en una fase diferente al resto de los componentes, se facilita la etapa de aislamiento, que es la más laboriosa y lenta de dicho proceso. Además presenta otros beneficios adicionales como la

posibilidad de trabajar con solventes de alto punto de ebullición, de eliminar de etapas de purificación y, en definitiva, de disminuir el tiempo de realización de una secuencia sintética. Adicionalmente, la separación espacial entre los sustratos unidos al polímero es una ventaja fundamental en reacciones de acoplamiento cruzado o ciclaciones intramoleculares, ya que se evitan productos de homoacoplamiento y dimerizaciones indeseadas.

Presentamos aquí los resultados de dos estudios diferentes: la funcionalización de monobactamas por introducción de subestructuras α -aminoacídicas mediante reacción de Petasis y la diversificación en el núcleo penam de penicilinas mediante hibridación molecular.

En el primer caso, se trata del proceso en fase sólida dirigido a la incorporación de una subunidad α -aminoacídica en la posición 3 del anillo β -lactámico. Para ello se desarrolló la síntesis de diferentes 3-amino- β -lactamas unidas a soporte sólido (**24**, Esquema 30). Estos compuestos fueron los sustratos utilizados para la aplicación de reacción de multicomponentes de Petasis y obtener con buenos rendimientos, una variada biblioteca de β -lactamas monocíclicas que poseen la funcionalidad aril o vinil glicina en posición 3 (**26**). Los compuestos sintetizados están siendo evaluados contra distintos objetivos biológicos (actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, etc).



La segunda parte del trabajo estuvo dirigido a la aplicación de los principios de la hibridación molecular mediante conjugación de una penicilina y una porción peptídica, a través de un grupo triazol, dando origen a una biblioteca de compuestos híbridos (**Figura 20**) que presentan varios puntos de diversidad.

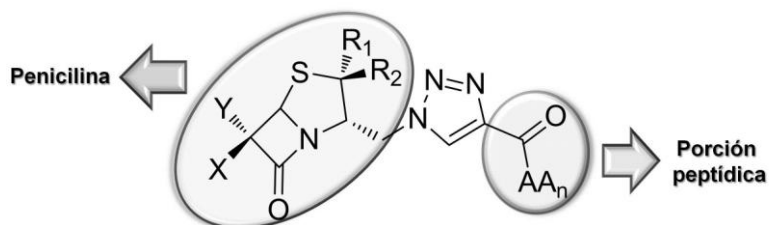
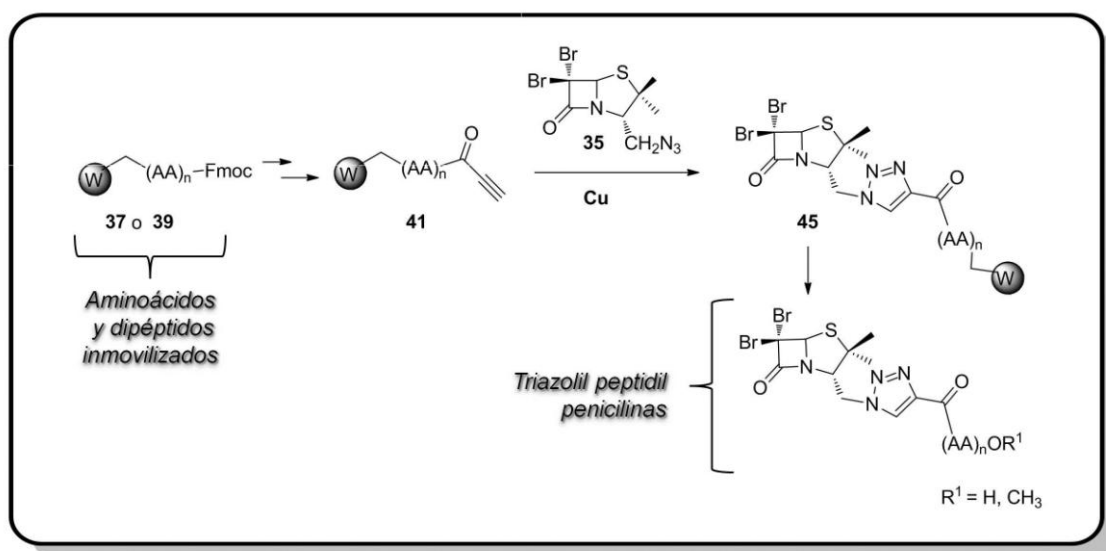


Figura 20

Para la síntesis de esta biblioteca se tomaron diferentes aminoácidos o dipéptidos unidos a resina de Wang (**37** o **39**, **Esquema 31**) que, luego de eliminar el protector del grupo amino, se acoplaron con el ácido propargílico para obtener los *N*-propiolilaminoácidos(peptidos) inmovilizados (**41**). Por otro lado se sintetizó la azidometilpenicilina **35** en tres pasos tomando como material de partida el ácido 6,6-dibromopenicilánico. Finalmente la conjugación entre las dos porciones se llevó a cabo mediante la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre.



Esquema 31

Esta reacción demostró ser muy versátil y totalmente regioselectiva. Además, en la mayoría de los casos, los triazoles se obtuvieron con buenos rendimientos totales para los pasos de reacción involucrados. Los resultados preliminares de actividad anticancerígena de estos compuestos demostraron su potencial importancia biológica.

Como conclusiones generales de este trabajo podemos mencionar:

- ④ El desarrollo una síntesis original de β -lactamas monocíclicas que incorporan una subunidad α -aminoacídica en la posición 3 del anillo β -lactámico, aplicando la reacción de multicomponentes de Petasis en fase sólida.
- ④ La síntesis de una biblioteca de β -lactamas monocíclicas altamente funcionalizadas, las cuales se lograron obtener con buenos rendimientos.
- ④ La validación de la síntesis en fase sólida, que demostró ser mucho más conveniente y versátil que la química en solución para la obtención de este tipo de compuestos.
- ④ El desarrollo y optimización de una metodología versátil y eficiente para la síntesis en fase sólida de triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas, mediante la cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre.
- ④ El estudio de la cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre, que demostró que la misma tiene un amplio alcance y una excelente regioselectividad.

- ④ La generación de una biblioteca de variadas triazolil peptidil penicilinas con buenos rendimientos totales para los pasos de reacción involucrados.

- ④ Evaluación de actividad antibacteriana y anticancerígena de varios componentes de la biblioteca generada.

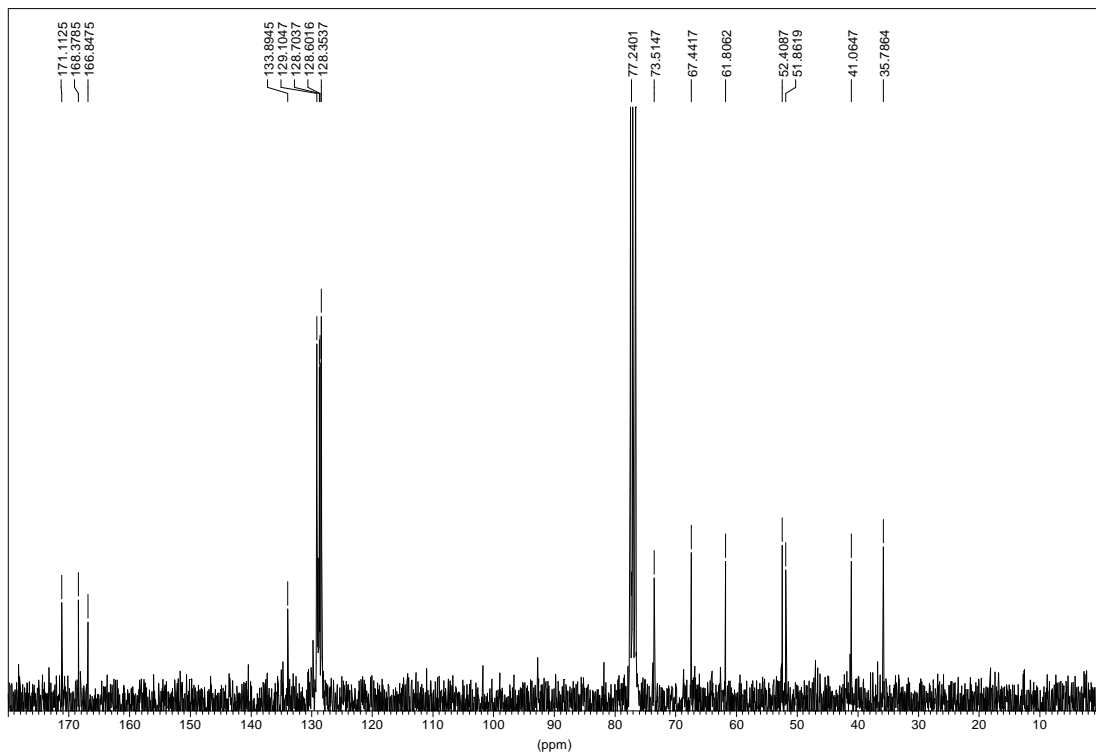
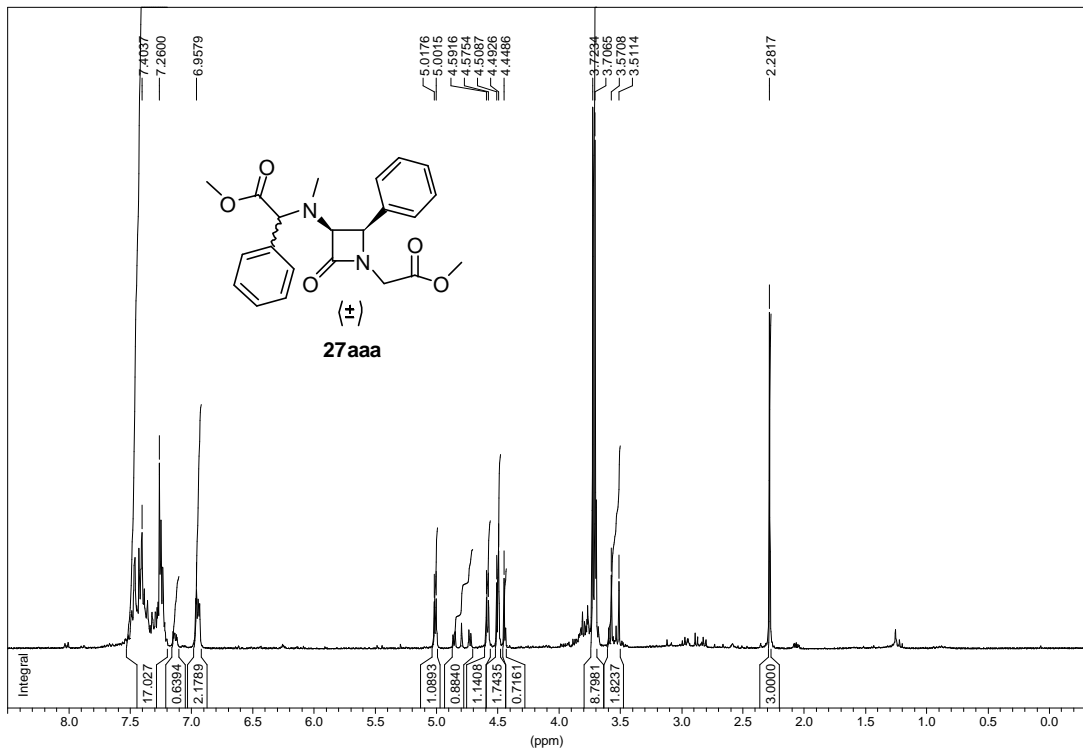
- ④ La identificación de estructuras con potente y selectiva actividad antiproliferativa y obtención de información preliminar sobre la relación estructura-actividad de las moléculas sintetizadas, lo que abre la posibilidad de futuros estudios para completar el conocimiento sobre la potencialidad anticancerígena de estos derivados.

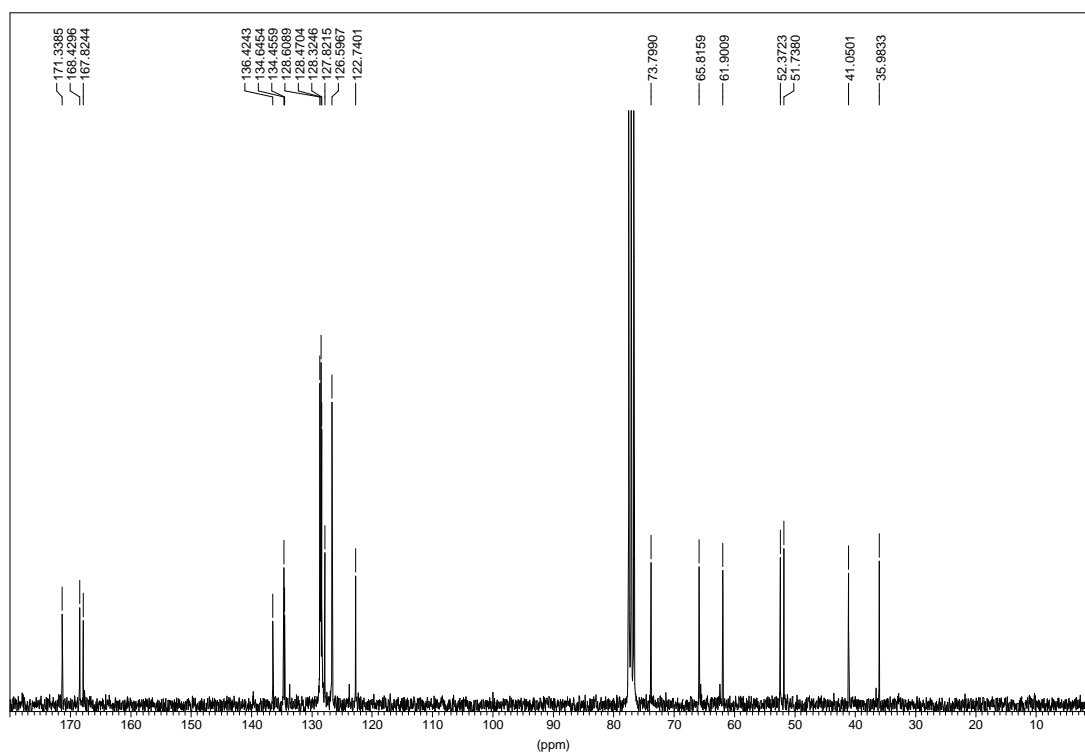
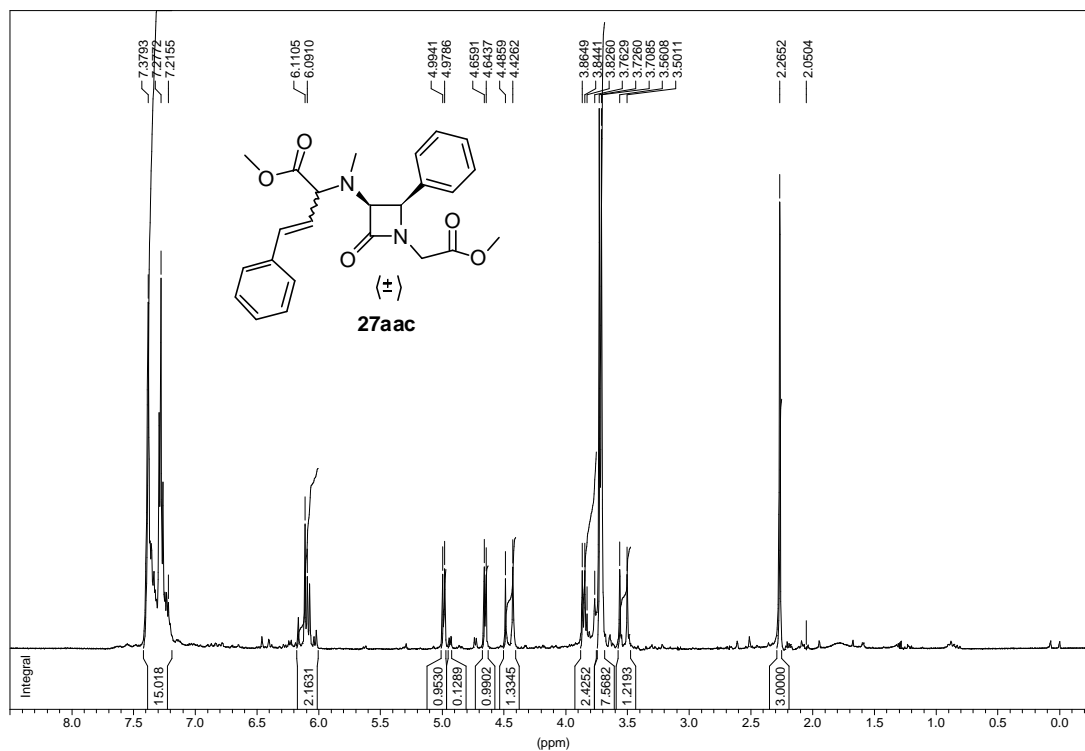
ESPECTROS **S**ELECCIONADOS

