



I Q U I R



Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

“Diseño y síntesis de nuevos análogos de
triazolilaminoacil(peptidil)-penicilinas enfocado al estudio de
la actividad antiproliferativa.”

Lic. Cristián Matías Camacho

Director: Dr. Ernesto G. Mata

Co-Directora: Dra. Dora B. Boggian

2020

“Diseño y síntesis de nuevos análogos de triazolilaminoacil(peptidil)-penicilinas enfocado al estudio de la actividad antiproliferativa.”

Cristián Matías Camacho

Licenciado en Biotecnología - 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 Instituto de Química Rosario, unidad Química Orgánica, ubicado en la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 2014 y 2020, bajo la dirección del Prof. Dr. Ernesto G. Mata y la co-dirección de la Dra. Dora B. Boggian.

**SE AGRADECE A LAS ENTIDADES QUE COOPERARON EN EL
FINANCIAMIENTO PARA DESARROLLAR ESTA TESIS:**

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Universidad Nacional de Rosario (UNR)

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República
Argentina (MINCyT)

Programa ECOS-Sud

Agradezco al Dr. Ernesto Mata por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, por su gran generosidad e increíble paciencia y por todo el tiempo invertido en enseñarme y aconsejarme a lo largo de estos años con la mejor predisposición.

A la Dra. Dora. Boggian (Bibi), quien me abrió las puertas al mundo de la Química, por confiar en mí, por sus enseñanzas, su apoyo incondicional tanto en lo académico como en lo personal y por estar siempre dispuesta a escucharme.

Me considero profundamente afortunado de haber sido dirigido por estas dos excelentes personas e investigadores. Gracias.

Esta Tesis va dedicada a mis padres quienes apoyaron y sostuvieron mi educación todos estos años. Les estaré eternamente agradecido por los valores que me inculcaron y por convertirme en quien soy hoy.

A mi hermano, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi Ale (momito), por ser mi sostén, mi compañero de vida y por alentarme en todas mis decisiones.

A mis sobrinos, tíos y primos por brindarme su amor y buenos deseos.

A mis amigos, por estar siempre.

Agradezco a todos los integrantes del grupo de investigación del Dr. Ernesto G. Mata, tanto a los que hoy están como a los que estuvieron. A Denis, Carla, Mai, Noe, Nadia y Cati. Gracias por integrarme, por divertirme y hacer del lugar de trabajo un segundo hogar.

A las Dras. Carina Delpiccolo, Luciana Méndez y Patricia Cornier por recibirme, enseñarme y principalmente escucharme y contenerme.

A Marianela Pizzio (Tata) y David Rocés por sus aportes y gran predisposición en este trabajo de Tesis.

También agradezco a todos los becarios de “los laboratorios de al lado”, por su generosidad y buena onda.

A todos los integrantes del IQUIR, por su ayuda y consejos y por hacer del instituto un lugar distendido y placentero donde trabajar.

Al director del Instituto, Dr. Kaufman, por haberme permitido realizar el doctorado en el IQUIR.

A Fer, Sergio y Pablito por su ayuda desinteresada con los espectros de RMN.

A Gri, por su colaboración en las tareas diarias en el laboratorio.

A la Dra. Roguín y su grupo de trabajo, por haber realizado los ensayos de actividad antiproliferativa.

A las Dras. Silvia López y Andrea Bracca por sus aportes en las reuniones de presentación de los informes de avance de Tesis.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xvii
RESUMEN	xx
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Química Medicinal y el desarrollo de nuevos fármacos.	2
1.2. Quimioterapia contra el cáncer. Breve reseña histórica.	8
1.3. Química Combinatoria e Hibridación Molecular.	11
1.3.1. Hibridación Molecular y triazolilaminoacil-(peptidil)-penicilinas	13
1.3.2. Estructuras β -lactámicas.....	14
1.3.2.1 Importancia biológica de las estructuras β -lactámicas.....	15
1.3.3. Oxadiazoles.	17
1.3.3.1. Importancia biológica de los anillos oxadiazólicos.	18
1.3.4. Compuestos con el heterociclo isoxazol.	21
1.3.4.1. Importancia biológica de los isoxazoles.	23
1.3.5. Metodologías de síntesis de heterociclos: 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol e isoxazol.....	25
1.3.5.1 Síntesis de 1,3,4-oxadiazoles disustituídos	25
1.3.5.1.1. Formación de 2,5-diaril (alquil)-1,3,4-oxadiazoles a partir de hidrazidas.	25
1.3.5.2. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles disustituídos.....	29
1.3.5.3. Síntesis de isoxazoles.....	34
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS GENERALES Y PLANEAMIENTO DE LA SÍNTESIS	37
2.1 Objetivos generales.	38
2.2 Planeamiento de síntesis.	38
2.2.1 Síntesis de estructuras conteniendo anillos 1,3,4-oxadiazólicos.	38
2.2.1.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.	39
2.2.1.2 Unión de estructuras penicilínicas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.	39
2.2.2. Síntesis de estructuras conteniendo anillos 1,2,4-oxadiazólicos.	41
2.2.2.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.	41
2.2.2.2 Unión de estructuras aromáticas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.....	42

2.2.2.3 Unión de estructuras aminoacídicas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.	42
2.2.2.4 Unión de estructuras aminoacídicas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol en fase sólida.....	43
2.2.3 Síntesis de estructuras conteniendo anillos isoxazólicos.	44
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.1 Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazólico.....	47
3.1.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.	47
3.1.1.1 Síntesis de hidrazidas.	47
3.1.1.1.1. Ensayo de síntesis de hidrazidas utilizando 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) como agente de acoplamiento.....	48
3.1.1.1.2. Ensayo de síntesis de hidrazidas utilizando <i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento.	51
3.1.1.2. Síntesis de 1,3,4-oxadiazoles	52
3.1.1.2.1. Ensayo de síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando anhídrido trifluoroacético (TFAA) como agente ciclodeshidratante.	53
3.1.1.2.2. Ensayo de síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando microondas y POCl ₃ como agente ciclodeshidratante.	56
3.1.1.2.3. Ensayo síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando CBr ₄ y PPh ₃ como agentes ciclodeshidratantes.	58
3.1.2. Unión de estructuras penicilínicas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.	62
3.1.2.1. Formación del ácido 6,6-dibromopenicilánico (34).	63
3.1.2.2. Ensayo de acoplamiento y posterior ciclación entre 34 y la hidrazida derivada del aminoácido de <i>N</i> -Boc-Leu 31b	65
3.2 Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico.....	72
3.2.1. Síntesis de aril-amidoximas.....	73
3.2.2. Síntesis del 3 α -ciano derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (61).	79
3.2.3 Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir de <i>N</i> -Boc-Leu (30b) utilizando activación con 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI).	84
3.2.4. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir de <i>N</i> -Boc-Ala (30f) utilizando activación con HATU y HOBt como coactivante.	85
3.2.5. Síntesis de 4-bromoamidoxima (15b) a partir del ácido 4-bromobenzoico (61-2).	88
3.2.6. Generación de una biblioteca de 1,2,4-oxadiazoles.....	88
3.2.6.1 Análisis del espectro de ¹ H-RMN del compuesto 39ae	89
3.2.7. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir del ácido 6,6-dibromopenicilánico (34). ..	91

3.2.8. Síntesis de derivados dipeptídicos.....	110
3.2.9. Estudio de la síntesis de derivados 1,2,4-oxadiazólicos en fase sólida.....	111
3.2.10. Ensayos biológicos de derivados oxadiazólicos.	120
3.2.10.1. Ensayos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA – CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.	120
3.3. Síntesis de derivados isoxazólicos.....	125
3.3.2. Síntesis de derivados isoxazólicos en fase sólida.....	129
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES	132
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	140
5.1. Condiciones generales.....	141
5.2. Instrumental.....	141
5.3. Gases, reactivos y solventes.....	143
5.4. Metodología general para el desarrollo de la síntesis en fase sólida.	144
5.5. Procedimientos generales y datos analíticos.....	144
5.5.1. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazólico.	144
5.5.1.1. Procedimientos generales para la síntesis de hidrazidas 144	
5.5.1.1.1. Método A para la síntesis de hidrazidas.	145
5.5.1.1.2. Método B para la síntesis de hidrazidas.	145
5.5.1.2. Procedimiento para la síntesis del ácido 6,6-dibromopenicilánico (34)	145
5.5.1.3. Procedimiento general para la esterificación de ácidos con diazometano.....	146
5.5.1.4. Procedimiento general para la síntesis de 1,3,4-oxadiazoles.....	146
5.5.1.5. Caracterización de 1,3,4-oxadiazoles.....	147
5.5.2. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico.	151
5.5.2.1. Procedimientos generales para la síntesis de aril-nitrilos.	151
5.5.2.1.1. Método A para la síntesis de aril-nitrilos.	151
5.5.2.1.2. Método B para la síntesis de aril-nitrilos.	151
5.5.2.2. Procedimientos generales para la síntesis de aril-amidoximas.....	152
5.5.2.2.1. Método A para la síntesis de aril-amidoximas.	152
5.5.2.2.2. Método B para la síntesis de aril-amidoximas.	152
5.5.2.3. Procedimientos generales para la síntesis de amidas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.....	152
5.5.2.4. Procedimiento general para la síntesis de nitrilos derivados de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	153

5.5.2.5. Procedimientos generales para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.....	153
5.5.2.5.1. Método A para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	154
5.5.2.5.2. Método B para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	154
5.5.2.5.3. Método C para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	154
5.5.2.5.4. Método D para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	155
5.5.2.5.5. Método E para la síntesis de amidoximas derivadas de <i>N</i> -Boc-(L)-aminoácidos.	155
5.5.2.6. Procedimiento general para la formación de cloruros de ácido.	155
5.5.2.7. Procedimiento general para la síntesis de la amida derivada del ácido 6,6-dibromopenicilánico (57).	155
5.5.2.8. Procedimiento general para la síntesis del ciano derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (61).	156
5.5.2.9. Procedimientos generales para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	156
5.5.2.9.1. Método A para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	156
5.5.2.9.2. Método B para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	157
5.5.2.9.3. Método C para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	157
5.5.2.9.4. Método D para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	157
5.5.2.9.5. Método E para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	157
5.5.2.9.6. Método F para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	158
5.5.2.9.7. Método G para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	158
5.5.2.9.8. Método H para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.	158
5.5.2.10. Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Boc.	158
5.5.2.11. Procedimiento general para la formación de derivados dipeptídicos 44ba y 44fc	159
5.5.2.12. Caracterización de 1,2,4-oxadiazoles.	159
5.5.2.12. Procedimientos generales en los estudios dirigidos a la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles en fase sólida.	173
5.5.2.12.1. Procedimiento para la unión del ácido 2-bromoacético a la resina de Wang.	173
5.5.2.12.2. Procedimiento general para la unión de aminas primarias a la resina 63a	174
5.5.2.12.3. Procedimiento general para la formación de amidas derivadas de Fmoc-aminoácidos.	174
5.5.2.12.4. Procedimiento general para la desprotección del grupo Cbz en solución.	174

5.5.2.13. Ensayos biológicos de derivados oxadiazólicos.....	174
5.5.2.13.1. Ensayos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA – CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.....	174
5.5.2.13.1.1. Líneas celulares	174
5.5.2.13.1.2. Ensayo de proliferación.....	175
5.5.3. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo isoxazol.....	175
5.5.3.1. Procedimiento general para la síntesis de aldoximas.....	175
5.5.3.2. Procedimiento general para la síntesis de cloro-oximas.	176
5.5.3.3. Procedimiento para la obtención del alcohol derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (90).	176
5.5.3.4. Procedimiento para la esterificación del alcohol 90 con ácido propiólico.	176
5.5.3.5. Procedimiento para la obtención de los derivados 3,4 y 3,5 penicilín-fenil-isoxazol 49a-a y 49a-b mediante cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre en solución.	177
5.5.3.8. Procedimiento para la separación de compuestos unidos a resina de Wang.	178
5.5.3.9. Procedimiento general para la desprotección del grupo amina en Fmoc-AA-resina de Wang.	178
5.5.3.10. Procedimiento general para la obtención de <i>N</i> -propiolil aminoácidos unidos a resina de Wang.....	179
5.5.3.11. Procedimiento general para obtención de aminoacilisoxazoles en fase sólida mediante cicloadición 1,3-dipolar.	179
5.5.3.12. Caracterización de aminoacil-isoxazoles.....	180
CAPÍTULO 6: ESPECTROS SELECCIONADOS	183
6.1. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 33b1	184
6.2. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 33ba	184
6.3. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 36b	185
6.4. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 36a (En acetona-d).....	186
6.5. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 36c	186
6.6. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 17a1	187
6.7. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39ab	188
6.8. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39af	188
6.9. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39ah	189
6.10. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39ae	190
6.11. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39bf	190
6.12. Espectro de RMN de ¹ H (arriba) y de ¹³ C (abajo) de 39bb	191

6.13. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41a	192
6.14. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41b	192
6.15. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41c	193
6.16. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41i	194
6.17. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41f	194
6.18. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41g	195
6.19. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41j	196
6.20. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41k	196
6.21. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41l	197
6.22. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41m	198
6.23. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41d	198
6.24. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41h	199
6.25. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41e	200
6.26. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44b	200
6.27. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44h	201
6.28. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44d	202
6.29. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44k	202
6.30. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44a	203
6.31. Espectro de RMN de ^1H (arriba) de 44j	204
6.32. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44g	204
6.33. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44l	205
6.34. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44ba	205
6.35. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 44dc	206
6.36. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 49aa y 49ab	207
6.37. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55ama'	207
6.38. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55fma'	208
6.39. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55fmb'	208
6.40. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55aaa'	209
6.41. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55aca'	210
6.42. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55aka'	210
6.42. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 55akb'	211
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	212



6-APA	Resina de Wang
AA	Ácido 6-aminopenicilánico
Abs	Aminoácido
ac.	Absorbancia
ADEPT	Acuoso
	Terapia de profármacos enzimáticos dirigida por anticuerpos (<i>Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>)
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad
Ala	Alanina
AMPA	Receptor de glutamato inotrópico
anh.	Anhidro
B16-F0	Melanoma murino
BALB/c:	Ratón albino
Bn	Bencilo
Boc	terc-butoxicarbonilo
CAN	Nitrato de amonio cérico
cat.	Cantidades catalíticas
Cbz	Grupo carboxibencilo
cc.	Concentrado
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDI	1,1-carbonildiimidazol
d	Doblete
DBU	2,3,4,6,7,8,9,10-octahidropirimido [1,2-a] azepina
DCC	N, N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DIB	Diisobutileno
DIC	N, N'-Diisopropilcarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMC	2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EE	Error estándar
eq.	Equivalentes
ER	Receptor de estrógenos
Et	Grupo etilo
Fmoc	Cloruro de fluorenilmetoxicarbonilo
Gly	Glicina
h	horas
HATU	1- [bis (dimetilamino) metilen] -1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] piridinio 3-óxido hexafluorofosfato
HM	Hibridación Molecular

HMBC	Correlación cuántica heteronuclear múltiple (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HRMS	espectrometría de masa de alta resolución (<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear (<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
HTS	Ensayos biológicos de alta <i>eficiencia</i> (<i>High-Throughput Screening</i>)
I+D	Investigación y desarrollo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
Ile	Isoleucina
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Leu	Leucina
LM3	Adenocarcinoma mamario
Lys	Lisina
Me	Grupo metilo
Met	Metionina
min.	Minutos
NE	No ensayado
NMuMG	Glándula mamaria murina normal
NR	No produjo reacción
Nu.	Nucleófilo
Phe	Fenilalanina
ppm	parte por millón
Pro	Prolina
Py	Piridina
REA	Relación estructura actividad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rto.	Rendimiento
s	Singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T3P	Anhídrido del ácido propanofosfónico
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBTU	Tetrafluoroborato de 2- (1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilaminio
TCCA	Ácido tricloroisocianúrico
td	Triple doblete
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
TsCl	Cloruro de tosilo
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta

Val	Valina
W	Vatio
WST-1	4- [3- (4-yodofenil) -2- (4-nitrofenil) -2H-5-tetrazolio] -1,3-benceno disulfonato
δ	Desplazamiento químico

En el nuevo milenio, la síntesis orgánica se ha enfrentado a nuevos desafíos con respecto a la generación de pequeñas moléculas no solo para encontrar compuestos líderes para el descubrimiento de fármacos, sino también para mejorar nuestra comprensión de diferentes procesos biológicos. La capacidad de las moléculas pequeñas para interactuar con las biomacromoléculas e interrumpir su funcionamiento normal las ha convertido en cruciales en Química Biológica, Nanomedicina y Genética Química, y ha ampliado los horizontes de la síntesis orgánica. Los heterociclos están casi omnipresentes en productos naturales, así como en muchos agentes terapéuticos, siendo por tanto un factor clave en la generación de pequeñas moléculas.

La presente tesis fue dirigida al diseño y síntesis de moléculas pequeñas formadas por compuestos híbridos que combinan una porción penicilínica y otras estructuras de interés a través de un heterociclo, y su posterior evaluación biológica frente a distintas líneas celulares tumorales.

En una primera instancia, se trabajó en la síntesis de moléculas formadas por la unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol. Posteriormente, y continuando con la misma línea de trabajo, se acopló una porción penicilínica a diferentes cadenas aminoácidas por medio del mismo heterociclo.

La segunda fase del trabajo de Tesis fue direccionada a la obtención de compuestos híbridos 1,2,4-oxadiazólicos. En esta etapa se investigaron y optimizaron diferentes metodologías para la formación de compuestos conteniendo los tres bloques estructurales de interés.

Finalmente, propusimos la síntesis de una estructura híbrida conteniendo un anillo isoxazólico y una estructura penicilínica. El método popular para la conjugación de dos restos orgánicos a través de este tipo de heterociclo es por medio de una cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino y un óxido de nitrilo, que permitió obtener los dos regioisómeros en una proporción diferente a la esperada de acuerdo con la literatura. Además, se desarrolló una estrategia paralela de

cicloadición de óxido de nitrilo en fase sólida para sintetizar una variedad de isoxazoles utilizando nuevamente la química de cicloadición 1,3-dipolar.

Los resultados presentados en este Trabajo de Tesis representan una interesante contribución a la generación de compuestos híbridos de interés biológico. Se obtuvo a través de desafiantes procesos sintéticos una biblioteca de híbridos que contienen anillos oxadiazol e isoxazol. Algunos de estos compuestos presentaron interesantes niveles de selectividad en estudios de actividad antiproliferativa, por lo cual pueden considerarse promisorios como punto de partida en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Química Medicinal y el desarrollo de nuevos fármacos.

La Química Medicinal es una disciplina en la que se aplican los principios de la Química y la Biología para la creación de conocimiento que conduzca a la obtención de nuevos agentes terapéuticos. Por lo tanto, el objetivo principal de la Química Medicinal es el diseño, la síntesis, la identificación, la evaluación e interpretación a nivel molecular del modo de acción de nuevos compuestos biológicamente activos. Así como establecer relaciones entre la estructura química y la actividad farmacológica (IUPAC, Boletín N°13, 1970).¹

El desarrollo de un nuevo fármaco (sustancia química que se utiliza para prevenir o curar una enfermedad) requiere no solo el diseño y síntesis, sino que también el desarrollo de métodos y procedimientos de prueba, que son necesarios para establecer cómo una sustancia opera en el cuerpo y su idoneidad para su uso como fármaco. Por lo tanto, es un proceso en el que resulta fundamental el conocimiento profundo del blanco biológico sobre el que se desea actuar.

Un fármaco es, por lo general, una molécula orgánica pequeña que activa o inhibe la función de una biomolécula tal como una proteína o un receptor, lo cual se traduce en un beneficio terapéutico en el organismo suministrado.² El efecto farmacológico de un fármaco se conoce como su actividad, mientras que la medida cuantitativa de su efectividad como potencia. Los fármacos interfieren en los procesos biológicos, por lo tanto, no existe fármaco seguro, aun el paracetamol o la aspirina tienen efectos colaterales o sea efectos no deseados.

El padre de la Química Medicinal moderna fue Paul Ehrlich quien introdujo los primeros conceptos para el Desarrollo Racional de Fármacos. Reconoció primero que, para la evaluación de un fármaco, tanto conocer sus efectos benéficos como sus efectos tóxicos era necesario e importante. Buscando nuevos agentes antibacterianos, también reconoció que los fármacos más efectivos eran aquellos que tenían la mayor selectividad contra el microorganismo respecto al hospedador.

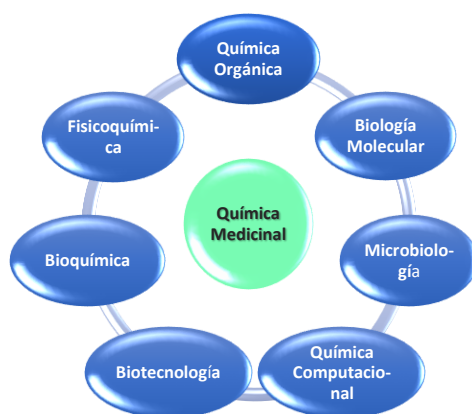


Figura 1: Disciplinas de las que se nutre la Química Medicinal

La química medicinal es considerada un área de investigación interdisciplinaria ya que se nutre de otras disciplinas como la Química Orgánica, la Fisicoquímica, la Química Computacional, la Bioquímica, la Biotecnología, la Biología Molecular, la Microbiología, entre otras (Figura 1). En los últimos años, los grandes avances en las ciencias biológicas han permitido tener mayor conocimiento sobre el cuerpo humano tanto a nivel celular como molecular, por lo tanto, muchas de las industrias farmacéuticas y universidades han emprendido proyectos de investigación identificando en primera instancia una biomacromolécula objetivo y diseñando posteriormente un fármaco que interactúe sobre ella.³

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 (Esquema 1).



Esquema 1: Proceso de investigación y desarrollo de un fármaco

Para el surgimiento de un nuevo fármaco se necesitan entre 10 y 15 años y el costo se estima entre 800 y mil millones de dólares estadounidenses. Este número incluye el costo de miles de fracasos y se estima que, de 10000 o más compuestos que ingresan a investigación y desarrollo (I + D), solo uno supera todas las pruebas necesarias.

Como se mencionó anteriormente, los científicos trabajan para conocer o identificar una biomacromolécula objetivo, es decir una diana terapéutica sobre la cual actuar. Para ello se requiere conocer en profundidad la enfermedad que desea tratar. Esto incluye comprender, por ejemplo, cuáles son los genes que se encuentran alterados, su implicancia en las proteínas que codifican y cómo estas proteínas interactúan entre sí en las células en las cuales se encuentran. Por último, es necesario entender cómo las células afectadas cambian el tejido específico en el que se encuentran y finalmente analizar las repercusiones en el organismo entero.

Una vez conocida la biomacromolécula objetivo, los pasos siguientes involucran la identificación de compuestos activos sobre esa diana terapéutica. En este contexto, el cribado de alta capacidad o HTS (*High Throughput Screening*) es una fase temprana que se encuentra en el núcleo del proceso de descubrimiento de fármacos, el cual consiste en la evaluación de miles de

compuestos a una concentración fija para obtener una respuesta de “sí o no” en términos de actividad de un objetivo biológico determinado utilizando un bioensayo adecuado. Es una etapa tan importante que para su diseño e implementación es necesario el aporte de especialistas de distintas áreas científicas,⁴ finalizando con el descubrimiento de compuestos líderes.⁵ Un compuesto líder tiene la actividad biológica o farmacológica deseada, pero suele presentar también ciertas características contraproducentes: alta toxicidad, inestabilidad, problemas metabólicos, actividades biológicas secundarias, etc. Por lo tanto, el compuesto líder es sometido a modificaciones químicas para mejorar así sus características y llegar a un compuesto “candidato” (líder optimizado) que será utilizado en las fases clínicas, que es la etapa anterior a la aprobación como fármaco comercial. La optimización de las estructuras líderes requiere de estudios estructurales y computacionales para permitan resultados que relacionen la estructura con la actividad (REA) y analizar también la forma de interacción de la molécula con su objetivo biológico (*docking*). Este análisis lleva a la síntesis de nuevos compuestos en función de los datos obtenidos. De esta forma, se crea un “ida y vuelta” entre el químico y el biólogo, ya que es éste el que realiza las pruebas *in vitro* y serán los resultados de las mismas las que guiarán las nuevas modificaciones sintéticas hechas por el químico, que serán analizadas nuevamente por el biólogo en un proceso iterativo hasta llegar al compuesto candidato.

A partir de este punto comienza la etapa de desarrollo, pasos necesarios para que el fármaco pueda llegar a ser comercializado. El compuesto candidato (aquel que superó las pruebas biológicas *in vitro*) es sometido a pruebas biológicas *in vivo* que consisten en la utilización de cultivos de células vivas y modelos animales. Estas pruebas se clasifican en distintas fases:⁶

- Fase preclínica en la cual el fármaco se prueba en animales para saber si pueden ser evaluadas en humanos.
- Fase I de las pruebas clínicas: donde se evalúa el fármaco en un pequeño grupo de voluntarios sanos con el objetivo de determinar efectos secundarios, dosis, farmacocinética (ADMET: absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad).

- Fase II de las pruebas clínicas: en la cual se evalúa el fármaco en un pequeño grupo de personas enfermas para determinar la efectividad.
- Fase III de las pruebas clínicas: aquí se trata a un mayor número de personas enfermas y donde se satisfacen los requerimientos de eficacia y seguridad de los organismos regulares.
- Fase IV de las pruebas clínicas también llamada farmacovigilancia que es una etapa de control del fármaco cuando ésta ya se encuentra en el mercado.

El cáncer puede clasificarse como una enfermedad multifactorial, que es fomentada rápidamente por una combinación de factores genéticos, epigenéticos y ambientales que trabajan juntos para la progresión de la enfermedad.⁷

En la actualidad el cáncer se ha transformado en uno de los problemas sanitarios más graves en todo el mundo, siendo una de las principales causas de muerte. Generalmente esta patología está relacionada con la vejez, el estilo de vida y los hábitos de las personas. Muchos factores han contribuido a lograr un mayor grado de supervivencia en la población: el diagnóstico precoz, el acceso universal a la atención de la salud y los avances en las terapias.⁸

No obstante, el número de casos nuevos de cáncer aumentó en aproximadamente un 33% en la década 2005-2015, principalmente debido al aumento demográfico y al incremento de la esperanza de vida.⁹

En cuanto a esta enfermedad, vale aclarar ciertos conceptos: neoplasia es el término que se utiliza en medicina para referirse a la formación de un neoplasma o tumor, es decir, cualquier crecimiento descontrolado de células o tejidos anormales en un organismo. Con frecuencia, se utiliza la palabra tumor para describir la inflamación perceptible de un neoplasma. Cuando el neoplasma no crece de forma agresiva ni descontrolada (neoplasma benigno) no invade los tejidos adyacentes o cercanos y, por lo tanto, no se disemina a lo largo del organismo. Por el contrario, cuando el neoplasma crece rápidamente invadiendo los tejidos circundantes se disemina por todo el organismo (neoplasma maligno)

por un proceso denominado metástasis (Figura 2). Cáncer es la expresión adecuada para referirse a los neoplasmas malignos.¹⁰

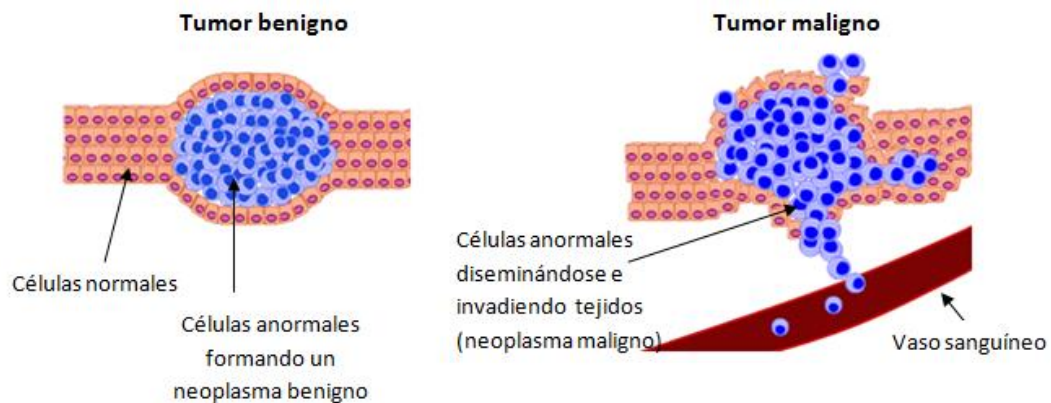


Figura 2: Diferencias entre tumor benigno y maligno.

Uno de los principales métodos para combatir esta enfermedad es la quimioterapia. Inicialmente este tratamiento permite que los tumores presenten una respuesta satisfactoria, reduciendo sus tamaños y la tasa de crecimiento. Sin embargo, las células cancerosas posteriormente pueden generar mecanismos para evadir los efectos tóxicos de los fármacos quimioterapéuticos desarrollándose de esta forma una enfermedad progresiva.¹¹ Por esta razón es importante continuar generando fármacos con estructuras químicas nuevas y que presenten diferentes mecanismos de actividad intracelular.

El problema principal de la quimioterapia es la dificultad del fármaco de distinguir entre las células cancerosas y las células normales. Esto genera efectos adversos en las terapias que producen una serie de inconvenientes al paciente debido a los efectos tóxicos de los fármacos. En la actualidad existen distintos enfoques que posibilitan que la terapia química sea lo menos agresiva posible para el paciente. Algunos de estos enfoques están basados en la búsqueda de nuevos medicamentos y combinaciones de ellos. Se trata de encontrar fármacos que estén específicamente dirigidos a células cancerosas preservando la viabilidad de las células normales. El desarrollo de fármacos que actúen contra un blanco molecular específico en las células cancerígenas se conoce como terapia dirigida. A diferencia de la terapia convencional que tiene un enfoque más empírico y citotóxico en la cual los pacientes padecen los

efectos secundarios en la terapia dirigida estos efectos están mucho más atenuados.⁹

1.2. Quimioterapia contra el cáncer. Breve reseña histórica.

La terapia química contra el cáncer fue iniciada a partir de una familia de compuestos químicos denominados mostazas, miembros de los agentes quimioterapéuticos alquilantes. Originalmente una subfamilia de éstas, las mostazas sulfuradas, fueron utilizadas durante la Primera Guerra Mundial como arma química, en el llamado “gas mostaza” (Figura 3).¹² La exposición a estos compuestos producía la inhibición de la formación de la médula ósea (aplasia). Basado en estas observaciones, estos compuestos se tuvieron en cuenta para el tratamiento de la leucemia. Durante la década de 1940 las mostazas fueron extensamente estudiadas. Se destacaron los estudios de Gilman y Goodman en colaboración con Gustav Lindskog sobre los efectos citotóxicos sobre los tejidos linfoides de mostazas nitrogenadas, también llamadas mustina (Figura 3) que marcaron el comienzo real de la quimioterapia contra el cáncer.¹³



Figura 3: Compuestos mostaza.

Años más tarde comenzaron a conocerse nuevas aproximaciones quimioterapéuticas para tratar distintos tipos de cáncer. En 1948 Farber, un patólogo pediátrico estadounidense, publicó su investigación sobre el efecto de la aminopterina, (Figura 4) un análogo del ácido fólico, en la atenuación temporal de la leucemia aguda en niños.

Sugirió que debido a que el ácido fólico favorece el crecimiento, un antagonista de esta vitamina, podría tener cierto valor en el tratamiento contra la leucemia.¹⁴ En este sentido se desarrollaron otros análogos de ácido fólico como el metotrexato que funcionaban como antagonistas con efectos prolongados contra la leucemia (Figura 4).

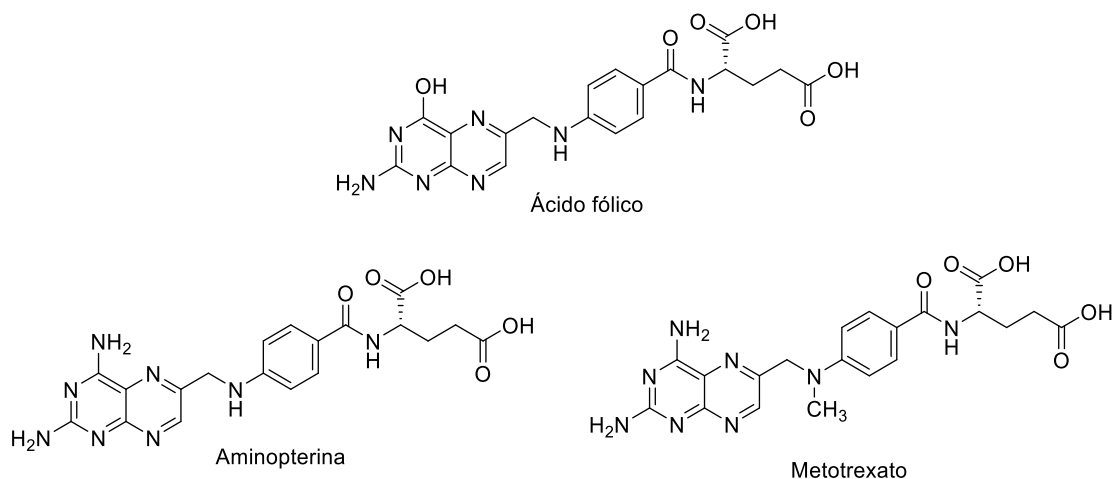


Figura 4: Análogos del ácido fólico.

A principios de la década de 1950, a través de los trabajos de George H. Hitchings, Gertrude B. Elion Howard. Skipper y J. Richard Thomson se evidenciaron los efectos anticancerígenos de la 6-mercaptopurina (Figura 5), un análogo de purina que producía inhibición de la síntesis del ADN en las células cancerosas en un tipo de leucemia.¹⁵

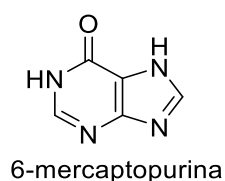


Figura 5: Estructura de la 6-mercaptopurina.

En la década siguiente. Irving S. Johnson, James G. Armstrong, Marvin Gorman y J. Paul Burnett, del grupo de investigación de productos naturales de los laboratorios Lilly, encontraron actividad antilinfocítica en alcaloides extraídos de la planta *Vinca rosea Linn.* Se han encontrado numerosos alcaloides químicamente relacionados entre sí, de los cuales cuatro resultaron bioactivos: vinblastina, vinleurosina, vincristina, vinrosidina (Figura 6).¹⁶

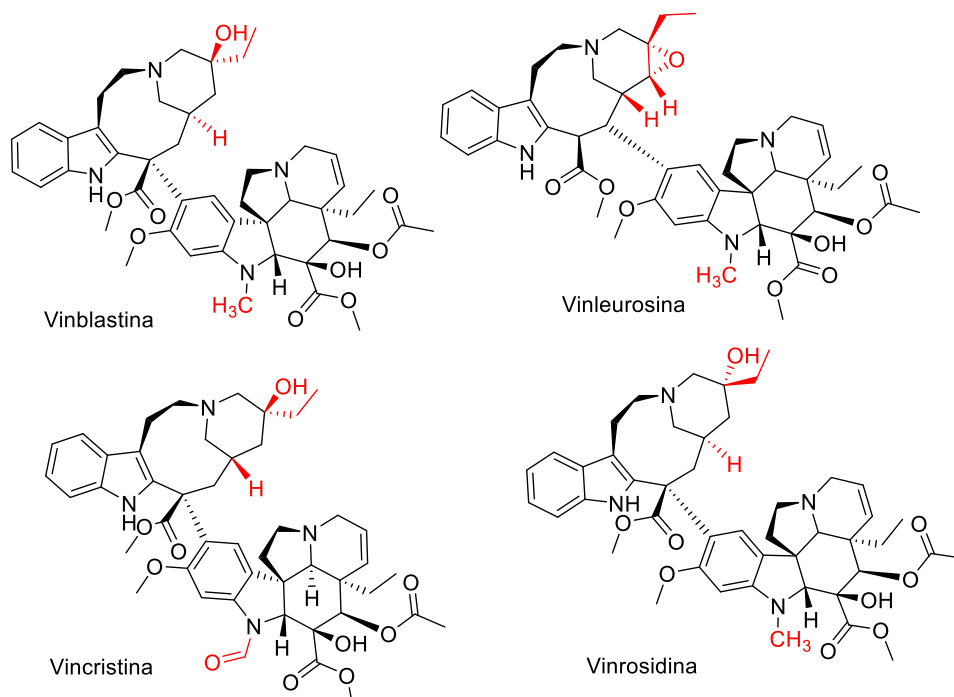


Figura 6: Alcaloides bioactivos extraídos de la planta *Vinca rosea* Linn.

Otros fármacos quimioterapéuticos de origen biológico muy importante es el paclitaxel que se comercializa bajo el nombre de taxol (Figura 7) Se trata de un alcaloide diterpeno que fue aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*. Tiene un mecanismo de acción único el cual promueve polimerización y estabilización de los microtúbulos en las células vivas, lo que lleva a una inhibición de la replicación celular.¹⁷

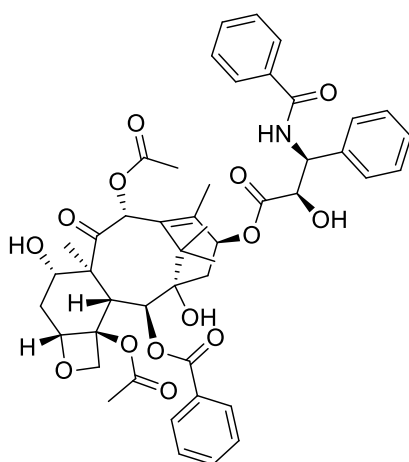


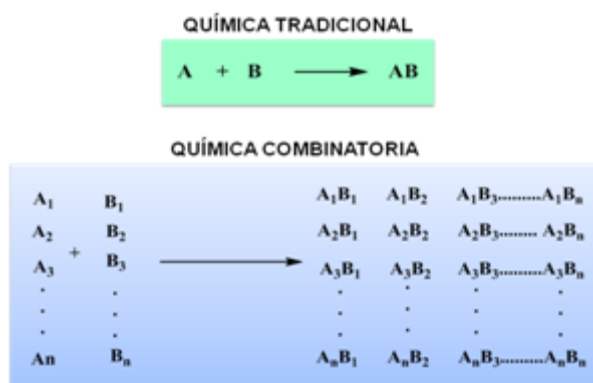
Figura 7: Estructura del paclitaxel.

1.3. Química Combinatoria e Hibridación Molecular.

Debido a la gran demanda de compuestos requerida por la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevos fármacos, es necesaria la obtención de una considerable cantidad de moléculas con potencial actividad biológica en el menor tiempo posible y con la mayor heterogeneidad. Si bien los ensayos biológicos automatizados de alto rendimiento permiten analizar miles a cientos de miles de compuestos a la vez, la química tradicional no puede aportar nuevos compuestos con tanta rapidez.

En este sentido, la Química Combinatoria es una de las metodologías desarrollada en las últimas décadas por los investigadores de la industria farmacéutica para reducir los costos y el tiempo asociados con la producción de nuevos compuestos para “alimentar” los equipos de *screening* biológico automatizado. De esta manera se acelera el proceso de síntesis química y por lo tanto aumenta la posibilidad de encontrar compuestos candidatos a ser desarrollados como fármacos.

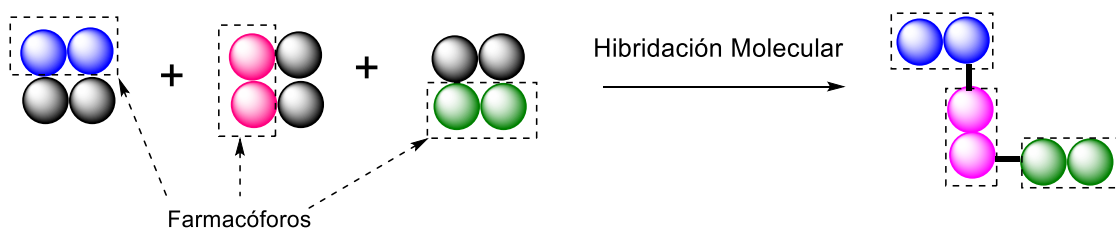
Mientras que la química clásica o tradicional busca obtener en cada etapa un único compuesto, la Química Combinatoria es una estrategia que permite construir rápida y simultáneamente grandes colecciones de compuestos, con una amplia diversidad estructural (Esquema 2).¹⁸



Esquema 2: A diferencia de la síntesis tradicional, en la que se obtiene un producto por vez, los métodos de Química Combinatoria dan lugar a gran cantidad de productos al mismo tiempo.

La Química Combinatoria puede ser llevada a cabo en un medio homogéneo (fase líquida o disolución) o heterogéneo (fase sólida) donde el

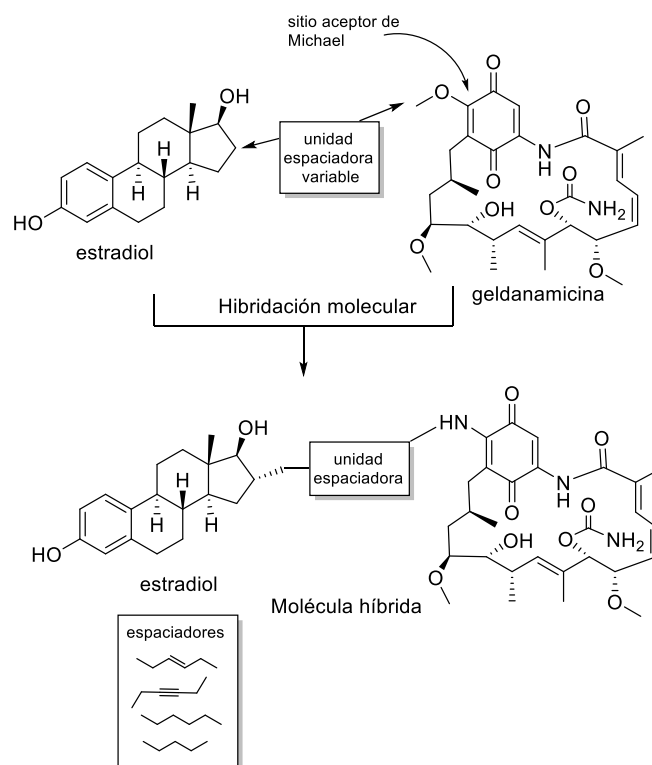
material que va a ser transformado se encuentra acoplado a un soporte sólido, polimérico e insoluble en solventes orgánicos llamado resina. Por otra parte, en los últimos años, la química de productos naturales ha estado volviendo a una posición prominente en la exploración de compuestos bioactivos lo que ha llevado a la industria farmacéutica a realizar nuevas inversiones en investigación de productos cuyo origen es vegetal, animal o de microorganismos. La enorme diversidad química de estos productos ha inspirado a la Química Medicinal a utilizarlos como plantillas para el descubrimiento de nuevos fármacos y la planificación de nuevos derivados sintéticos y semisintéticos.¹⁹ En este contexto, la Hibridación Molecular surge como una estrategia racional para el diseño de nuevos prototipos basándose en el reconocimiento de las subunidades farmacofóricas de dos o más derivados con actividad biológica, las cuales a través de una fusión adecuada, conduce al diseño de una nueva arquitectura híbrida que mantienen las principales características de las plantillas originales (Esquema 3).²⁰



Esquema 3: Esquema general del proceso de Hibridación Molecular.

El uso plantillas, cuyas propiedades fisicoquímicas y características farmacológicas (mecanismo de acción, toxicidad, etc.) ya son conocidas lleva a la posibilidad de desarrollo de nuevas quimiotecas de gran diversidad.

En la literatura hay numerosos trabajos en los que se utiliza esta estrategia de síntesis con diferentes objetivos terapéuticos. Por ejemplo, Kuduk²¹ y colaboradores quienes en 1999 propusieron la síntesis de híbridos de estradiol con geldanamicina (antibiótico antitumoral que se une a la proteína chaperona Hsp90 y provoca la degradación de varias proteínas de señalización importantes) con el objetivo de obtener moléculas híbridas capaces de causar la degradación para inducir la degradación selectiva del receptor de estrógenos (ER) que está altamente expresado en varios tipos de cáncer mama (Esquema 4).



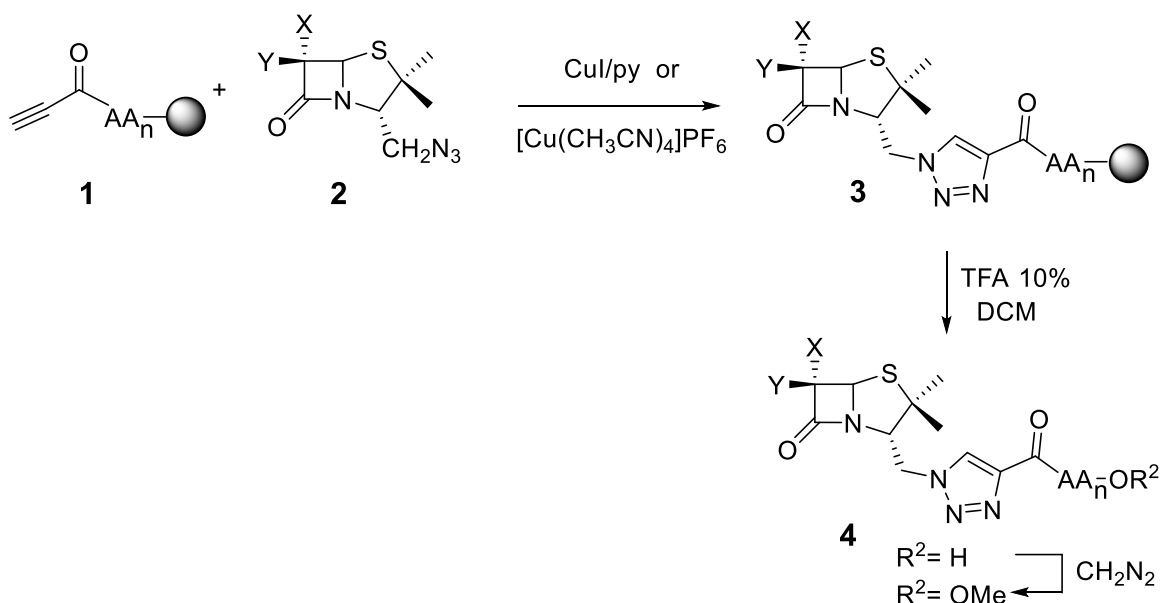
Esquema 4: Ejemplo de hibridación molecular: híbridos de estradiol con geldanamicina.

1.3.1. Hibridación Molecular y triazolilaminoacil-(peptidil)-penicilinas

Desde hace unos años en nuestro laboratorio se trabaja en la aplicación de metodologías de síntesis en fase sólida a estructuras β -lactámicas. Dado el interés desde el punto de vista clínico que poseen estos compuestos, resulta interesante el uso de diferentes derivados β -lactámicos para la generación de quimiotecas de compuestos potencialmente bioactivos. Entre las estructuras β -lactámicas, los derivados de penicilina son buenos candidatos dado su interesante actividad biológica, amplio espectro de actividad y baja toxicidad.²²

Por otro lado se sabe que estructuras peptídicas poseen actividades biológicas interesantes²³ al igual que estructuras heterocíclicas tales como triazoles, oxadiazoles, tiadiazoles, etc.²⁴ Por lo tanto, la estrategia de hibridación molecular (HM)¹⁹ es una herramienta poderosa para la construcción de quimiotecas de compuestos de potencial interés biológico, llevadas a cabo mediante la conjugación de un derivado de penicilina con una porción peptídica o aminoacídicas, a través de una estructura heterocíclica, dando origen a una serie de compuestos híbridos que presentan varios puntos de diversidad.

Como antecedente de esta estrategia, en nuestro laboratorio se ha logrado con éxito la fusión de un derivado de penicilina con una porción peptídica, a través de un grupo 1,2,3-triazol utilizando como metodología la síntesis en fase sólida (Esquema 5).²⁵



Esquema 5: Esquema general de la síntesis de un derivado penicilánico unido a una porción peptídica a través de un grupo 1,2,3-triazol.

1.3.2. Estructuras β -lactámicas

El nombre lactama está dado a amidas cíclicas y es análogo al nombre lactona dado a ésteres cíclicos. En la vieja nomenclatura, el segundo carbono en un ácido carboxílico alifático se designa como alfa, el tercero como beta, y así sucesivamente. Así, β -lactama es una amida cíclica con cuatro átomos en su anillo. El nombre contemporáneo de este sistema anular es 2-azetidinona (Figura 8).²⁶

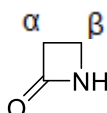


Figura 8: β -lactama o 2-azetidinona

La penicilina, una subclase de antibiótico β -lactámico, se caracteriza por la presencia de un anillo de tiazolidina substituído, fusionado con el anillo β -lactámico. Esta fusión y la quiralidad del anillo β -lactámico resulta en una molécula una estructura conformacional en forma de "V" (Figura 9). Esto afecta drásticamente la planaridad del enlace lactámico y la resonancia del nitrógeno lactámico con el grupo carbonilo. En consecuencia, el anillo β -lactámico es mucho más sensible a la hidrólisis comparado amidas planas normales.²⁶

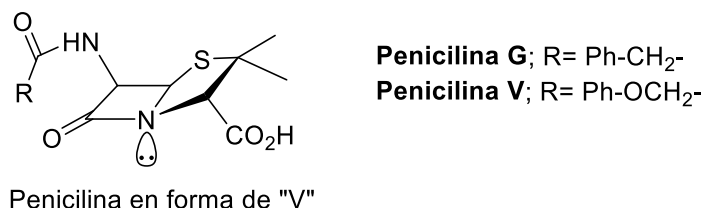


Figura 9: Conformación en "V" de la molécula de penicilina.

1.3.2.1 Importancia biológica de las estructuras β -lactámicas.

Los antibióticos β -lactámicos siguen siendo los productos más utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. En estos antibióticos los farmacóforos, es decir las partes responsables de la bioactividad en la molécula, son estructuras bicíclicas, conformacionalmente rígidas: cefams/cefems y penams/penems (Figura 10). Estos farmacóforos contienen el anillo β -lactámico.²⁷

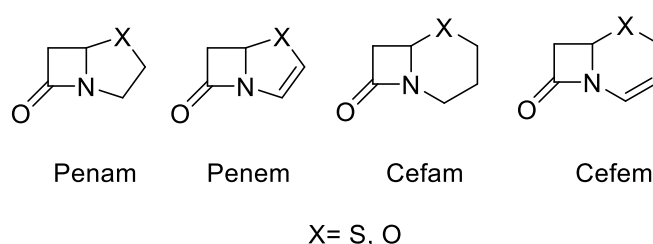
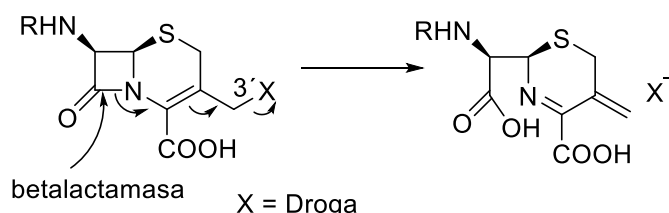


Figura 10: Núcleos de los principales antibióticos β -lactámicos.

Esta clase de compuestos interfieren con la biosíntesis del peptidoglicano, el componente principal de la pared celular bacteriana. Las moléculas antibióticas acilan irreversiblemente el sitio activo de la enzima transpeptidasa, y como consecuencia, el entrecruzamiento de los filamentos de peptidoglicano no puede tener lugar. Esto debilita la pared celular bacteriana, la célula sucumbe a la alta presión osmótica y estalla.²⁷

Estas moléculas siguen siendo populares debido a su toxicidad limitada o inexistente, su alta efectividad y su bajo costo, entre otros atributos. Los compuestos β -lactámicos, en general, son un gran grupo de compuestos que se han utilizado no solo como terapia antimicrobiana sino también se han estudiado como alternativa novedosa para el tratamiento del cáncer.²⁸

Se han desarrollado algunas estrategias para usar β -lactamas en el tratamiento del cáncer: una de ellas es el uso de compuestos β -lactámicos como profármacos, donde la fácil escisión del anillo β -lactámico ayuda a lograr la expulsión de un sustituyente en posición 3' que funcionaría como el elemento citotóxico (Esquema 6).



Esquema 6: Reacción del profármaco de cefalosporina. La enzima β -lactamasa induce la escisión hidrolítica del anillo de β -lactama, lo que provoca una reacción secundaria que conduce a la liberación del medicamento contra el cáncer en la posición 3'.

La estrategia de usar a los β -lactámicos como profármacos se aplica a terapias dirigidas que atacan a las células cancerosas de manera más específica que los medicamentos quimioterapéuticos convencionales. Particularmente se utiliza en la técnica denominada *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT)²⁹ (Figura 11), en la que anticuerpos específicos de unión a las células cancerígenas están unidos a enzimas (β -lactamasas, en el caso de cefalosporinas) que posibilitan la escisión del profármaco y liberación del elemento citotóxico.

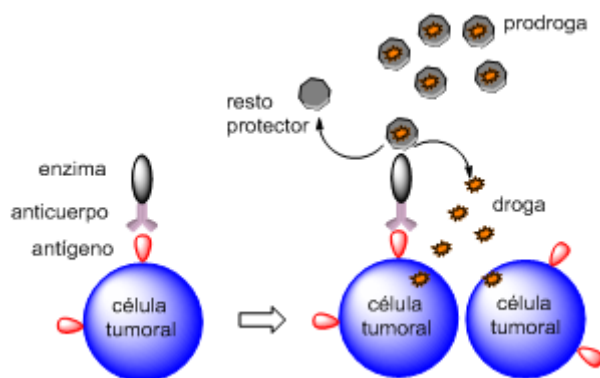


Figura 11: Principio básico de ADEPT.

De hecho, la síntesis de nuevas estructuras como las β -lactamas *N*-tioladas (Figura 12) resultó con una alta capacidad de inducir daño en el ADN, detención del crecimiento y apoptosis en células cancerosas humanas cultivadas.³⁰

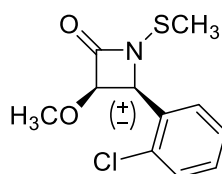


Figura 12: β -lactama L-1 con actividad anticancerígena.

1.3.3. Oxadiazoles.

Los oxadiazoles son una importante clase de heterociclos presentes en un gran número de moléculas biológicamente activas.

Desde el punto de vista químico, los oxadiazoles son anillos de cinco miembros conteniendo un átomo de oxígeno y dos de nitrógeno. En la literatura más antigua estos anillos eran llamados furadiazoles, debido a que eran considerados como un núcleo de furano en el cual dos "CH" eran reemplazados por nitrógenos. Cuando se utilizaba este nombre, las posiciones relativas de los átomos de nitrógeno se indican por las letras α y β . Si bien actualmente se utiliza una forma más sistemática para identificar los diferentes tipos de oxadiazoles, originalmente se conocían como "Azoxima" (al 1,2,4-oxadiazol) y "Furazan" (al 1,2,5-oxadiazol). Tiemann y Krüger,³¹ quienes prepararon el primer 1,2,4-oxadiazol, propusieron el nombre "Azoxima" basándose en la vieja literatura

alemana, pero el mismo ha quedado en desuso debido a la practicidad de la nomenclatura sistemática.

Una de las propiedades que hacen de los oxadiazoles interesantes desde el punto de vista de la química medicinal es su estabilidad en medio acuoso.

Los oxadiazoles son bases muy débiles debido al efecto inductivo del heteroátomo extra. El reemplazo de dos grupos CH en el anillo de furano por dos nitrógenos del tipo piridina (-N) reduce la aromaticidad del anillo de oxadiazol resultante a tal punto que el oxadiazol exhibe un carácter de dieno conjugado. Debido a la baja densidad electrónica en los átomos de carbono, el anillo de oxadiazol es extremadamente resistente a sustituciones electrofílicas sobre estos átomos. Sin embargo, si el anillo de oxadiazol está sustituido con grupos dadores de electrones, el ataque electrofílico ocurre sobre el átomo de nitrógeno. El ataque nucleofílico es un poco más complicado sobre el anillo de oxadiazol, sin embargo, oxadiazoles sustituidos con halógenos pueden ser sometidos a sustitución nucleofílica con el reemplazo del átomo de halógeno por el nucleófilo.³²

De acuerdo con las posiciones relativas que pueden tomarlos átomos de nitrógeno y oxígeno, encontramos cuatro tipos diferentes de oxadiazoles o isómeros estructurales (Figura 13).

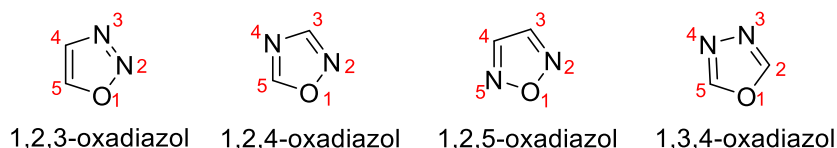


Figura 13: Diferentes isómeros estructurales del anillo oxadiazólico.

1.3.3.1. Importancia biológica de los anillos oxadiazólicos.

El descubrimiento de los oxadiazoles ha conducido al desarrollo de compuestos de importancia medicinal con una amplia gama de actividades biológicas: antibacterianos, antivirales, anticancerígenos, herbicidas, etc. Por lo tanto, se consideran un *scaffold* para el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Entre los posibles isómeros estructurales, el 1,3,4-oxadiazol y el 1,2,4-oxadiazol son los más conocidos y más ampliamente estudiados por los investigadores debido a muchas propiedades químicas y biológicas significativas. En particular, el isómero 1,3,4-oxadiazol se ha convertido en un importante bloque de construcción para el desarrollo de nuevos fármacos. Compuestos que poseen el heterociclo 1,3,4-oxadiazol pueden tener un amplio espectro de actividad biológica como ser antibacterianos, antifúngicos, propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antivirales, anticancerígenos, antihipertensivas, anticonvulsivas, antidiabéticas, entre otras.³³ También han despertado interés en la química medicinal como bioisómeros de ácidos carboxílicos, ésteres, y carboxamidas.³⁴ Dichos grupos suelen ser inestables en los medios biológicos, lo que plantea un obstáculo para su uso en la estructura de los candidatos a fármacos.³⁵

Actualmente pueden encontrarse en clínica médica algunos ejemplos de fármacos que contienen un anillo 1,3,4-oxadiazol, tales como el Raltegravir®³⁶ (Figura 14), un agente antirretroviral para el tratamiento de la infección por VIH producido por la compañía farmacéutica Merck & Co, y Zibotentan®³⁷ (Figura 15), un agente antineoplásico usado como vía rápida para el tratamiento del cáncer de próstata, desarrollado por la empresa farmacéutica AstraZeneca.

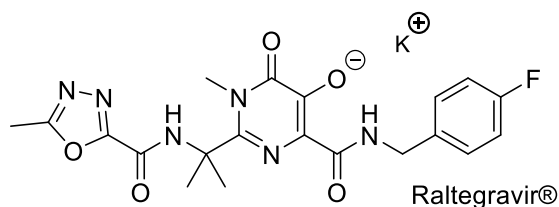


Figura 14: Estructura de Raltegravir®

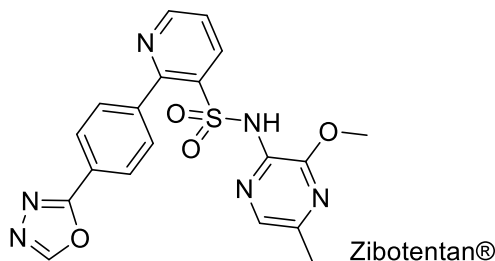


Figura 15: Estructura de Zibotentan®

De forma similar, el anillo 1,3,4-oxadiazólico puede ser encontrado en muchos otros compuestos biológicamente activos.³⁸ Particularmente, los 2,5-disustituídos 1,3,4-oxadiazoles han mostrado actividades como antibacterianos (I),³⁹ anticancerígenos,⁴⁰ anticonvulsivantes (II),⁴¹ (Figura 16) antagonista de receptores de benzodiazepina,⁴² entre otros. Además, estos heterociclos son considerados buenos bioisómeros de ésteres y amidas, que incrementan la bioactividad debido a las interacciones puentes de hidrógeno con los receptores^{40b}

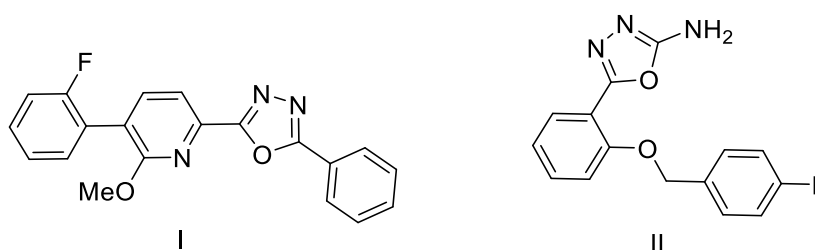


Figura 16: Estructuras de 2,5-disustituídos 1,3,4-oxadiazoles con actividades como antibacterianos (I) y anticancerígenos (II)

Hasta el momento se conocen pocos ejemplos de productos naturales con un núcleo de 1,2,4-oxadiazol o una estructura basada en él.⁴³ Los alcaloides indólicos 3-sustituídos, las fidianidinas A y B (Figura 17), han sido aislados por Carbone y colaboradores del aeolid opisthobranch *Phidiana militaris* (especie de molusco). Se tratan de inhibidores selectivos del transportador de dopamina DAT y agonistas parciales del receptor opioide μ . Además, fidianidina A y B no han resultado ser citotóxicas.

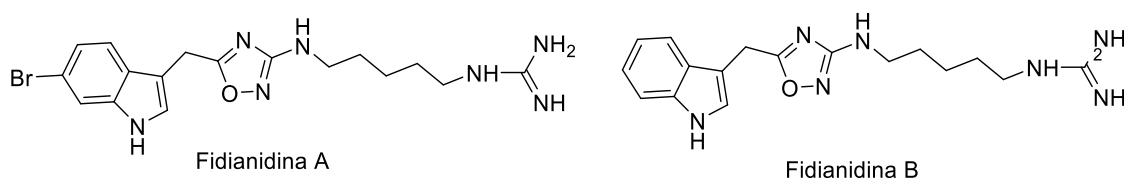


Figura 17: Alcaloides naturales fidianidas A y B.

El ácido quisquálico es otro ejemplo de un producto natural con un núcleo de oxadiazol (Figura 18). Este metabolito se obtuvo de las semillas de *Quisqualis indicay Q. Fructus* y es un fuerte agonista para los receptores AMPA (receptor de glutamato ionotrópico) y de los receptores de glutamato metabotrópico del grupo.⁴³

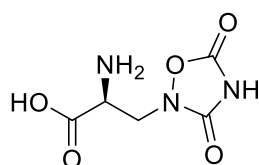


Figura 18: Estructura del ácido quisquálico.

Muchos derivados sintéticos de 1,2,4-oxadiazol han demostrado tener diversas actividades biológicas de interés. Por ejemplo, el heterociclo 1,2,4-oxadiazol se encuentra en varios fármacos como ser en ataluren⁴⁴ (III) para el tratamiento de la fibrosis quística,⁴⁵ en un receptor muscarínico (V) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer⁴⁶ y en varios potenciales agentes anticancerígenos (VI)⁴⁷, en un agonista potente del receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1P₁) (IV).⁴⁸ Este receptor se encuentra en muchos tipos celulares incluido los sistemas inmunitario, cardiovascular y nervioso central y está encargado de la señalización para la ejecución de muchos procesos celulares incluida la diferenciación celular, la migración, la supervivencia, la angiogénesis, la homeostasis del calcio, la inflamación y la inmunidad.⁴⁹ (Figura 19).

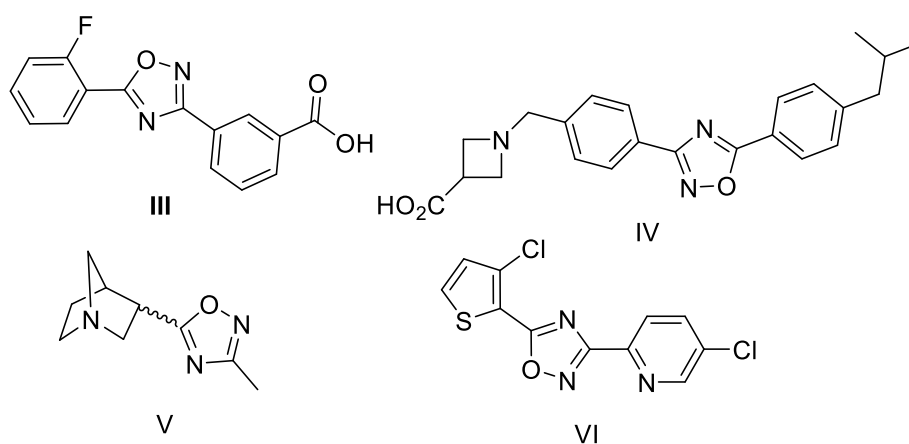


Figura 19: Diferentes derivados sintéticos de 1,2,4-oxadiazol con diversas actividades biológicas de interés.

1.3.4. Compuestos con el heterociclo isoxazol.

Los isoxazoles (a, Figura 21) son heterociclos de cinco miembros que contienen átomos de oxígeno y nitrógeno en posiciones adyacentes. Los análogos parcialmente saturados de isoxazoles se denominan isoxazolininas

(b,c,d, Figura 20) y el análogo completamente saturado es isoxazolidina⁵⁰ (e, Figura 20)

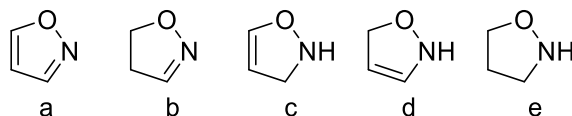


Figura 20: Análogos de isoxazoles

Los anillos de isoxazol se encuentran en productos naturales como el ácido iboténico (Figura 21).

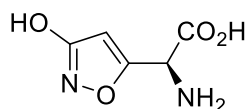


Figura 21: Estructura del ácido iboténico

El isoxazolilo es el radical univalente derivado del isoxazol. Se encuentra un grupo isoxazolilo en muchos antibióticos resistentes a la betalactamasa, como cloxacilina, dicloxacilina y flucloxacilina.⁵¹ (Figura 22).

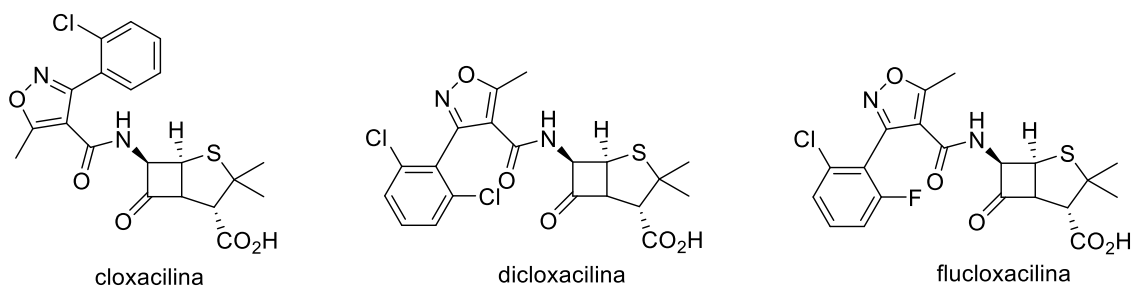


Figura 22: Antibióticos resistentes a la beta-lactamasa con anillos isoxazólicos.

La química del isoxazol⁵² está asociada con el nombre de Ludwig Claisen quien reconoció en 1888 la estructura cíclica del producto (3-metil-5-fenilisoxazol) que Ceresole⁵³ había obtenido en 1884 a partir de la acción de la hidroxilamina sobre la benzilacetona.

Estos también son la base de una serie de medicamentos como el inhibidor de la cicloxigenasa 2 (cox-2)⁵⁴ (Figura 23) o Danazol, esteroide heterocíclico usado en el tratamiento de la endometriosis pélvica que recientemente ha sido

aprobado para el tratamiento de la enfermedad quística de la mama (Figura 24).⁵⁵

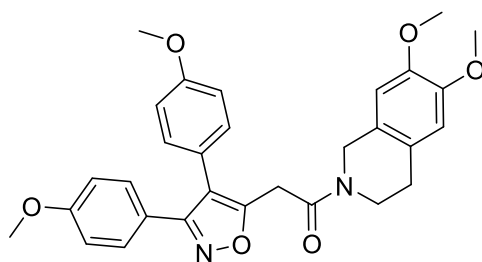


Figura 23: Inhibidor de COX-2

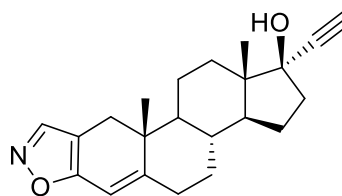


Figura 24: Danazol

1.3.4.1. Importancia biológica de los isoxazoles.

Al igual que los oxadiazoles, los isoxazoles son heterociclos de gran importancia desde el punto de vista medicinal ya que una gran variedad compuestos químicos, de origen natural o sintético, que contienen esta clase de heterociclo presentan actividades biológicas beneficiosas para la salud humana asociadas al anillo isoxazólico. Entre las propiedades terapéuticas podemos encontrar antimicrobiales⁵⁶, antivirales⁵⁷, antiinflamatorios⁵⁸, antidiabéticos⁵⁹, analgésicos⁶⁰, anti-Alzheimer⁶¹, anticancerígenos⁶², entre otros.

Las propiedades anticancerígenas de compuestos con isoxazoles resultan de gran interés para este trabajo de tesis. Uno de los blancos terapéuticos al cual se dirigen muchos de estos compuestos es la proteína Hsp90 o proteína de *shock* térmico de 90 kDa, es una proteína chaperona que ayuda a otras proteínas a plegarse adecuadamente, las chaperonas no determinan la estructura terciaria del plegado de proteínas, pero ayudan a encontrar su estructura de manera más eficiente.⁶³ Esta proteína chaperona está involucrada en la activación de muchas proteínas algunas de las cuales son oncogénicas.⁶⁴ Por lo tanto, inhibidores de esta chaperona pueden resultar eficaces en las terapias anticancerígenas. Podemos mencionar por ejemplo el compuesto de la Figura 25⁶² que es activo contra un amplio rango de líneas celulares tumorales especialmente en cáncer de mama.⁶⁵

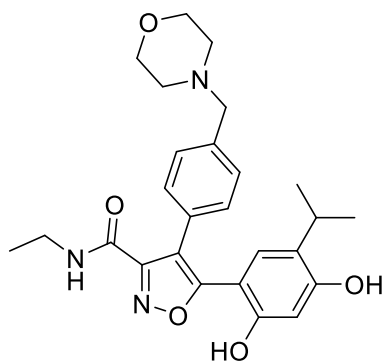


Figura 25: Derivado con núcleo de isoxazol activo contra un amplio rango de líneas celulares tumorales especialmente en cáncer de mama.

La proteína Hsp27 es otra proteína chaperona de *shock* térmico relacionada con el proceso de metástasis de las células tumorales. Se ha encontrado un derivado isoxazólico como el de la Figura 26 que inhibe la migración e invasión de células tumorales de mama de la línea celular humana MDA-MB-231 sin tener efectos citotóxicos en células normales.⁶⁶

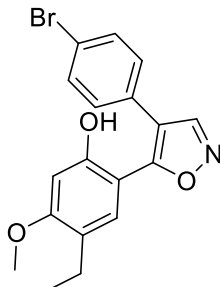


Figura 26: Derivado con núcleo de isoxazol activo frente a la línea celular humana MDA-MB-231.

Otro de los blancos elegidos son los microtúbulos que juegan un papel crucial durante la división celular. Combretastatina A-4 (CA4), (Figura 27), un producto natural aislado por Pettit y colab. en 1989⁶⁷ del sauce sudafricano, *Combretum caffrum*, este compuesto inhibe fuertemente la polimerización de la tubulina⁶⁸ y es activo frente a una gran variedad de tumores. Kaffy⁶⁹ y colaboradores han sintetizado una serie de análogos a CA4, de los cuales un 4,5-diarilisoxazol fue prometedor en la inhibición de la polimerización de tubulina en células de adenocarcinoma de color humanas. (Figura 28).

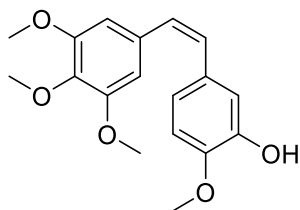


Figura 27: Combretastatina A-4 (CA4)

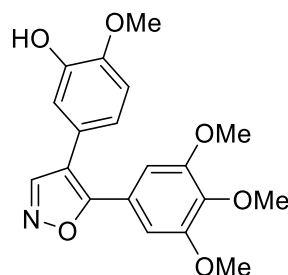


Figura 28: Análogo a CA4.

1.3.5. Metodologías de síntesis de heterociclos: 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol e isoxazol.

1.3.5.1 Síntesis de 1,3,4-oxadiazoles disustituídos

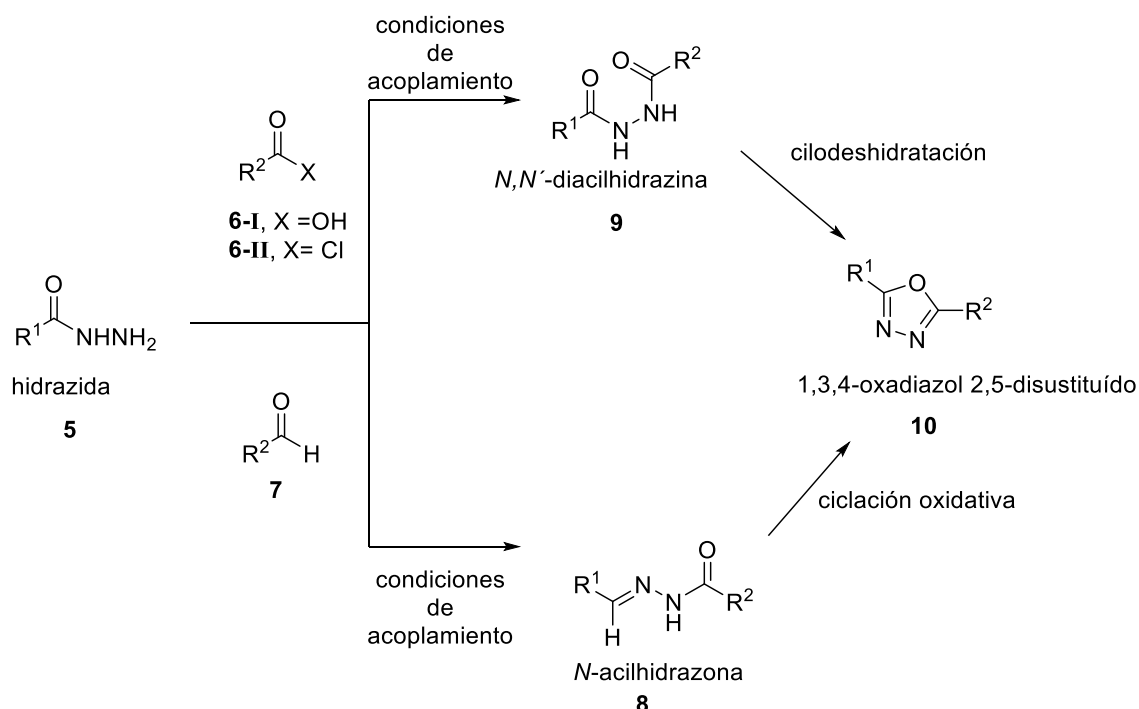
En la literatura existen publicado una gran variedad de metodologías destinadas a la síntesis de 1,3,4-oxadiazoles disustituídos. Dependiendo del tipo de sustituyentes algunas metodologías se ajustan mejor que otras.