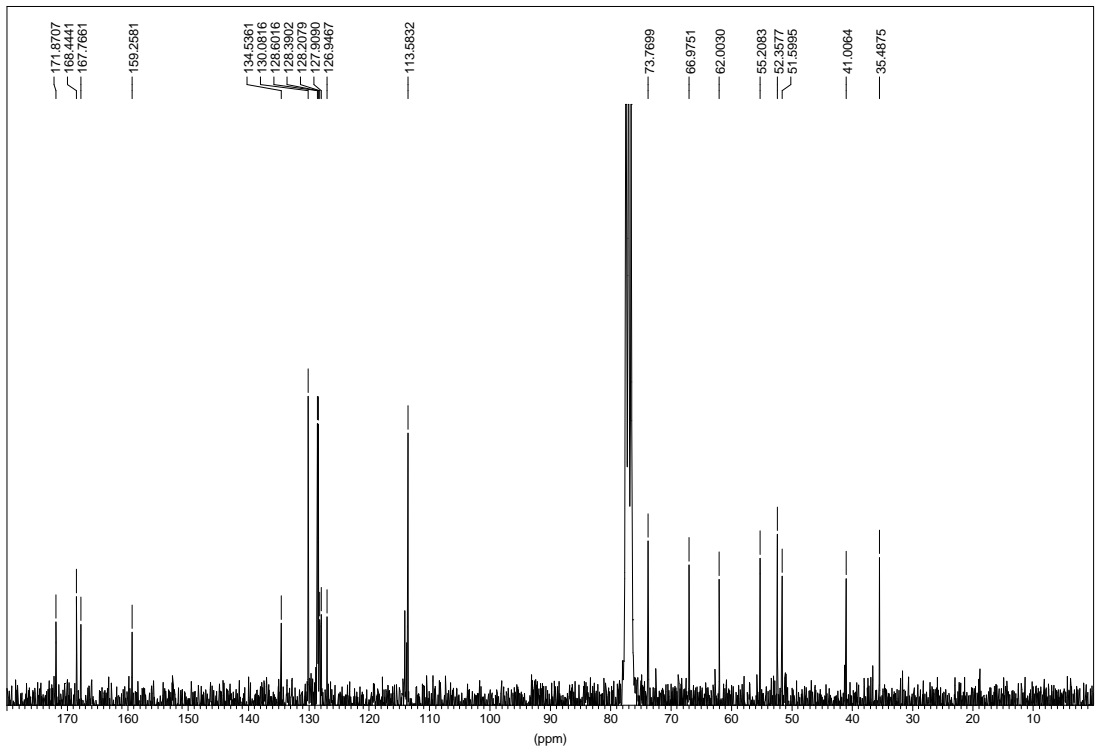
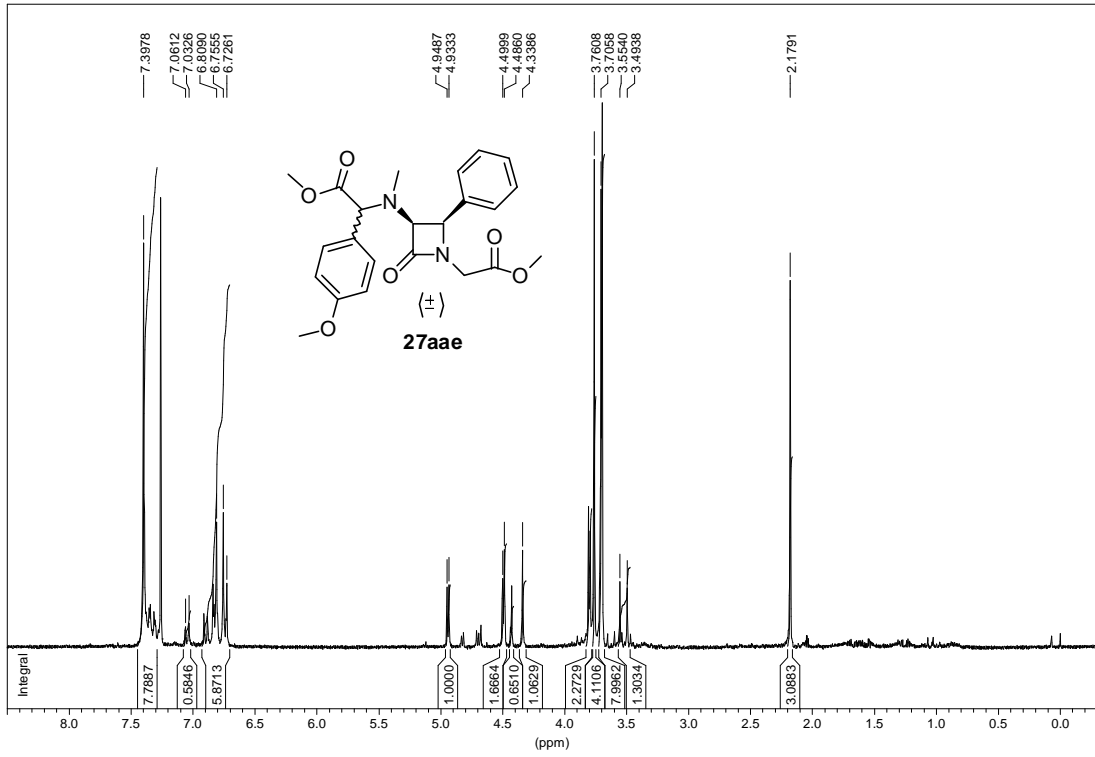


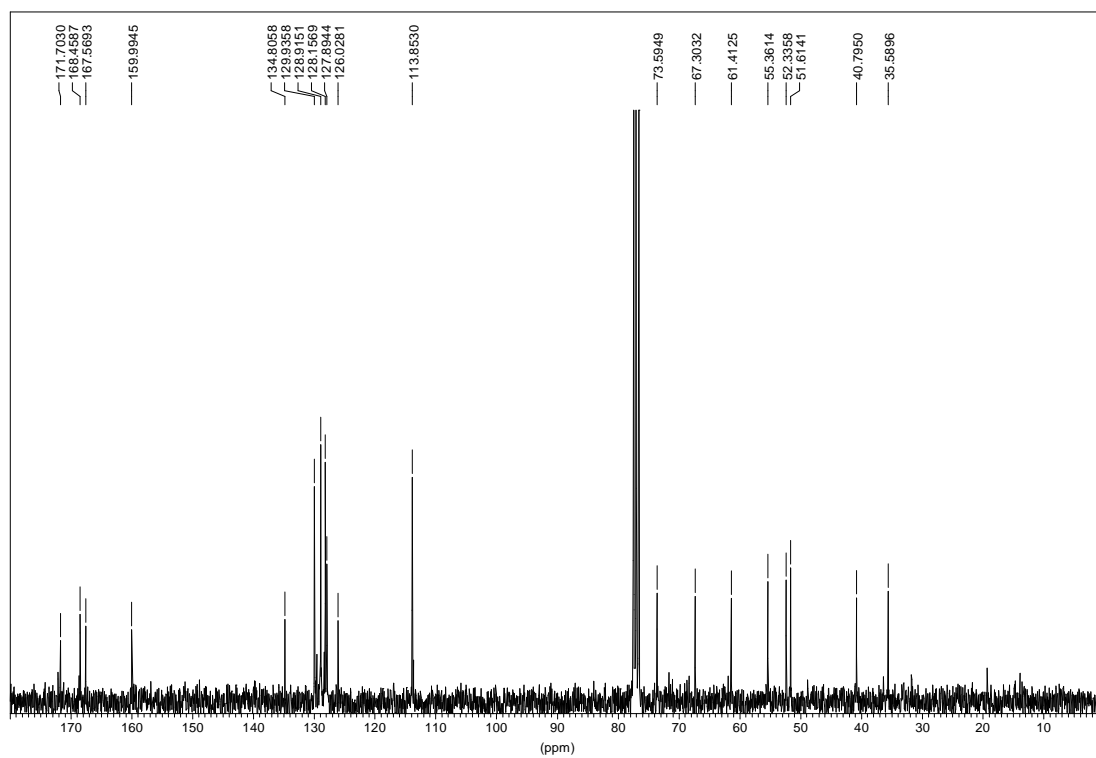
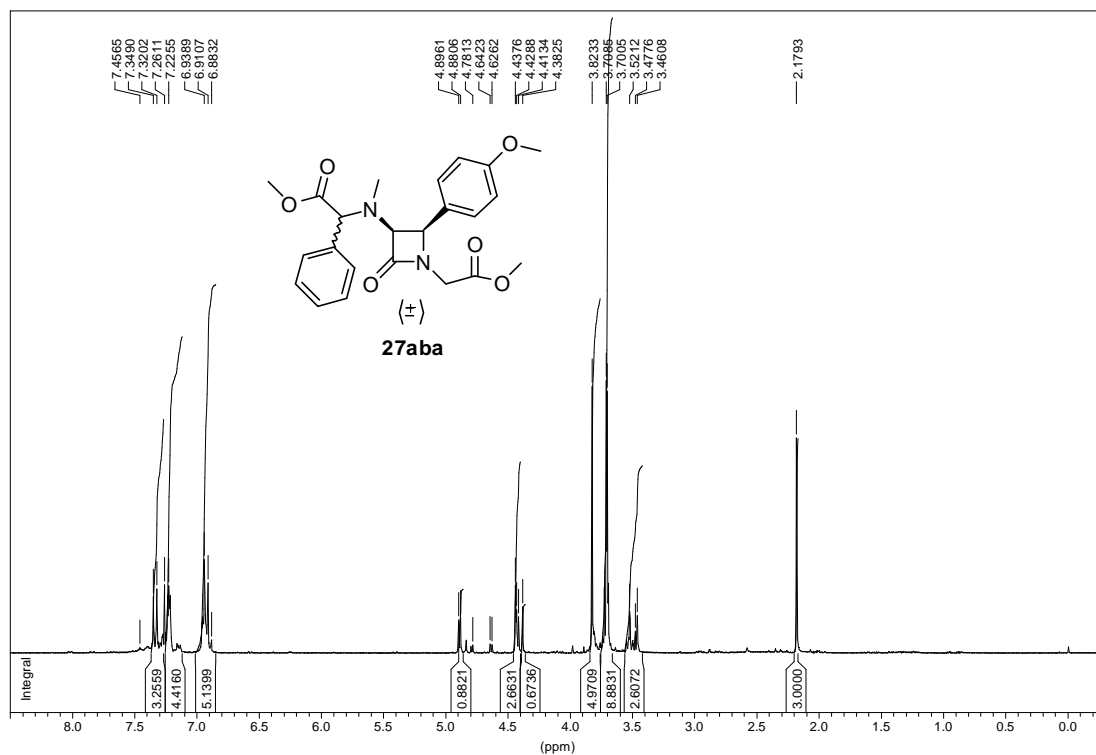


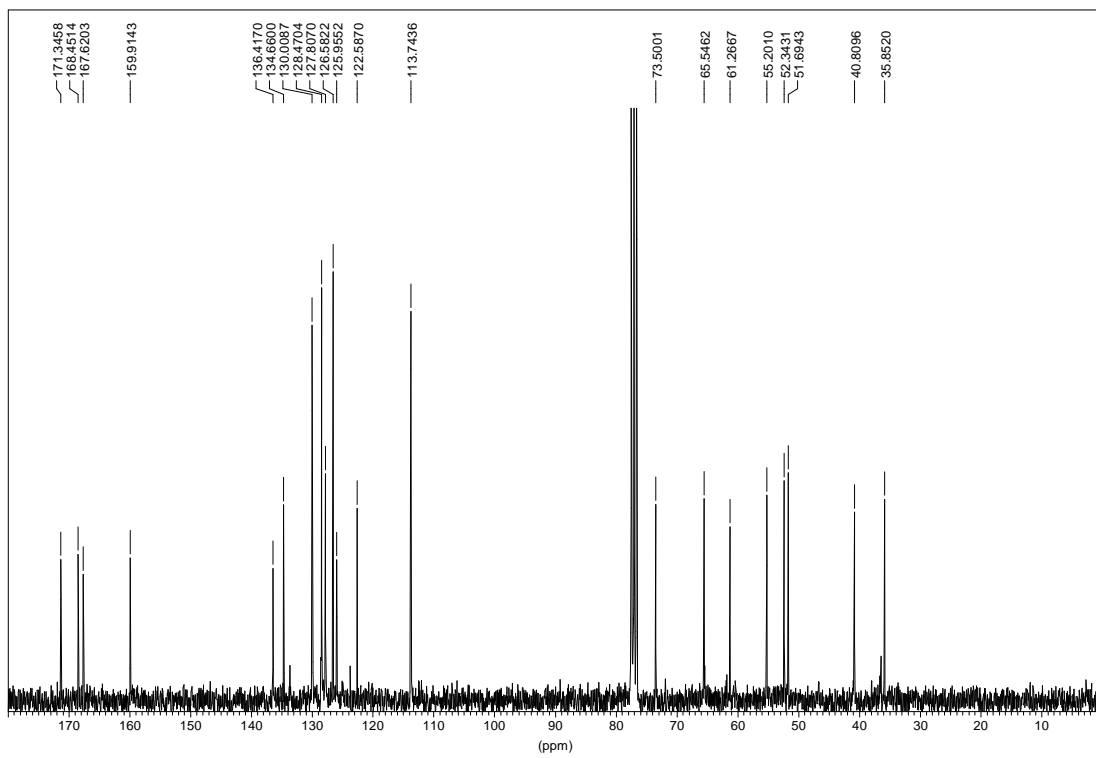
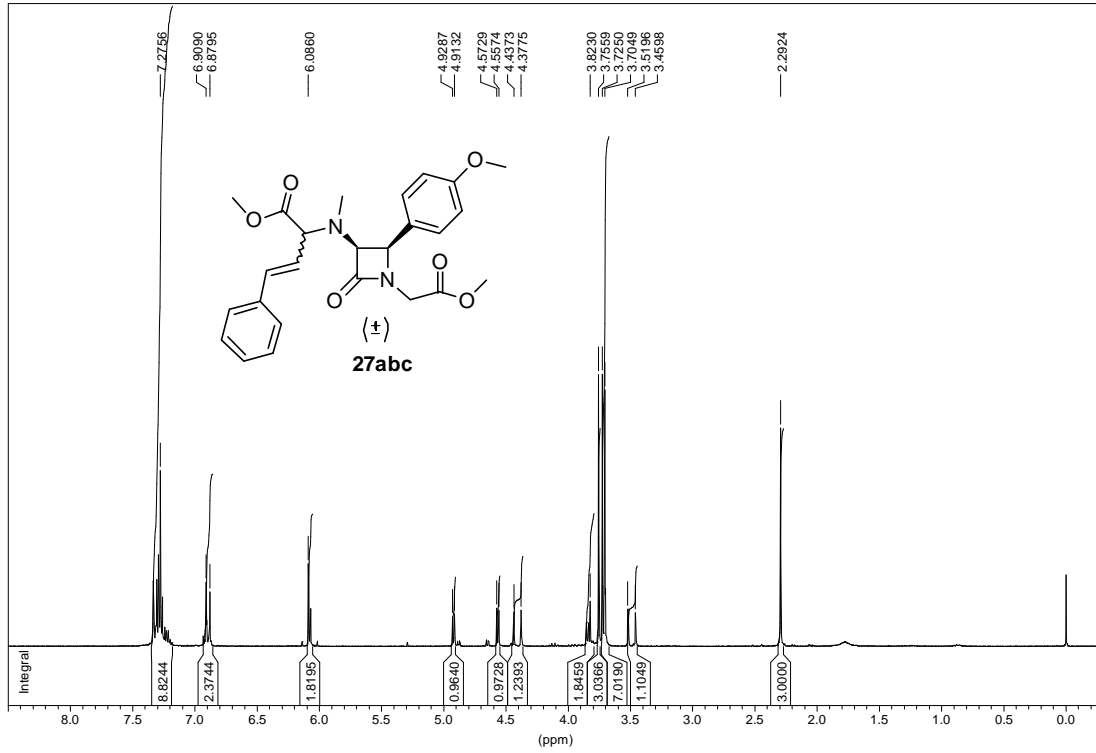
7. ESPECTROS SELECCIONADOS

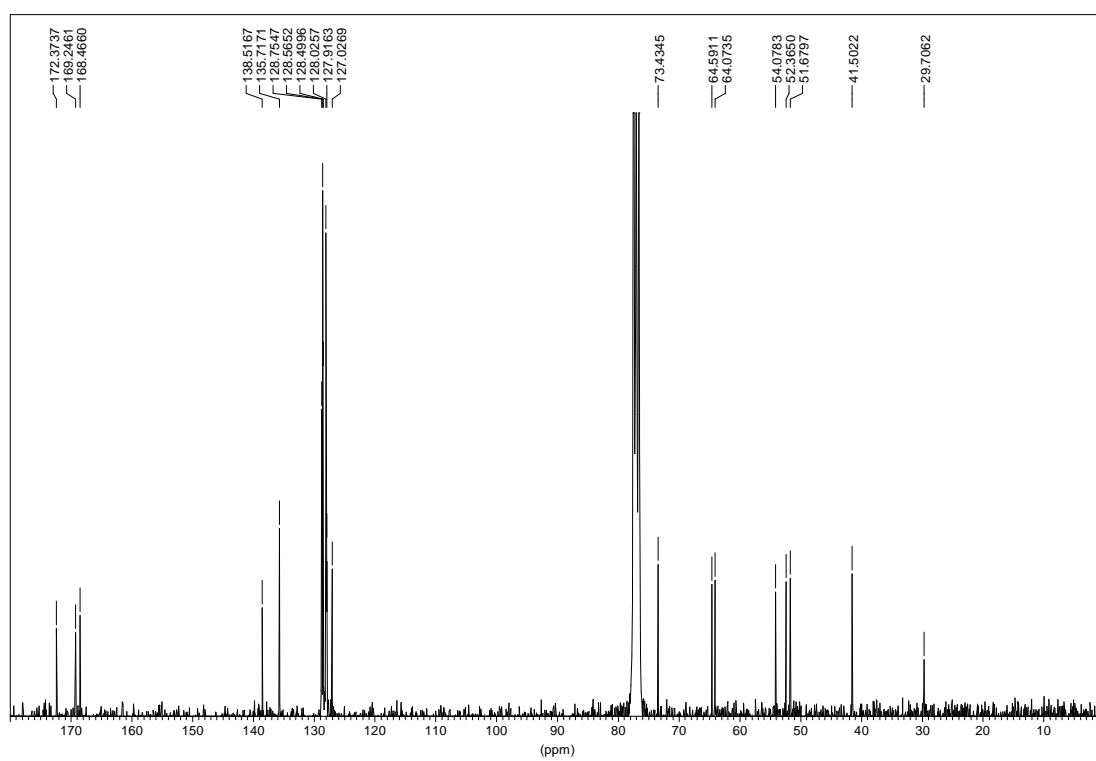
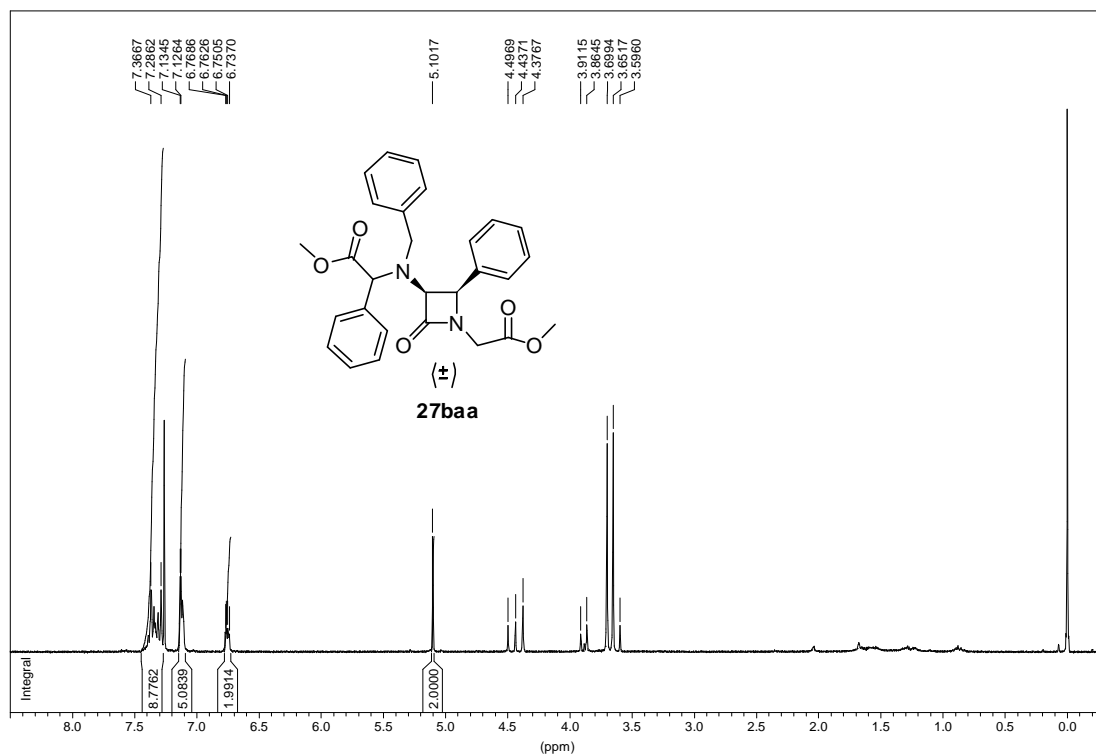


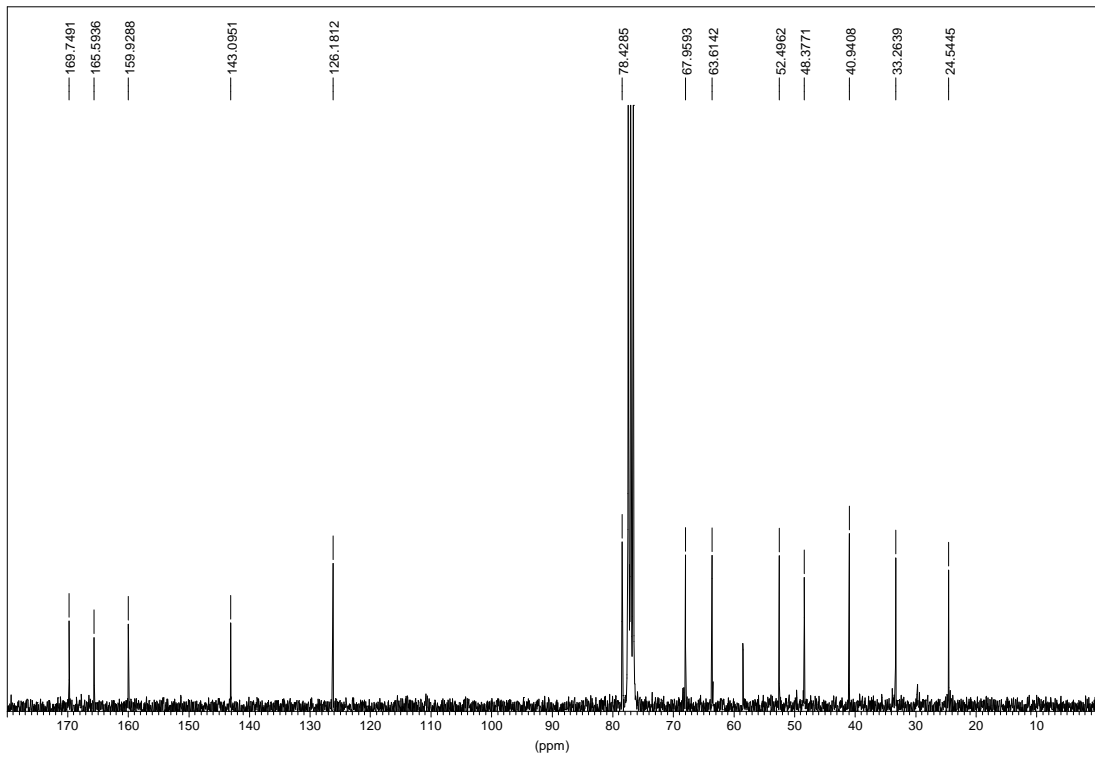
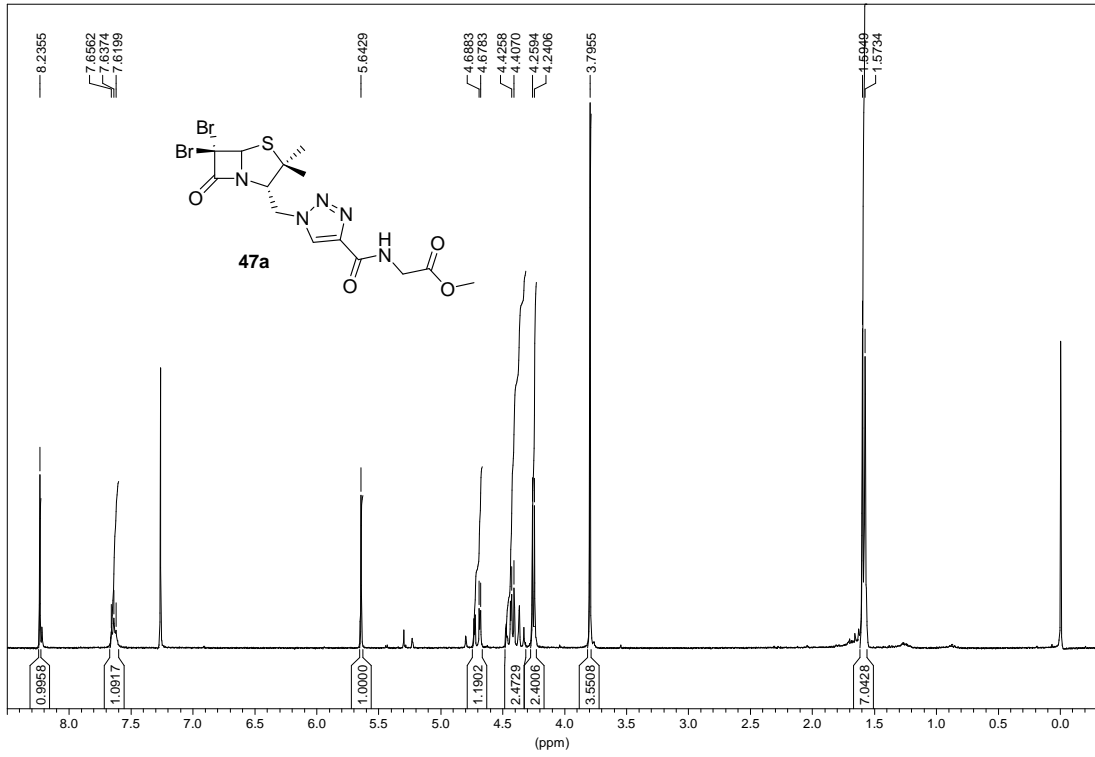