A continuación, se describen algunos métodos para llevar a cabo la síntesis de anillos 1,3,4-oxadiazólicos directamente unidos a sustituyentes alquílicos o arílicos.

1.3.5.1.1. Formación de 2,5-diaril (alquil)-1,3,4-oxadiazoles a partir de hidrazidas.

Las hidrazidas (acilhidrazinas) son los bloques de construcción más comunes para la síntesis de 2,5-diaril (alquil)-1,3,4-oxadiazoles **10**. Pueden reaccionar con ácidos carboxílicos o aldehídos.

La reacción entre una hidrazida **5** y un ácido carboxílico **6a** (o derivado, **6b**) conduce a la formación de una *N,N'*-diacilhidrazina **19**, la cual mediante una ciclodeshidratación da lugar al anillo 1,3,4-oxadiazólico **10**. Mientras que la reacción entre una hidrazida **5** y un aldehído **7** conduce a la formación de una *N*-acilhidrazona **8**, que por ciclación oxidativa conduce a la formación del anillo en cuestión.⁷⁰ Esquema 7.



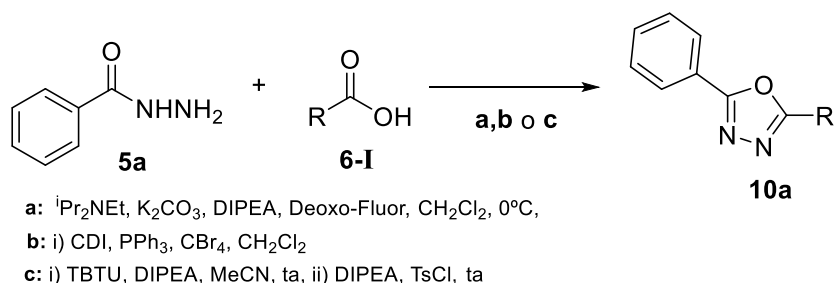
Esquema 7: Caminos de síntesis generales para la obtención de 1,3,4-oxadiazoles a partir de hidrazidas.

Muchos métodos para ciclodeshidratación involucran condiciones ácidas fuertes y con elevadas temperaturas. Los métodos más populares utilizan oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) como agente deshidratante. Otros agentes usualmente utilizados son el ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, pentacloruro de fósforo, pentóxido de fósforo, cloruro de tionilo y reactivos menos fuertes como derivados de carbodiimida, $TsCl$ / piridina, cloruro de trimetilsililo, Ph_3O / Tf_2O , PPh_3 / CX_4 ($X = Cl, Br, I$) y reactivo Burgess.³³ Condiciones más suaves pueden lograrse por medio de la formación de intermediarios de fosfonio o usando cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolinio (DMC), conduciendo a la activación del resto hidrazida seguido de la ciclación para dar el anillo 1,3,4-oxadiazólico. Por lo general estos métodos requieren mucho tiempo de reacción. Aprovechando la oxofilicidad de los agentes fosforilados que inician el proceso de deshidratación, un método más suave para la deshidratación de las hidrazidas es usando PPh_3 bajo condiciones redox de Mukaiyama.⁴⁴

Entre los métodos usados para el acoplamiento de las benzohidrazidas **5a** con ácidos carboxílicos **6a** como agente acilante podemos nombrar una estrategia *one-pot* en cual se utiliza carbonildiimidazol (CDI) como activante seguido de ciclación con PPh_3 y CBr_4 en diclorometano como solvente de reacción (Método **a**, Esquema 8).⁷¹

Además, podemos mencionar la utilización de Deoxo-fluor y $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ en diclorometano como solvente a 0°C como una buena alternativa para la formación de esta clase de heterociclo. El Deoxo-Fluor funciona como un eficiente promotor del acoplamiento y/o acoplamiento/ciclodehidratación de ácidos carboxílicos con aminas (Método **b**, Esquema 8).⁷²

Stabile ha introducido otro método *one-pot* en el que el ácido carboxílico **6a** se condensó eficientemente con benzohidrazida **5a** utilizando TBTU como activante para producir *N,N'*-diacilhidrazina correspondiente como intermediario, continuado por una reacción de ciclodehidratación mediada por cloruro de tosilo (TsCl) con varias bases tales como DBU, trietilamina, piridina y carbonato de potasio, llevada a cabo en varios solventes para lograr 2,5-disustituido-1,3,4-oxadiazol (Método **c**, Esquema 8).⁷³

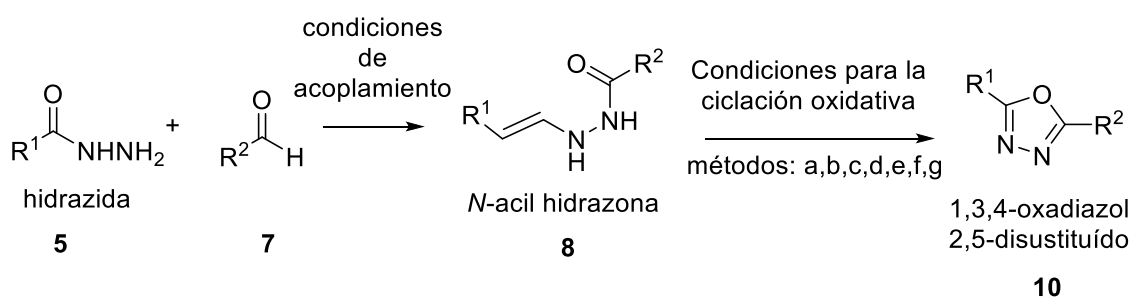


Esquema 8: Reacción *one-pot* de formación del núcleo 1,3,4-oxadiazol a partir de una benzohidrazida **5a** y un ácido carboxílico **6-I**.

Como dijimos, las hidrazidas **5** también pueden ser condensadas con aldehídos **7**. El producto de acoplamiento es una *N*-acilhidrazona **8** que mediante ciclación oxidativa da lugar al 1,3,4-oxadiazol disustituido **10**.

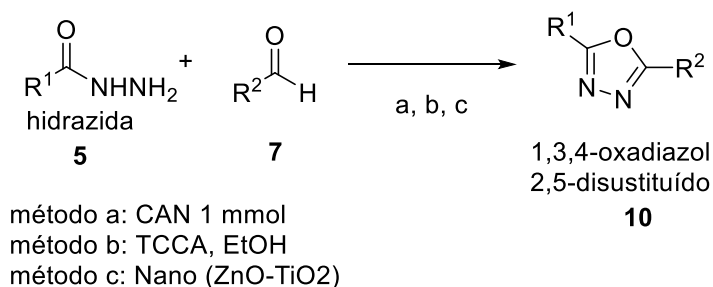
Existen diversos métodos (a-g) para la ciclación oxidativa del intermediario *N*-acilhidrazona **8** que consumen diferentes agentes oxidantes. Podemos mencionar los siguientes (Esquema 9):

- Periodinano Dess-Martin (DMP) en distintos solventes como diclorometano, dimetilformamida (DMF) y acetonitrilo (método a),⁷⁴
- N-clorosuccinimida (NCS) y 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) en diclorometano (método b),⁷⁵
- Hipoyodito de terc-butilo (^tBuOI), generado in situ a partir de ^tBuOCl y NaI en varios solventes como agua, etanol y muchos más (método c),⁷⁶
- Diacetato de yodobenceno en diclorometano (DCM) (método d),⁷⁷
- Cloramina T en etanol (método e),⁷⁸
- (diacetoxiiodo) benceno (DIB) en DCM (método f),⁷⁹
- Cantidad catalítica de Cu(OTf)₂, Cs₂CO₃ y oxígeno del aire bajo protección de nitrógeno (método g).⁸⁰



Esquema 9: Formación de 1,3,4-oxadiazoles a partir de hidrazidas y aldehído.

La reacción de formación de 1,3,4-oxadiazoles a partir de aldehídos puede llevarse a cabo en forma *one-pot* utilizando diferentes reactivos (métodos a-c) (Esquema 10).



Esquema 10: Reacción one-pot de formación de 1,3,4-oxadiazol a partir de hidrazina y aldehído.

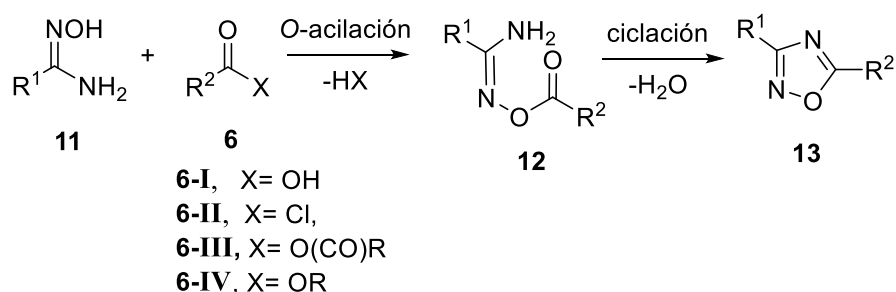
- nitrato de amonio cérico (CAN) en diclorometano (DCM) (método a),⁸¹
- ácido tricloroisocianúrico (TCCA) en etanol (método b),⁸²

- óxido combinado de nano-zinc y dióxido de titanio [nano (ZnO-TiO₂)] como catalizador en etanol a temperatura de reflujo (método c)⁸³

1.3.5.2. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles disustituídos.

Existen dos caminos o enfoques clásicos⁸⁴ para la síntesis de anillos 1,2,4-oxadiazólicos basados en nitrilos: por un lado, mediante la obtención del intermediario amidoxima (Enfoque 1) y por otro lado mediante la cicloadición 1,3-dipolar de nitrilos con *N*-óxidos de nitrilo. (Enfoque 2)

* **Enfoque 1:** se basa en la obtención de un intermediario de amidoxima **11** el cual es *O*-acilado y finalmente el aducto formado **12** es sometido a condiciones de ciclación. La ciclación se puede lograr tratando la *O*-acilamidoxima **12** con bases como NaH o NaOEt a temperatura ambiente, por calentamiento en solventes como piridina⁸⁵, o usando un catalizador como el fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF como solvente en condiciones suaves de temperatura.⁸⁶ (Esquema 11):



Esquema 11: Camino sintético general de obtención de 1,2,4-oxadiazoles basado en la formación y ciclación de *O*-acilamidoximas.

En el caso de los oxadiazoles sintetizados a partir de amidoximas (Enfoque 1), el agente acilante puede ser un ácido carboxílico o un derivado (cloruro de ácido, éster o anhídrido).

✓ *Acilación de amidoximas con ácidos carboxílicos*

La acilación de amidoximas mediante ácidos carboxílicos requiere de la activación del grupo funcional ácido con un reactivo activante para la generación

de un buen grupo saliente. Existen una gran variedad de reactivos que actúan como activadores del grupo carboxílico como ser: 1- [3- (dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida (EDC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI), O-(benzotriazol-1-il), N, N, N', N'-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TBTU) y sus análogos (HATU, HOBt, HOAt) y el reactivo Burgess ha sido ampliamente utilizado en condiciones de reflujo exhaustivo con DMF o piridina, para facilitar la obtención del 1,2,4-oxadiazol por O-acilación, en un proceso de un solo paso. Estos agentes tienen como objetivo facilitar la purificación de los productos por extracción o filtración simple líquido-líquido.⁸⁷ (Figura 29).

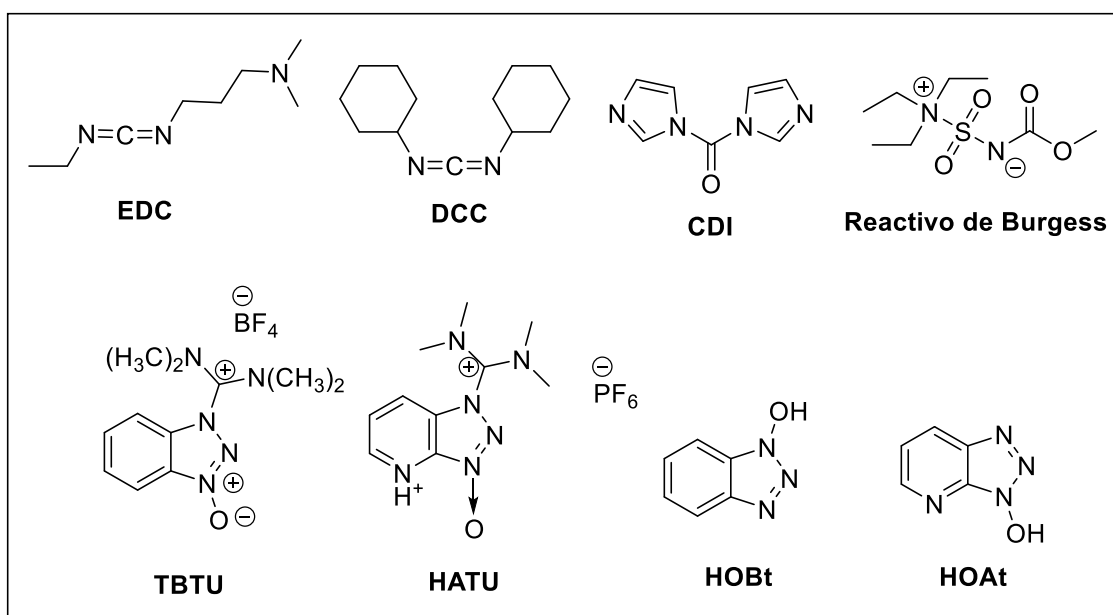


Figura 29: Activantes de ácidos carboxílicos

Dentro de la variedad de reactivos activantes resulta interesante el uso del anhídrido propilfosfónico (T3P®), (Figura 30). Agustine⁸⁸ y colaboradores han demostrado que T3P® funciona como un reactivo eficaz y suave para la síntesis en *one-pot* de 1,2,4-oxadiazoles.

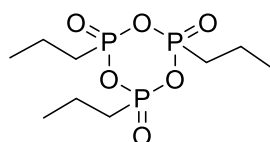
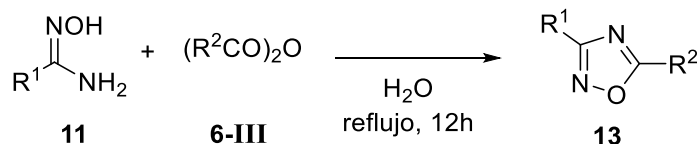


Figura 30: Anhídrido propilfosfónico (T3P®)

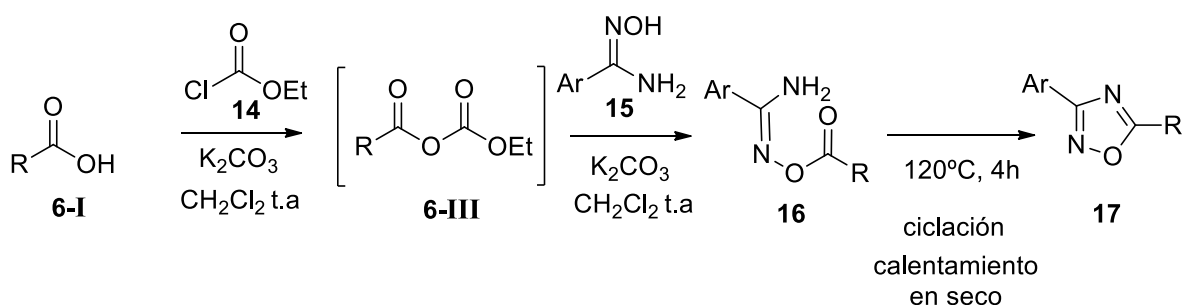
✓ *Acilación de amidoximas con anhídridos de ácidos carboxílicos*

Otro derivado de ácido ampliamente utilizado es el anhídrido de ácido **6-III**. Kaboudin y Malekzadeh⁸⁵ reportaron la síntesis de derivados oxadiazólicos **13** a partir de amidoximas **11** y anhídridos de ácido **6-III** en un medio acuoso en condiciones de reflujo durante 12 h y en ausencia de catalizadores (Esquema 12).



Esquema 12: Síntesis general del anillo 1,2,4-oxadiazólico a partir de amidoxima y anhídrido de ácido.

Una estrategia es usar el cloroformiato de etilo (**14**) como agente de acoplamiento en la síntesis de algunos 1,2,4-oxadiazoles 2,5 disustituídos a partir de ácidos carboxílicos y arilamidoximas⁸⁹ (Esquema 13).

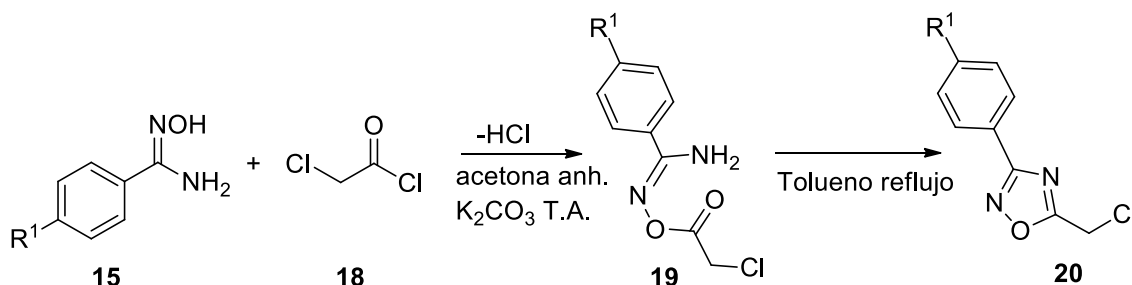


Esquema 13: Obtención del anillo 1,2,4-oxadiazol usando cloroformiato de etilo como agente activante.

✓ *Acilación de amidoximas con cloruros de ácido*

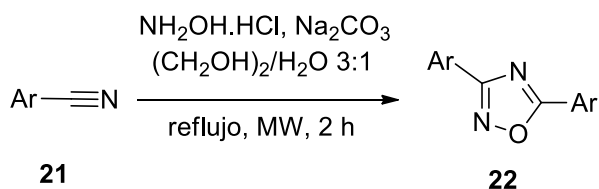
En cuanto a los cloruros de ácido, estos funcionan como ácidos carboxílicos ya activados. Su uso está ampliamente extendido y resulta una alternativa limpia y eficaz. Una de las primeras publicaciones sobre esta metodología fue en 1884 por Tiemann y Kruger,³¹ en la cual se describe la reacción entre una amidoxima y un cloruro de ácido como agente acilante. Como ejemplo de esta metodología podemos referenciar el trabajo de Mohammadi-Khanaposhtani⁹⁰ y colaboradores quienes reaccionaron diferentes benzamidoximas **15** sustituidas con cloruro de 2-cloro acetilo (**18**) como agente

acilante. Los cloruros de acilo al ser especies muy reactivas permiten reacciones de O-acilación a temperatura ambiente, dando lugar a las O-acilamidoximas. La reacción para formar intermediarios de 1,2,4-oxadiazol **20** se llevó a cabo en tolueno a reflujo (Esquema 14).



Esquema 14: Síntesis general de 1,2,4-oxadiazoles a partir de amidoxima y cloruro de ácido

Esta estrategia sintética también puede ser adaptada a una reacción *one-pot* en microondas mucho más rápida y sencilla. Outirite⁹¹ y colaboradores utilizaron nitrilos aromáticos **21** en presencia de hidroxilamina y carbonato de sodio en etilenglicol/agua 3:1 como solvente de reacción. El sistema se irradió durante 2 horas hasta reflujo (Esquema 15).

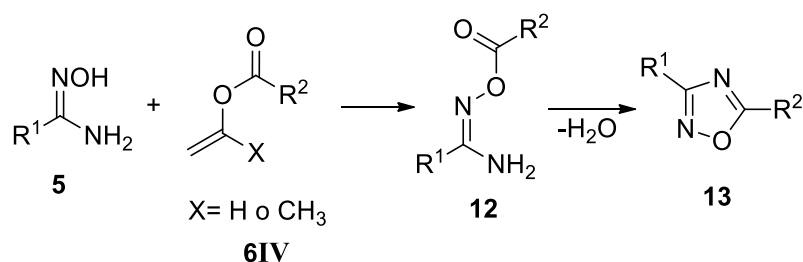


Esquema 15: Reacción *one-pot* de formación del núcleo 1,2,4-oxadiazólico a partir de nitrilo aromático.

Otra forma de reducir los tiempos de reacción es por medio de la irradiación con ultrasonido. Bretanha⁹² y colaboradores utilizaron tricloroacetoamidoxima y los cloruros de benzoilo sustituidos en acetato de etilo como disolvente y redujeron los tiempos de reacción hasta 15 minutos.

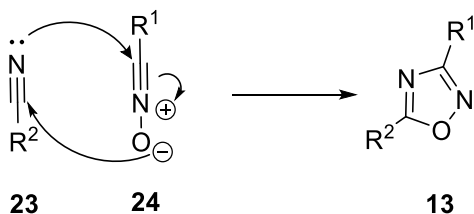
✓ *Acilación de amidoximas con ésteres*

Según Durden y Heywood⁹³ la reacción de los ésteres **6IV** con las amidoximas **11** (Esquema 16) puede regirse por los mismos factores que gobiernan la hidrólisis básica de los ésteres. La electrofilicidad del carbonilo y la basicidad del anión desplazado, podría ser particularmente importante en la facilidad de reacción de los ésteres. Los ésteres simples de los ácidos dicloroacético y tricloroacético y particularmente enol ésteres de ácidos alifáticos o aromáticos reaccionan como las amidoxima en forma directa para formar 1,2,4-oxadiazol. En cambio, los ésteres alifáticos como el acetato de etilo no da buenos resultados.



Esquema 16: Síntesis general de 1,2,4-oxadiazol a partir de amidoxima y éster.

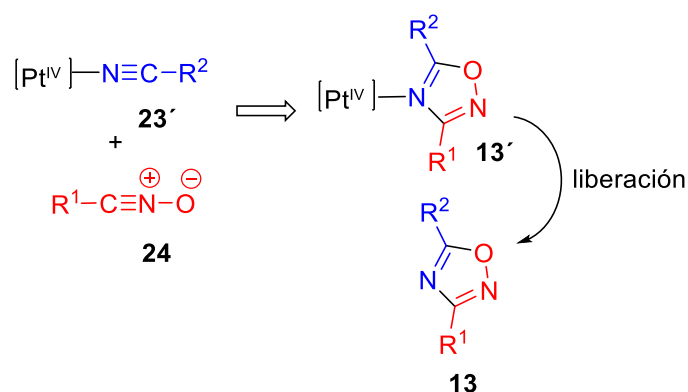
* **Enfoque 2:** basado en la cicloadición 1,3-dipolar de nitrilos **23** con *N*-óxidos de nitrilo **24** (Esquema 17):



Esquema 17: Reacción general de formación de 1,2,4-oxadiazoles a partir de nitrilos y *N*-óxidos de nitrilo.

Esta metodología podría ser una de las más ventajosas debido al fácil acceso sintético y a la disponibilidad comercial de los materiales de partida. Sin embargo, presenta desventajas desde el punto de vista químico; la baja activación del triple enlace del grupo nitrilo hace que la reacción sea menos favorable. Por lo tanto, se necesitan condiciones severas cuando se utilizan nitrilos no activados. La activación del grupo nitrilo puede mejorarse mediante la introducción de grupos R aceptores de electrones unidos al carbono CN. Otro modo de activación de nitrilo implica afectar el nitrilo a través del extremo

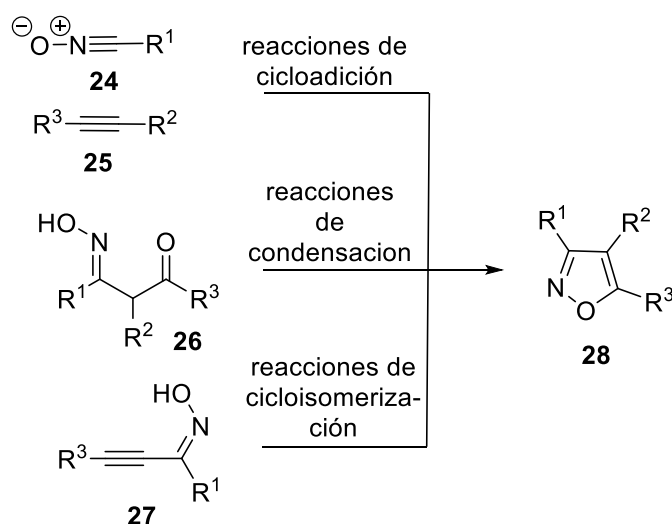
opuesto, es decir, mediante la coordinación a un centro metálico a través del átomo de N (**23'**). Bokach⁹⁴ y colaboradores encontraron que el centro de platino (IV) en los complejos $[\text{PtCl}_4(\text{RCN})_2]$ proporciona una activación suficientemente fuerte de los nitrilos para ayudar a una fácil cicloadición $[2 + 3]$ (Esquema 18).



Esquema 18: Activación del grupo nitrilo por medio de la coordinación del nitrógeno a un centro de platino (IV).

1.3.5.3. Síntesis de isoxazoles

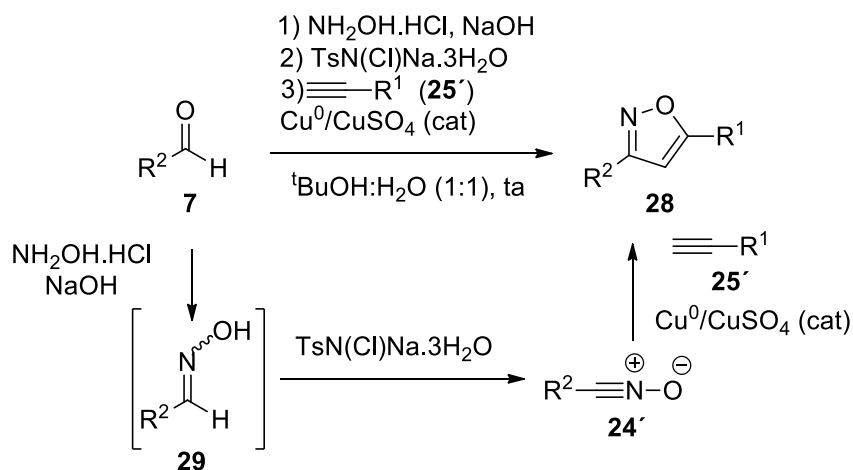
Los anillos isoxazólicos pueden sintetizarse por una gran variedad de métodos muchos de los cuales están reunidos en tres tipos de reacciones generales: reacciones de cicloadición, de condensación y de cicloisomerización⁹⁵ (Esquema 19).



Esquema 19: Tipos de reacciones para la formación de isoxazoles.

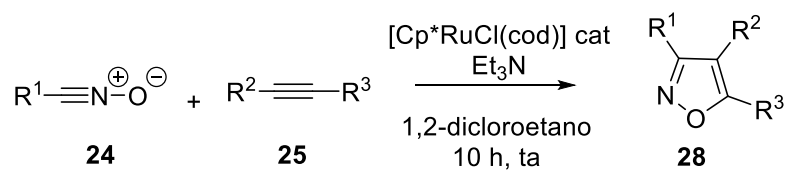
A continuación, solo vamos a ampliar algunas metodologías referidas a las reacciones de cicloadición.

Un método clásico para la conjugación de dos restos orgánicos a través de un anillo de isoxazol **28** es por medio de una cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino **25** y un óxido de nitrilo **24**. En 2005, Fokin⁹⁶ y colaboradores reportaron el primer ejemplo de síntesis de isoxazoles catalizada por metal por medio de una cicloadición 1,3-dipolar como una variante de la reacción de Huisgen catalizada por Cu(I) entre alquinos y azidas para dar triazoles. La reacción es llevada a cabo a temperatura ambiente con una alta selectividad del 3,5-regioisómero.⁹⁷ Un aldehído **7** se convierte primero en el correspondiente aldoxima **29** por reacción con hidroxilamina. Sin aislamiento, la aldoxima **29** se transforma en el óxido de nitrilo correspondiente **24'** utilizando cloramina-T trihidrato, que actúa como un agente halogenante y una base. En presencia de una cantidad catalítica de cobre (I) (obtenida por reacción *in situ* entre Cu metálico y sulfato cúprico), el óxido de nitrilo **24'** generado *in situ* experimenta una adición gradual con acetiluro de cobre (I) a temperatura ambiente, proporcionando el 3,5-disustituido isoxazol **28**⁹⁷ (Esquema 20).



Esquema 20: Cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino **25** y un óxido de nitrilo **24**.

Años más tarde el grupo Fokin informó un catalizador de Ru (II) para la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos **25** con óxidos de nitrilo **24** que ocurre con selectividad complementaria al proceso catalizado por Cu (I) para dar isoxazoles 3,4-disustituidos⁹⁸ (Esquema 21).



Esquema 21: Cicloadición 1,3-dipolar de alquinos **25** y óxidos de nitrilo **24** catalizada por Ru (II).

**CAPÍTULO 2. OBJETIVOS GENERALES Y PLANEAMIENTO DE LA
SÍNTESIS**

2.1 Objetivos generales.

El objetivo de este plan de trabajo es lograr la obtención de una quimioteca de compuestos mediante HM de tres tipos de estructuras: una porción penicilínica u otras estructuras de interés, y una cadena peptídica unidas por un heterociclo, que serán evaluadas biológicamente. La optimización de las estrategias sintéticas desarrolladas nos permitirá luego estudiar la combinación de las variaciones con el fin de determinar su efecto sobre la actividad antiproliferativa.

Este trabajo de tesis consta de tres partes, cada una dedicada a la formación del heterociclo nexo entre las otras estructuras de interés: en primer lugar, la síntesis de estructuras híbridas conteniendo anillos 1,3,4-oxadiazólicos, por otro lado, la síntesis de estructuras conteniendo anillos 1,2,4-oxadiazólicos, y por último la síntesis de estructuras conteniendo anillos isoxazólicos.

Para generar las quimiotecas se tuvieron en cuenta algunos aspectos: en primer lugar, la experiencia de trabajo en nuestro laboratorio en el uso de entidades químicas como las estructuras aminoacídicas y penicilínicas. Por otro lado, los antecedentes bibliográficos referidos a las síntesis de cada uno de los heterociclos mencionados. Por último, la adaptación de las condiciones experimentales encontradas a los materiales de partida elegidos y a los reactivos químicos disponibles. El proceso permitió adquirir experiencia en distintos aspectos de la compleja química de estas estructuras.

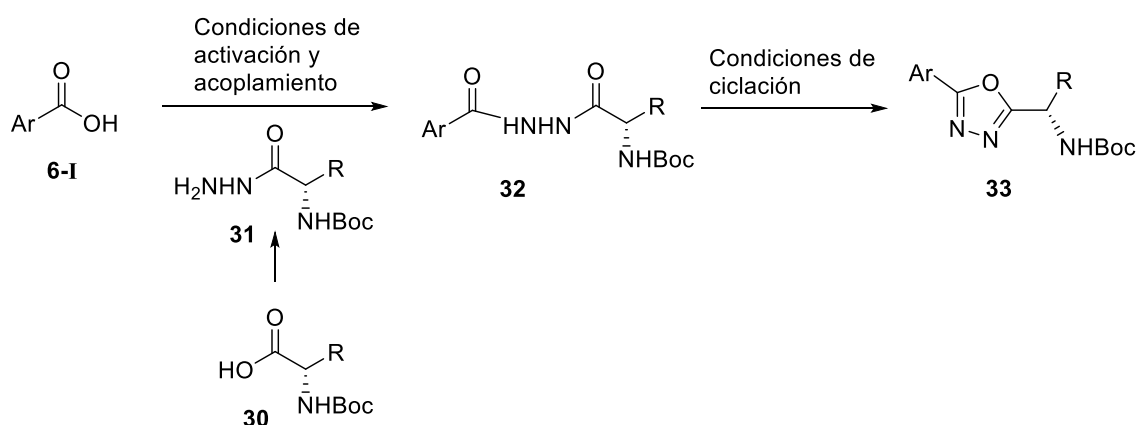
2.2 Planeamiento de síntesis.

2.2.1 Síntesis de estructuras conteniendo anillos 1,3,4-oxadiazólicos.

En esta primera fase, se comienza con el estudio de metodologías para la síntesis de 1,3,4-oxadiazoles sustituidos en las posiciones 3 y 5, con el objetivo de generar la correspondiente quimioteca y finalmente realizar el análisis de bioactividad. La síntesis se basa principalmente en el uso de hidrazidas y agentes acilantes como materiales de partida.⁷⁴

2.2.1.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

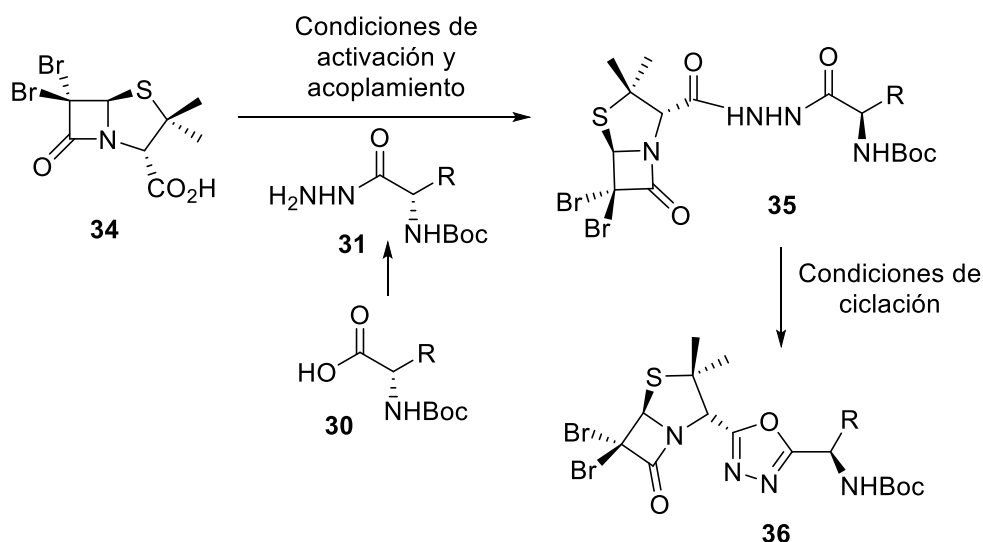
Para esta síntesis se pensó utilizar el procedimiento que requiere de la activación de la funcionalidad ácido carboxílico **6-I** seguido del acoplamiento con hidrazidas basadas en aminoácidos *N*-protegidos **31**. Los aductos **32** formados se someten a condiciones de ciclación hasta conseguir los productos deseados **33** (Esquema 22).



Esquema 22: Unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

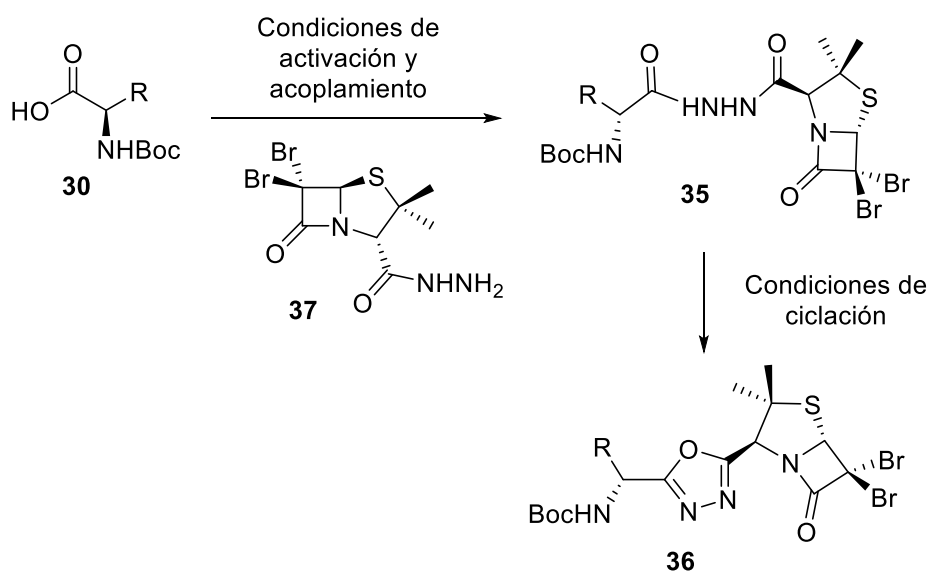
2.2.1.2 Unión de estructuras penicilínicas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

La primera opción considerada para este objetivo fue la activación de una estructura penicilínica, el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**), y su acoplamiento de una serie de hidrazidas basadas en aminoácidos *N*-protegidos **31**. Los aductos **35** se exponen a condiciones de ciclación hasta conseguir los productos deseados **36** (Esquema 23).



Esquema 23: Unión de hidrazidas de *N*-Boc-aminoácidos y ácidos penicilánicos mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

Con el objetivo de evaluar otra metodología, se plantea, además, la preparación de un derivado de hidrazida **37**, sintetizado a partir de **34**, para luego condensarlo a una serie de *N*-Boc-aminoácidos **30**. Los aductos formados **35** se ciclan para obtener los productos finales **36**. Intercambiar los grupos funcionales de los materiales de partida que intervienen en el acoplamiento (ácido carboxílico e hidrazida) no repercute en las conectividades de los productos finales **36** (Esquema 24).



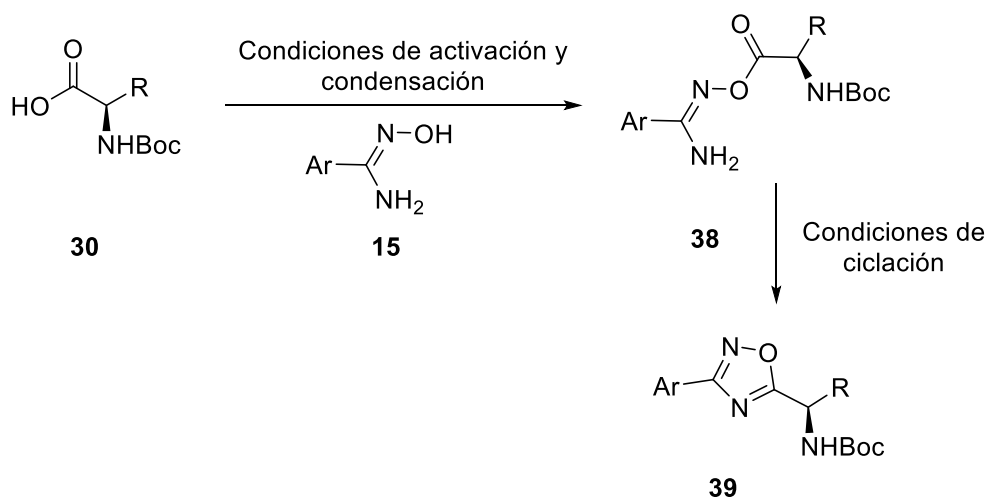
Esquema 24: Unión de *N*-Boc aminoácidos y penicilin-hidrazidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

2.2.2. Síntesis de estructuras conteniendo anillos 1,2,4-oxadiazólicos.

Esta etapa comienza, al igual que en la anterior, con el estudio de metodologías para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles sustituidos en las posiciones 3 y 5, continúa con la formación de la correspondiente quimioteca y finaliza con el análisis de bioactividad. La síntesis se basa principalmente en el uso de amidoximas primarias y agentes acilantes como materiales de partida iniciales.⁸⁴ En los últimos años, se han publicado numerosos informes sobre nuevos métodos de formación de 1,2,4-oxadiazoles; y aunque es bien conocida la síntesis de 1,2,4 oxadiazoles mediante la condensación de amidoximas y ácidos carboxílicos, la formación de estos anillos usando aminoácidos y estructuras penicilínicas no ha sido reportada. De acuerdo con la combinación de materiales de partida propuestos subdividimos esta sección en:

2.2.2.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

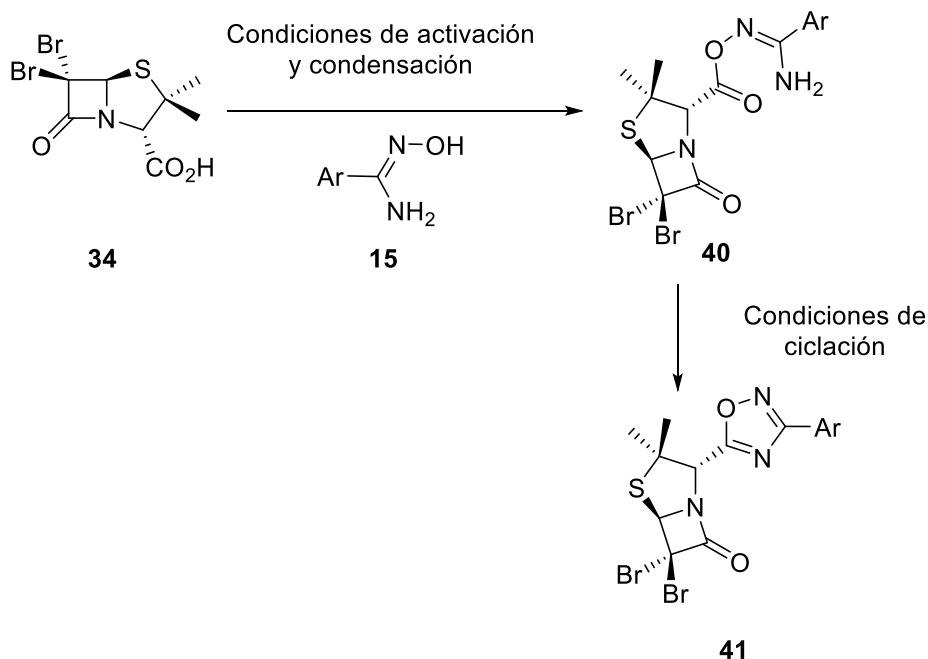
Para esta síntesis se pensó utilizar el procedimiento que requiere de la activación de la funcionalidad ácido carboxílico de una serie de aminoácidos *N*-protegidos **30** para la *O*-acilación de aril-amidoximas **15**, seguido de la ciclación de los aductos formados **38** para obtener los productos finales **39** (Esquema 25).



Esquema 25: unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

2.2.2.2 Unión de estructuras aromáticas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

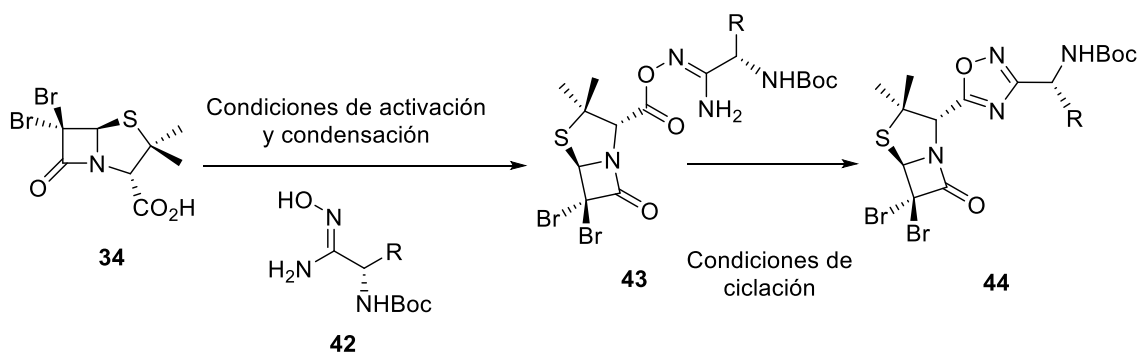
En esta síntesis se consideró la activación del grupo ácido carboxílico de la estructura penicilínica **34** para la *O*-acilación de aril-amidoximas **15**, seguido de la ciclación de los aductos formados **40** para lograr los productos finales **41** (Esquema 26).



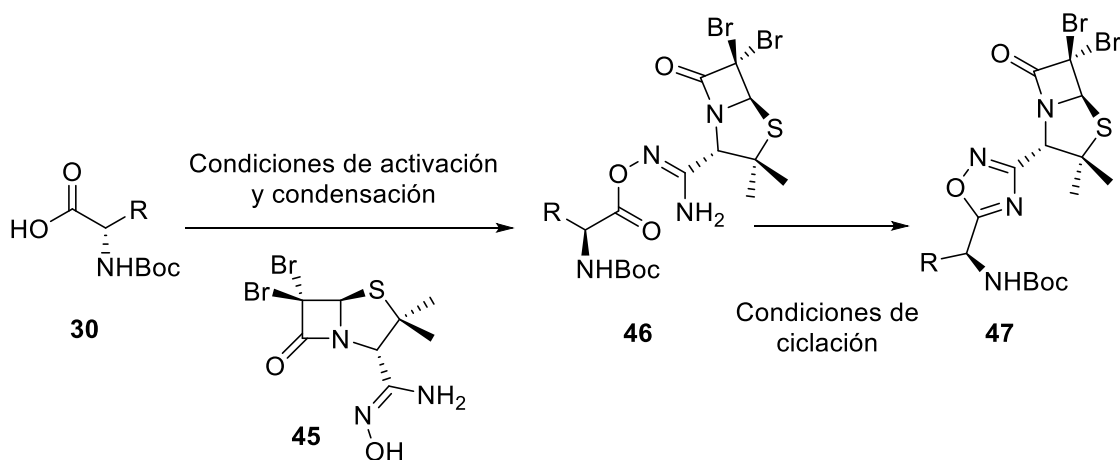
Esquema 26: Unión de estructuras aromáticas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

2.2.2.3 Unión de estructuras aminoacídicas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

En esta sección se consideraron llevar a cabo dos caminos sintéticos: por un lado, comenzar con la activación del grupo ácido carboxílico de la estructura penicilínica **34** para la *O*-acilación de distintas aminoacil-amidoximas *N*-protegidas **42**, seguido de la ciclación de los aductos formados **43**, hasta obtener los productos híbridos esperados **44** (Esquema 27). Por otro lado, el segundo camino propuesto, fue iniciar con la activación de los aminoácidos *N*-protegidos **30** para la *O*-acilación de una amidoxima basada en penicilina **45**. Luego continuar con la ciclación del aducto formado **46** hasta lograr los productos finales **47** según el Esquema 28.



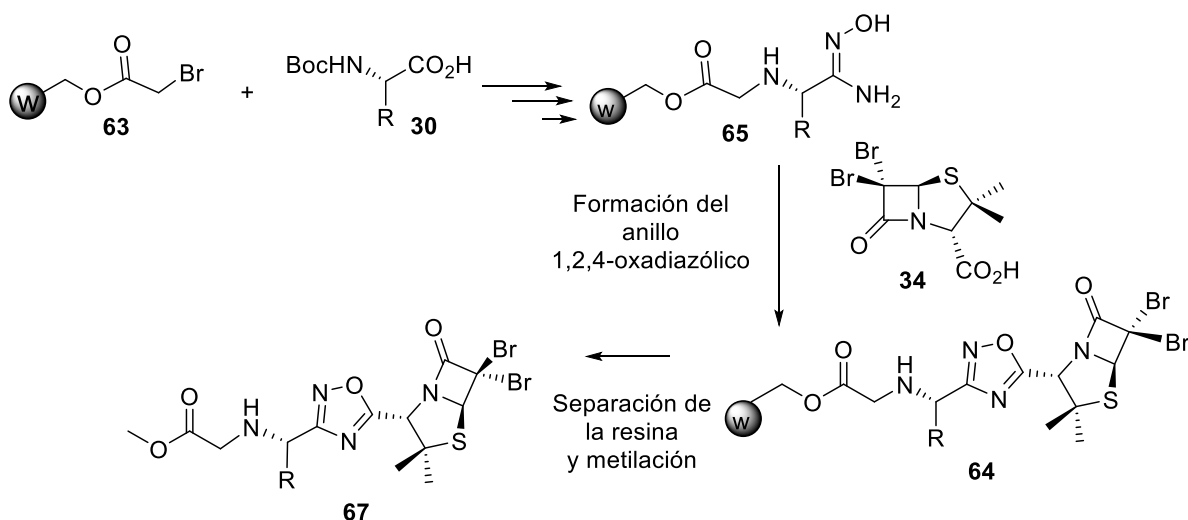
Esquema 27: Estructuras aminoácidas y penicilínicas como sustituyentes 3' y 5', respectivamente del heterociclo 1,2,4-oxadiazol.



Esquema 28: Estructuras aminoácidas y penicilínicas como sustituyentes 5' y 3', respectivamente del heterociclo 1,2,4-oxadiazol.

2.2.2.4 Unión de estructuras aminoácidas y penicilínicas mediante el heterociclo 1,2,4-oxadiazol en fase sólida.

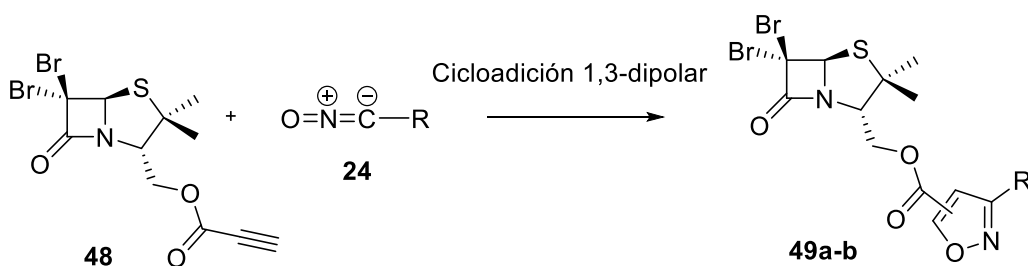
En esta sección se plantea la unión de diferentes aminoácidos **30** a un soporte sólido como la resina de Wang y realizar la derivatización hasta la funcionalidad amidoxima **65** (Esquema 29). Luego mediante activación del grupo ácido carboxílico del derivado penicilánico **34**, se lleva a cabo la condensación con **65** y la posterior ciclodeshidratación hasta obtener los derivados 1,2,4-oxadiazólicos **64**. Finalmente, se realiza la separación del producto de la resina y posteriormente se lo metila para obtener **67**.⁹⁹



Esquema 29: Síntesis en fase sólida de derivados 1,2,4-oxadiazólicos.

2.2.3 Síntesis de estructuras conteniendo anillos isoxazólicos.

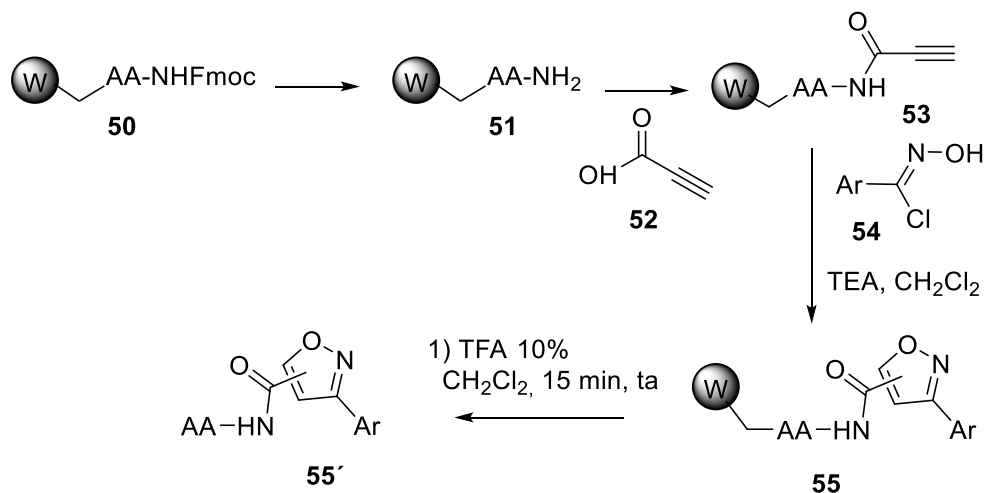
En esta parte de la tesis se propone la síntesis de una estructura híbrida conteniendo un anillo isoxazólico y una estructura penicilínica. Un método popular para la conjugación de dos restos orgánicos a través de este tipo de heterociclo es por medio de una cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino y un óxido de nitrilo, que permite obtener dos regioisómeros.⁹⁶ Por lo tanto, para lograr los productos de cicloadición 49a-b, se propone la formación de un alquino basado en la estructura penicilínica (48) y un óxido de nitrilo 24 generado in situ, que reaccionan bajo catálisis de Cu(I) (Esquema 30).



Esquema 30: Síntesis de estructura híbrida conteniendo anillo isoxazólico.

Otra opción considerada es la posibilidad de síntesis en fase sólida de estructuras conteniendo el anillo isoxazólico sustituido por un resto aminoacídico y una estructura aromática. La conjugación entre los dos restos orgánicos será por medio de una cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino derivado de un

aminoácido que estará anclado a un soporte sólido **50** y una cloroxima **54**, que reaccionan sin catálisis metálica (Esquema 31).¹⁰⁰



Esquema 31: Ruta de síntesis de aminoacil isoxazoles en fase sólida.

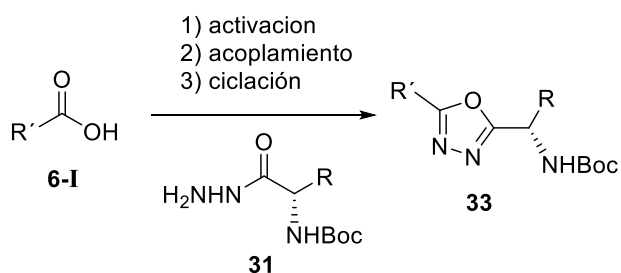
En resumen, este trabajo de investigación se basa fundamentalmente en la adaptación de metodologías y estrategias de síntesis a la preparación de compuestos híbridos de interés biológico. En ese sentido, nos propusimos llevar a cabo importantes objetivos que implican el diseño y desarrollo de procesos sintéticos para la obtención de estructuras orgánicas originales. El objetivo final de las quimiotecas generadas es evaluar las mismas respecto a su posible actividad como agentes antiproliferativos.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazólico.

3.1.1 Unión de estructuras aromáticas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

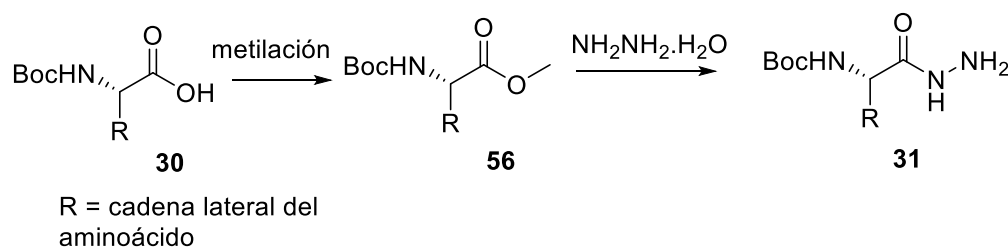
El primer objetivo de esta tesis fue generar una quimioteca de compuestos con anillos oxadiazólicos con isomería 1,3,4 para lo cual decidimos sintetizarlos por condensación entre hidrazidas y ácidos carboxílicos. En un principio decidimos usar hidrazidas derivadas de aminoácidos para la generación de estos oxadiazoles. Por lo tanto, comenzamos buscando condiciones de activación y acoplamiento de aminoácidos *N*-protegidos con el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) y examinando posteriormente metodologías para la ciclación de los aductos formados. En el Esquema 32 se muestra el camino sintético general para la obtención de los derivados de interés.



Esquema 32: Camino sintético general para la obtención de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazol.

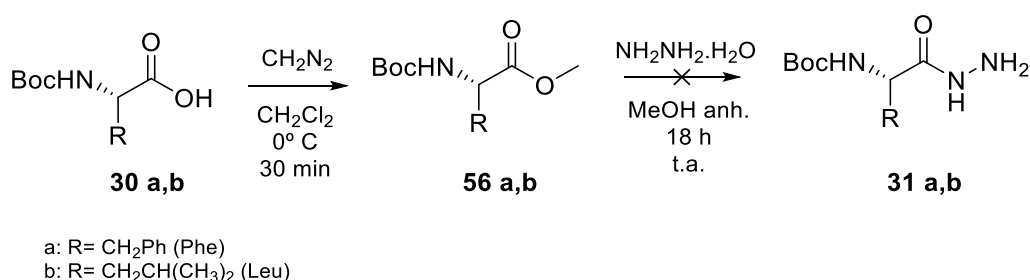
3.1.1.1 Síntesis de hidrazidas.

El método habitual para obtener hidrazidas de aminoácidos (y de péptidos) es la hidrazinólisis de los ésteres metílicos o etílicos de los aminoácidos deseados (Esquema 33). Este procedimiento también es utilizado en la síntesis de azidas. Por lo general, el proceso se realiza en condiciones moderadas, a temperatura ambiente, en solventes como etanol o *N,N'*-dimetilformamida (DMF) y utiliza reactivos tóxicos como el monohidrato de hidrazina. Dicho reactivo presenta propiedades altamente básicas lo que impide utilizar aminoácidos *N*-protegidos con el grupo protector fluorenilmetiloxi-carbonilo (Fmoc).



Esquema 33: Esquema general de la hidrazinólisis de ésteres metílicos derivados de aminoácidos *N*-protegidos.

La hidrazina se utiliza en la forma de su hidrato o, más raramente, como hidrazina anhidra, y se suele emplear en exceso para evitar la formación de bishidrazidas simétricas.¹⁰¹ La necesidad de la síntesis previa del éster metílico o etílico del aminoácido correspondiente supone una desventaja ya que en varios casos está asociado con ciertas dificultades en la esterificación. En nuestro caso intentamos probar esta metodología utilizando como agente metilante el diazometano sobre los aminoácidos fenilalanina (**30a**) y leucina (**30b**) protegidos con Boc, pero lamentablemente no evidenciamos la formación de las correspondientes hidrazidas derivadas **31a** y **31b**. (Esquema 34).

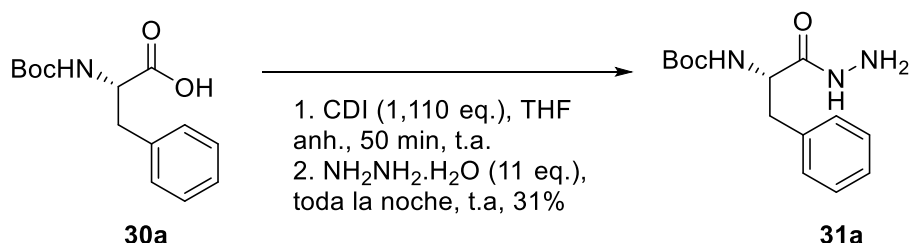


Esquema 34: Intento de síntesis de hidrazidas a partir de ésteres derivados de aminoácidos.

3.1.1.1.1. Ensayo de síntesis de hidrazidas utilizando 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como agente de acoplamiento.

De forma alternativa, las hidrazidas pueden prepararse mediante condensación de ácidos carboxílicos con hidrazina en presencia de agentes de acoplamiento bajo condiciones estrictamente anhidras. Por lo tanto, enfocamos nuestra atención a una reacción de acoplamiento entre el aminoácido *N*-Boc-fenilalanina (**30a**) y la hidrazina monohidrato utilizando como agente de acoplamiento 1,1-carbonildiimidazol (CDI) en THF anhidro como solvente de

reacción.¹⁰² En este caso, la reacción es llevada a cabo en dos etapas: en la primera, se produce la activación del ácido carboxílico del aminoácido mediante CDI durante 50 minutos a temperatura ambiente en el solvente mencionado. Posteriormente, se incorpora la hidrazina monohidrato y la reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante toda la noche (Esquema 35).



Esquema 35: Formación de la hidrazida de *N*-Boc-fenilalanina **31a** empleando CDI como agente activante.

Luego de evidenciar un producto por medio de la CCD se purificó el crudo de reacción por columna cromatográfica hexano-acetato de etilo. La hidrazida **31a** purificada se obtuvo con un rendimiento del 31% evidenciando su presencia mediante RMN de ^1H (Figura 32) y RMN de ^{13}C (Figura 31).

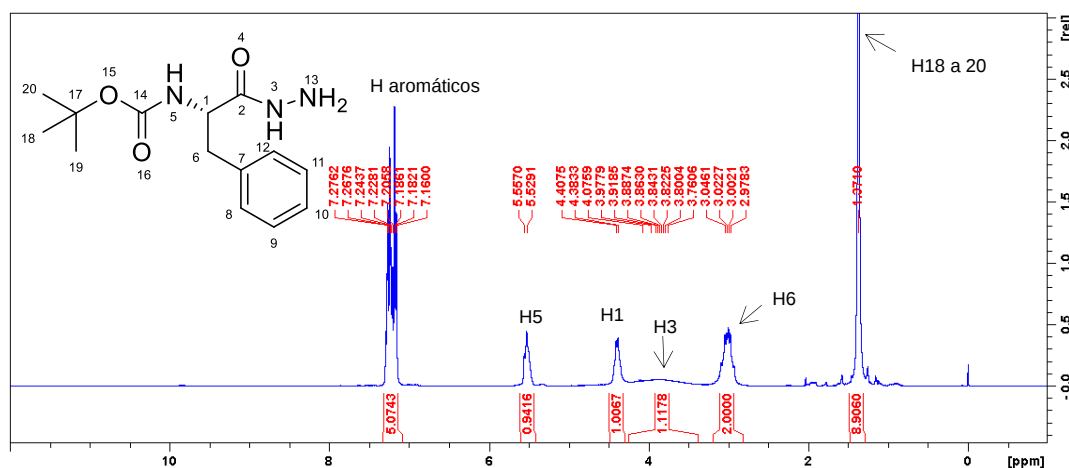


Figura 31: Espectro de RMN de ^1H de **31a**

Los protones unidos a nitrógeno (u oxígeno) generalmente tienen amplios rangos de desplazamientos químicos esperados (δ); el valor δ real depende del disolvente utilizado, la concentración, la temperatura, etc. No se suelen acoplar con protones vecinos y dan señales tipo singlete anchas. Debido a que estos protones son ácidos y, por lo tanto, intercambiables, muchas veces no aparecen en el espectro de RMN de ^1H . La señal del H1(4.38 ppm) no sufre grandes

cambios respecto al material de partida (4.40 ppm). Algo similar pasa con las señales de los otros protones, no se aprecian grandes desplazamientos respecto al material de partida.

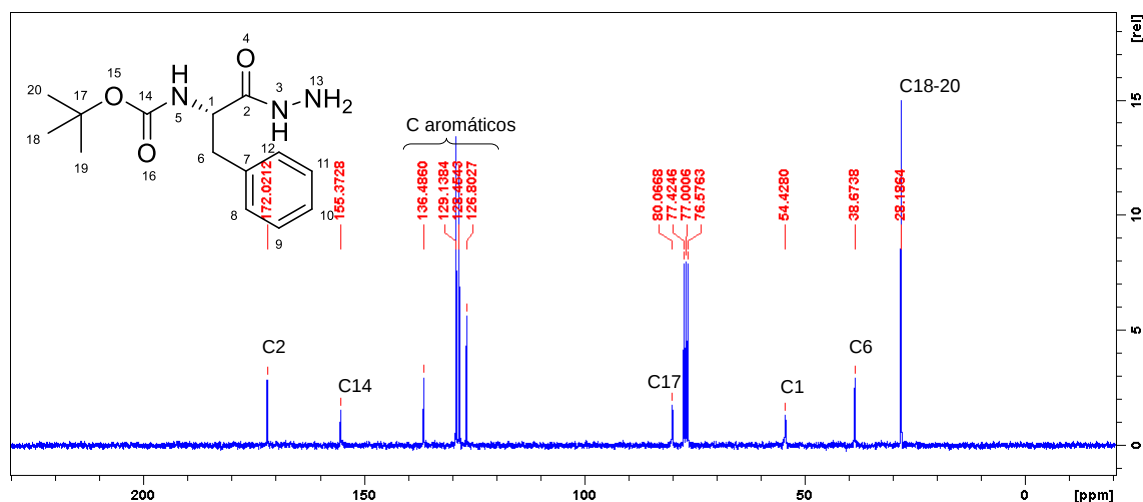


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C de **31a**

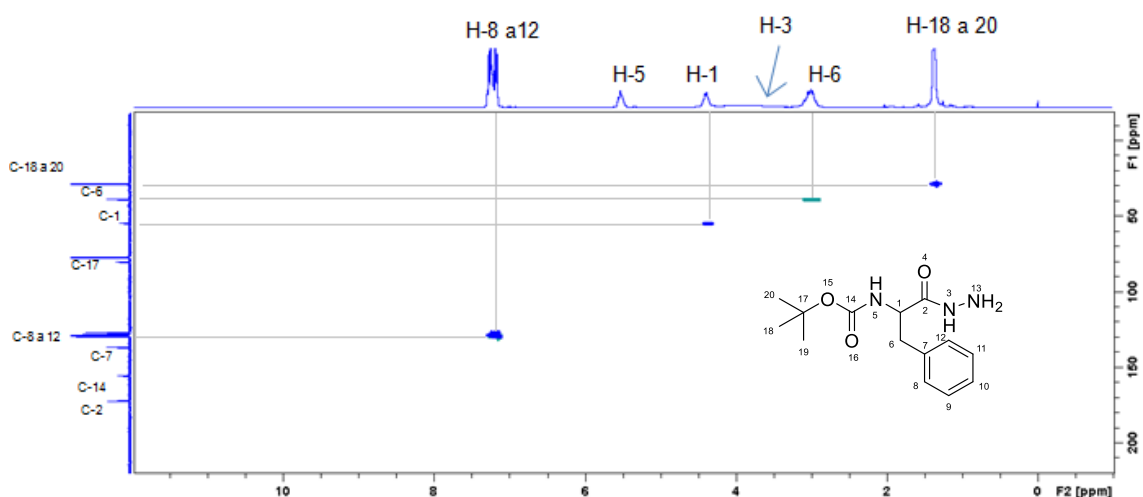
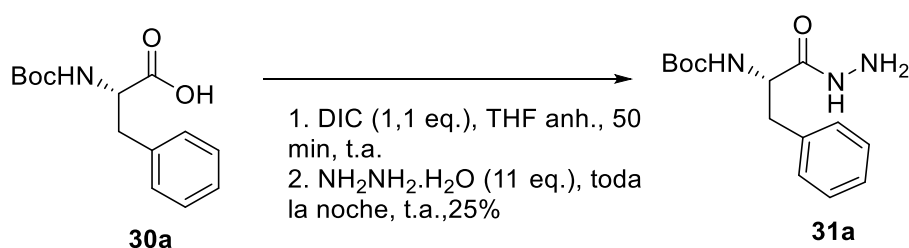


Figura 33: Espectro HSQC de **31a**

El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 32) muestra señales que corresponden al compuesto esperado. La señal de carbonilo de la hidrazida se desplaza levemente a campos más altos (172 ppm) respecto a la señal del carbonilo del aminoácido de partida (177 ppm). La presencia del grupo hidrazida también fue corroborada mediante IR evidenciando las siguientes señales: 3350-3180 (NH), 1700-1640 (C=O) y 1635-1600 (NH₂).

3.1.1.1.2. Ensayo de síntesis de hidrazidas utilizando *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento.

De modo similar, y con propósitos de mejorar los rendimientos de la reacción, se ensayó la transformación anterior en el mismo solvente pero usando *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como reactivo de acoplamiento en igual cantidad de equivalentes de reacción manteniendo además las condiciones de tiempo y temperatura. En este caso el rendimiento no mejoró (25%) pero a diferencia de la metodología anterior se obtuvieron menores cantidades de subproductos de reacción. (Esquema 36).



Esquema 36: Formación de la hidrazida de *N*-Boc-fenilalanina **30a** empleando DIC como agente activante.

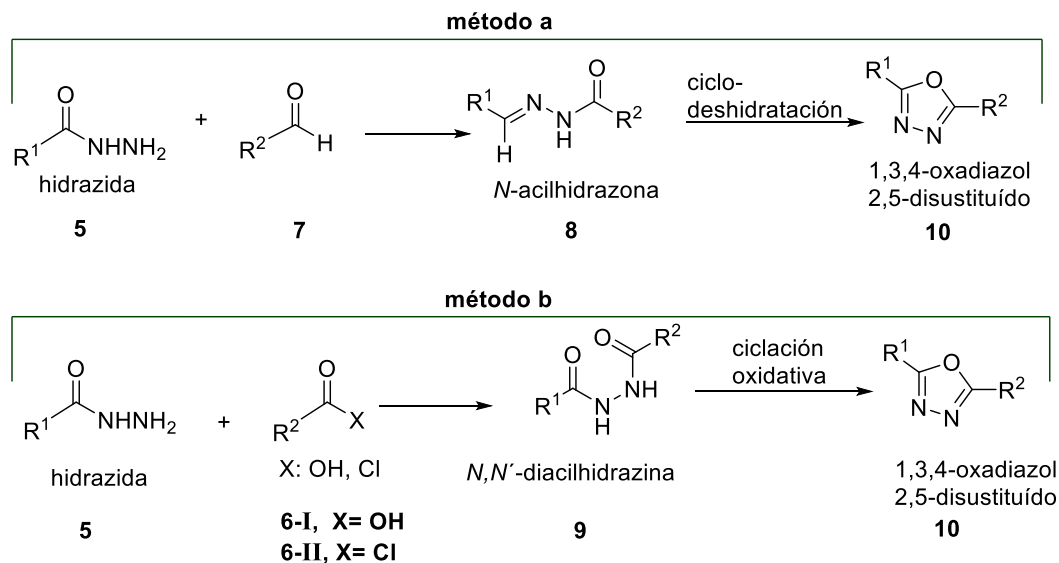
En la Tabla 01 se informan las hidrazidas derivadas de aminoácidos que se han obtenido.

Tabla 01: hidrazidas derivadas de aminoácidos

N-Boc-aminoácido-NHNH ₂		Método	Rto(%)
1	<i>N</i> -Boc-Phe-NHNH ₂ 31a	CDI /DIC	31/25
2	<i>N</i> -Boc-Leu-NHNH ₂ 31b	CDI	21
3	<i>N</i> -Boc-Trp-NHNH ₂ 31c	CDI	40
4	<i>N</i> -Boc-O-Bzl-Thr-NHNH ₂ 31d	CDI	20
5	<i>N</i> -Boc-Pro-NHNH ₂ 31e	DIC	15

Una vez encontrado un método exitoso para la síntesis de hidrazidas derivadas de aminoácidos, nuestro siguiente foco de atención fue la síntesis del heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

3.1.1.2. Síntesis de 1,3,4-oxadiazoles



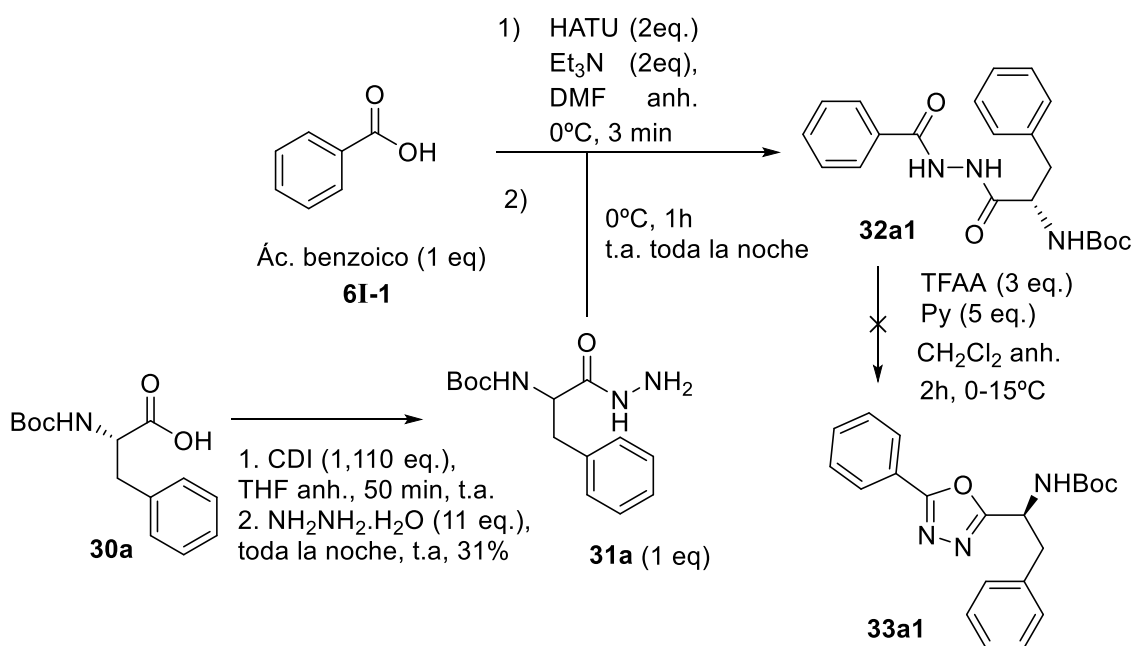
Esquema 37: Métodos de síntesis del anillo 1,3,4-oxadiazol a partir de hidrazidas.

Se han informado varios métodos para la síntesis 1,3,4-oxadiazoles con sustituyentes alquílicos y/o arílicos en posición 2 y 5 en los cuales se utilizan hidrazidas como material de partida. Estos métodos están resumidos en el Esquema 36. Uno de los procedimientos descritos es mediante la ciclación oxidativa de *N*-acilhidrazonas **8** (método a, Esquema 37). Este método requiere de la reacción previa entre una hidrazida **5** y un aldehído **7** que resulta en la formación del intermediario *N*-acilhidrazona **8**. Otro procedimiento para obtener 2,5-diaril(alquil)-1,3,4-oxadiazoles es mediante la reacción de hidrazidas **5** con un ácido carboxílico **6-I** o derivado **6-II** (método b, Esquema 37), esta reacción conduce a la formación del aducto 1,2-diacilhidrazina **9**. Luego, este intermediario sufre una ciclodeshidratación con la ayuda de un agente deshidratante llevando a la obtención del heterociclo deseado **10**. Entre los agentes deshidratantes³³ comúnmente utilizados se habían mencionado al oxicloruro de fósforo (POCl₃), ácido trifluoroacético (CF₃CO₂H), ácido sulfúrico (H₂SO₄), pentóxido de fósforo (P₂O₅), ácido fosfórico (H₃PO₄), pentacloruro de fósforo (PCl₅), cloruro de tionilo (SOCl₂) y reactivos más suaves como el cloruro de trimetilsililo, óxido de fosfina y anhídrido trifluorometanosulfónico (Ph₃O/Tf₂O),

derivados de carbodiimida, la dupla cloruro de *p*-toluensulfonilo y piridina (TsCl/Py), la dupla trifenilfosfina y un tetrahaluro de carbono (PPh₃/CX₄, [X = Cl, Br, I]), o el reactivo de Burgess [metil-*N*-(trietilamoniosulfonil) carbamato].