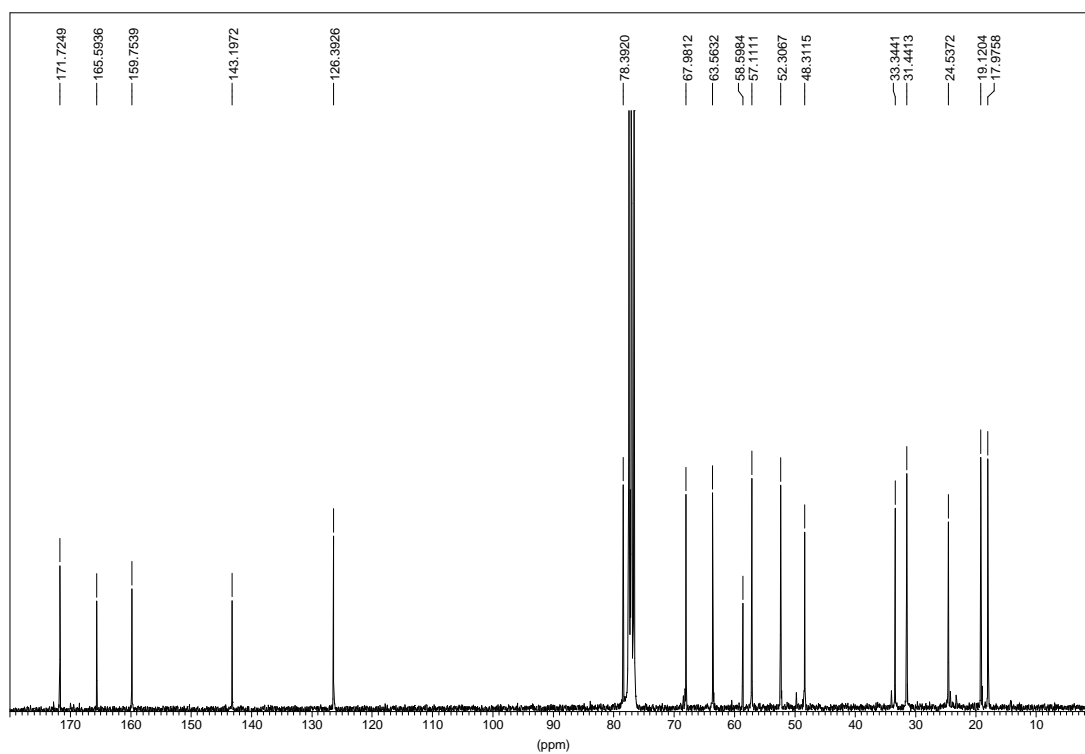
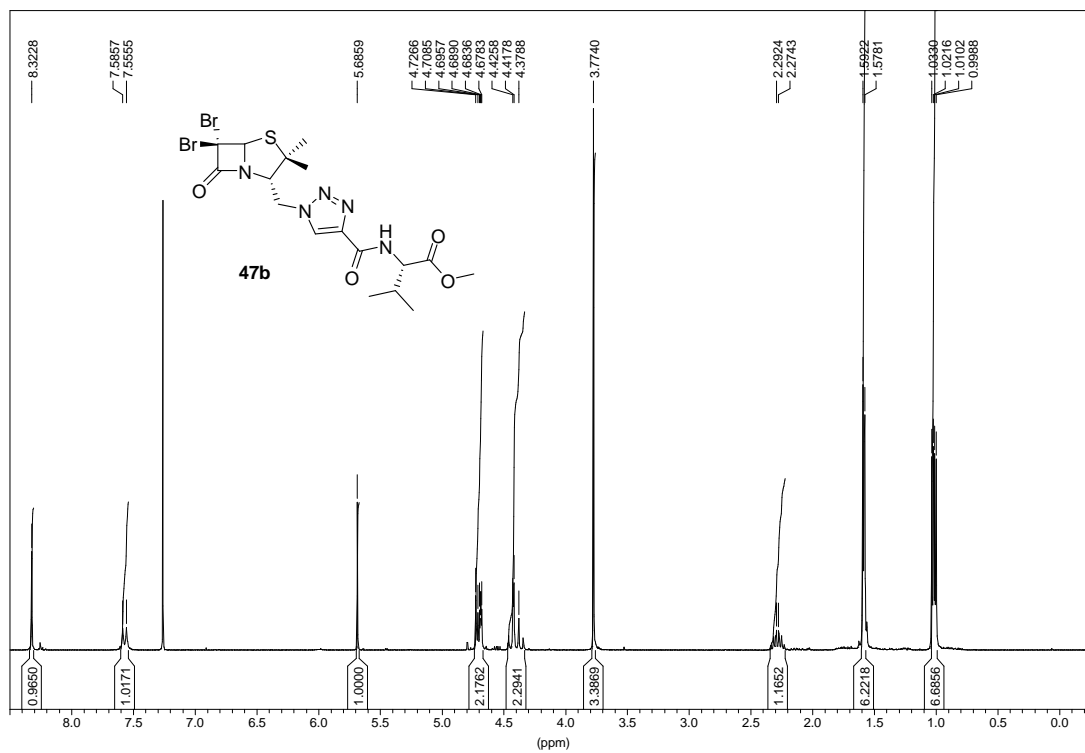


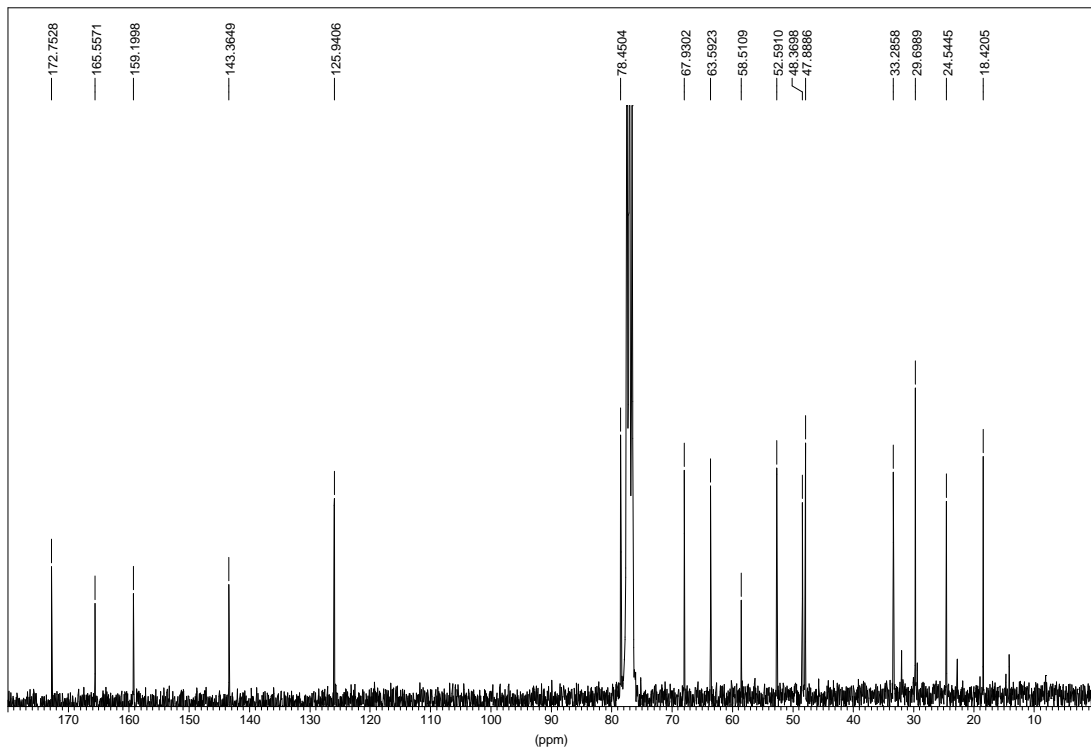
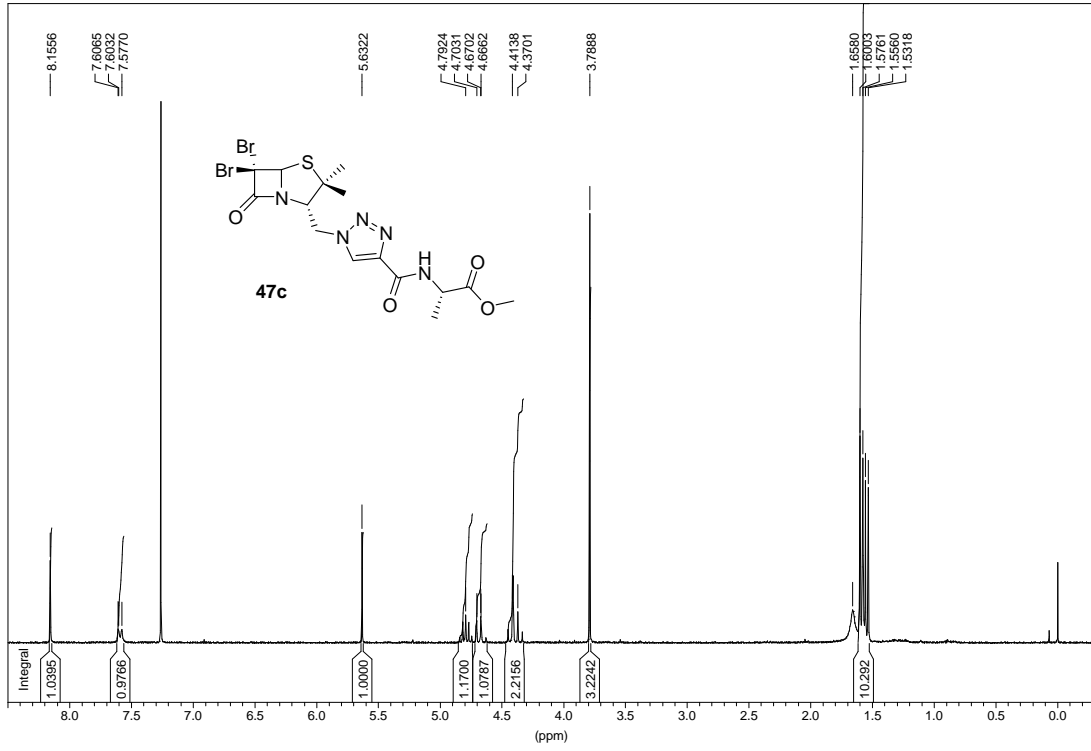


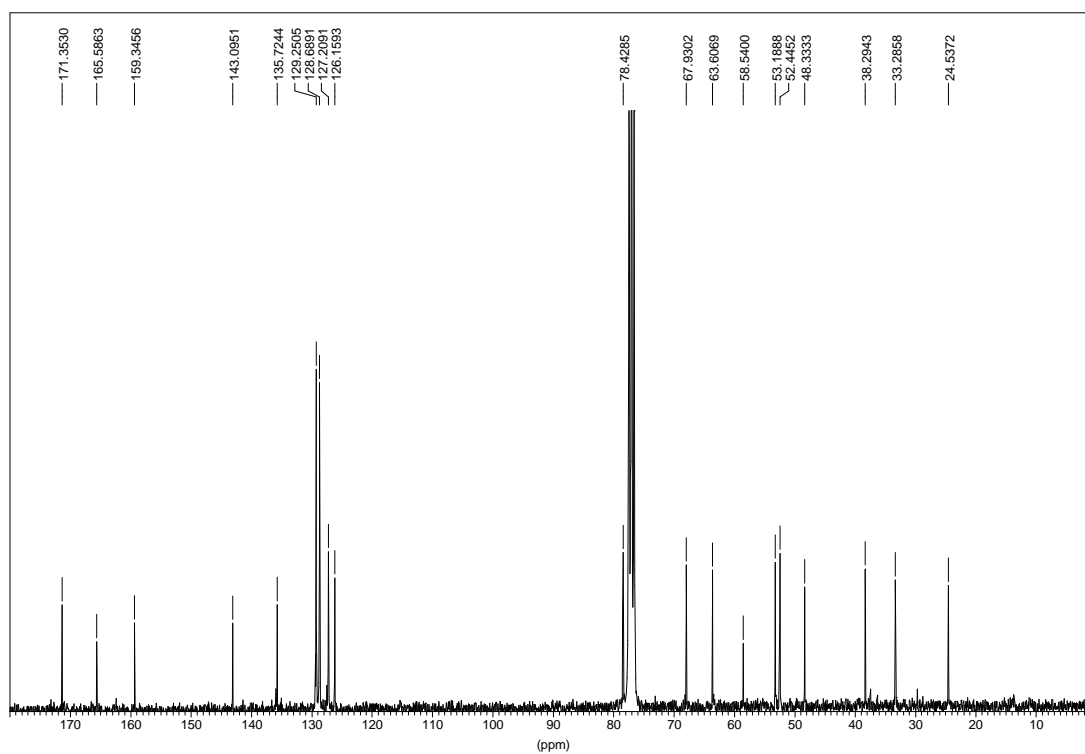
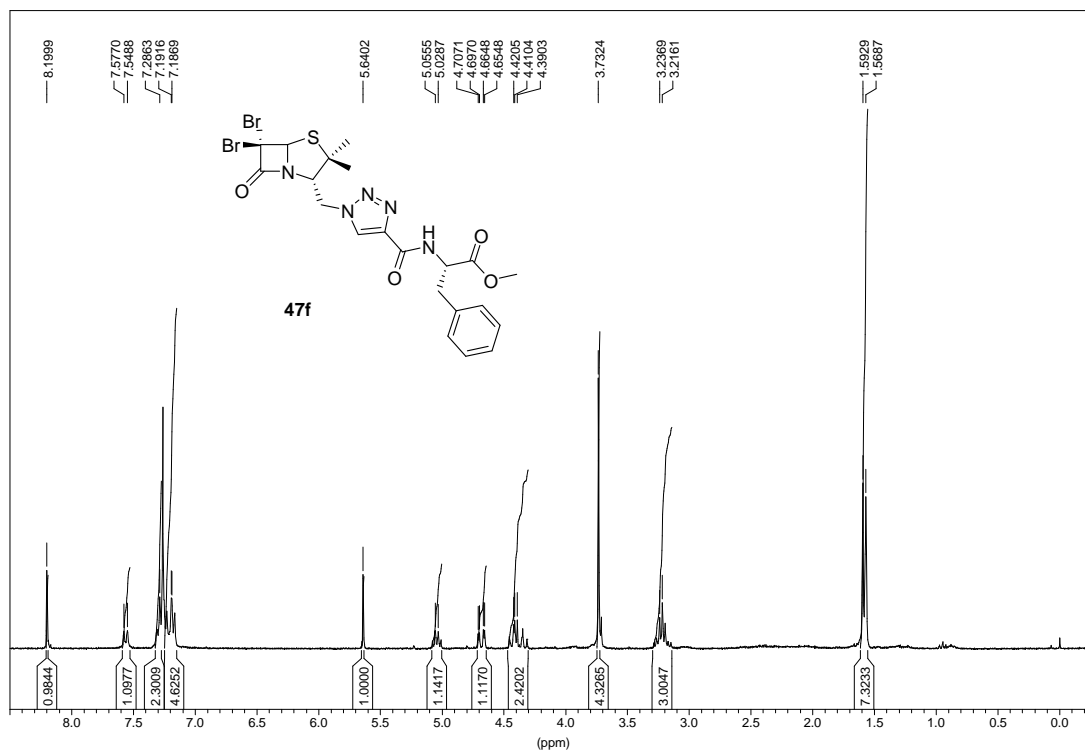