3.1.1.2.1. Ensayo de síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando anhídrido trifluoroacético (TFAA) como agente ciclodeshidratante.

En base a los reactivos disponibles en nuestro laboratorio y proyectando en el objetivo de este capítulo nos propusimos iniciar el estudio de la reacción de formación del heterociclo 1,3,4-oxadiazol a través de la reacción entre la hidrazida derivada del aminoácido *N*-Boc-Phe (**30a**) y un ácido carboxílico comercial simple como el ácido benzoico (**6I-1**) siguiendo la secuencia de reacciones mostrada en el Esquema 38:



Esquema 38: Secuencia de reacción dirigida a la obtención de **33a1**.

La reacción de la hidrazida del aminoácido *N*-Boc-fenilalanina (**30a**) con el ácido benzoico (**6I-1**) en DMF como solvente de reacción se llevó a cabo en presencia de trietilamina (Et₃N) como base y hexafluorofosfato (V) de 1-óxido-3-(bis(dimetilamino)metilen)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridina (HATU) como reactivo de acoplamiento, a 0°C.¹⁰³ De esta manera, se obtuvo el aducto intermediario **32a1** cuya presencia fue evidenciada inicialmente por cromatografía en capa delgada (CCD) y mediante RMN de ¹H y ¹³C (Figuras 34 y 35). En el espectro de ¹H se puede observar una banda ancha a campos bajos centrada a 9.55 ppm

integrada para 2H correspondiente a los protones del grupo diacilhidrazina – CONHNHCO-. A su vez corroboramos la presencia de dicho grupo mediante las señales de ambos carbonilos en el espectro de ^{13}C situadas a 164 y 169 ppm.

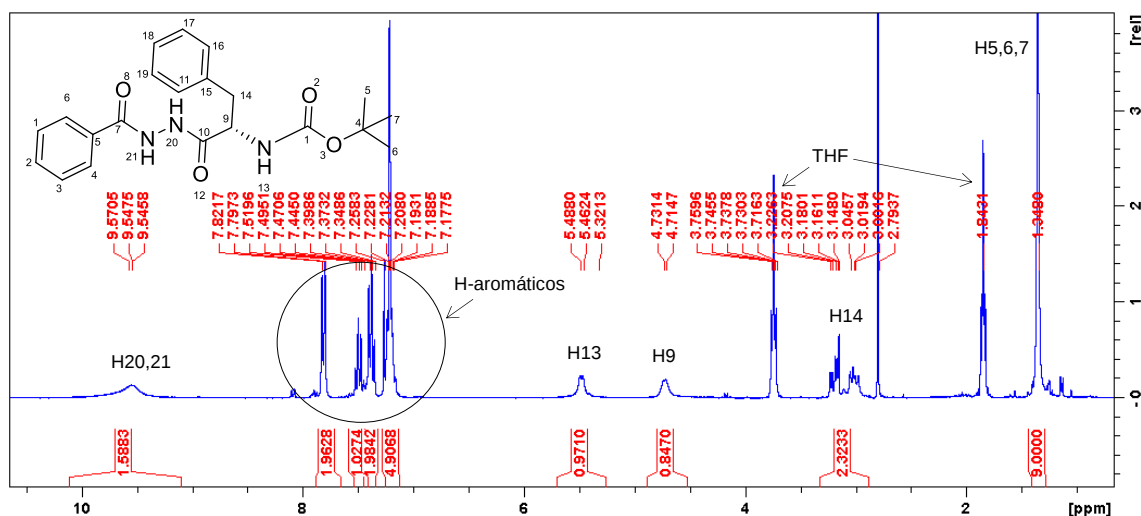


Figura 34: Espectro RMN de ^1H de **32a1**

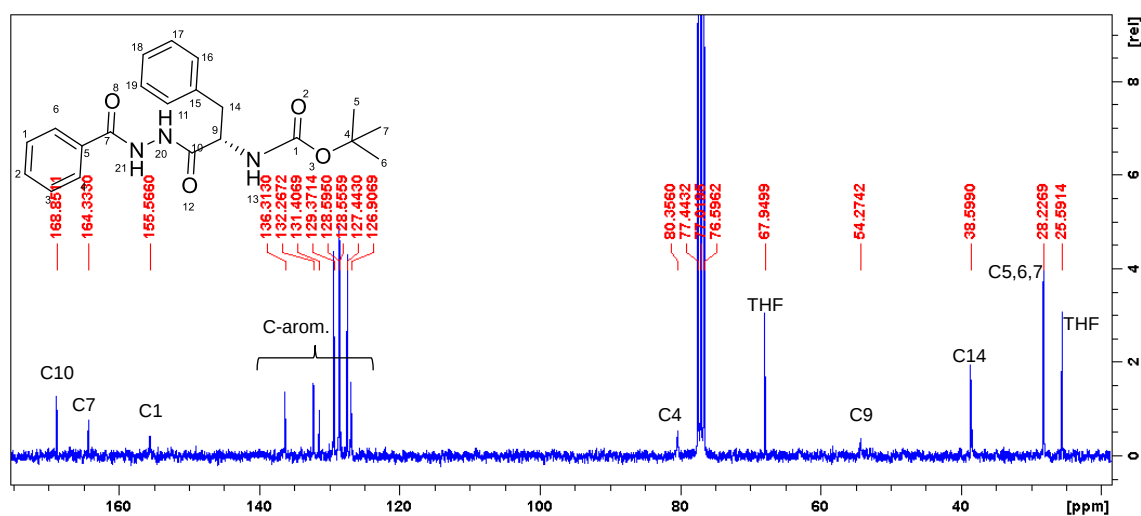
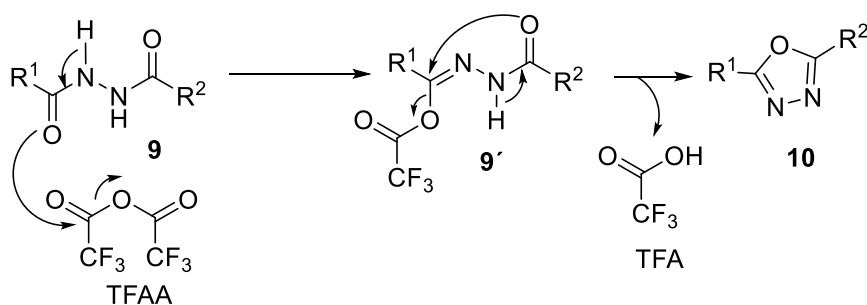


Figura 35: Espectro RMN de ^{13}C de **32a1**

Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de ciclodeshidratación del aducto **32a1**. Se agregó gota a gota anhídrido trifluoroacético (TFAA) a una solución enfriada a 0°C del aducto intermediario **32a1** disuelto en diclorometano en presencia de piridina (Py).¹⁰⁴

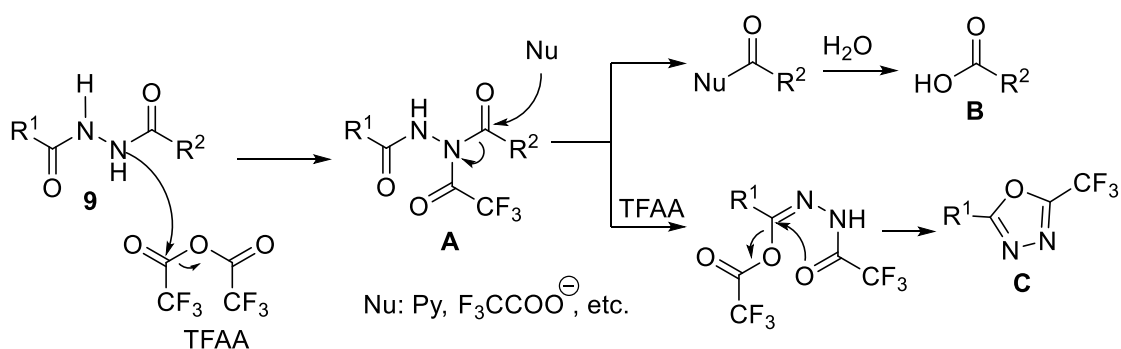
En el Esquema 39 se muestra un mecanismo probable por el cual el TFFA conduce a la ciclodeshidratación del aducto diacilhidrazina **9**.



Esquema 39: Mecanismo probable de ciclodeshidratación con TFAA

Lamentablemente no se tuvo éxito en esta reacción ya que se obtuvo una mezcla de productos secundarios y no se evidenció el compuesto deseado (**33a1**) en los espectros de RMN.

Investigando al respecto, encontramos que lo sucedido podría ser consecuencia de que el TFAA en un medio básico como piridina, se comporte como un agente acilante de la acilhidrazida conduciendo a la formación de un intermediario *N*-acilado (**A**) (Esquema 40). Como resultado, los nitrógenos amídicos serían trifluoroacetilados, lo que podría llevar a la formación de **B** y **C**. Sin embargo, dado a que las fracciones aisladas consistían en mezclas de productos que no se pudieron separar y dilucidar con precisión, no pudimos confirmar este supuesto.



Esquema 40: Mecanismo probable de formación de productos secundarios durante el empleo de TFAA en medio básico como agente de ciclodeshidratación.

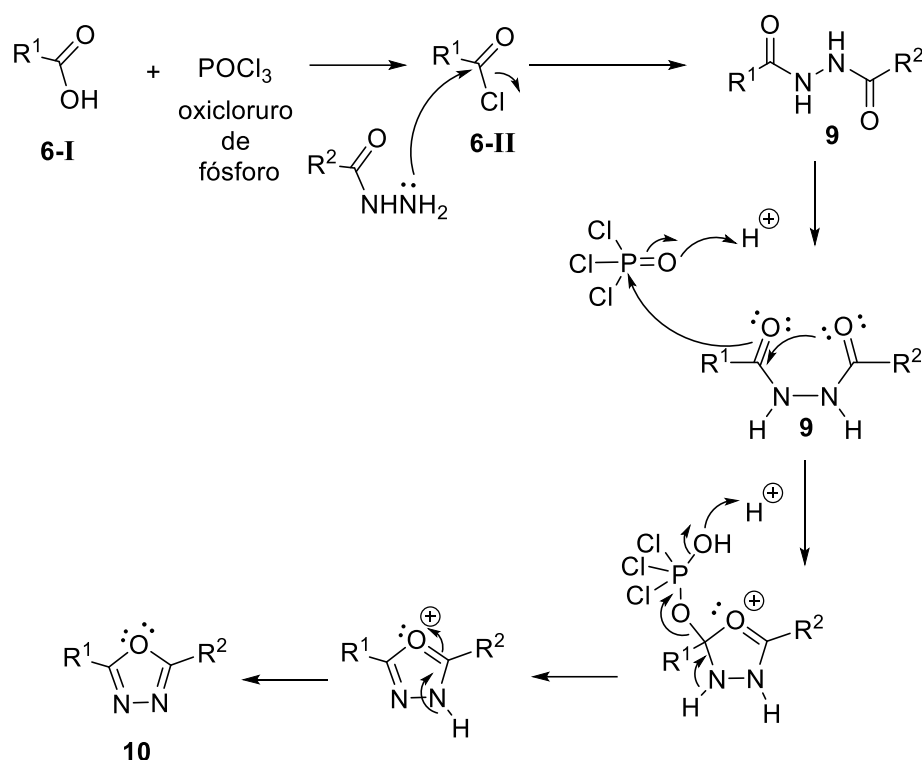
3.1.1.2.2. Ensayo de síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando microondas y POCl_3 como agente ciclodeshidratante.

Continuando con el propósito de encontrar una metodología para formación del anillo 1,3,4-oxadiazólico adaptable a nuestros objetivos, planteamos la posibilidad utilizar calentamiento por microondas.

La irradiación de microondas es una de las técnicas emergentes en síntesis orgánica utilizada para incrementar la velocidad de las reacciones.¹⁰⁵ Además, el uso de microondas se ha extendido en los últimos años por ser una herramienta que optimiza las reacciones químicas en síntesis orgánica ya que, por lo general además de reducir los tiempos de reacción, puede mejorar los rendimientos y/o promover nuevas reacciones. El uso de microondas posibilita, en algunos casos, no emplear un solvente en la reacción (o usar una mínima cantidad, preferentemente polar, para solubilizar los materiales de partida). Por tal motivo, esta técnica resulta atractiva y podría enmarcarse en los lineamientos de la Química Verde, ya que los solventes, además de ser un residuo luego de la reacción, en muchos casos, son contaminantes.

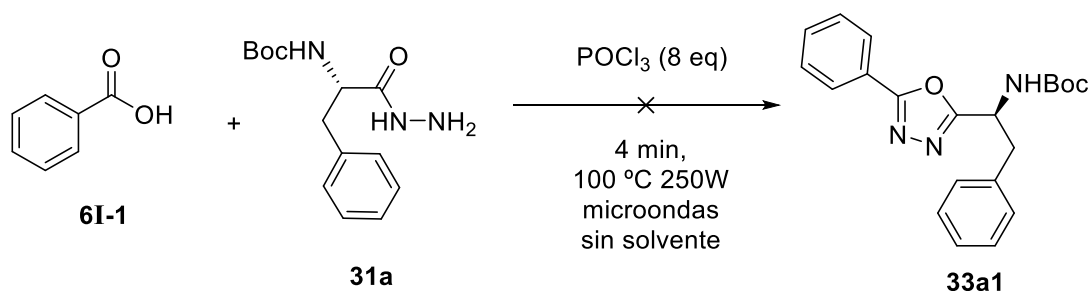
Por otro lado, encontramos que el POCl_3 (oxicloruro de fósforo) había sido empleado como reactivo deshidratante juntamente con radiación de microondas en el trabajo publicado por Dornelles y colaboradores (2015).¹⁰⁶

Un mecanismo propuesto para la formación de los anillos 1,3,4-oxadiazólicos utilizando POCl_3 se muestra en el Esquema 41.¹⁰⁷ La ventaja de este proceso es que el POCl_3 actúa a la vez como activante del ácido carboxílico **6-I** (forma el cloruro de ácido correspondiente **6-II**) para la generación de la diacilhidrazina intermediaria **9**, y como agente deshidratante para la formación del oxadiazol **10**.



Esquema 41: Mecanismo propuesto de formación del anillo 1,3,4-oxadiazólico a partir de un ácido carboxílico y una hidrazida utilizando POCl₃ como agente ciclodeshidratante.

Ensayamos esta metodología en el acoplamiento entre el ácido benzoico (**6I-1**) y la hidrazida derivada de la *N*-Boc-fenilalanina (**31a**) (Esquema 42).



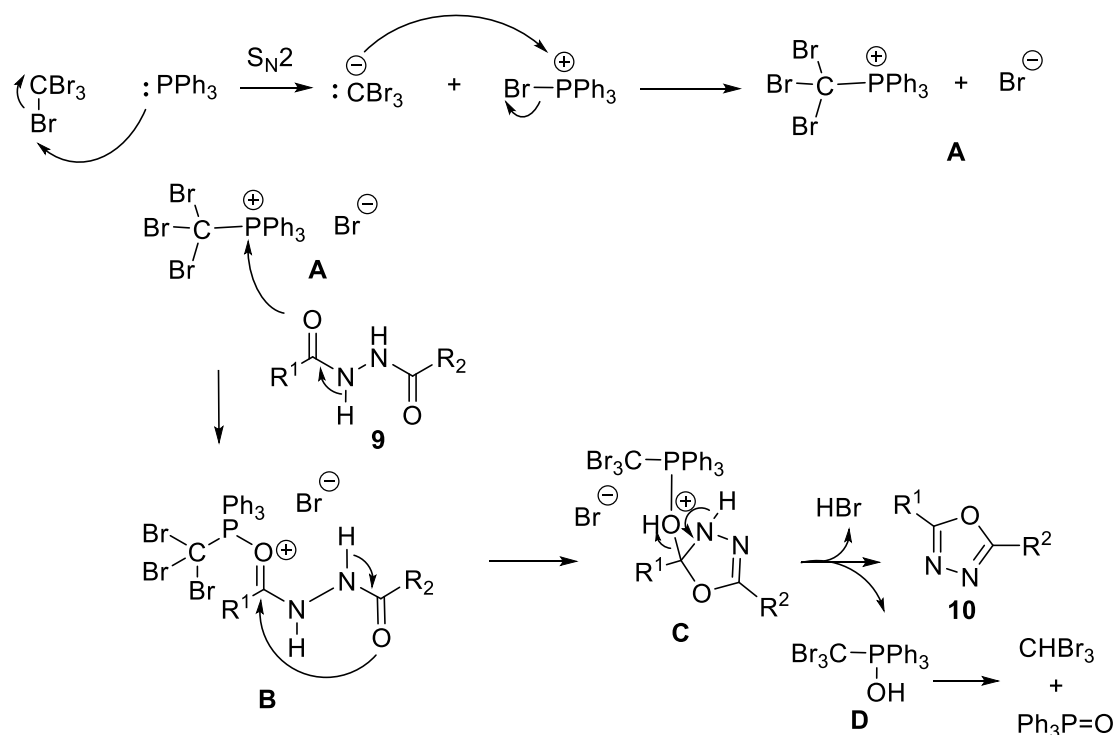
Esquema 42: Ensayo de síntesis del anillo 1,3,4-oxadiazólico empleando POCl₃ como agente de ciclodeshidratación.

Nuevamente, observando el espectro de RMN de ¹H del crudo de la reacción anterior observamos solo productos de descomposición.

3.1.1.2.3. Ensayo síntesis de 1,3,4-oxadiazol utilizando CBr_4 y PPh_3 como agentes ciclodeshidratantes.

A raíz de los resultados anteriores probamos una metodología distinta para lograr la ciclodeshidratación del aducto 1,2-diacilhidrazina utilizando para ello la dupla tetrabromuro de carbono (CBr_4) y trifenilfosfina (PPh_3) como agentes deshidratantes.⁷¹

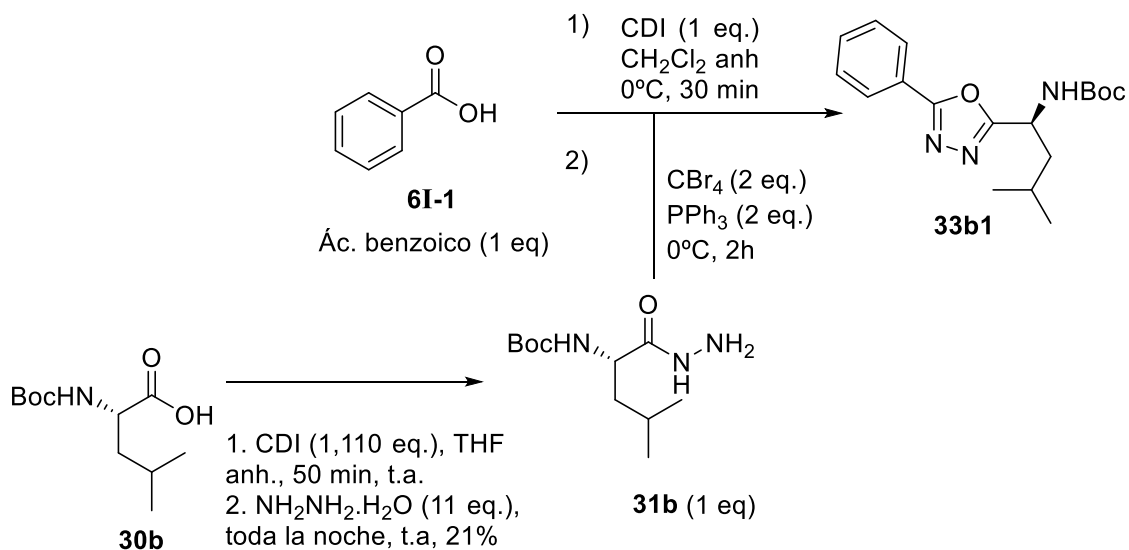
El mecanismo¹⁰⁸ propuesto para esta transformación se muestra en el Esquema 43.



Esquema 43: Mecanismo de reacción propuesto para la ciclodeshidratación de diacilhidrazinas utilizando CBr_4 y PPh_3 .

Inicialmente, la trifenilfosfina reacciona con el tetrabromuro de carbono para dar la sal **A**, la cual sufre un ataque nucleofílico de uno de los oxígenos carbonílicos de la diacilhidrazina **9** creando el intermediario **B**. El siguiente ataque nucleofílico del segundo oxígeno carbonílico conduce a la ciclación y aromatización del sistema, dando finalmente el 1,3,4-oxadiazol correspondiente **10**, bromoformo (CHBr_3), óxido de trifenilfosfonina ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$) y ácido bromhídrico (HBr) como productos secundarios (Esquema 43).

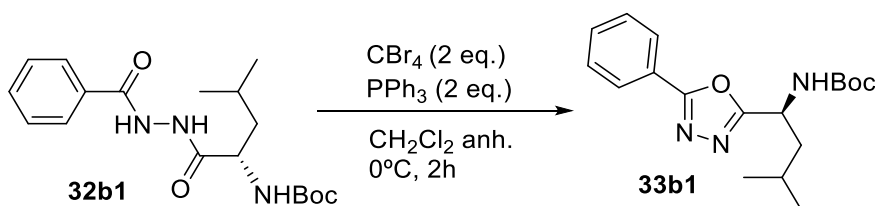
Apoyados en esta nueva metodología, a partir del ácido benzoico y la hidrazida derivada del aminoácido *N*-Boc-leucina (**30b**) llevamos a cabo las reacciones de acoplamiento y ciclodeshidratación en forma *one-pot* como se muestra en el Esquema 44. El ácido benzoico (**6I-1**) fue activado utilizando CDI en diclorometano como solvente de reacción y la reacción fue mantenida a una temperatura de 0°C durante 30 minutos. Luego la hidrazida derivada de *N*-Boc-leucina (**31b**) fue incorporada manteniendo la misma temperatura y agitación durante 45 minutos. El acoplamiento y formación del aducto intermediario (**32b1**, no mostrado) fue seguido por CCD. Finalmente, se agregaron 2 equivalentes del tetrabromuro de carbono y 2 equivalentes de la triphenilfosfina de una sola vez y se dejó la reacción a 0°C durante 2 horas siguiéndola por CCD. Transcurrido ese periodo, a pesar de no evidenciar que la reacción fue completa, se evaporó el solvente a presión reducida y se purificó el crudo de reacción por cromatografía en columna utilizando gradiente de polaridad *n*-hexanos-acetato de etilo.



Esquema 44: Camino sintético de 1,3,4-oxadiazoles empleando CBr_4 y PPh_3 como agentes ciclodeshidratantes.

Afortunadamente logramos con esta metodología la obtención del anillo 1,3,4-oxadiazol **33b1** a partir de los materiales de partida mostrados en el Esquema 43. En las Figuras 37 y 38 se muestran los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para el compuesto **33b1**, respectivamente. Luego de la purificación por columna cromatográfica, además de nuestra fracción de interés, se obtuvieron fracciones mayoritarias correspondientes a materiales de partida y al

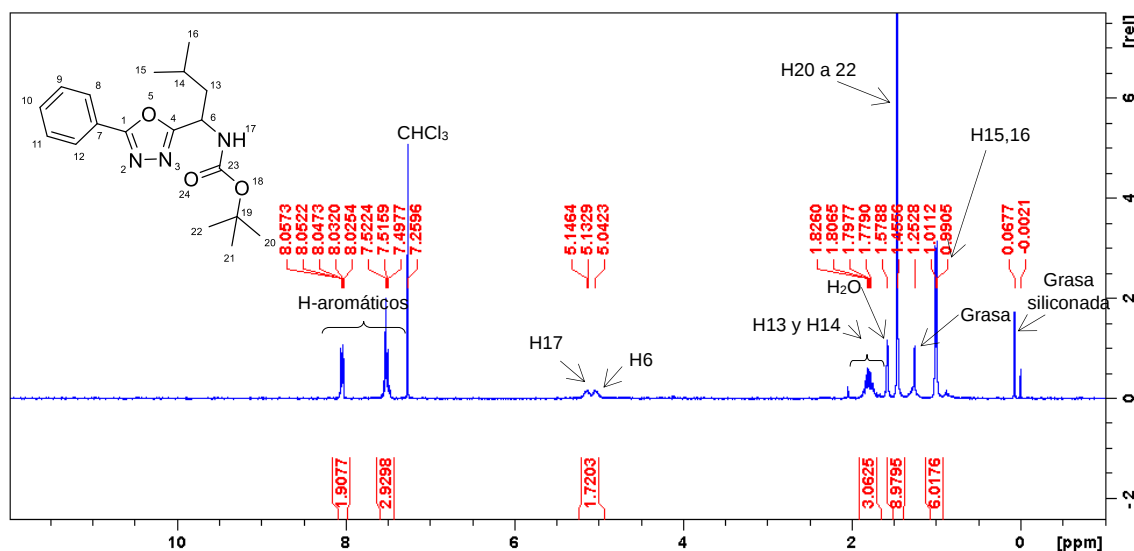
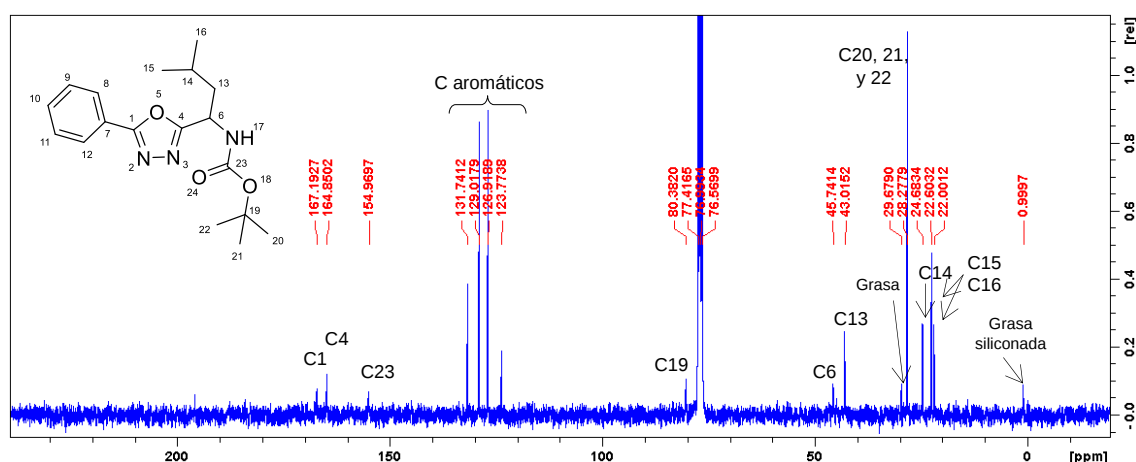
intermediario diacilhidrazina **32b1**. Este último fue sometido nuevamente a las condiciones de ciclación ($\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$) para lograr mayor cantidad del producto deseado (Esquema 45).



Esquema 45: Reacción de ciclación del intermediario **32ba**.

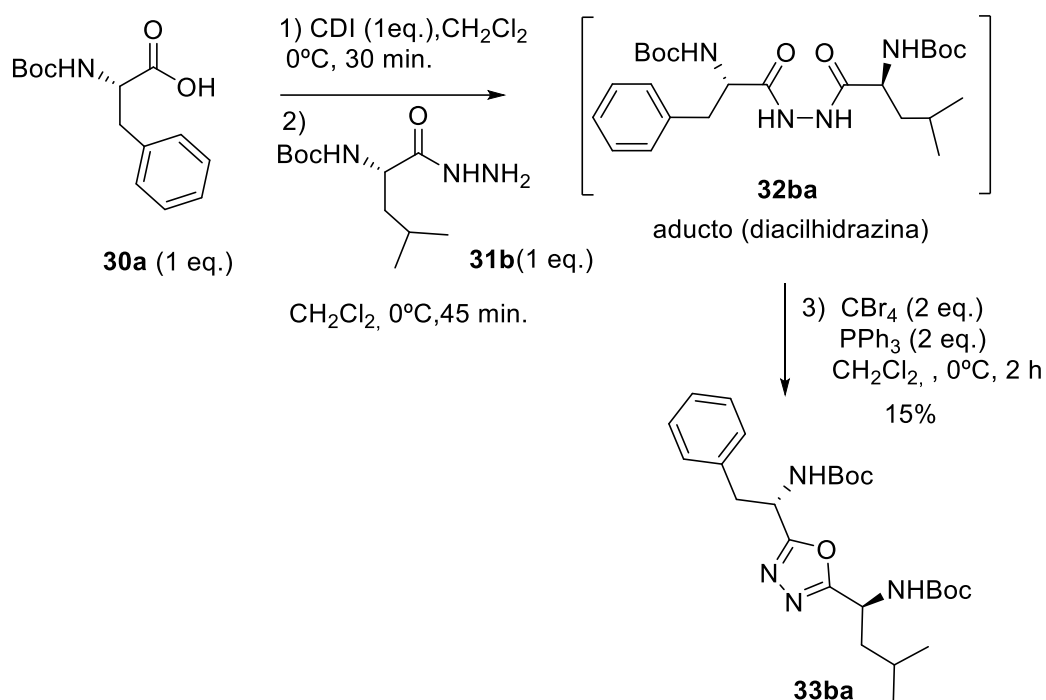
Los rendimientos químicos han sido un aspecto importante que considerar durante todo el trabajo de tesis. Sin embargo, considerando los propósitos inicialmente planteados, nuestro enfoque principal fue lograr la obtención de los derivados híbridos. Por tal motivo, a pesar de que el rendimiento de la reacción anterior fue bajo (alrededor del 10%), decidimos continuar trabajando con esta metodología para la obtención de más derivados 1,3,4-oxadiazólicos.

En la Figura 36, donde se muestra el espectro RMN de ^1H de **33b1**, se puede apreciar la ausencia de las señales correspondientes a los protones del grupo diacilhidrazina (banda ancha a campos bajos centrada a 9.55 ppm) lo que da un indicio de la ciclación del aducto intermediario **32b1**. Por otro lado, el protón unido al carbono alfa del resto de leucina se desplaza a campos más bajos (de 4,48 a 5,04 ppm) mientras que el protón NH aminoacídico lo hace a campos más altos (de 5,46 a 5,14 ppm). El espectro de RMN de ^{13}C de **33b1** (Figura 37) no muestra gran diferencia respecto al espectro del aducto intermediario **32b1**, solamente un leve desplazamiento de los carbonos C1 y C6 de **33b1** a campos más altos.


 Figura 36: Espectro de RMN ^1H de **33b1**

 Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C de **33b1**

Continuamos con la síntesis de otro derivado conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazólicos con restos aminoacídicos utilizando la misma metodología que en el derivado anterior.

Como se muestra en el Esquema 46 se llevó a cabo el acoplamiento, mediante CDI, de la hidrazida derivada del aminoácido *N*-Boc-Leu (**31b**) con el aminoácido *N*-Boc-Phe (**30a**). Posteriormente, el aducto formado **32ba** se cicló empleando la dupla CBr_4 y PPh_3 .

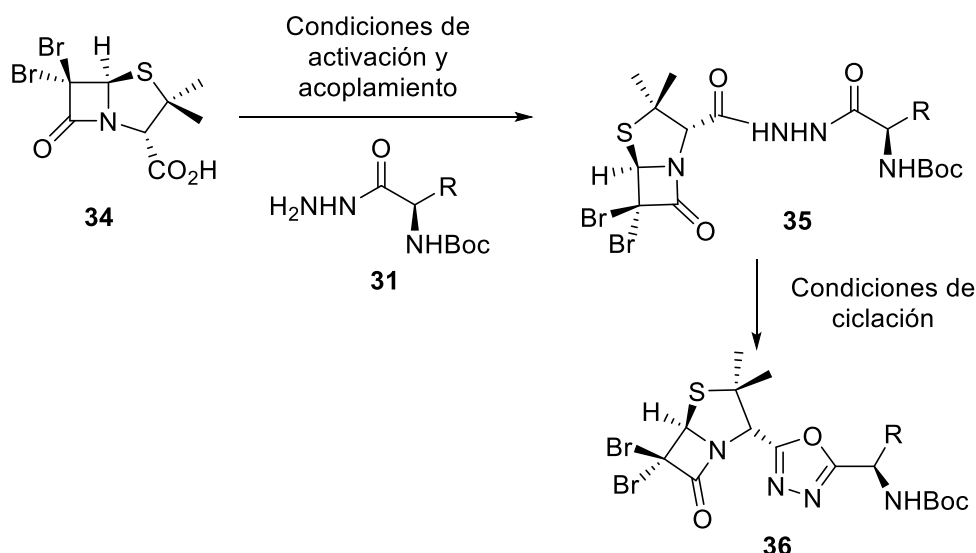


Esquema 46: Formación de 1,3,4-oxadiazoles 2,5 disustituídos con restos aminoacídicos empleando CBr_4 y PPh_3 como agentes ciclodeshidratantes.

La formación de **32ba** fue corroborada por los datos espectroscópicos (RMN de ^1H y ^{13}C).

3.1.2. Unión de estructuras penicilínicas y aminoacídicas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

La primera opción considerada para este objetivo fue la activación de una estructura penicilínica **34** seguida del acoplamiento de una serie de hidrazidas basadas en *N*-Boc-aminoácidos **31**. Los aductos **35** se exponen a condiciones de ciclación hasta conseguir los productos deseados **36** (Esquema 47).



Esquema 47: Esquema general de unión de estructuras penicilínicas y aminoácidas mediante el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

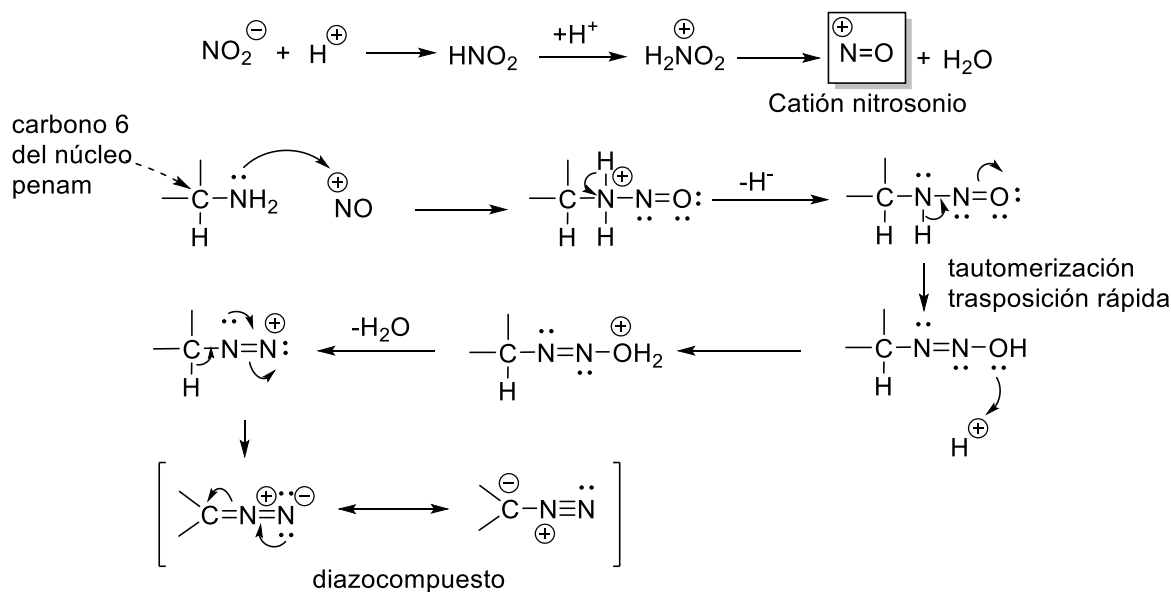
3.1.2.1. Formación del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**).

Inicialmente se llevó a cabo la dibromación del ácido 6 β -aminopenicilánico (**6-APA**) en posición 6 para obtener el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**). Los derivados 6,6-dibromosustituídos de penicilinas son ampliamente utilizados en química de compuestos β -lactámicos dado su estabilidad y versatilidad como materiales de partida para la obtención de distintos compuestos de interés biológico.

El ácido 6 β -aminopenicilánico (**6-APA**) presenta varias ventajas tales como su fácil disponibilidad y la presencia en su estructura de grupos funcionales que permiten acceder a la molécula deseada a partir de transformaciones sencillas.

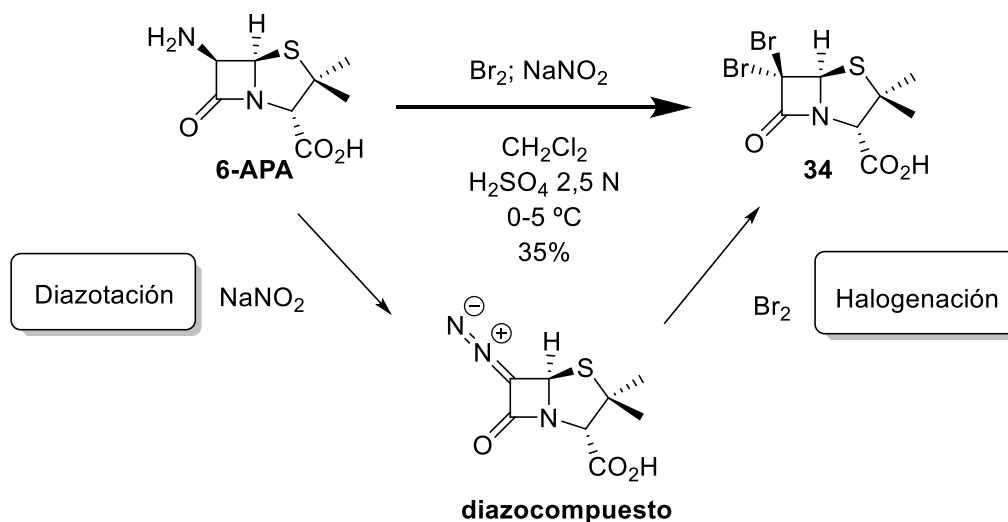
La modificación se realizó sobre la posición 6 del núcleo penam del **6-APA**. Esta transformación fue realizada por primera vez en 1969 por J. P. Clayton.¹⁰⁹ Sin embargo, en este trabajo dicho compuesto ha sido sintetizado siguiendo el procedimiento de R. A. Volkmann, en 1982.¹¹⁰

A partir de **6-APA** se realizó una reacción de diazotación utilizando NaNO_2 y H_2SO_4 , obteniendo el intermediario ácido 6-diazopenicilánico (diazocompuesto). Este intermediario se obtiene cuando el ácido nitroso, generado *in situ* por el nitrito de sodio y el ácido sulfúrico reacciona con el grupo amino libre de posición 6 del 6-APA (Esquema 48).