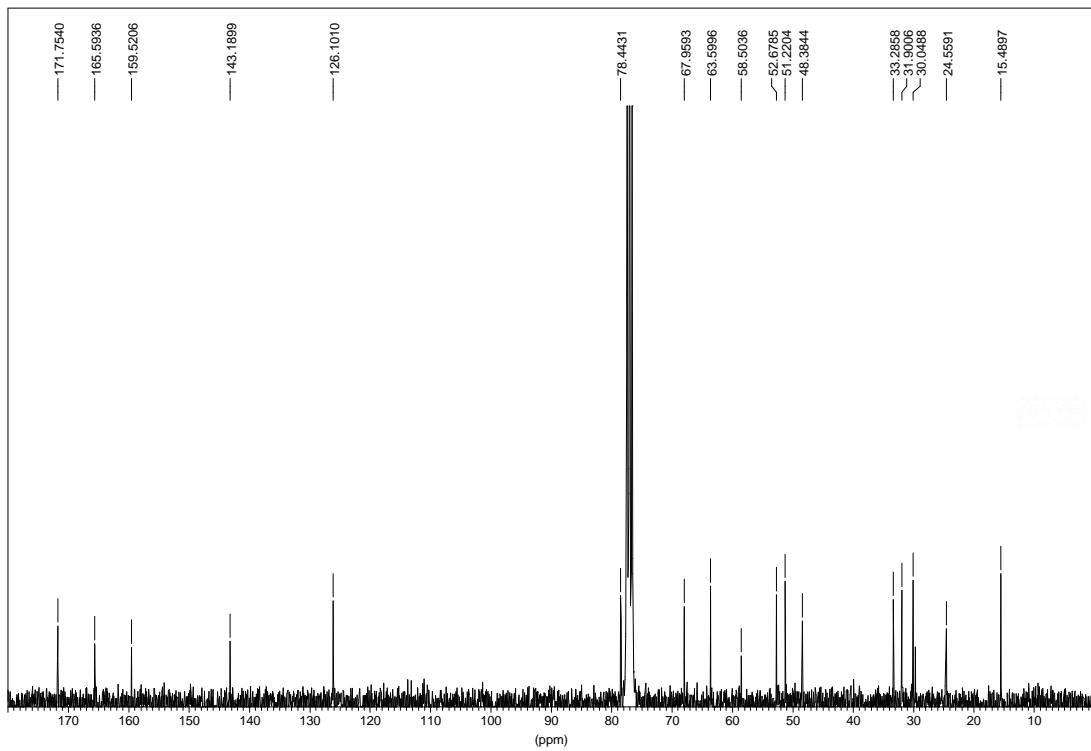
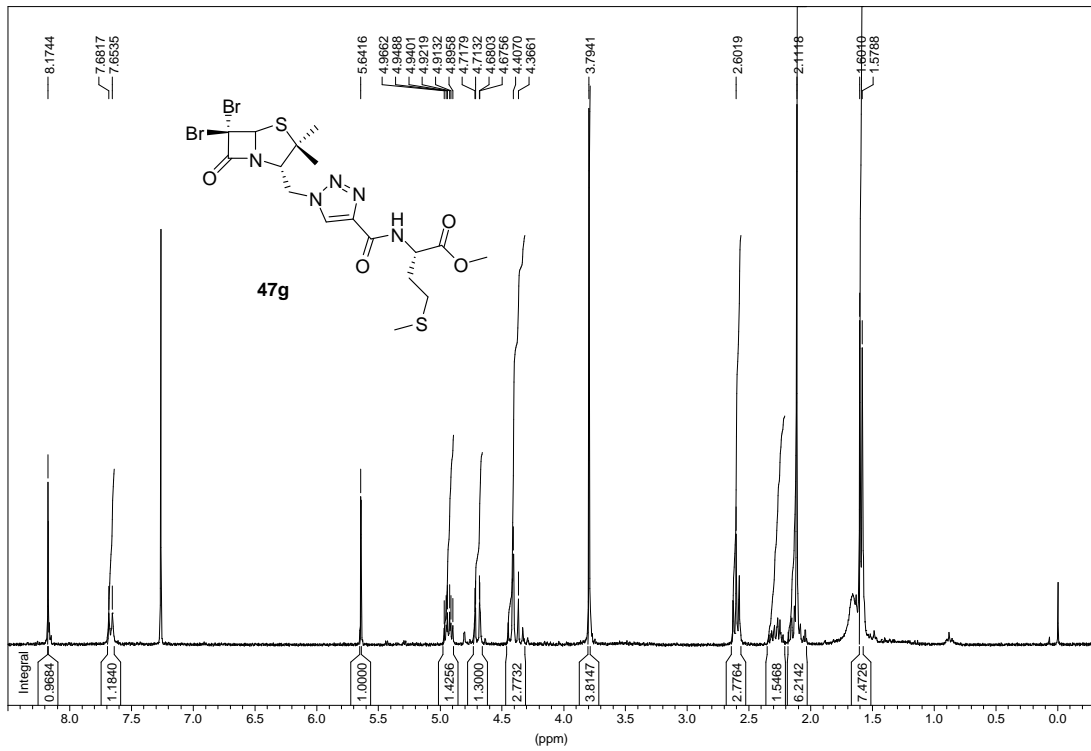


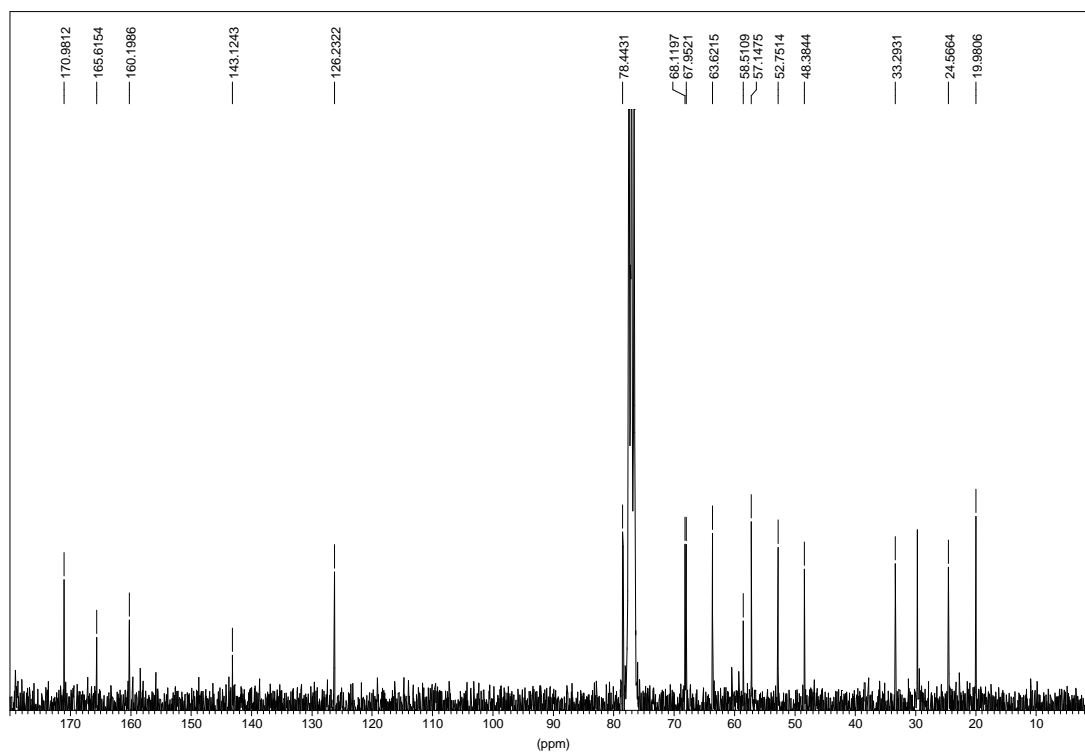
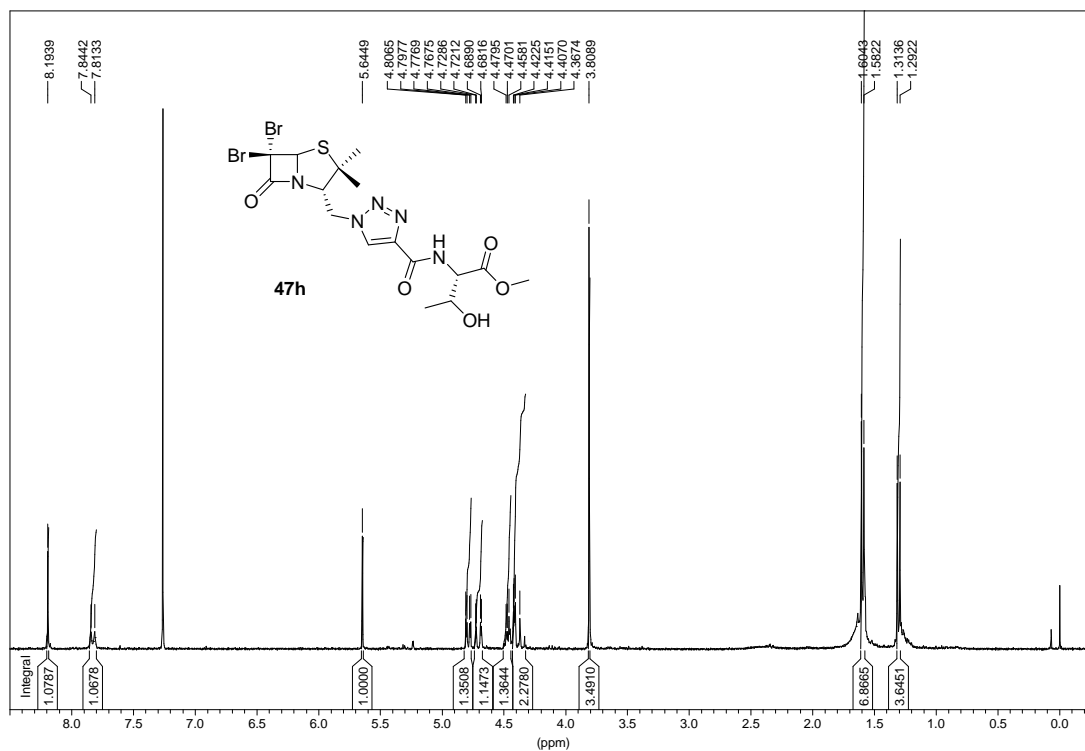


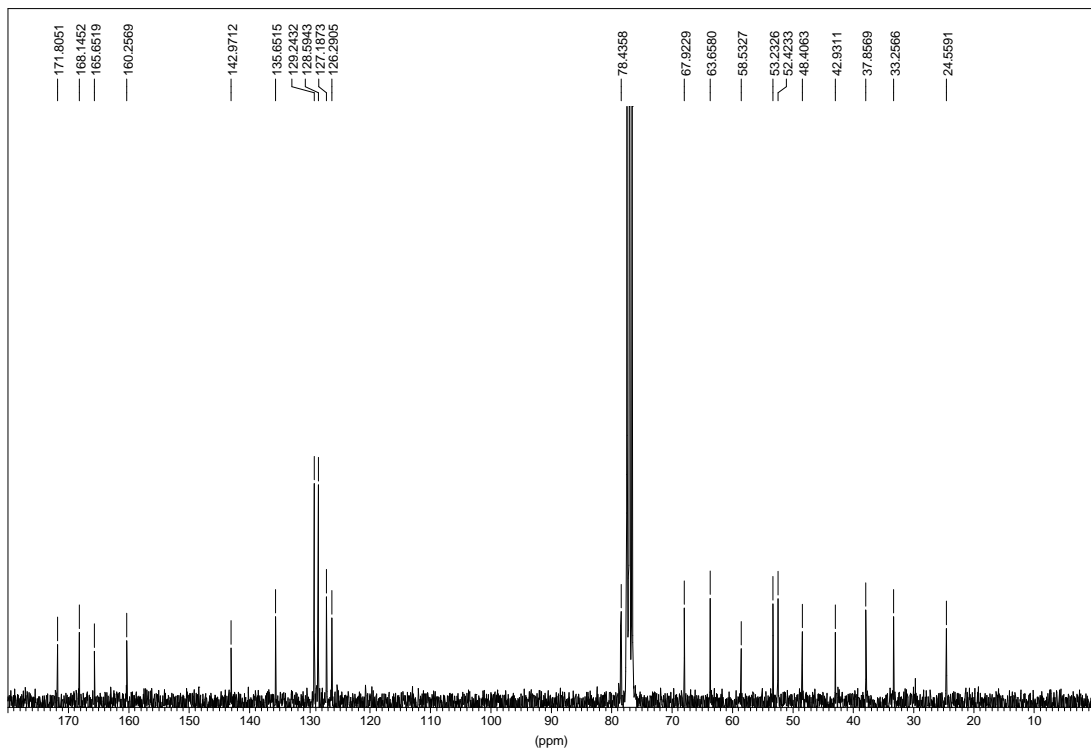
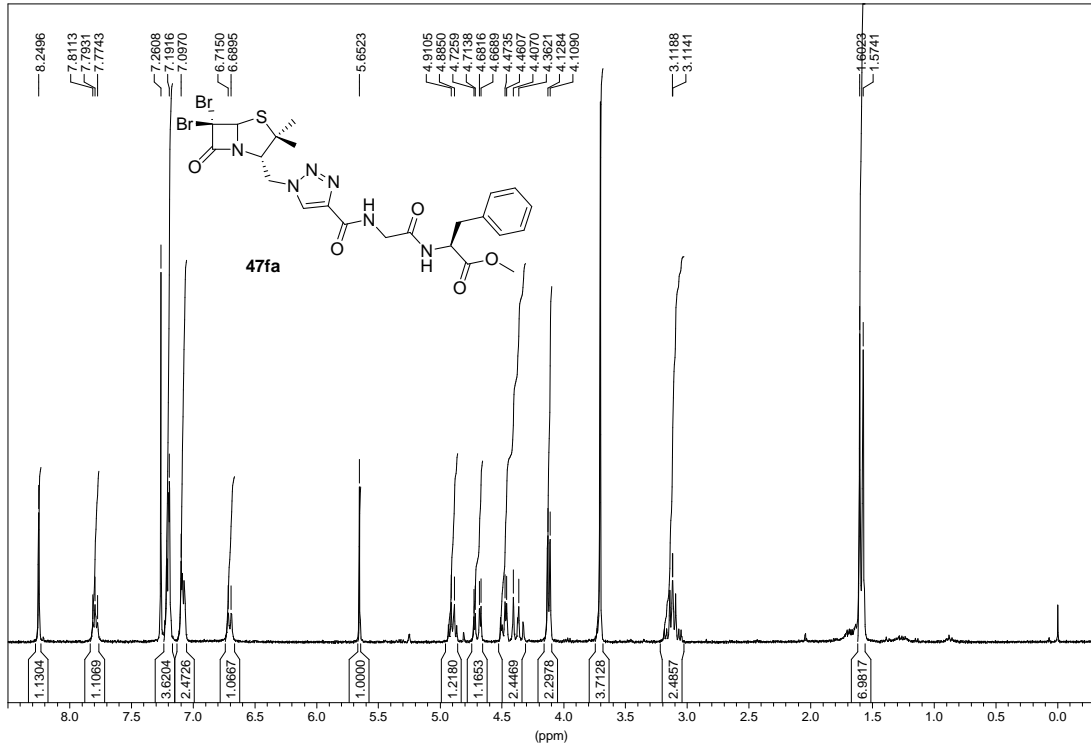


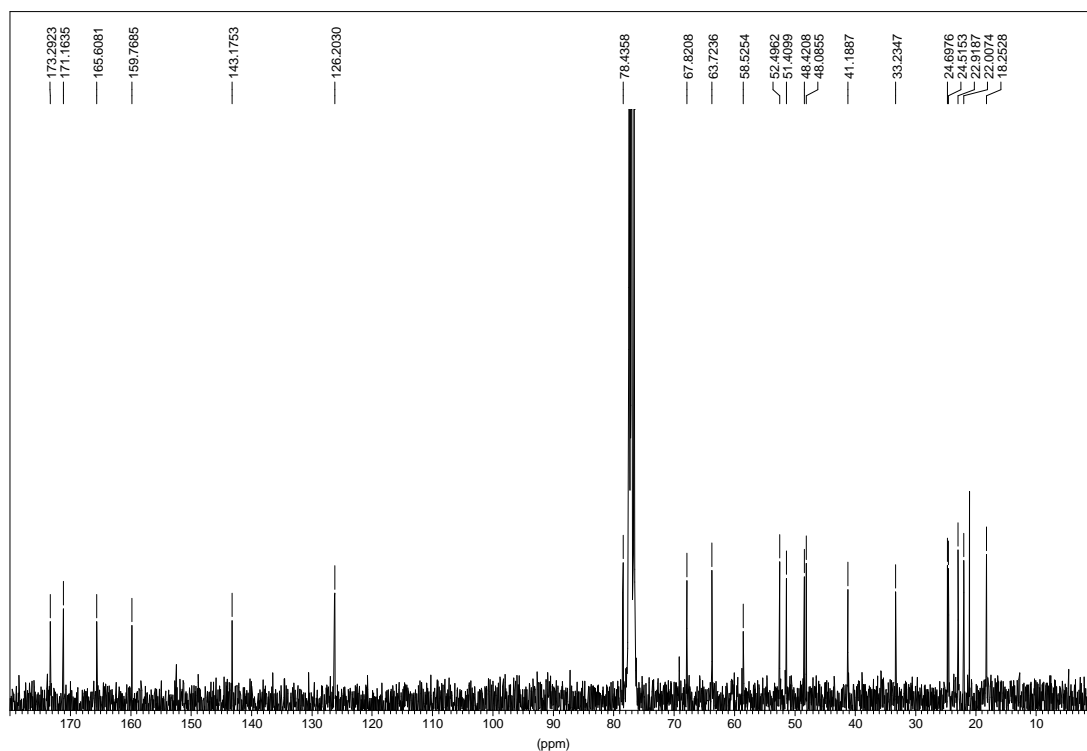
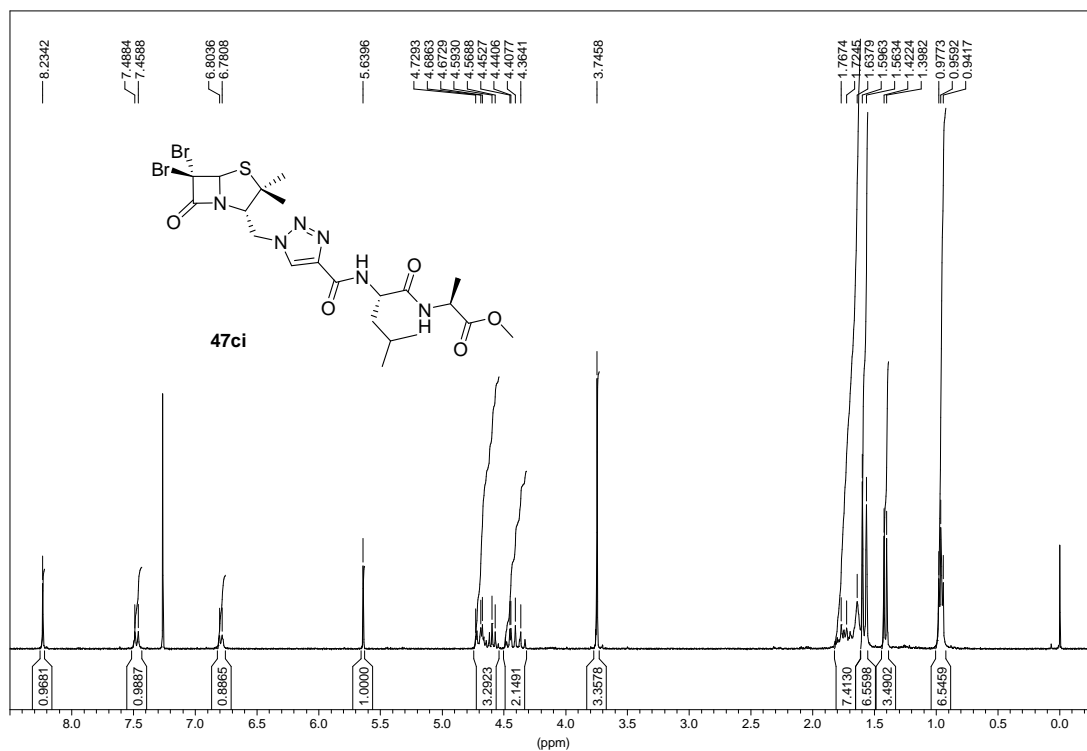


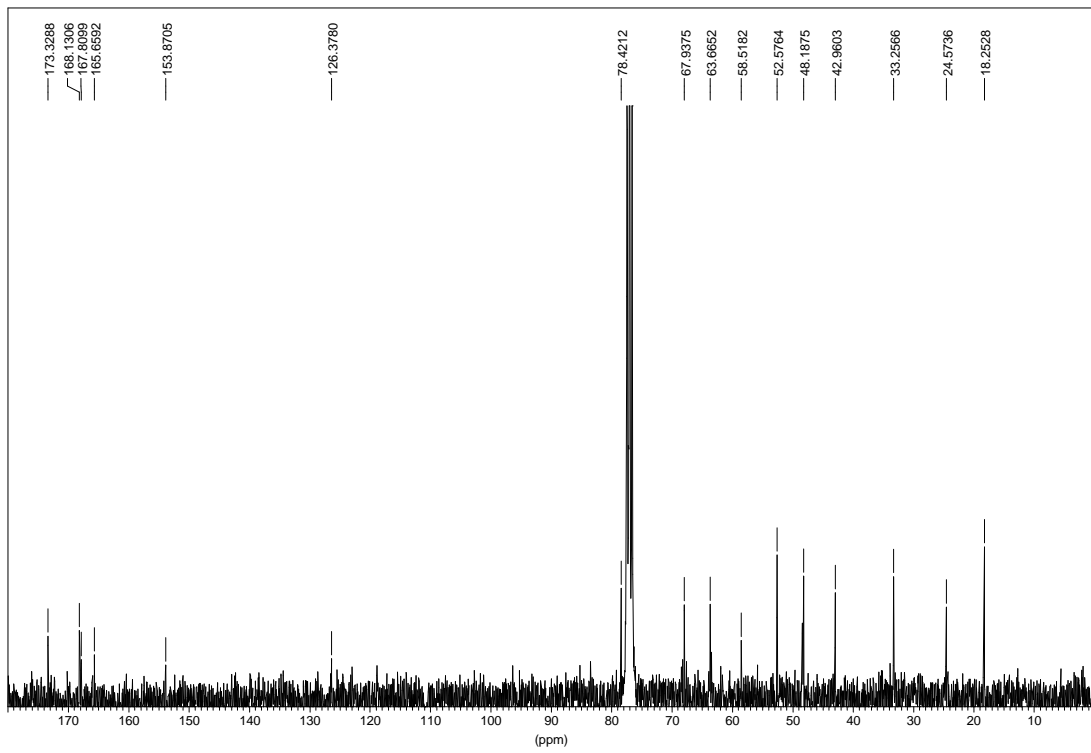
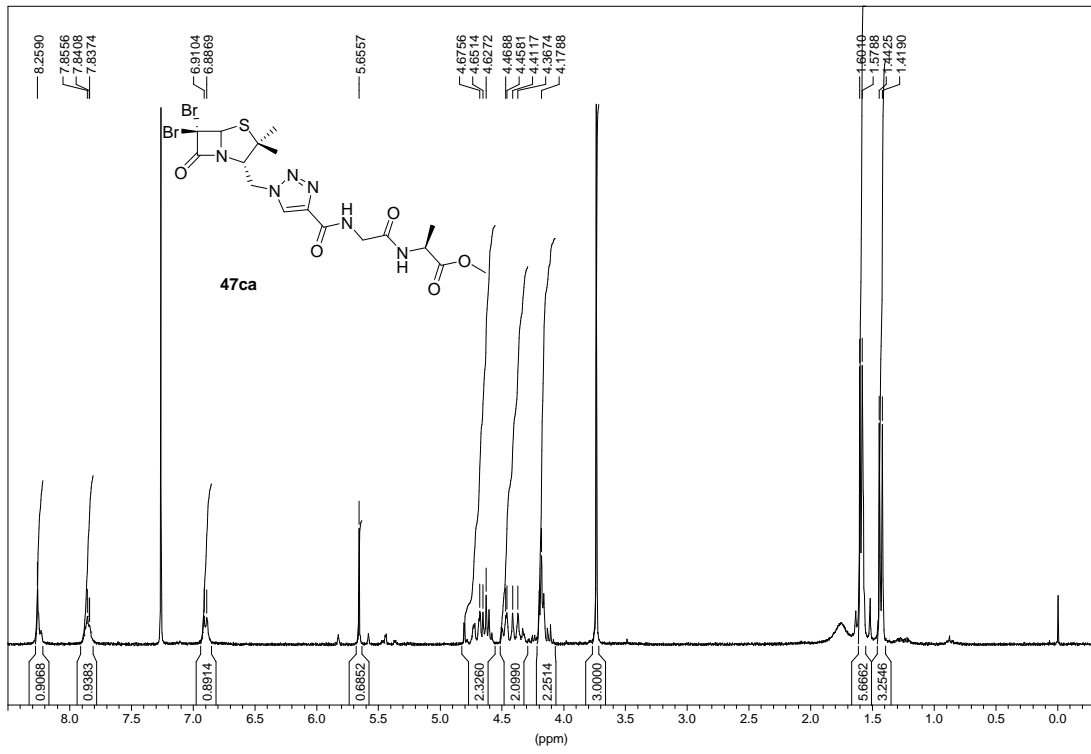


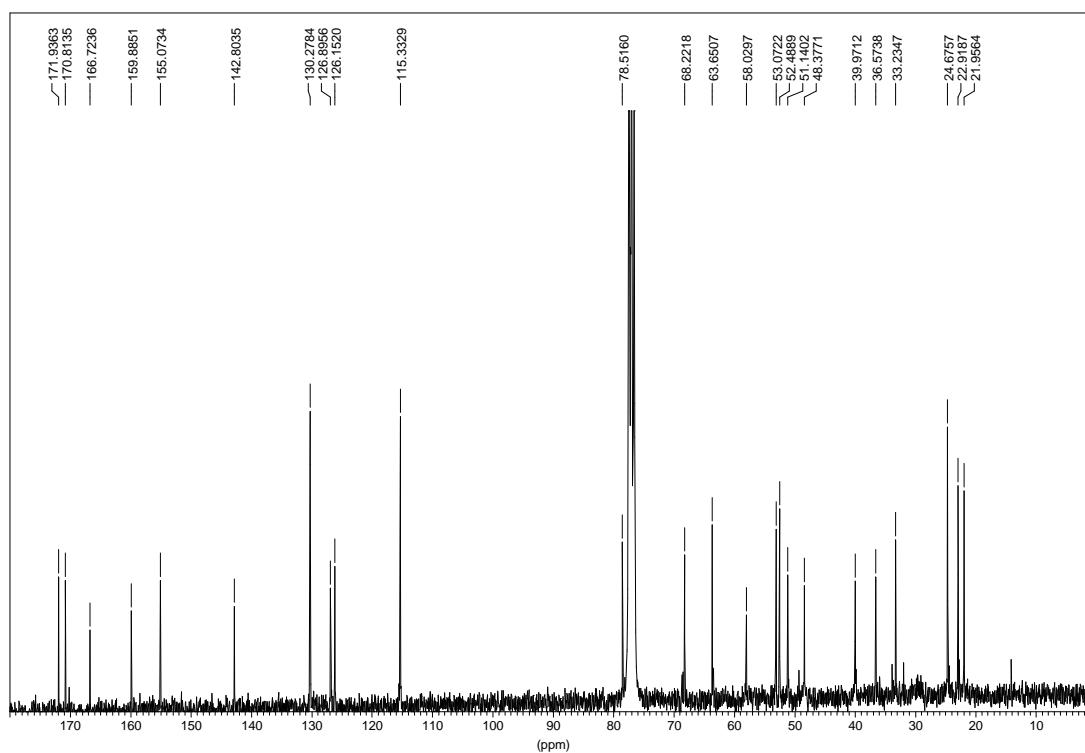
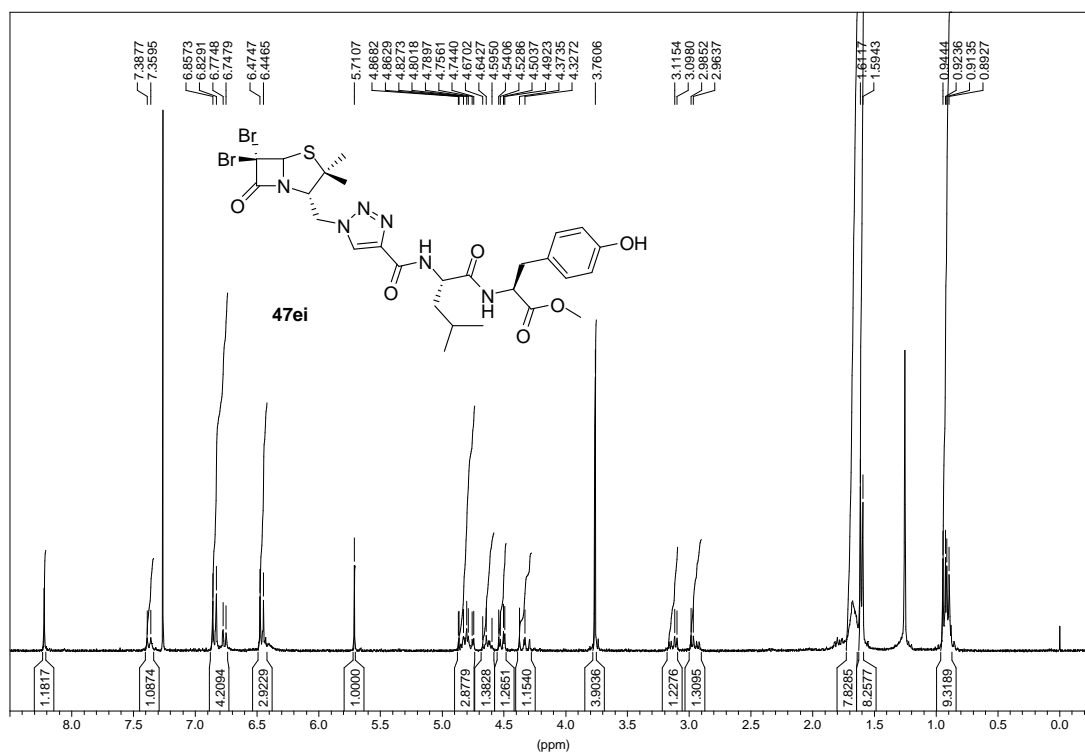