Esquema 48: Mecanismo de formación del intermediario ácido 6-diazopenicilánico (diazocompuesto).

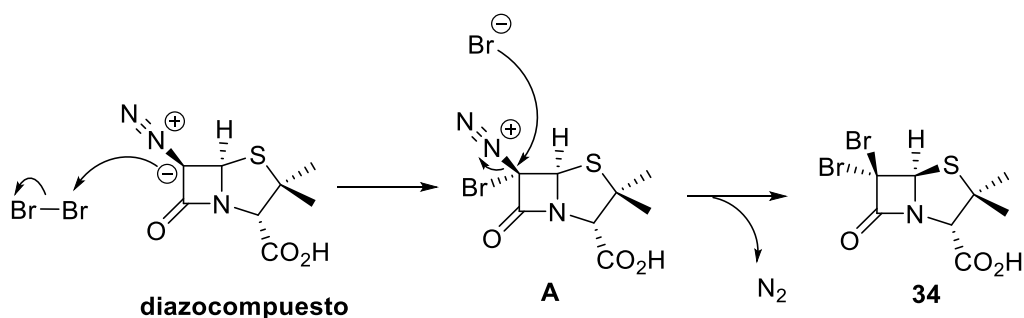
Posteriormente, se procedió a realizar la gem-dibromación *in situ* del ácido 6-diazopenicilánico empleando bromo, obteniéndose el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**). Esquema 49.



Esquema 49: Síntesis del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**).

En el Esquema 50 se muestra el posible mecanismo de este último paso de síntesis. El ácido 6-diazopenicilánico (diazocompuesto) reacciona con el bromo para dar el ión intermediario **A**, el cual se convierte en el ácido 6,6-

dibromopenicilánico (**34**) a través de una sustitución nucleofílica bimolecular llevada a cabo por el ataque el anión bromuro.



Esquema 50: Mecanismo propuesto para la formación del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**).

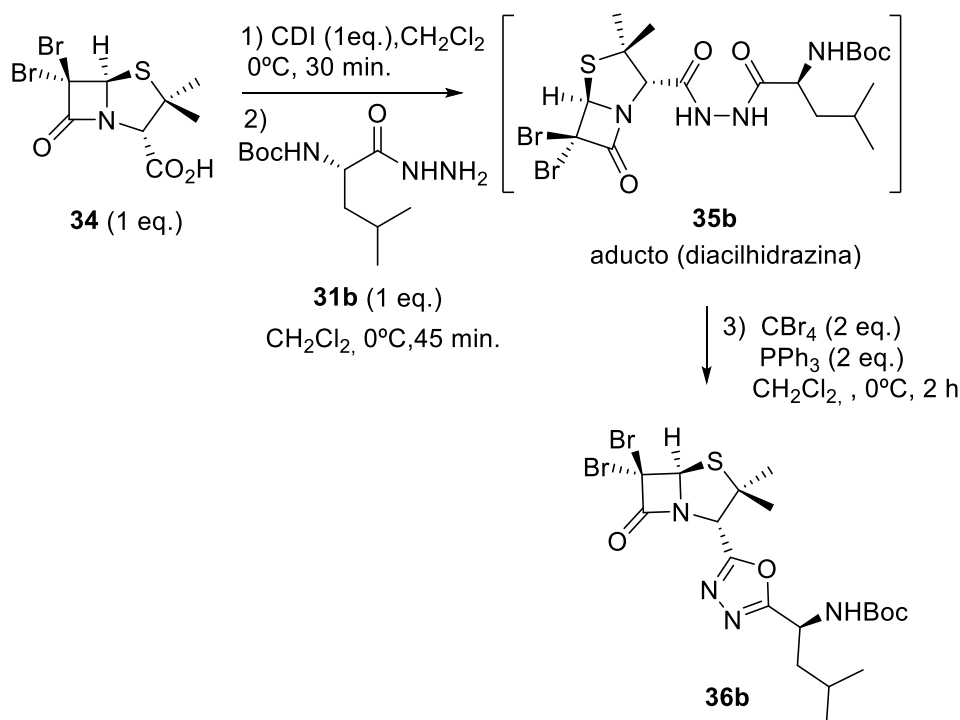
Este ácido **34** es un sólido cristalino de fácil recrystalización en agua, soluble en todos los solventes orgánicos, excepto hidrocarburos y muy estable aún a temperatura ambiente.

El derivado penicilánico dibromado **34** se utilizó posteriormente como bloque de construcción común para la elaboración de la quimioteca de compuestos híbridos conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazol y un resto aminoacídico.

3.1.2.2. Ensayo de acoplamiento y posterior ciclación entre **34** y la hidrazida derivada del aminoácido de *N*-Boc-Leu **31b**.

Una vez obtenido el derivado el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**), continuamos con el acoplamiento de éste con una hidrazida derivada del aminoácido *N*-Boc-Leu (**31b**), la cual fue nuevamente sintetizada utilizando la metodología descrita en la sección 3.1.1.1.1. (página 48).

Como se muestra en el Esquema 51, el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) fue activado con CDI y acoplado a la hidrazina derivada de *N*-Boc-Leu (**31b**). La formación del aducto intermediario **35b** se siguió por CCD y por último la ciclodeshidratación se llevó a cabo empleando la cupla $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$. El producto final **36b** se purificó por columna cromatográfica usando gradiente de polaridad *n*-hexano-acetato de etilo con un rendimiento del 12%.



Esquema 51: Síntesis de **36b** a partir de **34** y **31b**.

En las Figuras 38 y 40, se muestran los espectros de RMN de ¹H y ¹³C correspondientes a **36b**, respectivamente.

Al igual que en los casos anteriores, la desaparición de las señales correspondientes a los protones del grupo diacilhidrazina en el aducto **35b** fue una referencia de la ciclación del intermediario. Por otro lado, se observa el desplazamiento de la señal de H3, contiguo al oxadiazol, a campos más bajos. Las señales de los protones H18 y H19, correspondientes al resto aminoacídico, también sufren un desplazamiento, tendiendo a agruparse en una región centrada en 5 ppm. Las señales de los carbonos de **36b** no muestran grandes cambios en el espectro RMN de ¹³C respecto al aducto **35b**.

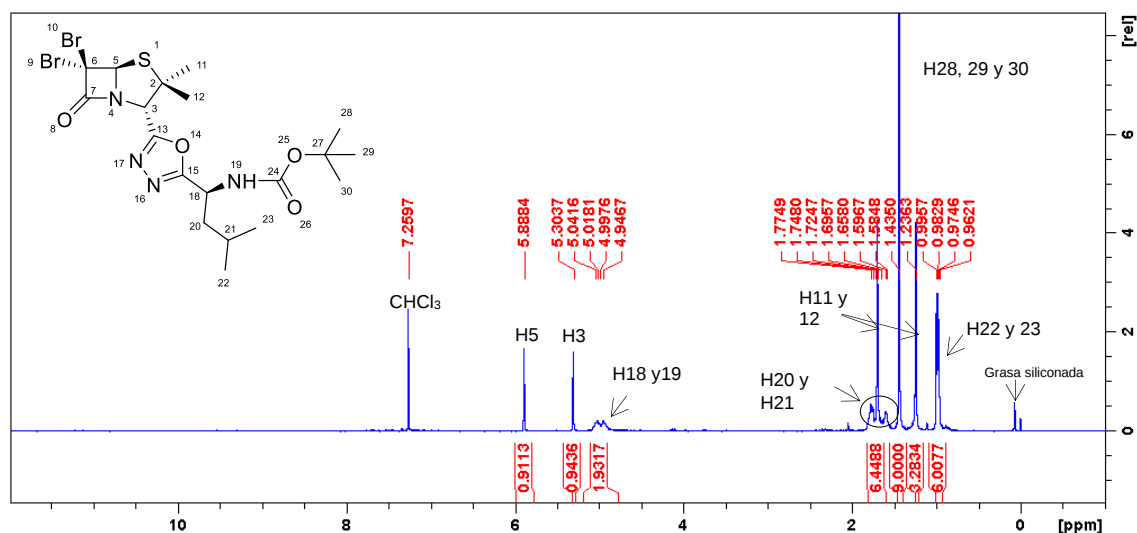


Figura 38: Espectro RMN de ^1H de **36b**.

La asignación de los carbonos en el compuesto **36b** fue posible a partir de la realización del espectro bidimensional HSQC (Figura 39).

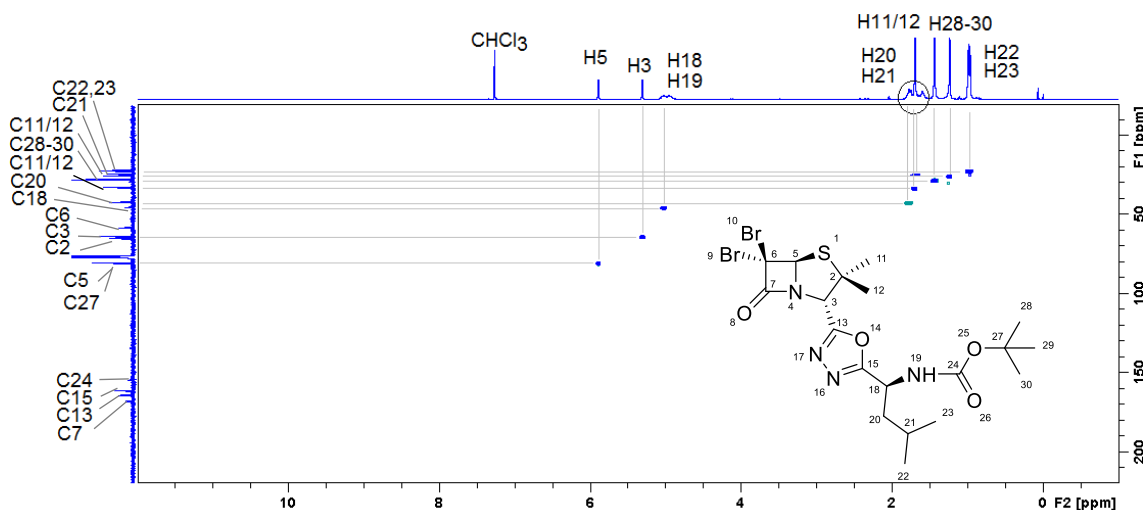


Figura 39: Espectro HSQC de **36b**.

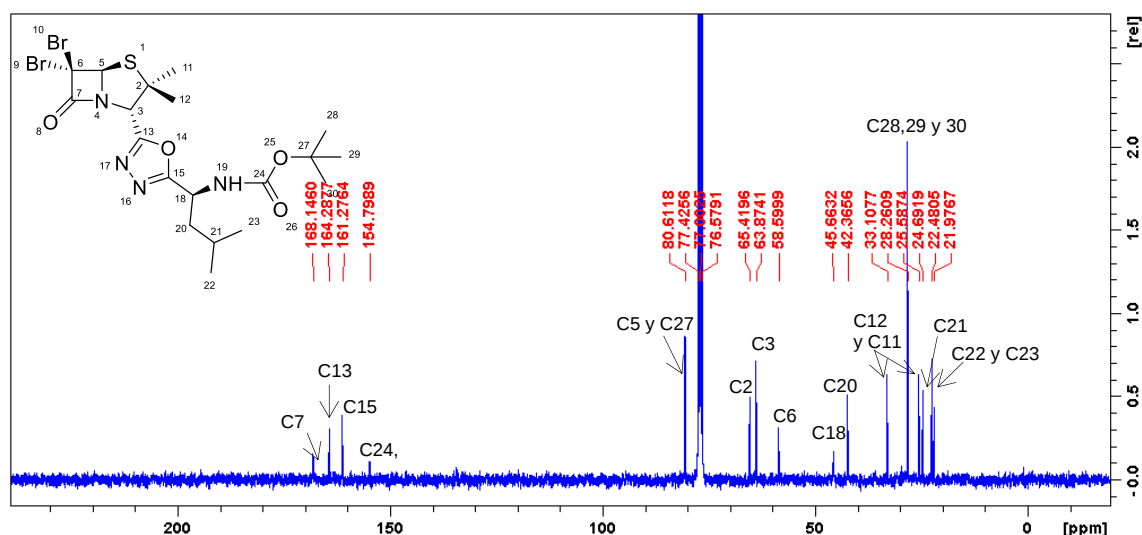


Figura 40: Espectro RMN de ^{13}C de **36b**.

Además, se separaron fracciones correspondientes al aducto intermediario **35b**, evidenciado por RMN de ^1H (Figura 41), en el cual se pueden apreciar los NH de la diacilhidrazina (H15 y H16) cuyos desplazamientos químicos aparecen a 9.80 y 10.08 ppm y productos secundarios.

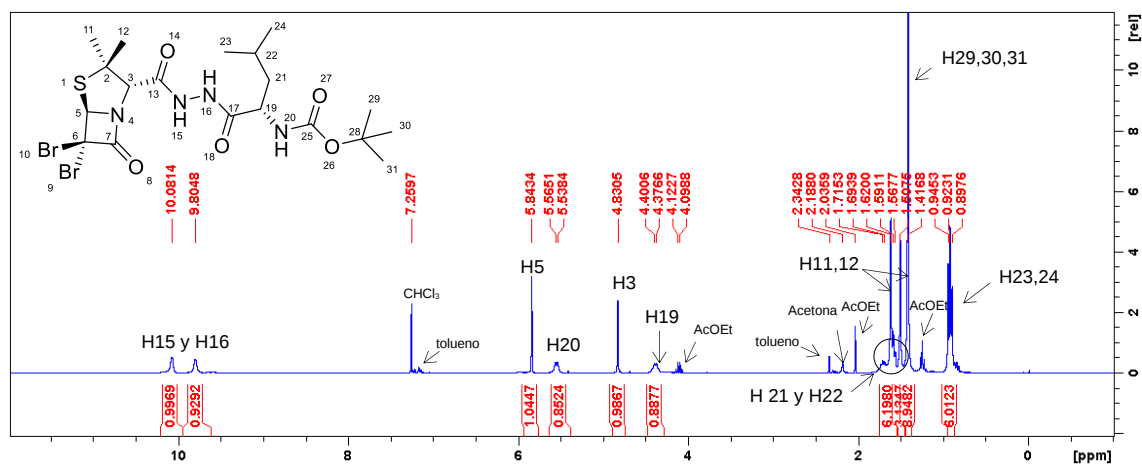
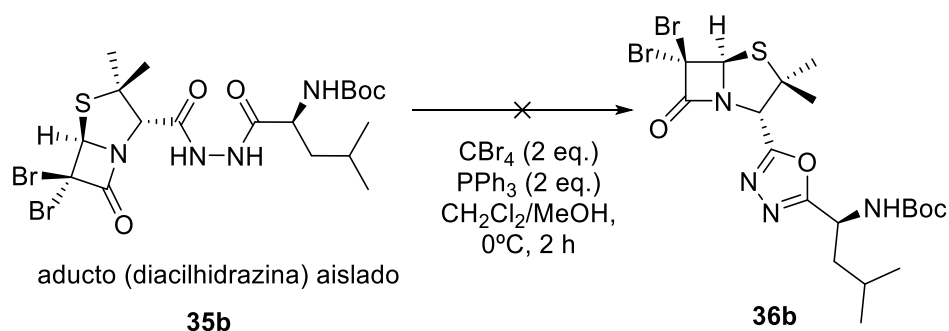


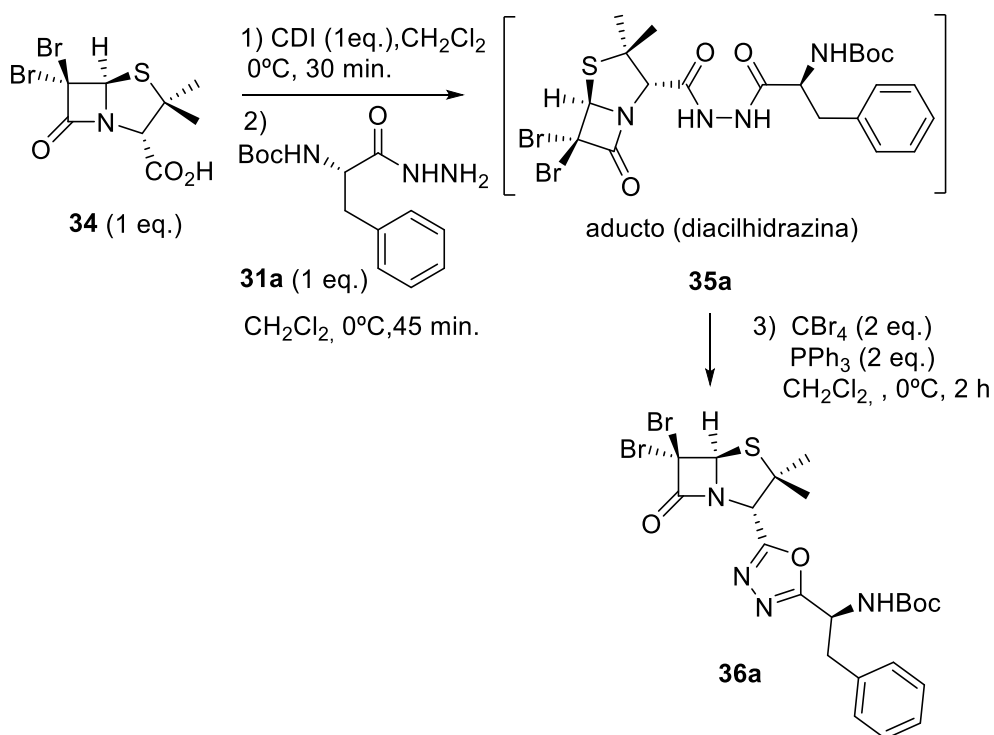
Figura 41: Espectro RMN de ^1H del aducto **35b**.

El aducto aislado **35b** fue sometido nuevamente a las condiciones de ciclodeshidratación ($\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$), pero no logramos obtener mayor cantidad adicional del producto deseado. En esta reacción además de utilizar diclorometano anhidro como solvente de reacción se utilizó una pequeña cantidad de metanol anhidro para ayudar a la disolución del aducto **35b** (Esquema 52).



Esquema 52: Ensayo de ciclación del aducto **35b** recuperado.

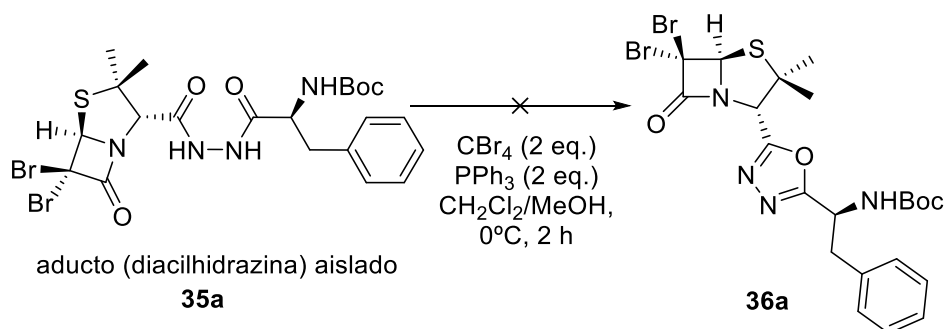
Continuamos con el acoplamiento de la hidrazida derivada de *N*-Boc-Phe **31a** al derivado penicilánico dibromado **34**. Se repitieron las mismas condiciones que para el caso anterior, logrando el híbrido deseado con un rendimiento del 15% (Esquema 53).



Esquema 53: Síntesis de **36a** a partir de **34** y **31a**

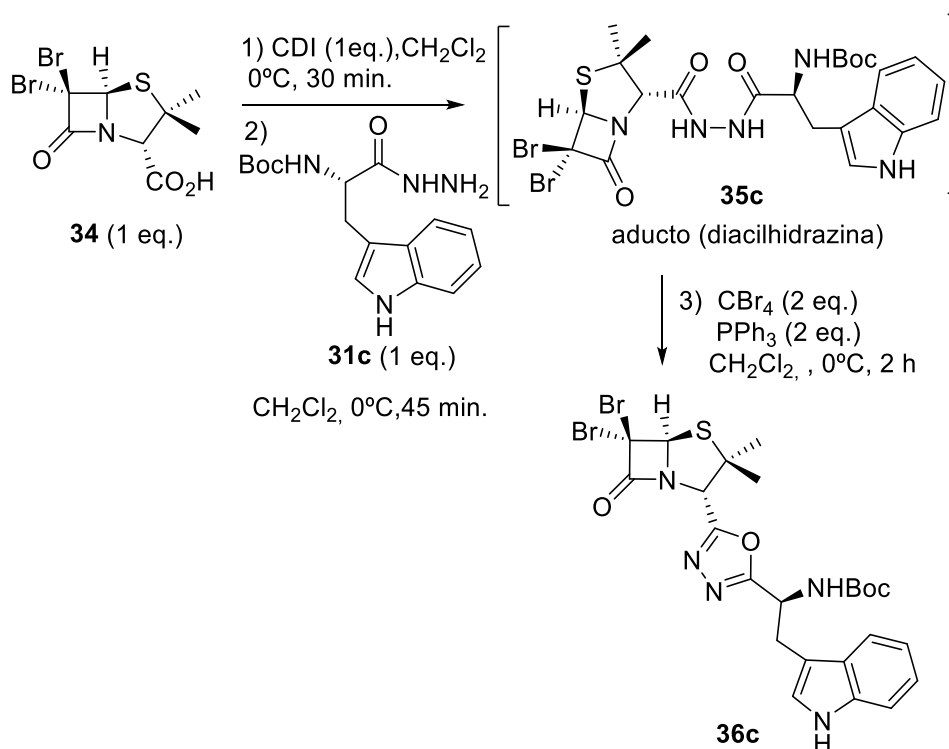
El producto deseado **36a** fue identificado por medio de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , donde se aprecian las señales esperadas para este 1,3,4-oxadiazol híbrido entre una penicilina y un aminoácido.

Nuevamente, fue posible aislar el aducto intermediario **35a** luego de la purificación del crudo de reacción y sometido posteriormente a las condiciones de ciclación (Esquema 54). Al igual que en el caso anterior no evidenciamos la formación del anillo 1,3,4-oxadiazólico.



Esquema 54: Ensayo de ciclación del aducto **35a** recuperado.

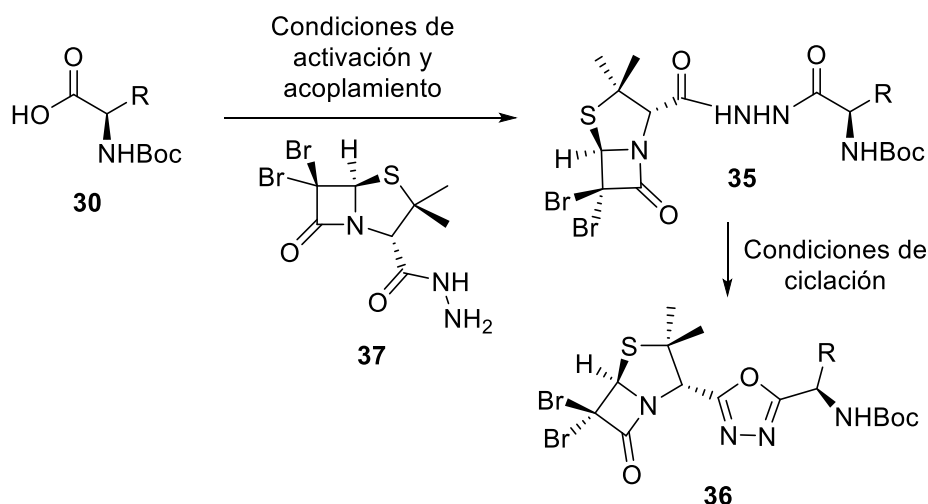
Posteriormente sintetizamos la hidrazida derivada del aminoácido *N*-Boc-Trp **31c** y llevamos a cabo la misma secuencia sintética y metodología que para los derivados oxadiazólicos anteriores. Según las placas de CCD realizadas al crudo de reacción, el nuevo derivado oxadiazólico **36c** se encontraba flanqueado de varios productos secundarios de muy cercana polaridad. Finalmente, **36c** se obtuvo con un rendimiento del 12%, luego de purificación por columna cromatográfica usando gradiente de polaridad *n*-hexano-acetato de etilo (Esquema 55).



Esquema 55: Síntesis de **36c** a partir de **34** y **31c**.

En el espectro de RMN ¹H de **31c** (en CDCl₃) encontramos la esperada desaparición de las señales de los protones del grupo diacilhidrazina lo que nos confirmó la ciclodeshidratación del aducto **35c**. Se conservó el mismo patrón de corrimiento de las señales respecto al intermediario en este derivado oxadiazólico. Nuevamente, las señales de los carbonos no mostraron gran diferencia respecto al aducto **35c** en el espectro de RMN de ¹³C.

La segunda opción considerada para este objetivo fue la formación de la hidrazida derivada de la estructura penicilínica **37** seguida del acoplamiento de una serie de *N*-Boc-aminoácidos **30**. Luego, las diacilhidrazinas **35** se exponen a condiciones de ciclación con el objetivo de conseguir los productos cíclicos deseados **36** (Esquema 56). Los productos esperados tendrían la misma conectividad que aquellos obtenidos a partir de ácidos penicilánicos e hidrazidas de aminoácidos, ya que se trata de un heterociclo simétrico.



Esquema 56: Esquema general de la reacción de una hidrazida de penicilina y un aminoácido para formar el heterociclo 1,3,4-oxadiazol.

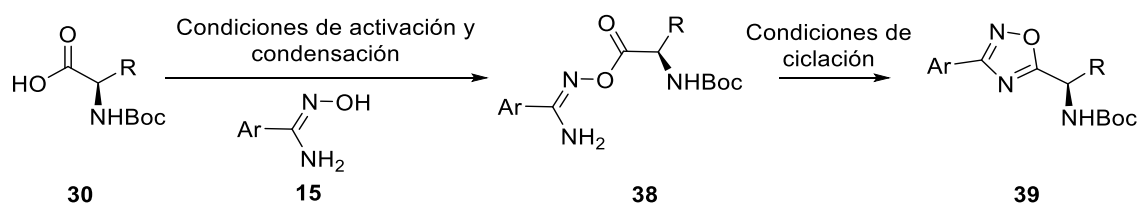
Lamentablemente las condiciones básicas y nucleofílicas del monohidrato de hidrazina requerida para la formación de la hidrazida **37** promueven la apertura del anillo β -lactámico y esta estrategia no pudo continuarse.

3.2 Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico.

En este capítulo continuamos con el desarrollo de estructuras híbridas, en este caso conectadas por medio del heterociclo 1,2,4-oxadiazol. Se han informado en bibliografía diversos métodos sintéticos generales para sistemas de anillo de 1,2,4-oxadiazol¹¹¹: (a) ciclación de *O*-acilamidoxima; (b) ciclación de *N*-acilamidoxima; (c) oxidación de 4,5-dihidro-1,2,4-oxadiazoles; (d) cicloadición 1,3-dipolar de óxidos de nitrilo con nitrilos y compuestos relacionados; y (e) reordenamiento de otros heterociclos. El método más comúnmente adoptado es la ciclación de *O*-acilamidoximas obtenidas de la acilación de las amidoximas con ácidos carboxílicos o ácidos carboxílicos derivados. Estos métodos de síntesis han sido optimizados a lo largo de los últimos años incorporando nuevas tecnologías tales como el empleo de soportes sólidos (síntesis en fase sólida) y la asistencia de calentamiento por microondas que, a su vez, han sido adaptadas a la síntesis de otros heterociclos similares como los isoxazoles.

En primer término, se intentó llevar a cabo el acoplamiento de derivados de aril-amidoximas **15** con *N*-Boc-aminoácidos **30** y la posterior ciclación de los aductos formados (**38**, *O*-acilamidoximas). Nuestro propósito inicial fue que los dos sustituyentes de interés estén conectados al núcleo oxadiazólico en

posiciones, 3 y 5, del anillo 1,2,4-oxadiazólico. En el Esquema 57 se muestra el camino sintético general para la obtención de esta clase de compuestos híbridos **39**.



Esquema 57: Camino sintético general para la obtención de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazol.

3.2.1. Síntesis de aril-amidoximas

El término amidoxima fue empleado por primera vez en 1884 por Tiemann para referirse a estructuras químicas identificadas como oximas en la que uno de los sustituyentes era un grupo amino (Figura 42).

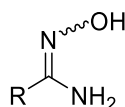


Figura 42: Estructura general de una amidoxima.

Estos compuestos han ganado mucho interés en distintos campos de investigación. Desde la perspectiva médica, exhiben actividades biológicas beneficiosas tales como antitripanocidas,¹¹² antituberculosos,¹¹³ hipotensivos y antiarrítmicos,¹¹⁴ antibacterianos y fungicidas.¹¹⁵ Además, el grupo funcional amidoxima se suele considerar como bioisómero de un ácido carboxílico, y existen algunos ejemplos exitosos de candidatos a fármacos que contienen el grupo amidoxima y exhiben propiedades antiartríticas y cardiotónicas.¹¹⁶ Desde el punto de vista químico, estos compuestos son relativamente fáciles de sintetizar y son empleados para la síntesis de una gran variedad de compuestos valiosos.

Las amidoximas han sido poco estudiadas en la literatura con respecto a su isomería. Este aspecto tiene gran importancia para la determinación de su estructura. Estos compuestos pueden exhibir isómeros geométricos Z o E.

(Figura 43). Numerosos estudios mostraron que la forma Z es la configuración más estable. Esto fue probado por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en los que el calentamiento y fusión de la forma E llevó a su isomerización a la forma Z. Ambas formas pueden estar presentes pero la forma E se encuentra en general en menor proporción.¹¹⁷

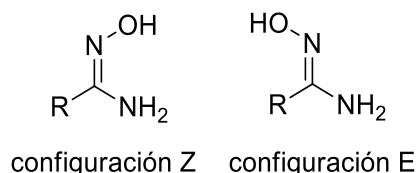
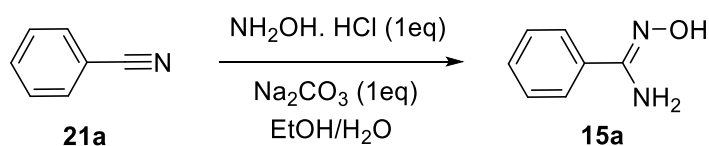


Figura 43: Isómeros E y Z de la funcionalidad amidoxima.

Los isómeros Z sean probablemente más estables debido a la posibilidad de formación de puente de hidrógeno intramolecular entre el resto NH_2 y el OH .¹¹⁸ Por razones puramente geométricas, es evidente que la formación directa del anillo 1,2,4-oxadiazólico solo es posible cuando la amidoxima adopta la forma Z.

Como en el capítulo anterior, comenzamos nuestros ensayos con materiales de partida sencillos. Por lo tanto, se inició con la síntesis de la amidoxima **15a** probando dos metodologías, ambas utilizando benzonitrilo (**21a**), hidrocloreuro de hidroxilamina como materiales de partida y una base como carbonato de sodio en una mezcla de etanol-agua. Una de ellas (método A, Esquema 58) se llevó a cabo utilizando sonicación ya que se encontraron antecedentes de su aplicación en este tipo de transformaciones químicas.¹¹⁹ Dicha metodología consiste en la aplicación de ondas de ultrasonido de alta intensidad en el medio de reacción lo que lleva a la formación y colapso de microburbujas en dicho medio (cavitación acústica).¹²⁰ Esta técnica fue probada reiteradas veces hasta encontrar las condiciones más óptimas, las cuales consistieron en aplicar sonicación durante 40 minutos a 50 °C, dando un rendimiento de 18% del producto esperado.¹¹⁹ Por otro lado, se llevó a cabo la reacción de obtención de la misma amidoxima **15a** utilizando el método convencional (método B, Esquema 58)¹²¹ el cual consiste en dejar la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente dando un mejor rendimiento que la metodología anterior (67%).



Metodo A: sonicación, 50 °C, 40 min, 18%

Metodo B: 24h t.a, 67%

Esquema 58: Comparación métodos de síntesis de la amidoxima **15a**

En el espectro de RMN de ^1H de **15a** (Figura 44) se muestra la aparición de un singlete ancho a 4,88 ppm correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$. El protón perteneciente al grupo $-\text{OH}$ es intercambiable y su señal no suele aparecer en el espectro de RMN de ^1H . La formación del grupo amidoxima la pudimos confirmar con el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45). Mientras que la señal referida al carbono del grupo nitrilo ($-\text{CN}$) en el material de partida posee un desplazamiento químico de 119 ppm, en el espectro RMN de ^{13}C de **15a** podemos observar que el carbono del grupo oxima derivado sufre un desapantallamiento mostrando un desplazamiento de la señal a campos más bajos (152,70 ppm).

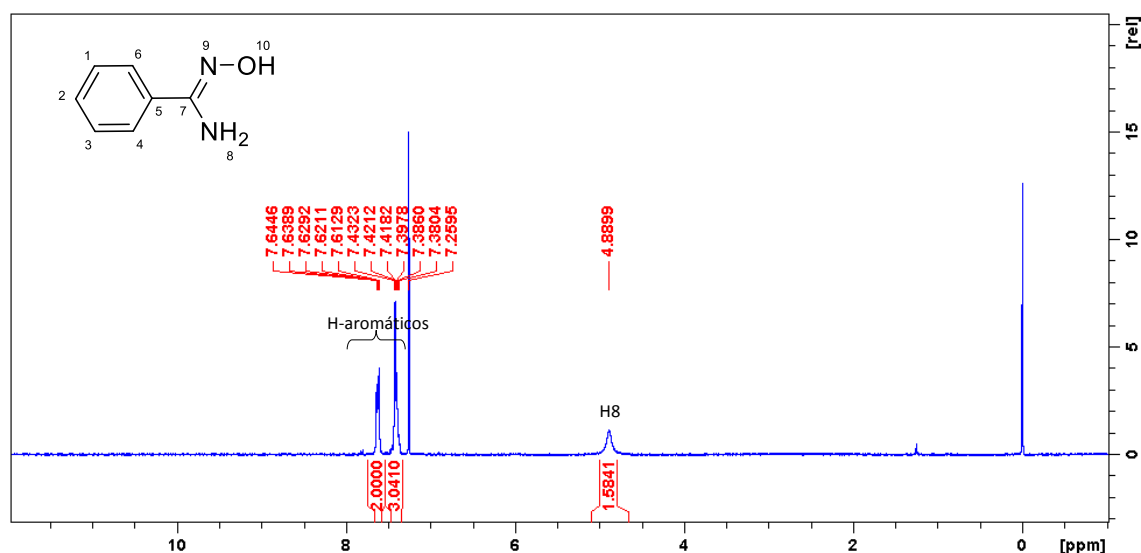


Figura 44: Espectro RMN de ^1H de **15a**.

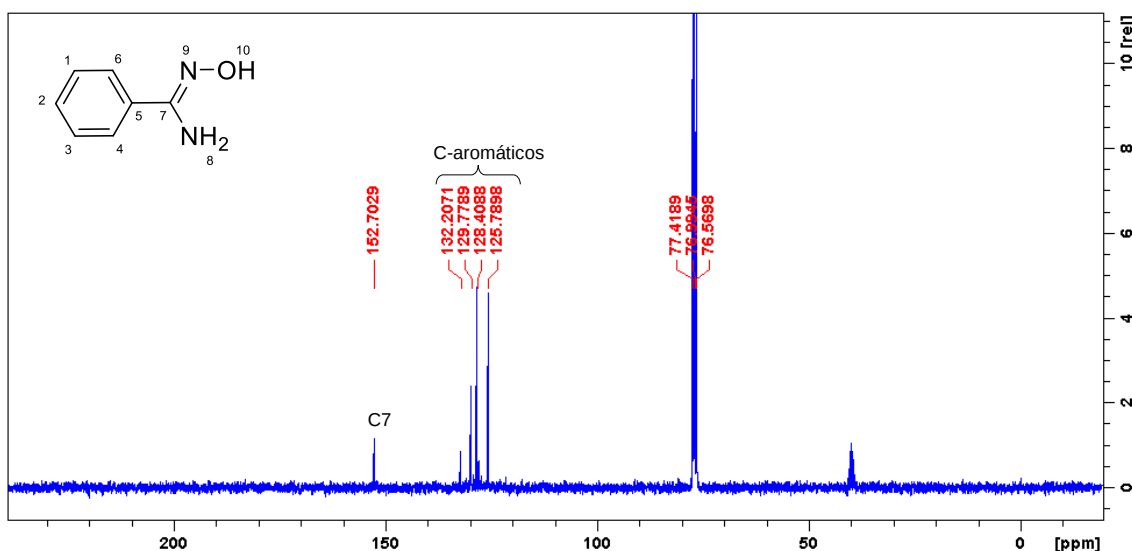
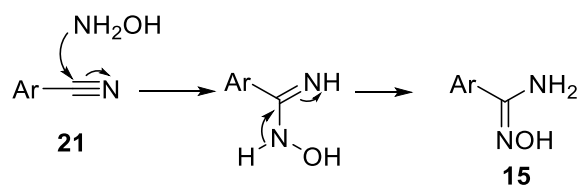


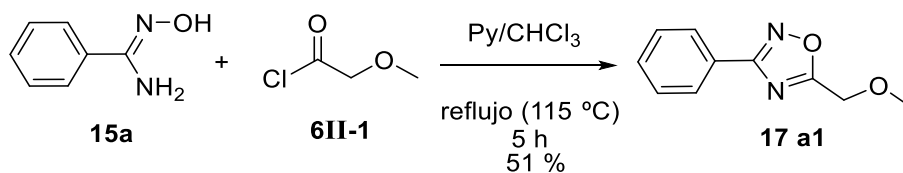
Figura 45: Espectro RMN de ^{13}C de **15a**.