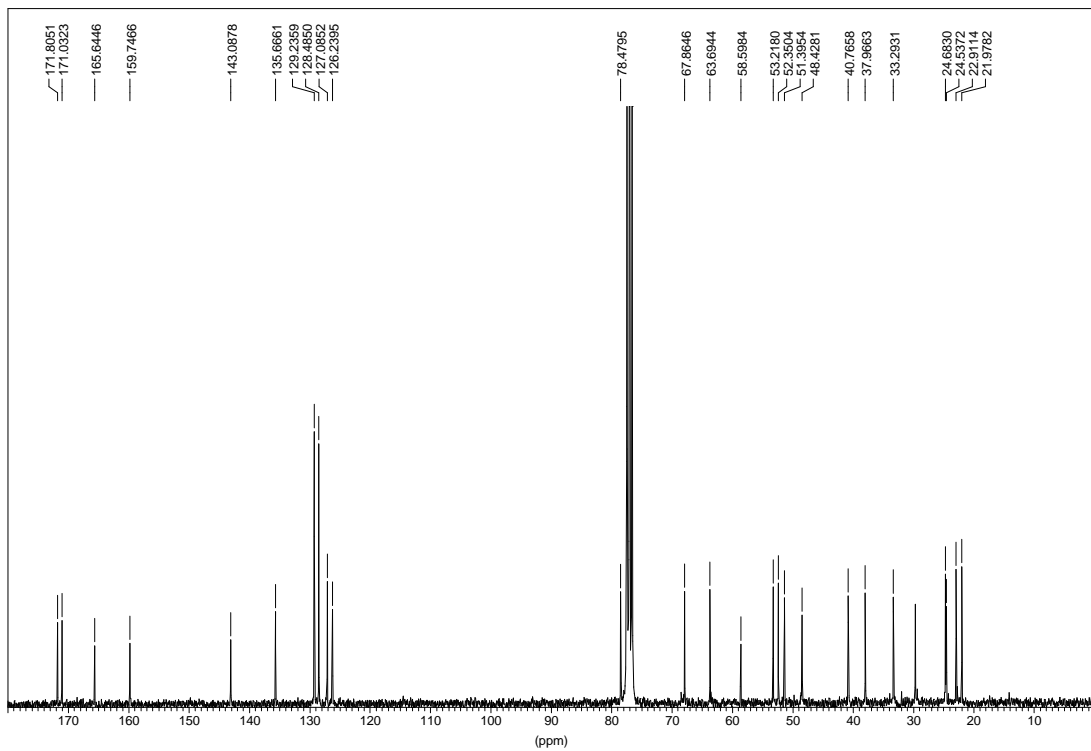
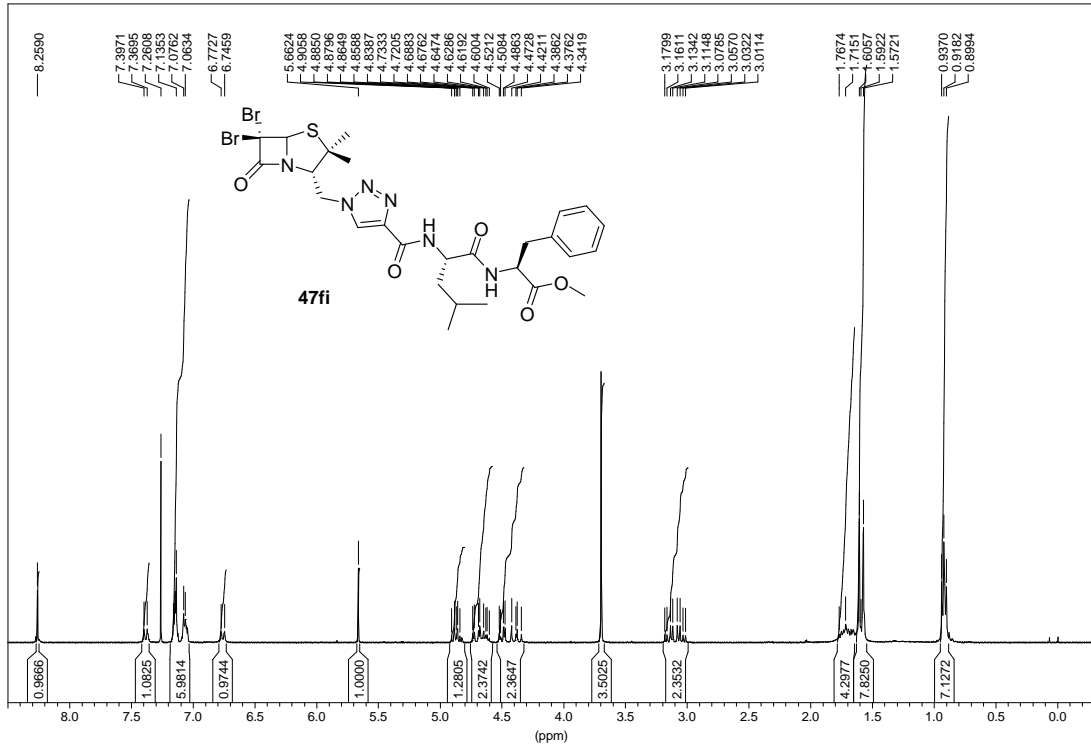


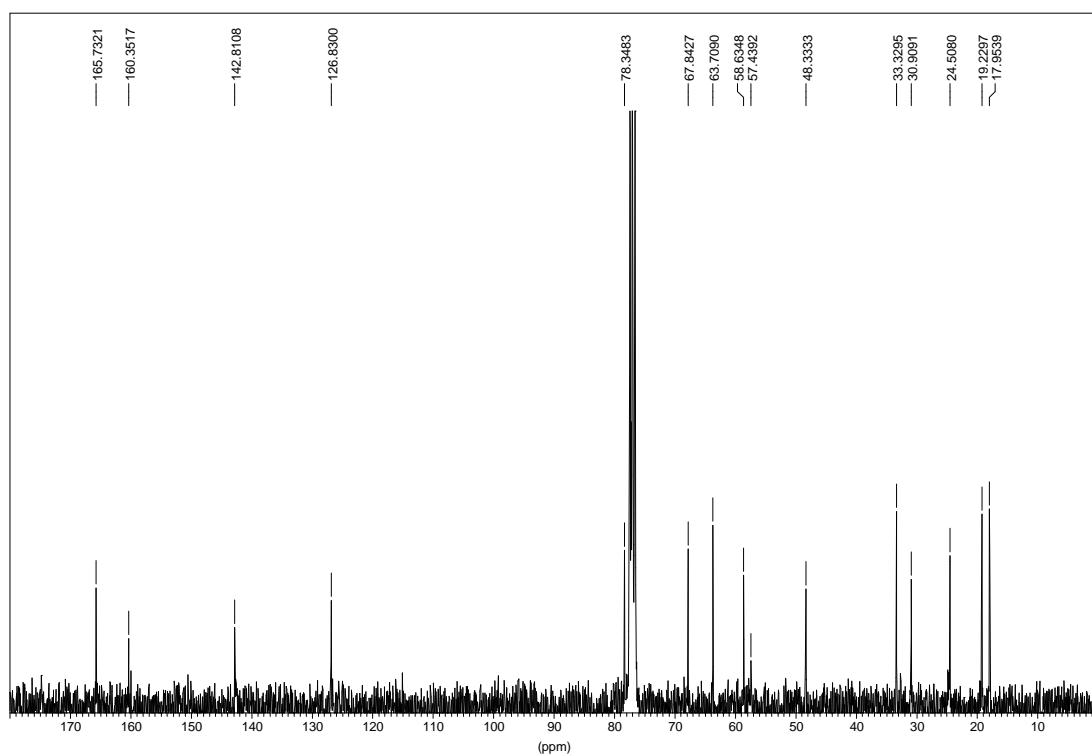
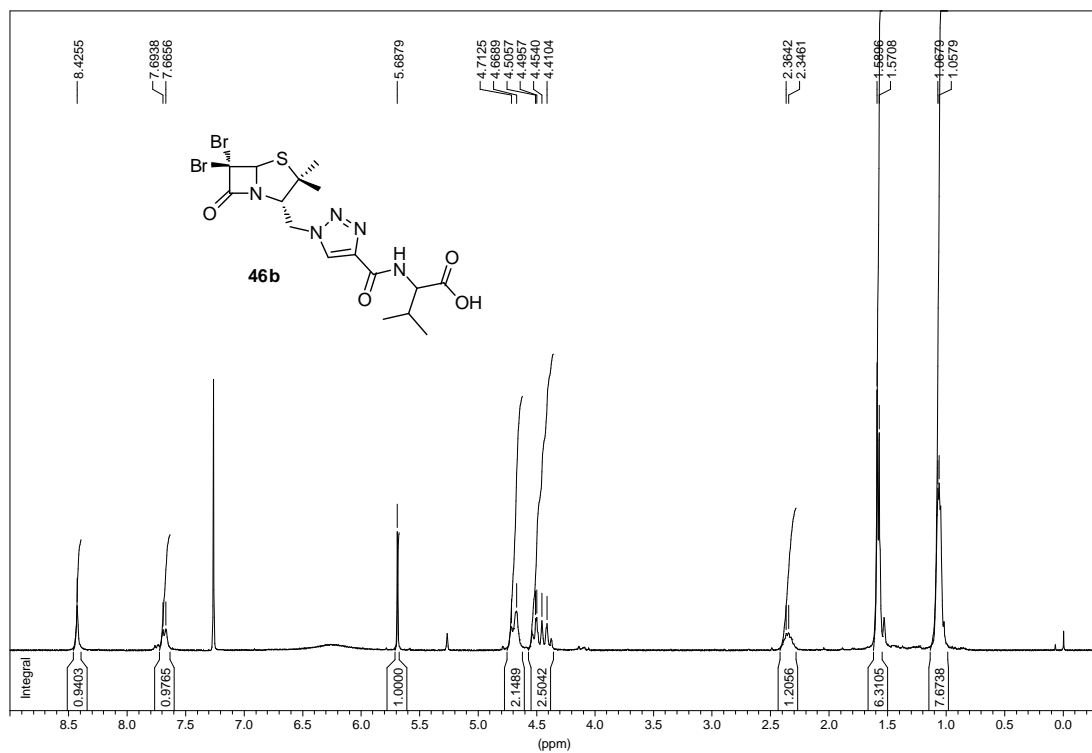












REFERENCIAS





8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wermuth, C. G., "The Practice of Medicinal Chemistry", tercera edición, Academic Press Elsevier, **2008**.
2. Patrick, G. L., "An Introduction to Medicinal Chemistry", cuarta edición, Oxford University Press, **2009**.
3. Kramer, R., Cohen, D., "Functional genomics to new drug targets", *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 965–972.
4. a) Furlán, R.L.E.; Mata, E.G., "Química Combinatoria. Metodologías relacionadas con la generación de diversidad molecular", Editorial Fondo de Cultura Económica, México, **2012**, ISBN 978-607-16-0670-9. b) Handbook of Combinatorial Chemistry. Drugs, Catalysts, Materials. Editado por Nicolaou, K. C., R. Hanco, W. Hartwig, **2002**, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim. c) P. Seneci, "Solid-Phase synthesis and Combinatorial Technologies", Wiley-Interscience, **2000**.
5. Adams, C.P.; Brantner, V.V., "Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars?", *Health Aff. (Millwood)*, **2006**, 25, 420-428.
6. Dickson, M.; Gagnon, J.P., "The cost of new drug discovery and development", *Discov. Med.*, **2004**, 4, 172-179.
7. a) Merrifield, R. B., "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154. b) Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M., Knapp, R. J., Lam, K. S., "A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity", *Nature*, **1991**, 354, 82-84.
8. a) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A., "Peptoids: A modular approach to drug discover", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9367-9371. b) Thompson, L. A.; Ellman, J. A., "Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries", *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555-600.
9. Wang, J.; Bray, A. M.; DiPasquale, A. J.; Joe Maeji, N.; Geysen, H.M., "Application of the multipin peptide synthesis technique for peptide receptor binding studies: Substance P as A model system", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 447-450.
10. a) Frank, R.; Döring, R., "Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports", *Tetrahedron*, **1988**, 44, 6031-6040. b) Heine, N.; Ast, T.; Schneider-Mergener, J.; Reineke, U.; Germeroth, L.; Wenschuh, H., "Synthesis and screening of peptoid arrays on cellulose membranes", *Tetrahedron*, **2003**, 59, 9919-9930.
11. Houghten, R. A., "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 5131-5135.
12. Furka, A.; Sebestyen, F.; Asgedom, M.; Dibo, G., "Complex synthetic chemical libraries indexed with molecular tag", *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1991**, 37, 487-493.

13. Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H., "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery", *Nature*, **1991**, *354*, 84-86.
14. Blackburn, C.; Albericio, F.; Kates, S. A. "Resin ND Linkers for Solid Phase Synthesis of Small Molecules", *Recent. Res. Devel. In Organic Chem.*, **1997**, *1*, 477-495.
15. Wang, S. "*p*-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and *p*-Alkoxybenzyl oxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of protected Peptide Fragments" *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 1328-1333.
16. Gaggini, F.; Porcheddu, A.; Reginato, G.; Rodriguez, M.; Taddei, M., "Colorimetric Tools for Solid-Phase Organic Synthesis", *J. Comb. Chem.*, **2004**, *6*, 805-810.
17. Yan, B. "Monitoring the Progress and the yield of Solid-Phase Organic", *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 621-630.
18. Egner, B.J.; Langley, G. J.; Bradley, M. "Solid Phase Chemistry: Direct Monitoring by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. A Tool for Combinatorial Chemistry." *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652-2653.
19. Dörwald, F. Z., "Organic Synthesis on Solid Phase. Supports, Linkers, Reactions", Wiley-VCH, **2000**.
20. Giralt, E.; Rizo, J.; Pedroso, E.; "Application of Gel-Phase ¹³C-NMR to Monitor Solid Phase Peptide Synthesis". *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4141-4152.
21. Wehler, T.; Westman, J. "Magic Angle Spinning NMR: A Valuable tool for Monitoring the Progress of Reactions in Solid Phase Synthesis", *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4771-4774.
22. Zhu, J.; Bienaymé, H. "Multicomponent Reactions"; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**.
23. Ganem, B., "Strategies for Innovation in Multicomponent Reaction Design". *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 463-472.
24. Candeias, N. R.; Montalbano, F.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P., "Boronic Acids and Esters in the Petasis-Borono Mannich Multicomponent Reaction". *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6169-6193.
25. Petasis, N. A.; Akritopoulou, I., "The boronic acid mannich reaction: A new method for the synthesis of geometrically pure allylamines" *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 583-586.
26. Petasis, N. A.; Zavialov, I. A., "A New and Practical Synthesis of α -Amino Acids from Alkenyl Boronic Acids" *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 445-446.
27. Hall, D. "Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine"; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**, p.282.
28. a) Schlienger, N.; Bryce M. R.; Hansen, T. K., "The Boronic Mannich Reaction in a Solid-Phase Approach". *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 10023-10030. b) Klopfenstein, S. R.; Chen, J. J.; Golebiowski, A.; Li, M., Peng S. X.; Shao, X., "A practical synthesis of peptide mimetics via the solid-phase Petasis reaction" *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*,

- 4835-4839. c) Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Chen, J. J.; Shao, X. "Solid supported high-throughput organic synthesis of peptide β -turn mimetics via Petasis reaction/diketopiperazine formation", *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 4841-4844. d) Danieli, E.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, A., "Synthesis and Conformational Analysis of Constrained β -Turn Mimetics Incorporating a Bicyclic Turn Inducer by Use of the Petasis Three-Component Reaction on Solid Phase" *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, *10*, 1659–1668.
- 29.** Petasis, N. A.; Goodman, A.; Zavialov, I. A., "A New Synthesis of α -Arylglycines from Aryl Boronic Acids", *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 16463-16470.
- 30.** Font, D., Heras, M.; J. M. Villalgorido, "Synthesis of pyrimidinyl arylglycines through subsequent Mitsunobu and Petasis reactions", *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 5226–5235.
- 31.** Williams, R. M.; Hendrix, J. A., "Asymmetric Synthesis of Arylglycines", *Chem. Rev.*, **1992**, *92*, 889-917.
- 32.** Conway, S. J.; Miller, J. C.; Howson, P. A.; Clark, B. P.; Jane, D. E.;"Synthesis of Phenylglycine Derivates as Potent and Selective Antagonist of Group III Metabotropic Glutamate Receptors". *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *11*, 777-780.
- 33.** Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N. C.; Bräse, S.; Winssinger, N., "Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics", *Angew.Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2096–2152.
- 34.** Bush, K.; Pucci, M.J., "New antimicrobial agents on the horizon", *Biochem Pharmacol.*, **2011**, *82*, 1528-1539.
- 35.** a) Ben-Ishai, D.; Altman, J.; Peled, N., "The synthesis of p-substituted D,L-phenylglycines by the amidoalkylation of benzylchloride and N-benzylbenzamide", *Tetrahedron*, **1977**, *33*, 2715-2717. b) O'Donnell, M.J.; Bennett, W. D., "The synthesis of amino acids by reaction of an electrophilic glycine cation equivalent with neutral carbon nucleophiles", *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 5389-5401.
- 36.** Evans, D. A.; Evrard, D. A.; Rychnovsky, S. D.; Frith, T.; Whittingham, W. G.; DeVries, K. M., "A general approach to the asymmetric synthesis of vancomycin-related arylglycines by enolate azidation", *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 1189-1192.
- 37.** Vernier, J. M.; Hegedus, L. S.; Miller, D. B. J., "Synthesis of optically active arylglycines by photolysis of optically active (.beta.-hydroxyamino) carbene-chromium(0) complexes", *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 6914-6920.
- 38.** Kunz, H.; Rück, K., "Carbohydrates as Chiral Auxiliaries in Stereoselective Synthesis. New Synthetic Methods (90)", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 336–358.
- 39.** a) Chakraborty, T.K., Azhar Hussain, K., Venkat Reddy, G., " α -phenylglycinol as chiral auxiliary in diastereoselective strecker synthesis of α -amino acids", *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9179-9190. b) Pérez-Fuertes, Y.; Taylor, J. E.; Tickell, D.A.; Mahon, M. F.; Bull, S. D. y James, T. D., "Asymmetric Strecker Synthesis of α -Arylglycines", *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6038–6047.