El mecanismo aceptado para la formación del grupo amidoxima se muestra en el Esquema 59.



Esquema 59: Mecanismo probable de formación del grupo amidoxima a partir del grupo nitrilo.

Luego se ensayó la formación del 1,2,4-oxadiazol a partir de la amidoxima **15a** y un cloruro de ácido comercial, el cloruro de 2-metoxiacetilo (**6II-1**). De esta manera el oxadiazol **17a1** se obtuvo con 51% de rendimiento (Esquema 60).¹²²

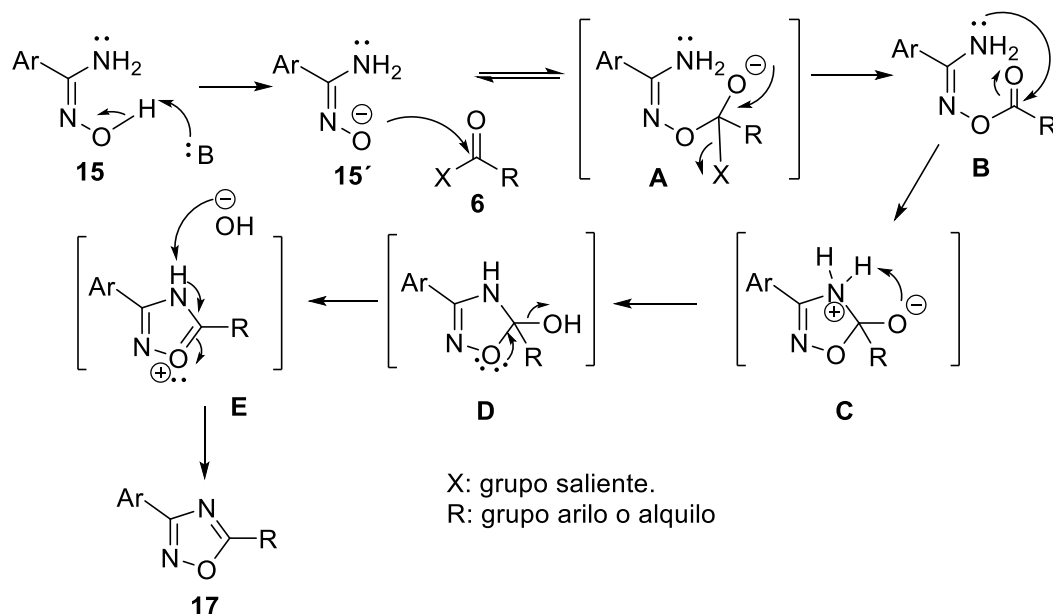


Esquema 60: Síntesis de anillo 1,2,4-oxadiazólico a partir de cloruro de ácido y amidoxima.

La reacción anterior fue llevada a cabo en cloroformo anhidro en presencia de piridina como base a temperatura de reflujo (115°C) durante 5 horas. El crudo fue purificado por columna cromatográfica usando gradiente de polaridad

hexano-acetato de etilo. La confirmación de la formación del producto **17a1** se realizó mediante RMN.

Un posible mecanismo que lleva a la formación del anillo 1,2,4-oxadiazol a partir de amidoxima y un ácido carboxílico o derivado se detalla en el Esquema 61.¹²³



Esquema 61: Mecanismo probable de formación del anillo 1,2,4-oxadiazol a partir de amidoxima y ácido carboxílico activado o derivado en medio básico.

Inicialmente, la eliminación del protón ácido de **15** con una base adecuada crea un anión **15'** en el átomo de oxígeno que ataca el carbono carbonílico de **6** para proporcionar una especie tetraédrica inestable **A** con la consiguiente pérdida de del grupo saliente para dar **B**. Luego, este intermedio se cicla para proporcionar **C**, sufriendo eliminación de agua por calentamiento (intermedio **D** y **E**) para formar finalmente el 1,2,4-oxadiazol **17**.

En la Figura 46 se muestra el espectro de RMN de ^1H de **17a1**, en el cual podemos evidenciar la desaparición de las señales anchas correspondientes a los protones amínicos de la amidoxima **15a**.

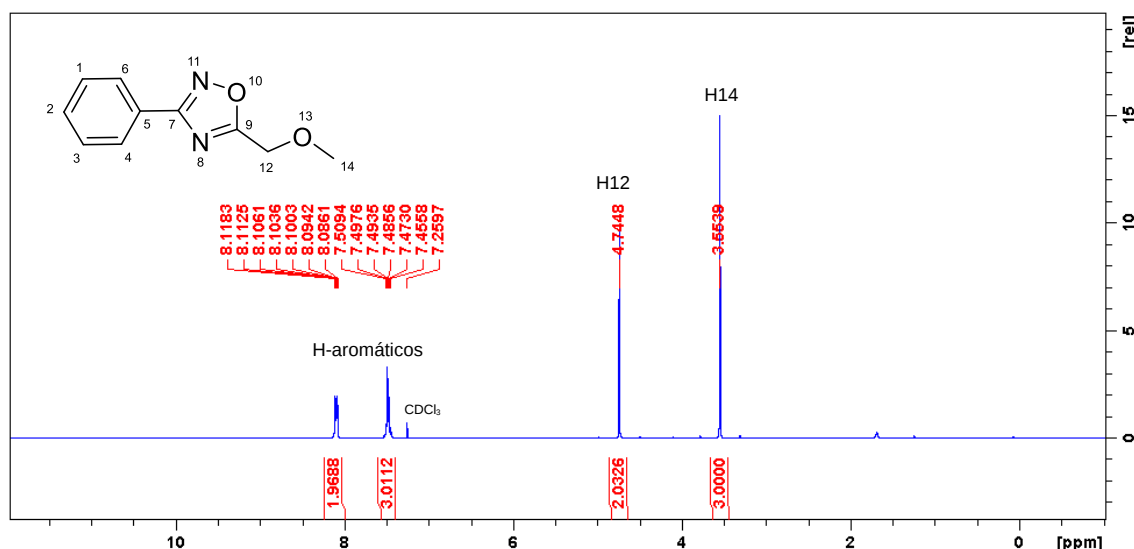


Figura 46: Espectro RMN de ^1H de **17a1**.

La asignación de las señales de los carbonos fue posible mediante el espectro en dos dimensiones HSQS y HMBC. En este último (Figura 47) fue posible determinar las señales que corresponden a los carbonos cuaternarios. Podemos confirmar que el C7 está correlacionado con los protones aromáticos ya que se evidencia un cruce de picos entre ambas señales. En el espectro RMN de ^{13}C (Figura 48) se observa que C7 sufre un desapantallamiento en el anillo oxadiazólico, desplazándose la señal a campos más bajos (168.36 ppm) respecto a la amidoxima **15a** en la cual el C7 resuena a campos más altos (152.70 ppm). Por otro lado, el carbono carbonílico proveniente del cloruro de ácido (**6II-1**) no muestra un cambio significativo de desplazamiento químico cuando forma parte del heterociclo en el producto **17a1**.

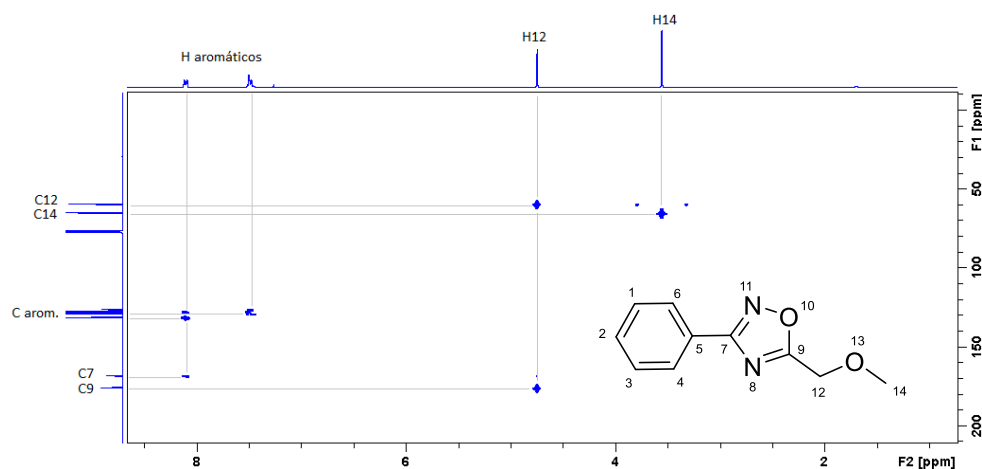


Figura 47: Espectro HSQC de **17a1**.

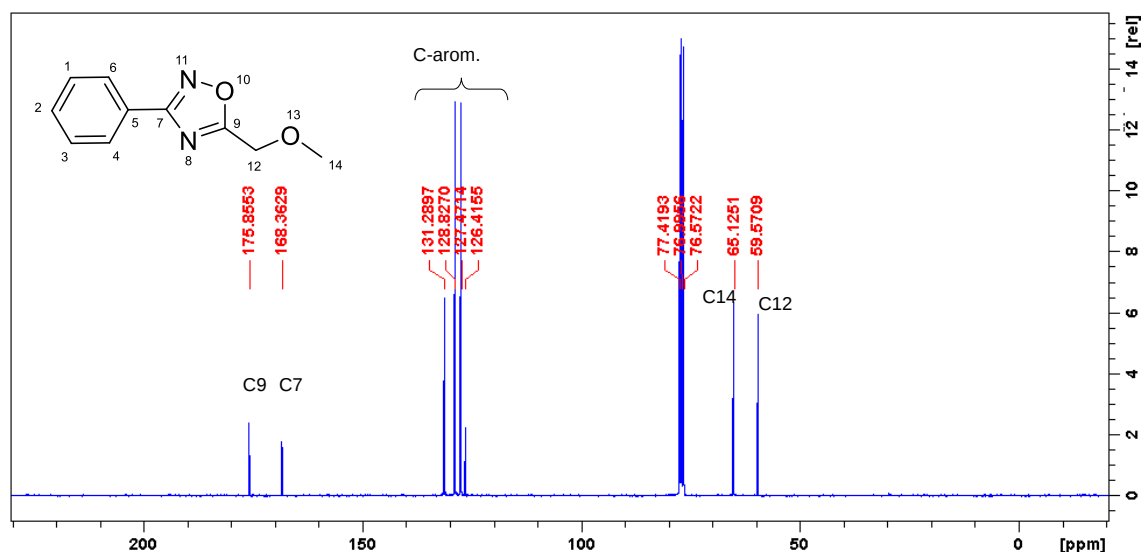
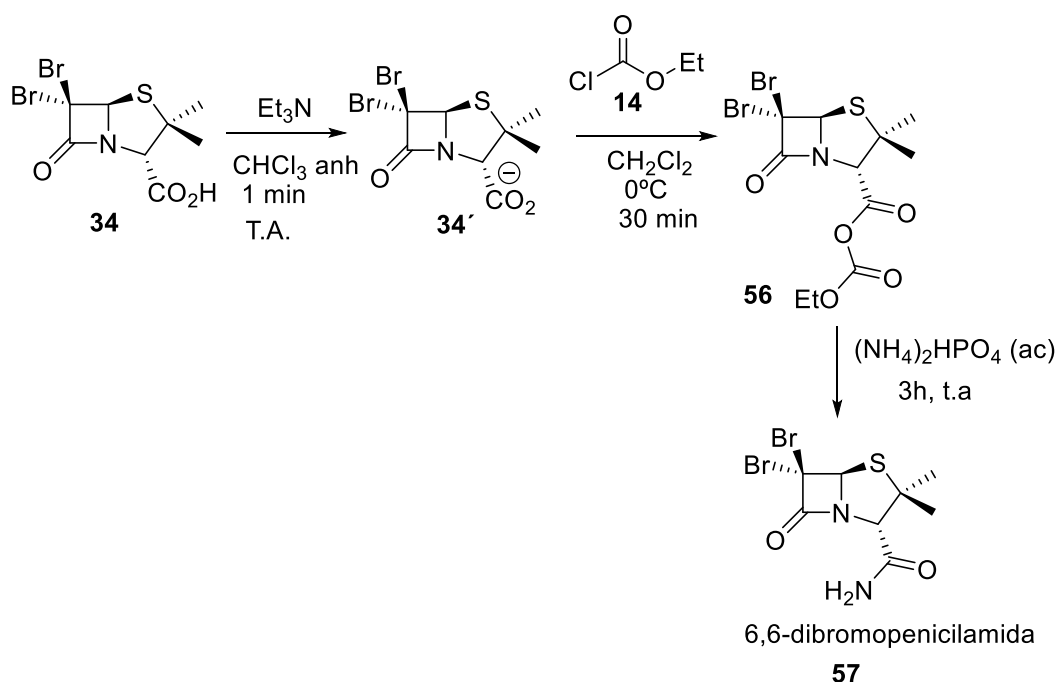


Figura 48: Espectro RMN de ^{13}C de **17a1**.

A partir de estos resultados alentadores se buscó aplicar dichas metodologías a los derivados de penicilinas. Para ello, inicialmente se requirió sintetizar el nitrilo **61**,¹²⁴ derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) obtenido, a su vez, a partir del ácido 6 β -aminopenicilánico (**6-APA**), cuya síntesis fue descrita previamente (pág XX).

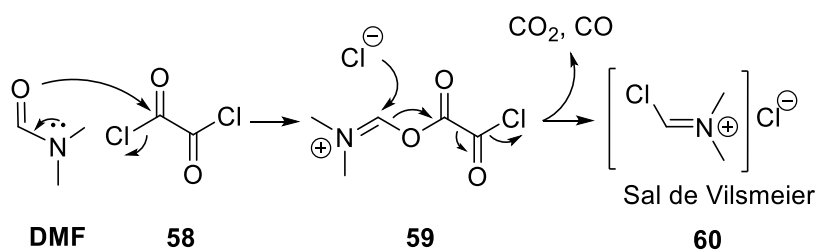
3.2.2. Síntesis del 3 α -ciano derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**61**).

El Esquema 62 muestra el procedimiento de formación de la 6,6-dibromopenicilamida (**57**), precursor del 3 α -ciano derivado de penicilina **61**. Se comienza con la obtención de la sal **34'** a partir del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**), usando una amina cuaternaria como la trietilamina. Cuando la sal **34'** se la hace reaccionar con cloroformiato de etilo (**14**) lleva a la formación del anhídrido mixto **56** el cual posee un buen grupo saliente. El anhídrido reacciona de forma controlada con amoníaco, generado *in situ* a partir de fosfato diamónico, llevando a la obtención de la amida correspondiente **57**.

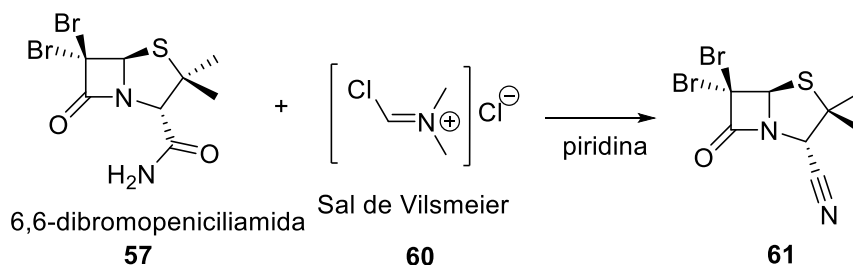


Esquema 62: Síntesis de la amida **57** derivada del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**).

Una vez obtenida la 6,6-dibromopenicilamida **57**, el siguiente paso hacia la síntesis del nitrilo correspondiente fue la obtención de la sal de Vilsmeier (**60**) formada a partir de dimetilformamida y cloruro de oxalilo (**58**) en acetonitrilo como solvente (Esquema 63).

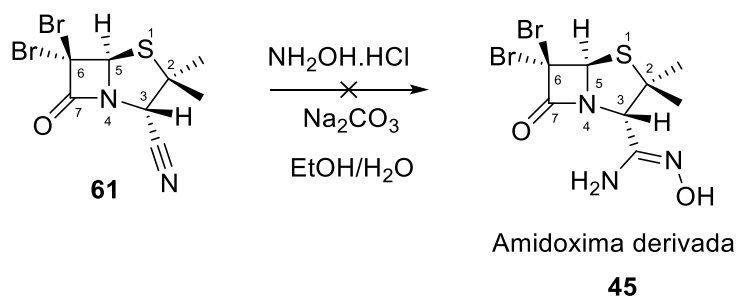


Esquema 63: Formación de la sal de Vilsmeier (**60**).



Esquema 64: Formación de la 3α-cianopenicilina **61** a partir de **57** y la sal de Vilsmeier (**60**)

La sal de Vilsmeier (**60**), generada in situ, se hace reaccionar con la 6,6-dibromopenicilamida (**57**) en presencia de piridina para obtener la 3 α -cianopenicilina **61** (Esquema 64). Una vez obtenido el nitrilo **61** aplicamos las condiciones desarrolladas en el Esquema 65 para la síntesis de la amidoxima derivada de penicilinas **45** para luego ensayar la formación del 1,2,4-oxadiazol.



Esquema 65: Reacción de formación de la amidoxima derivada del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**45**).

Se ensayaron distintas condiciones para esta reacción, pero en ningún caso pudo obtenerse la amidoxima **45** y todas las pruebas llevaron a productos de descomposición (Tabla 02).

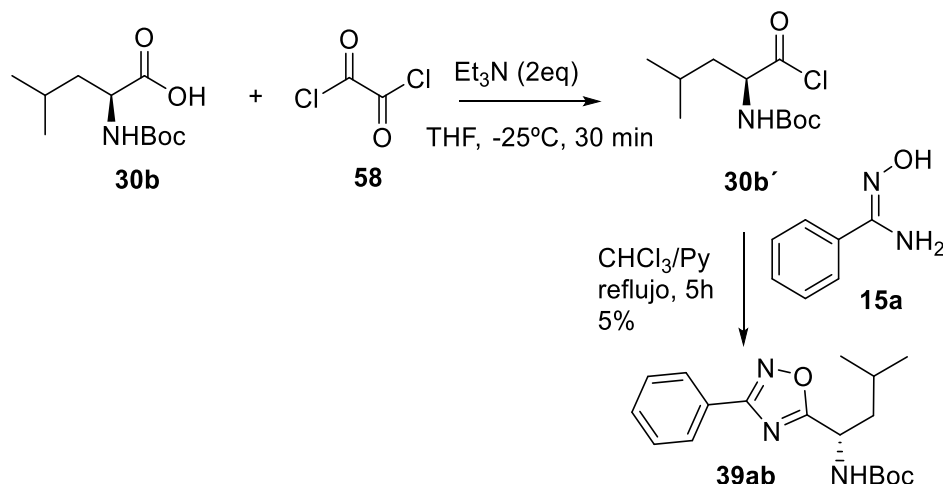
Tabla 02: Condiciones ensayadas para la formación de la amidoxima **45**.

Pruebas	Temperatura	Tiempo	Resultado
1	50°C-Sonicación	30 min	Sin producto
2	T.A.	24 h	Sin producto
3	T.A.	1 h	Sin producto

Posiblemente, al igual que en el caso de la hidrazina, la hidroxilamina realice un ataque nucleofílico al carbono carbonílico del anillo β -lactámico produciéndose la apertura de este. Esto pudo inferirse debido a que en los espectros de RMN de ^1H no se detectaron los hidrógenos de los carbonos 5 y 3 característicos del anillo penam como así tampoco la señal entre 1745 y 1750 cm^{-1} del carbonilo de la β -lactama en los espectros de IR.

A pesar de no haber podido formar la amidoxima **45** a partir de la 3 α -cianopenicilina **61**, se intentó verificar si era posible la formación del anillo 1,2,4-oxadiazol utilizando aminoácidos y un derivado de amidoxima simple, como la amidoxima **15a**. Para ello fue necesario la formación del cloruro de ácido derivado del aminoácido correspondiente (Esquema 66).¹⁹ Partiendo de *N*-Boc-Leu (**30b**), se trató con cloruro de oxalilo (**58**) para obtener el cloruro de ácido

30b', el cual se utiliza directamente en la siguiente reacción, sin purificar. La reacción con la amidoxima **15a** llevó a la formación del heterociclo 1,2,4-oxadiazol **39ab**, aunque con sólo un 5% de rendimiento, aislado por columna cromatográfica.



Esquema 66: Síntesis de 1,2,4-oxadiazol **39ab** a partir de la benzoamidoxima **15a** y el cloruro de ácido de N-Boc-Leu (**30b**).

En el espectro de RMN de ^1H del producto purificado **39ab** (Figura 49) podemos observar la presencia de las señales correspondientes a los protones aromáticos derivados de la amidoxima **15a** y de los protones del resto aminoacídico derivados de **30b**, lo que da un indicio del acoplamiento entre ambas estructuras. Por otro lado, se evidencia un desplazamiento del H-alfa de la N-Boc-Leu (**30b**) a campos más bajos (de 3.90 aprox. en **30b** a 5.08 ppm para H-12 en **39ab**). A su vez la señal del protón unido al N del resto aminoacídico queda más apantallado desplazándose la señal a campos más altos (de 7.04 a 5.13 ppm para H-13 en **39ab**).

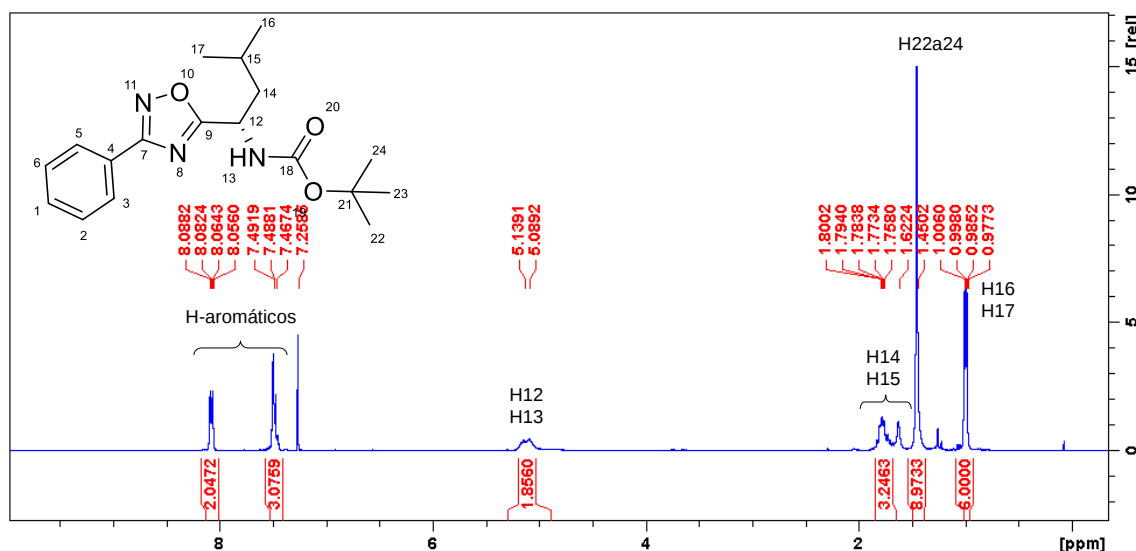


Figura 49: Espectro RMN de ^1H de **39ab**.

En cuanto al espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50), se evidencian los carbonos cuaternarios C7 y C9 a desplazamientos químicos que se corresponden al anillo 1,2,4-oxadiazólico. El C7 sufre un pequeño desplazamiento a campos más bajos respecto a la amidoxima **15a** (de 152,7 ppm a 168,2 ppm). Por otro lado, el C9 también se desplaza a campos más bajos respecto al material de partida **30b** (de 174,61 a 180,01 ppm). Además, la señal del C-alfa del resto aminoacídico se desplaza a campos más altos en relación con **30b** (de 51.72 a 46.79 ppm).

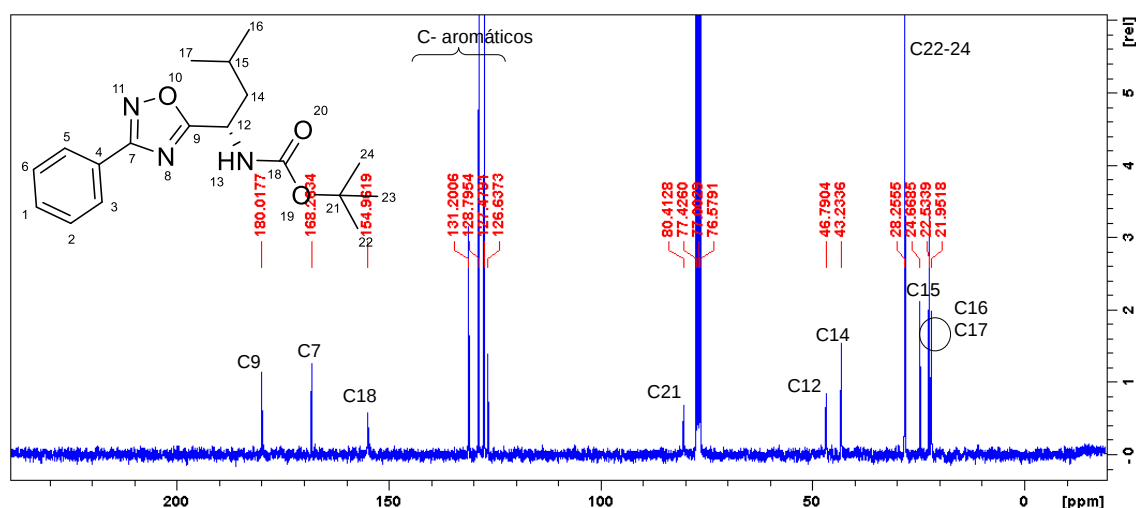
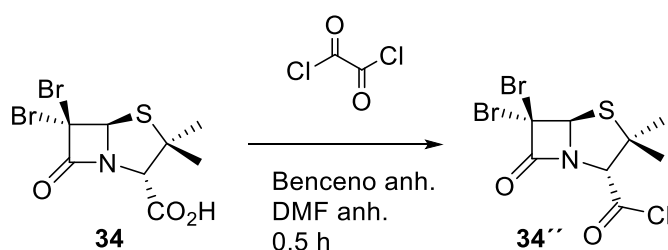


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C de **39ab**.

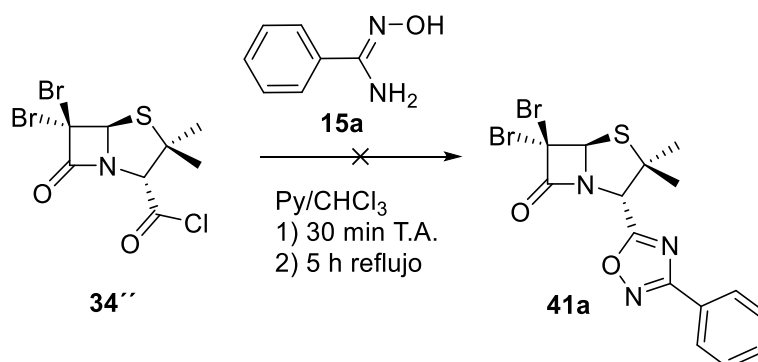
Creemos que el bajo rendimiento de esta secuencia podría deberse a la baja eficiencia en la etapa de formación del cloruro de ácido **30b'**. Generalmente

los cloruros de ácido son inestables y se hidrolizan fácilmente, lo que impide su manipulación, por lo que no se puede tener la certeza de rendimiento en la etapa de su formación. La posibilidad de aplicar condiciones de calentamiento por microondas, tal como se ha reportado en la literatura,¹²³ también fue ensayada, aunque no resultaron en la formación del 1,2,4-oxadiazol esperado.

Si bien el rendimiento fue bajo, la obtención del 1,2,4-oxadiazol fue confirmada, por lo tanto, se intentó la formación del cloruro de ácido de la penicilina, cuya síntesis ya ha sido reportada,¹²⁵ y hacerlo reaccionar con la amidoxima **15a** para obtener **41a** (Esquema 67 y 68).



Esquema 67: Formación del cloruro de ácido de la penicilina.



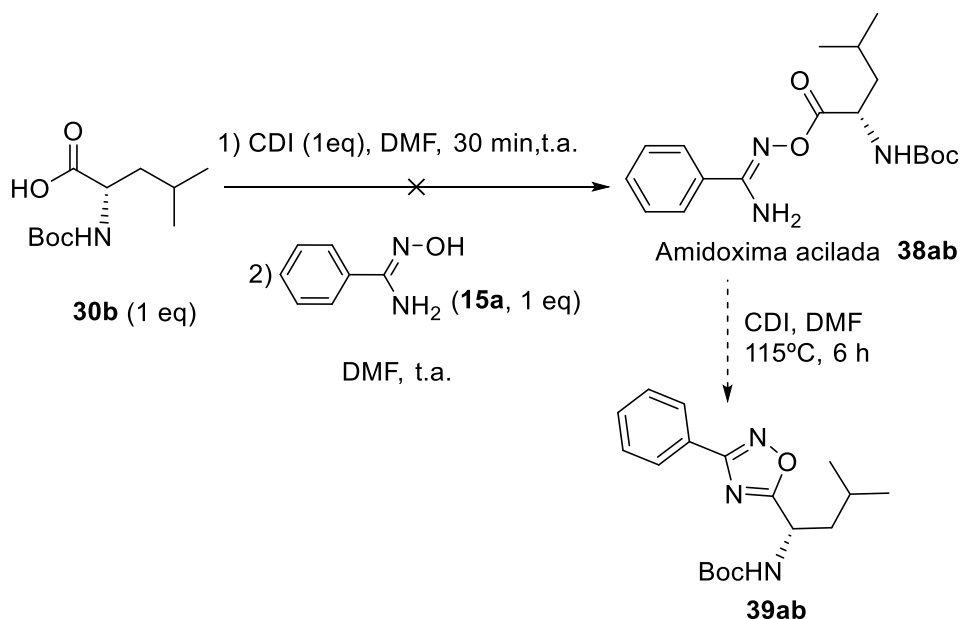
Esquema 68: Ensayo de formación del anillo 1,2,4-oxadiazol a partir del cloruro de ácido de la penicilina.

Lamentablemente el producto deseado **41a** no pudo detectarse en el espectro de RMN de ^1H , probablemente debido a la no formación de **34''** o a su descomposición antes de reaccionar.

3.2.3 Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir de *N*-Boc-Leu (**30b**) utilizando activación con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI).

Otra opción encontrada en la literatura¹²⁶ para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles es la utilización de un activante del grupo ácido carboxílico, como lo

es el CDI. El CDI reacciona con el ácido para dar una forma activada que reaccionará más eficientemente con el nucleófilo. En la primera etapa del Esquema 69 se muestra cuando se intentó llevar a cabo la formación de la amidoxima acilada **38ab** empleando tres condiciones que varían solamente en el tiempo después del agregado de la amidoxima **15a** manteniendo constante la temperatura (Tabla 03).



Esquema 69: Ensayo de síntesis del anillo 1,2,4-oxadiazólico utilizando CDI como activante de ácido carboxílico

Tabla 03: Tiempos de acilación de **15a** con *N*-Boc-Leu (**30b**)

Entradas	t (h)	T (°C)	Resultado
1	3	25	Sin producto
2	10	25	Sin producto
3	12	25	Sin producto

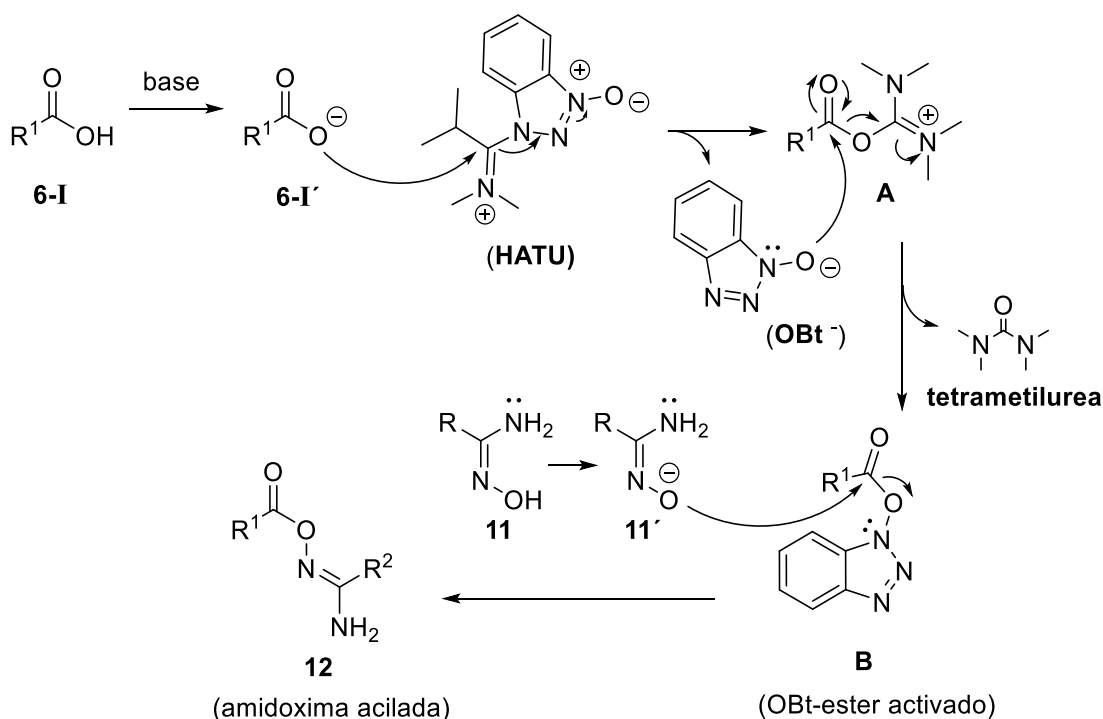
En ninguna prueba se detectaron en los espectros de RMN de ^1H las señales correspondientes al producto **38ab**. Se pensó que la activación con CDI no fue lo suficientemente eficiente, por lo tanto se buscó otro activante.

3.2.4. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir de *N*-Boc-Ala (**30f**) utilizando activación con HATU y HOBt como coactivante.

Una metodología muy utilizada en síntesis peptídica es la activación de ácido carboxílicos mediante la combinación HATU/HOBt.¹²⁷ La *O*-acilación de la

amidoxima se lleva a cabo con HATU en presencia de HOBt para acelerar el acoplamiento.

El mecanismo de reacción de la activación del ácido carboxílico por HATU y la posterior *O*-acilación se resume en el Esquema 70. En el primer paso, el anión carboxilato **6-I'** (formado por la desprotonación por una base orgánica) ataca al **HATU** para formar la sal inestable de *O*-acil(tetrametil)isouronio (**A**). El anión **OBt** ataca rápidamente la sal de isouronio **A**, proporcionando el éster activo de OBt (**B**) y liberando una cantidad estequiométrica de tetrametilurea. La adición de la amidoxima **11** (nucleófilo) al éster activado da como resultado su acilación.

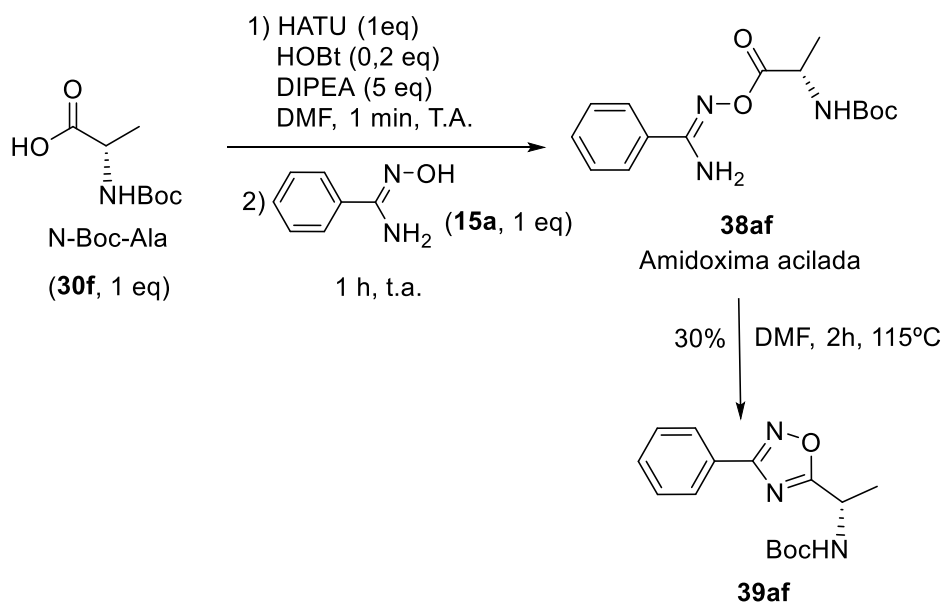


Esquema 70: Mecanismo de activación del ácido carboxílico **6-I** utilizando HATU/HOBt

El agregado de HOBt se suele usar para ayudar a minimizar la racemización (especialmente en la síntesis de péptidos) pero también funciona como un catalizador nucleófilo, lo que significa que acelerará la reacción. Sin la presencia de HOBt la reacción procede, pero más lentamente.