40. Boger, D. L.; Borzilleri, R.M.; Nukui, S., "Synthesis of (R)-(4-Methoxy-3,5-dihydroxyphenyl)glycine Derivatives: The Central Amino Acid of Vancomycin and Related Agents", *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3561-3565.
41. Candeias, N. R.; Cal, P. M.S.D.; Andre, V.; Duarte, M. T.; Veiros, L. F.; Gois, P. M. P., "Water as the reaction medium for multicomponent reactions based on boronic acids". *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 2736–2745.
42. Alcaide, B.; Polanco, C.; Saez, E.; Sierra, M., "The Intramolecular Aldol Condensation Route to Fused Bi- and Tricyclic β -Lactams", *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7125-7132.
43. Wang, Q.; Finn, M. G.; "2H-Chromenes from Salicylaldehydes by a Catalytic Petasis Reaction", *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4063-4065.
44. Nanda, K. K.; Wesley Trotter, B., "Diastereoselective Petasis Mannich reactions accelerated by hexafluoroisopropanol: a pyrrolidine-derived arylglycine synthesis", *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2025-2028.
45. Southwood, T. J.; Curryb, M. C., Huttona, C. A., "Factors affecting the efficiency and stereoselectivity of α -amino acid synthesis by the Petasis reaction", *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 236–242.
46. Stas, S.; Tehrani, K. A., "Lewis acid promoted Mannich type reactions of α,α -dichloro aldimines with potassium organotrifluoroborates", *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 8921-8931.
47. Kumagai, N.; Muncipinto, G.; Schreiber, S. L. "Short Synthesis of Skeletally and Stereochemically Diverse Small Molecules by Coupling Petasis Condensation Reactions to Cyclization Reactions", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3635-3638.
48. Delpiccolo, C. M. L.; Mata, E. G., "Stereoselective solid-phase synthesis of 3,4-substituted azetidinones as key intermediates for mono- and multicyclic β -lactam antibiotics and enzyme inhibitors", *Tetrahedron Asymmetry*, **2002**, *13*, 905-910.
49. Delpiccolo, C. M. L.; "Síntesis en fase sólida dirigida a la preparación de bibliotecas combinatorias de compuestos de interés biológico", Tesis doctoral. IQUIOS, **2005**, pag.131-134.
50. Wang, Y.; Liang, Y.; Jiao, L.; Du, D. M.; Xu, J., "Do Reaction Conditions Affect the Stereoselectivity in the Staudinger Reaction?", *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6983-6990.
51. Hermanek, S., "Boron-11 NMR spectra of boranes, main-group heteroboranes, and substituted derivatives. Factors influencing chemical shifts of skeletal atoms", *Chem. Rev.*, **1992**, *92*, 325–362.
52. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A., "Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes", *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14* (17), 1829-1852.
53. Guantai, E.M.; Ncokazi, K.; Egan, T.J.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Smith, P.J.; Chibale K., "Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds", *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 8243–8256.

54. a) Clader, J. W., "The Discovery of Ezetimibe: A View from Outside the Receptor", *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1-9. b) Burnett, D.A., " β -Lactam Cholesterol Absorption Inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11*, 1873-1887.
55. (a) Adlington, R.M.; Baldwin, J.E.; Chen, B.; Cooper, S.L.; McCoull, W.; Pritchard, G.J.; Howe, T.J.; Becker, G.W.; Hermann, R.B.; McNulty, A.M.; Neubauer, B.L., "Design and synthesis of novel monocyclic β -lactam inhibitors of prostate specific antigen", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 1689-1694. (b) Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Puglisi, A., "Efficient and highly stereoselective synthesis of a β -Lactam inhibitor of the serine protease prostate-specific antigen", *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 1813-1818.
56. Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Maggioni, F.; Puglisi, A., "Efficient Synthesis of an Enantiopure β -Lactam as an Advanced Precursor of Thrombin and Trypsin Inhibitors", *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 2952-2955.
57. Borthwick, A.D.; Weingarten, G.; Haley, T.M.; Tomaszewski, M.; Wang, W.; Hu, Z.; Bedard, J.; Jih, H.; Yuen, L.; Mansour, T.S., "Design and synthesis of monocyclic β -lactams as mechanism-based inhibitors of human cytomegalovirus protease", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 365-370.
58. (a) Setti, E.L.; Davis, D.; Chung, T.; McCarter, J., "3,4-Disubstituted azetidinones as selective inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. Exploring P2 elements for selectivity", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2051-2053. (b) Zhou, N.E.; Guo, D.; Thomas, G.; Reddy, A.V.N.; Kaleta, J.; Purisima, E.; Menard, R.; Micetich, R.G.; Singh R., "3-Acylamino-azetidin-2-one as a novel class of cysteine proteases inhibitors", *Bioorg. Med. Chem., Lett.* **2003**, *13*, 139-141.
59. Feledziak, M.; Michaux, C.; Urbach, A.; Labar, G.; Muccioli, G.G.; Lambert, D.M.; Marchand-Brynaert, J., " β -Lactams Derived from a Carbapenem Chiron Are Selective Inhibitors of Human Fatty Acid Amide Hydrolase versus Human Monoacylglycerol Lipase", *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 7054.
60. (a) Veinberg, G.; Vorona, M.; Shestakova, I.; Kanepe, I.; Zharkova, O.; Mezapuke, R.; Turovskis, I.; Kalvinsh, I.; Lukevics, E., "Synthesis and antitumor activity of selected 7-alkylidene substituted cepheids", *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1033-1040. (b) Veinberg, G.; Shestakova, I.; Vorona, M.; Kanepe, I.; Lukevics, E., "Synthesis of antitumor 6-alkylidenepenicillanate sulfones and related 3-alkylidene-2-azetidinones", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 147-150. (c) Banik, I.; Becker, F.F.; Banik, B.K., "Stereoselective Synthesis of β -Lactams with Polyaromatic Imines: Entry to New and Novel Anticancer Agents", *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 12-15. (d) Singh, P.; Sachdeva, S.; Raj, R.; Kumar, V.; Mahajan, M.P.; Nasser, S.; Vivas, J.; Gut, L.; Rosenthal, P.J.; Feng, T.; Chibale, K., "Antiplasmodial and cytotoxicity evaluation of 3-functionalized 2-azetidinone derivatives", *Bioorg. Med. Chem., Lett.* **2011**, *21*, 4561-4563. (e) Kazia, A.; Hilla, R.; Longb, T. E.; Kuhna, D. J.; Turosa, E.; Ping Doua, Q., "Novel N-thiolated β -lactam antibiotics selectively induce apoptosis in human tumor and transformed, but not

- normal or nontransformed, cells", *Biochemical Pharmacology*, **2004**, 67, 365–374. f) Kuhn, D.; Coates, C.; Daniel, K.; Di Chen; Bhuiyan, M.; Kazi, A.; Turos, E.; Ping Dou, Q., "Beta-lactams and their potential use as novel anticancer chemotherapeutics drugs", *Frontiers in Bioscience*, **2004**, 9, 2605-2617. g) Smith D. M.; Kazi A.; Smith L.; Long T.E.; Heldreth B.; Turos E.; Dou Q.P., "A novel beta-lactam antibiotic activates tumor cell apoptotic program by inducing DNA damage", *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 61, 1348-1358.
61. (a) Rothstein, J.D.; Patel, S.; Regan, M.R.; Haenggeli, C.; Huang, Y.H.; Bergles, D.E.; Jin, L.; Dykes-Hoberg, M.; Vidensky, S.; Chung, D.S.; Toan, S.V.; Bruijn, L.I.; Su, Z-Z.; Gupta, P.; Fisher, P.B., "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression", *Nature*, **2005**, 433, 73-77. (b) Ji, H-F.; Shen, L.; Zhang, H.Y., "Beta-lactam antibiotics are multipotent agents to combat neurological diseases", *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, **2005**, 333, 661-663.
62. a) Peczuh, M.W.; Hamilton, A.D., "Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules", *Chem Rev.*, **2000**, 100, 2479-2494. b) Pandey, K. N., "Small peptide recognition sequence for intracellular sorting", *Curr. Op. in Biotech.*, **2010**, 21, 611–620.
63. Moses, J.E.; Moorhouse, A.D., "The growing applications of click chemistry", *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 1249-1262.
64. Tron, G.C.; Pirali, T.; Billington, R.A.; Canonico, P.L.; Sorba, G.; Genazzani, A.A., "Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes", *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28, 278-308.
65. (a) Genin, M. J.; Allwine, D. A.; Anderson, D. J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D. E.; Garmon, S. A.; Graber, D. R.; Grega, K. C.; Hester, J. B.; Hutchinson, D. K.; Morris, J.; Reischer, R. J.; Ford, C. W.; Zurenko, G. E.; Hamel, J. C.; Schaadt, R. D.; Stapert, D.; Yagi, B. H., "Substituent Effects on the Antibacterial Activity of Nitrogen–Carbon-Linked (Azolyphenyl)oxazolidinones with Expanded Activity Against the Fastidious Gram-Negative Organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*", *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 953-970. (b) Holla, B.S.; Mahalinga, M.; Karthikeyan, M.S.; Poojary, B.; Akberali, B.M.; Kumari, N.S., "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some substituted 1,2,3-triazoles", *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40, 1173-1178.
66. (a) Buckle, D. R.; Outred, D. J.; Rockell, C. J. M.; Smith, H.; Spicer, B. A., "Studies on v-triazoles. 7. Antiallergic 9-oxo-1H,9H-benzopyrano[2,3-d]-v-triazoles", *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 251-254. (b) Buckle, D. R.; Rockell, C. J. M.; Smith, H.; Spicer, B. A., "Studies on 1,2,3-triazoles. 13. (Piperazinylalkoxy)-[1]benzopyrano[2,3-d]-1,2,3-triazol-9(1H)-ones with combined H1-antihistamine and mast cell stabilizing properties", *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 2262-2267.
67. (a) Kumar, D.; Reddy, V.B.; Kumar, A.; Mandal, D.; Tiwari, R.; Parang, K., "Click chemistry inspired one-pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles and their Src kinase inhibitory activity", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 449-452. (b) Reddy,

- D.M.; Srinivas, J.; Chashoo, G.; Saxena, A.K.; Kumar, S., "4 β -[(4-Alkyl)-1,2,3-triazol-1-yl] podophyllotoxins as anticancer compounds: Design, synthesis and biological evaluation", *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1983-1991.
68. a) Alvarez, R.; Velazquez, S.; San, F.; Aquaro, S.; De, C.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. , "1,2,3-Triazole-[2,5-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-.beta.-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide) (TSAO) Analogs: Synthesis and Anti-HIV-1 Activity", *J. Med. Chem.*,**1994**, *37*, 4185–4194. b) Velazquez, S.; Alvarez, R.; Perez, C.; Gago, F.; de Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M., "Regiospecific synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of novel 5-substituted N-alkylcarbamoyl and N,N-dialkylcarbamoyl 1,2,3-triazole-TSAO analogues", *J. AntiViral Chem. Chemother.*, **1998**, *9*, 481-489.
69. Brockunier, L. L.; Parmee, E. R.; Ok, H. O.; Candelore, M. R.; Cascieri, M. A.; Colwell, L. F.; Deng, L.; Feeney, W. P.; Forrest, M. J.; Hom, G. J.; MacIntyre, D. E.; Tota, L.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Weber, A. E., "Human β 3-adrenergic receptor agonists containing 1,2,3-triazole-substituted benzenesulfonamides", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10* (18), 2111-2114.
70. Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M., "Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-Triazole Inhibitors against a Recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease", *J. Comb. Chem.*, **2004**, *6*, 312-324.
71. Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharples, K.B., "A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes", *Angew Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596–2599.
72. Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M.; "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides", *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057–3064.
73. Jahnke, W.; Erlanson, D. A., "Fragment-based Approaches in Drug Discovery", WILEY-VCH, **2006**.
74. Narukawa, Y.; Juneau, K.N.; Snustad, D.; Miller, D.B.; Hegedus, L.S., "Synthesis of optically active .beta.-lactams by the photolytic reaction of imines with optically active chromium carbene complexes. 2. Synthesis of 1-carbacephalothin and 3-ANA relays", *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 5453–5462.
75. Atherton, E.; Sheppard, R. C., "Solid Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press, USA, **1989**, pag. 108.
76. Malkinson, J. P.; Anim, M. K.; Zloh, M.; Searcey, M., "Efficient Solid-Phase-Based Total Synthesis of the Bisintercalator TANDEM" , *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 7654-7661.
77. Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J.; "Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides" , *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 4479–4482.

78. Trost, B. M.; Romero, A. G., " Synthesis of optically active isoquinuclidines utilizing a diastereoselectivity control element", *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2332-2342.
79. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., "Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition", *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2952.
80. a) Zhang, Z.; Fan, E., "Solid phase synthesis of peptidotriazoles with multiple cycles of triazole formation", *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 665–6693. b) Punna, S.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Finn, M.G., "Head-to-Tail Peptide Cyclodimerization by Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 2215-2220.
81. Huisgen, R., "1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry"; Padwa A., Editor; Wiley: New York, **1984**; Vol. 1, 1-176.
82. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., "Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 210–216.
83. Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V., "Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism", *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 8923-8930.
84. "The 10 x '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020", *Clin Infect Dis.*, **2010**, *50*, 1081-1083.
85. Almeida, C. A.; Barry, S. A., "Cancer: Basic Science and Clinical Aspects", Wiley-Blackwell, **2010**.
86. Página oficial de la Organización mundial de la salud (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>)
87. Gottesman, M.M., "Mechanisms of cancer drug resistance", *Annu. Rev. Med.*, **2002**, *53*, 615-627.
88. Patente de aplicación de Estados Unidos, Luesch y col, Pub. No: US 2012/0095065A1, Pub. Date Apr. 19, **2012**.
89. Armarego, W. F. L.; Perrin, D. D., "Purification of Laboratory Chemicals", 4º Edición, Butterworth-Heinemann, Oxford, **2000**.
90. "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry", Louisville, Kentucky, **1998**, pág. 101.