Una reacción secundaria puede tener lugar cuando la amidoxima reacciona con el reactivo de acoplamiento para formar un subproducto de guanidinio, por lo tanto, el orden de adición y el tiempo son cruciales.¹²⁸

Por medio de esta metodología finalmente se logró obtener un procedimiento de síntesis de 1,2,4-oxadiazol utilizando aminoácidos (Esquema 71). Luego de la generación de la amidoxima acilada **38af**, calentamos la misma a 115°C por 2 h en DMF para obtener de primer anillo 1,2,4-oxadiazólico unido a un resto aminoacídico (**39af**) con un rendimiento del 30%, después de purificación con columna cromatográfica.



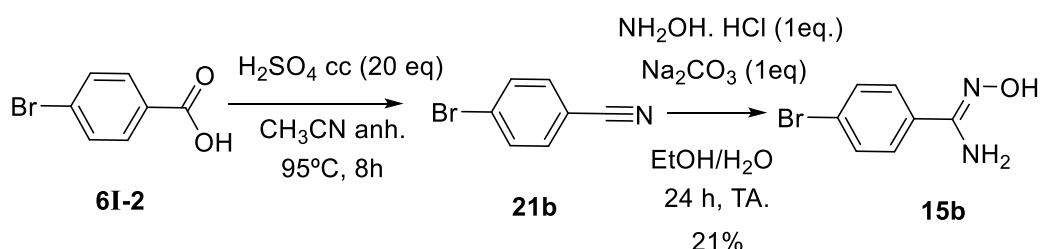
Esquema 71: Síntesis del anillo 1,2,4-oxadiazólico utilizando HATU/HOBt como dupla activante del ácido carboxílico.

La presencia del producto **39af** fue confirmada mediante los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y por espectrometría de masa de alta resolución. En el RMN de ^1H de **39af** no se observó la presencia de un singlete ancho correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$, lo cual indica la total ciclación del intermediario amidoxima acilada **38af** que generalmente presenta una señal entre 6 y 7 ppm, de acuerdo con la literatura. Por otra parte, los desplazamientos químicos de los carbonos cuaternarios del anillo 1,2,4-oxadiazólico en el RMN de ^{13}C son los esperados y compatibles con los encontrados en literatura.

En función de estos resultados, se decidió preparar una pequeña biblioteca de 1,2,4-oxadiazoles con el objetivo de generar una colección de compuestos que pudiesen ser utilizados en pruebas de actividad biológica.

3.2.5. Síntesis de 4-bromoamidoxima (**15b**) a partir del ácido 4-bromobenzoico (**6I-2**).

En principio, se sintetizó la 4-bromoamidoxima (**15b**) con el fin de lograr mayor variabilidad en la biblioteca a sintetizar (Esquema 72).¹²⁹ Para dicha síntesis se partió del ácido 4-bromobenzoico (**6I-2**) el cual se deshidrató con H₂SO₄ concentrado en acetonitrilo anhidro durante 8 horas a 95°C para dar 4-bromobenzonitrilo (**21b**). Posteriormente, el compuesto **21b** se lo hizo reaccionar con 1 equivalente de hidrocloreto de hidroxilamina en presencia de carbonato de sodio en una mezcla de etanol-agua durante 24 horas a temperatura ambiente para dar el producto **15b**.



Esquema 72: Síntesis de 4-bromobenzoamidoxima (**15b**).

3.2.6. Generación de una biblioteca de 1,2,4-oxadiazoles.

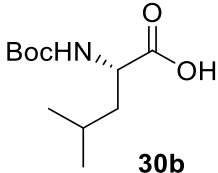
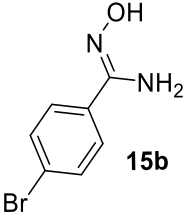
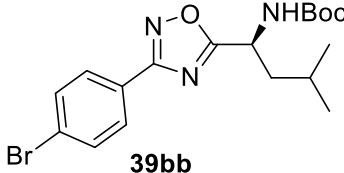
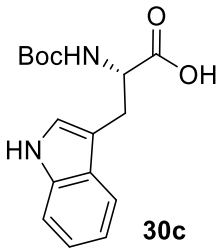
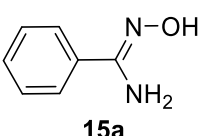
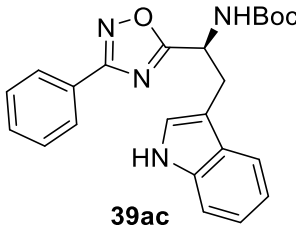
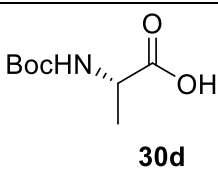
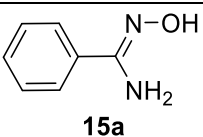
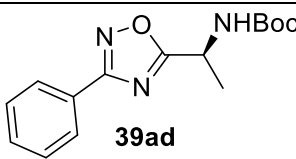
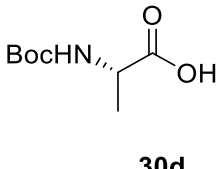
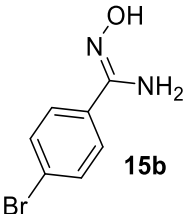
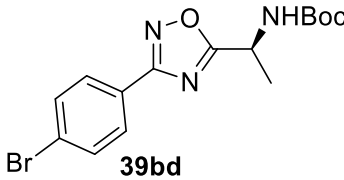
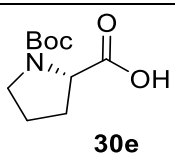
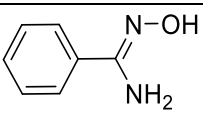
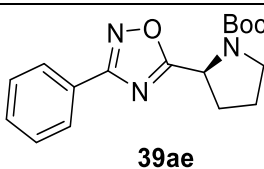
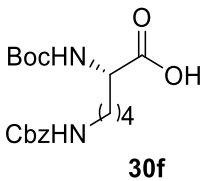
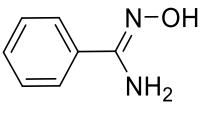
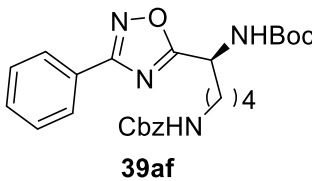
A partir de la metodología del Esquema 72 se probaron distintos *N*-Boc-aminoácidos **30** junto a las amidoximas **15a** y **15b**. Llevando el sistema a la temperatura de reflujo, los intermediarios amidoximas aciladas ciclaron obteniendo así los distintos derivados de 1,2,4-oxadiazoles con rendimientos de moderados a buenos (Tabla 04).

Tabla 04: 3,5-aril-aminoacil-1,2,4-oxadiazoles

1° Etapa: i) HATU (1eq), HOBt (0,2 eq), DIPEA (5 eq), DMF, 1 min, T.A.
ii) amidoxima (1eq.) T.A.

2° Etapa: DMF, 2h, 115°C

	Boc-Aminoácido	Amidoxima	Producto	Rto. (%) ^a
1				75
	30b	15a	39ab	

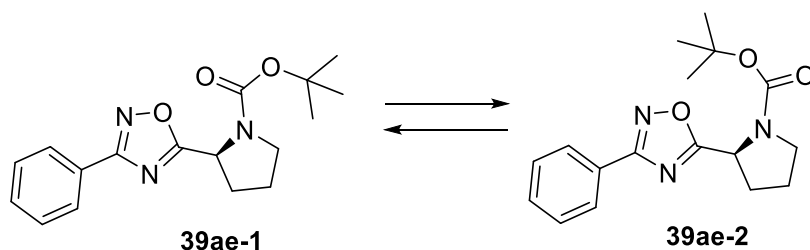
2	 30b	 15b	 39bb	51
3	 30c	 15a	 39ac	25
4	 30d	 15a	 39ad	30
5	 30d	 15b	 39bd	58
6	 30e	 15a	 39ae	50
7	 30f	 15a	 39af	68

^aTodos los rendimientos fueron determinados luego de la purificación por columna cromatográfica. ^{*}El rendimiento del compuesto **39ag** no pudo ser determinado debido a que no fue posible separar una impureza mediante cromatografía por columna.

3.2.6.1 Análisis del espectro de ¹H-RMN del compuesto **39ae**.

Uno de los compuestos que resulta interesante analizar es el compuesto **39ae**. El análisis del espectro RMN de ¹H, a diferencia del resto de los compuestos de la biblioteca, mostraba una duplicación o desdoblamiento en

ciertas señales especialmente la señal correspondiente a los tres metilos del *terc*-butilo de la porción Boc, para los cuales se esperaba una única señal. En análisis de RMN de ^{13}C también evidenciábamos este fenómeno. Se realizó un análisis de HSQC el cual mostraba que a las señales desdobladas en el espectro de RMN de ^1H se le correspondía una señal en el espectro de RMN de ^{13}C . Este efecto podría atribuirse a la rotación restringida del enlace C-N en el resto *N*-Boc-Pro (Esquema 73). Para corroborar la hipótesis, realizamos un experimento de RMN de ^1H a temperatura variable que mostró que las señales de protones duplicadas colapsan en una sola cuando la temperatura alcanza los 55°C (Figura 51).



Esquema 73: Equilibrio de rotámeros de **39ae** a temperatura ambiente

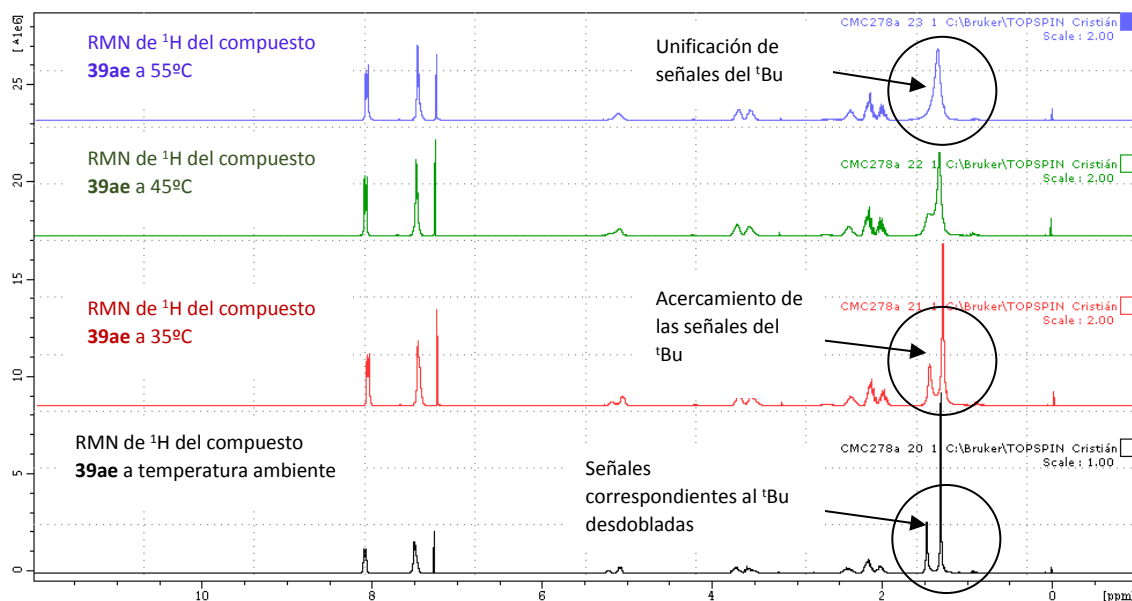


Figura 51: RMN de ^1H de **39ae** a temperatura variable.

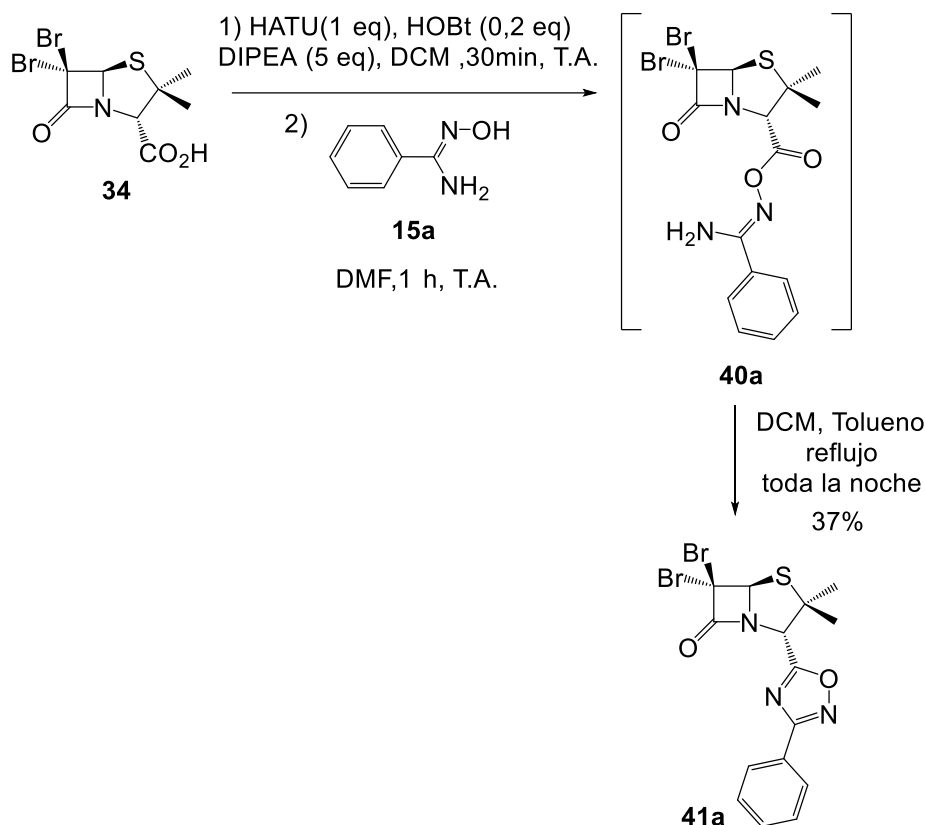
Como se puede observar en la Figura 52, al aumentar la temperatura en los espectros de RMN de ^1H las señales desdobladas correspondientes al *terc*-butilo de la porción Boc se unifican al llegar a los 55°C , por lo que creemos se

trata de dos conformaciones del compuesto **39ae**. Además, es lógico pensar que la señal mayor en el espectro de RMN de ^1H a temperatura ambiente corresponda a **39ae-1** ya que es el de menos congestión estérica.

3.2.7. Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles a partir del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**).

Una vez obtenida la primera quimioteca de compuestos con anillos 1,2,4-oxadiazólicos y residuos aminoacídicos, el siguiente propósito de síntesis fue generar otros compuestos 1,2,4-oxadiazólicos conteniendo el anillo de penicilina.

Inicialmente se llevó a cabo la activación del grupo ácido carboxílico del derivado penicilánico **34** utilizando la dupla HATU/HOBt en presencia de DIPEA y usando DCM como solvente de reacción, ya que a diferencia de la DMF (utilizado en las síntesis anteriores-**Método B**), es de fácil remoción a presión reducida y solubiliza correctamente los materiales de partida. Posteriormente, se realizó el acoplamiento con la amidoxima **15a**. Finalmente, se llevó a cabo la ciclación del aducto intermediario, para lo cual fue necesario que el sistema alcance altas temperaturas. Esto se logró incorporando tolueno ya que es un solvente de alto punto de ebullición y de posible remoción a presión reducida. A estas nuevas condiciones la llamamos **Método C** (Esquema 74).



Esquema 74: Esquema de síntesis del anillo 1,2,4-oxadiazólico a partir de **34** y utilizando HATU/HOBt como dupla activante del ácido carboxílico.

De esta manera se obtuvo el primer derivado 1,2,4-oxadiazólico conteniendo el anillo de penicilina (**41a**), confirmado a partir de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 52 y 53, respectivamente) y por espectrometría de masa de alta resolución. En el espectro de RMN de ^1H se observan las señales características de los protones del núcleo penam: H5 (6,01 ppm) y H3 (la cual sufre un corrimiento de 4,56 a 5,38 ppm, respecto al material de partida) y las señales del gem-dimetilo, H11 y H12 (1,30 y 1,75 ppm).

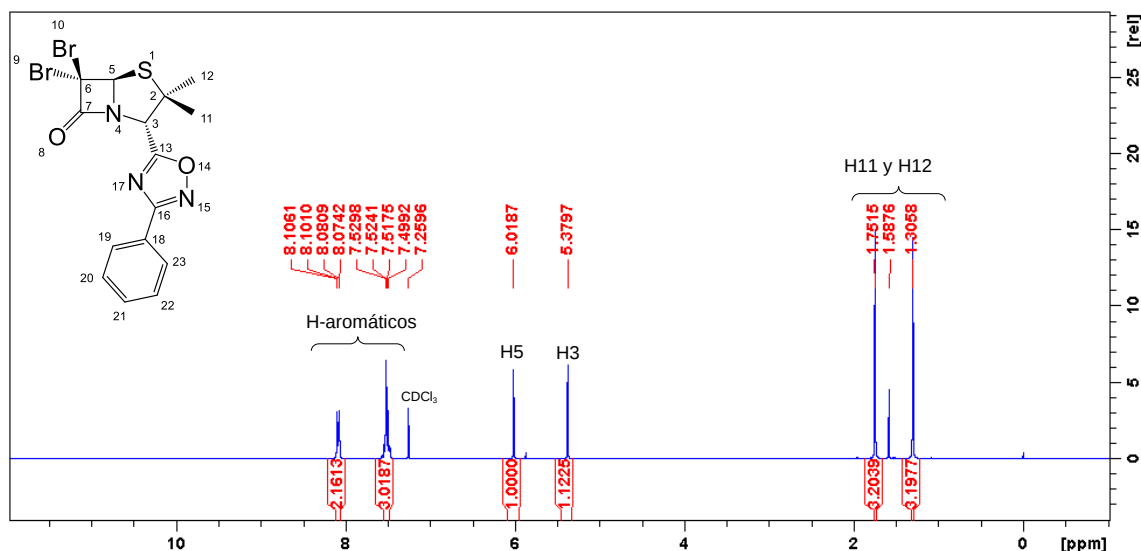


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H de **41a**.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53), podemos reconocer la señal esperada para el carbonilo del núcleo penan (C7) a 164,30 ppm y de los carbonos pertenecientes al anillo 1,2,4-oxadiazólico cuyas señales se muestran a 173.16 ppm (C13) y a 168.46 ppm (C16). La asignación de las señales fue posible con la ayuda de los espectros en dos dimensiones HSQC y HMBC.

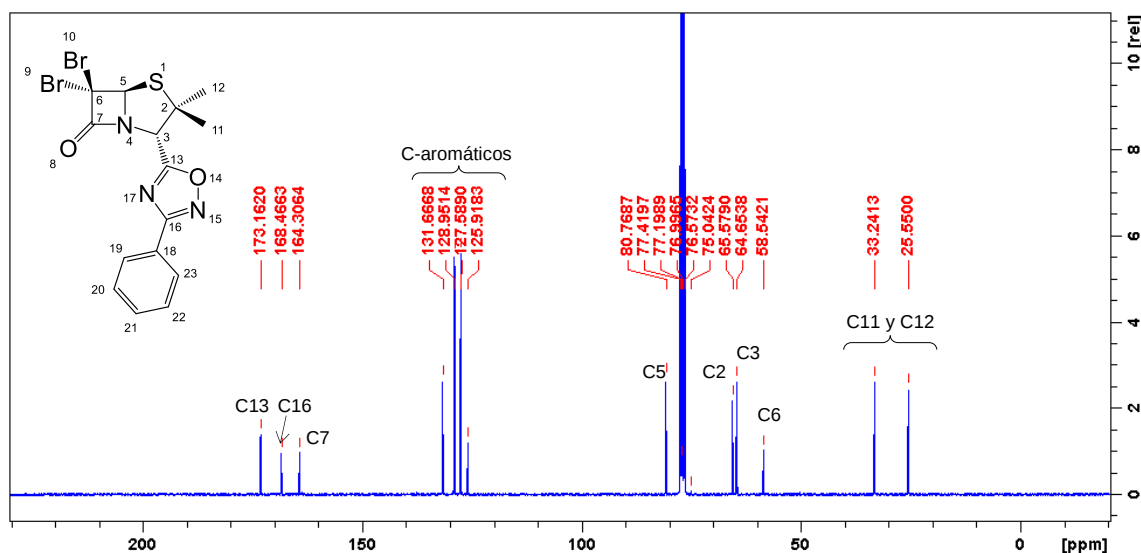
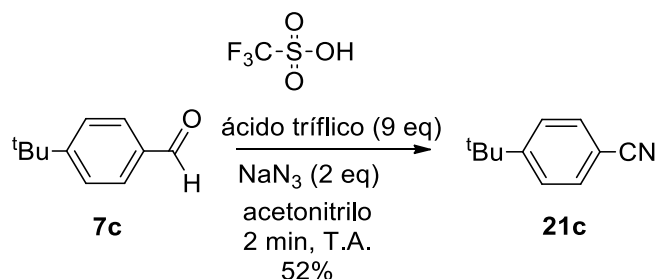


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C de **41a**.

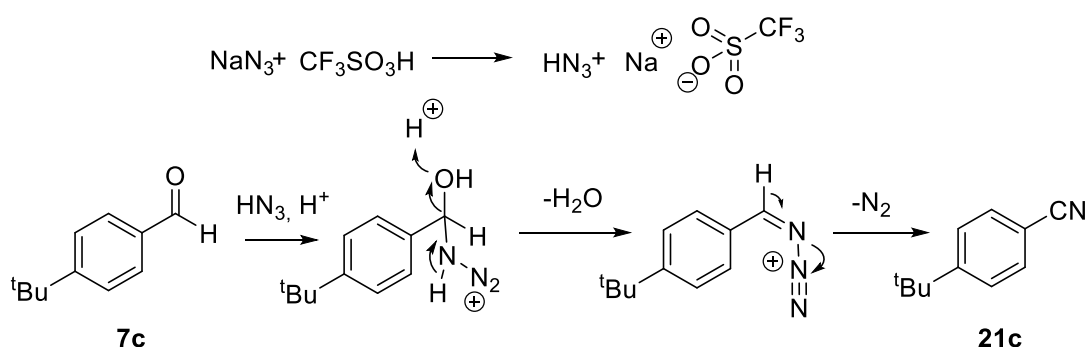
Viendo que la formación del anillo 1,2,4-oxadiazol a partir del derivado de penicilina era posible, se consideró formar otros compuestos conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico a partir de la misma penicilina (**34**) y otras amidoximas.

Para la síntesis de nuevos derivados de amidoximas en primer lugar fue necesario sintetizar los nitrilos correspondientes. De allí que se comenzó con la síntesis del nitrilo derivado del aldehído **7c** utilizando ácido triflico y azida de sodio¹³⁰ como se muestra en el Esquema 75.



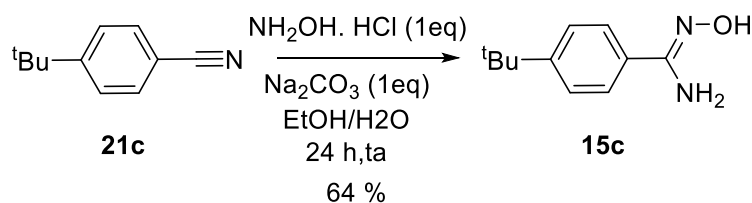
Esquema 75: Síntesis del nitrilo **21c** a partir del aldehído **7c**.

El mecanismo¹³⁰ posible de la reacción anterior se muestra en el Esquema 76.



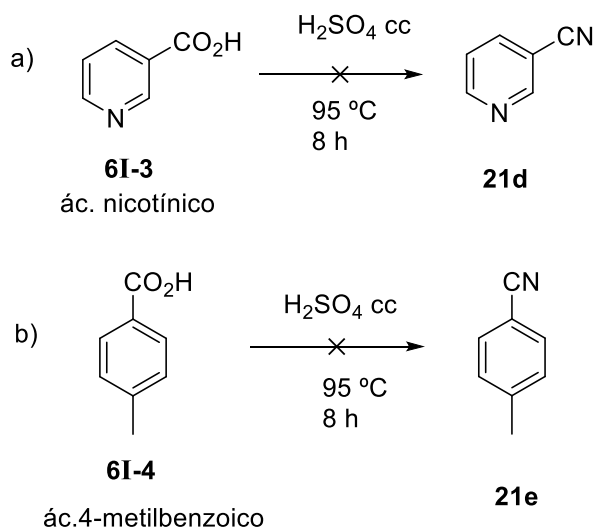
Esquema 76: Mecanismo posible de formación de nitrilos a partir de aldehídos utilizando ácido triflico y azida de sodio.

A partir del nitrilo **14** se formó la correspondiente amidoxima **15c** (Esquema 77).



Esquema 77: Síntesis de la amidoxima **15c** a partir del nitrilo **21c**

Además, se intentó formar los nitrilos derivados de los ácidos nicotínico y 4-metilbenzoico usando ácido sulfúrico¹²⁹ como deshidratante pero lamentablemente no fue posible su obtención (Esquema 78).



Esquema 78: Intentos de síntesis de los nitrilos **21d** y **21e** a partir de los ácidos nicotínico y 4-metilbenzoico.

Finalmente, se llevó a cabo la formación de los 1,2,4-oxadiazoles a partir las amidoximas **15a-c** y el derivado penicilánico **34** utilizando el **Método C**.

De esta manera se obtuvieron tres derivados de penicilina conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico cuyos rendimientos se muestran en la Tabla 05.

Tabla 05: Derivados de penicilina conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico

Entrada	Amidoxima	Ar	Producto	Rto (%)
1	15a	C ₆ H ₅	41a	37
2	15b	<i>p</i> -C ₆ H ₄ Br	41b	16
3	15c	<i>p</i> -C ₆ H ₄ ^t Bu	41c	20

En la Figura 54 se muestran los tres derivados 1,2,4-oxadiazólicos obtenidos utilizando la metodología detallada en el Esquema 74.

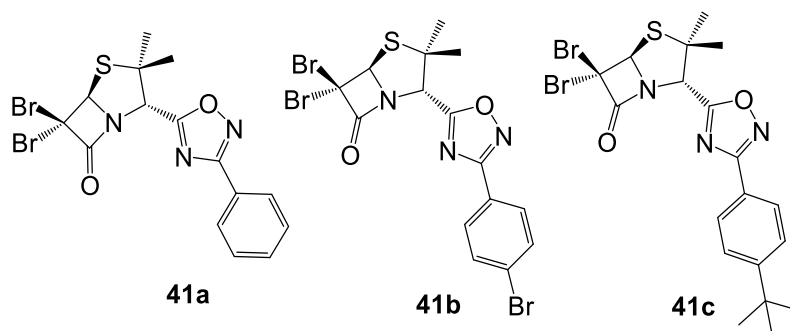
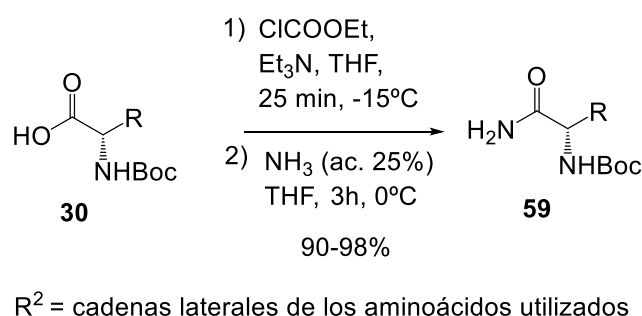


Figura 54: Derivados 1,2,4-oxadiazólicos con porciones penicilínica y aromática.

A raíz de los resultados alentadores en la obtención de los anillos 1,2,4-oxadiazólicos unidos al anillo de penicilina, se ensayó la formación de las amidoximas derivadas de *N*-Boc-aminoácidos. Con este fin, *N*-Boc-aminoácidos se derivatizaron, en primera instancia, a la función amida¹³¹ (Esquema 79) empleando cloroformiato de etilo, trietilamina y amoníaco acuoso en THF como solvente.



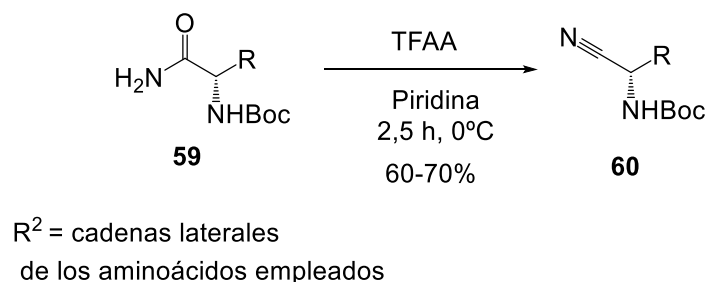
Esquema 79: Síntesis general de amidas a partir de *N*-Boc-aminoácidos.

Los rendimientos de estas reacciones fueron excelentes (Tabla 06) obteniéndose de forma casi completa los productos esperados. Además, las amidas derivadas se lograron con un alto grado de pureza por lo que no hubo necesidad de purificación por columna cromatográfica.

Tabla 06: Rendimientos de las amidas derivadas de *N*-Boc-aminoácidos.

Entrada	Compuesto	Rto(%)
1	59a (Phe)	95
2	59b (Leu)	95
3	59d (Ala)	90
4	59e (Pro)	91
5	59g (Thr)	90
6	59h (Ile)	100
7	59i (Tyr)	99

Posteriormente, las amidas derivadas fueron convertidas en los nitrilos correspondientes¹³¹ (Esquema 80). Esta transformación cursa a través de una deshidratación empleando para ello el anhídrido trifluoroacético (TFAA) en piridina anhidra como solvente. Los nitrilos derivados se purificaron por columna cromatográfica. En este caso, los rendimientos fueron menores en comparación con los de las amidas, pero aun así aceptables (Tabla 07).



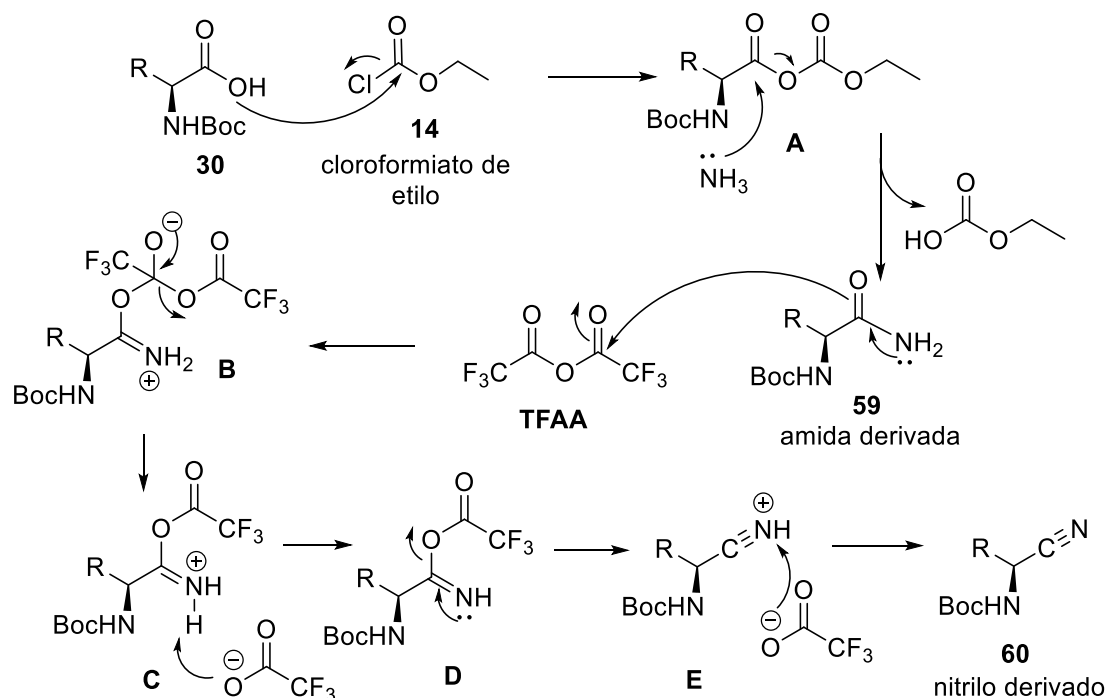
Esquema 80: Síntesis general de nitrilos derivados de *N*-Boc-aminoácidos

Tabla 07: Rendimientos de los nitrilos derivados de *N*-Boc-aminoácidos.

Entrada	Compuesto	Rto(%)
1	60a (Phe)	90
2	60b (Leu)	78
3	60d (Ala)	64
4	60e (Pro)	20
5	60g (Thr)	20
6	60h (Ile)	85
7	60i (Tyr)	15

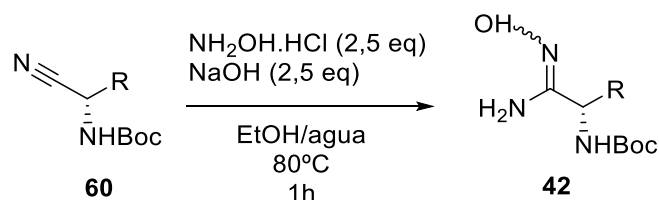
El mecanismo propuesto para la generación de los nitrilos derivados a partir de los aminoácidos correspondientes se muestra en el Esquema 81.

El proceso de obtención de los nitrilos derivados de aminoácidos **60** comienza con la activación de los *N*-Boc-aminoácidos **30** con cloroformiato de etilo para formar el anhídrido mixto y así hacerlos susceptibles al ataque nucleofílico del amoníaco generado *in situ* por el hidróxido de amonio. Como resultado de esta reacción se obtiene la amida primaria derivada **59**. La deshidratación de las amidas primarias para generar los nitrilos no se realiza normalmente por calentamiento sino bajo la influencia de reactivos deshidratantes. Por lo tanto, **59** es transformada al nitrilo correspondiente por medio de la deshidratación mediada por el anhídrido trifluoroacético (TFAA, por sus siglas en inglés).



Esquema 81: Mecanismo de síntesis de nitrilos a partir de aminoácidos.

Una vez obtenidos los nitrilos derivados de aminoácidos **60**, se los empleó para la síntesis de las amidoximas correspondientes **42**¹³² (Esquema 82). Los rendimientos de los derivados de amidoxima **42** se muestran en la Tabla 08.



R²: cadenas laterales de los aminoácidos empleados

Esquema 82: Síntesis general de aminoximas derivadas de *N*-Boc-aminoácidos

Tabla 08: Rendimientos de las amidoximas derivadas.

Entrada	Compuesto	Rto(%)
1	42a (Phe)	47
2	42b (Leu)	61
3	42d (Ala)	34
4	42e (Pro)	13
5	42g (Thr)	10
6	42h (Ile)	23
7	42i (Tyr)	60

Debido a que los rendimientos obtenidos de las amidoximas **42** fueron moderados, se trabajó en su optimización ensayando metodologías basadas de procedimientos encontrados en la literatura.^{132,133} Las condiciones varían en el tipo de base utilizada, temperatura, tiempo y solvente de reacción. Los resultados se detallan en la Tabla 09. En todos los casos se utilizó como material de partida el nitrilo derivado del aminoácido *N*-Boc-Ala (**60f**) y como clorohidrato de hidroxilamina.

Tabla 09: Rendimientos de la formación de la amidoxima **42f**.^a

Entrada	Base	T (°C)	t (h)	Solvente	Rto % ^b
1	NaOH (1M, 2,5eq)	100	1	EtOH/agua	40
2	NaOH (1M, 2,5eq)	t.a.	Toda la noche	EtOH/agua	89
3	KO ^t Bu (2,5 eq)	100	1	MeOH	83
4	KO ^t Bu (2,5 eq)	t.a.	Toda la noche	MeOH	85
5	KO ^t Bu (10 eq)	t.a.	Toda la noche	DMSO	NC ^{c,d}

^aSe utilizaron 2,5 equivalentes de clorohidrato de hidroxilamina (excepto en entrada 5)

^bLos rendimientos son calculados usando patrón interno mesitileno

^cNC: no calculado: el producto no se pudo recuperar para el cálculo de rendimiento

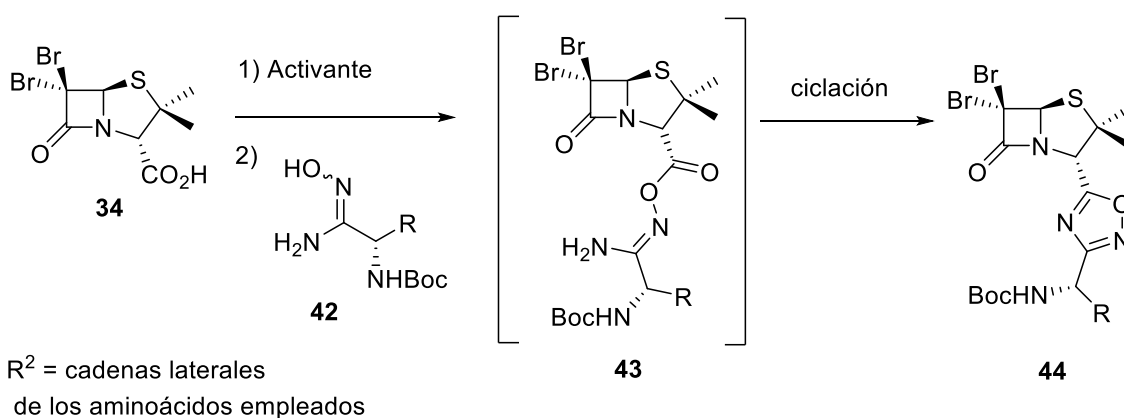
^dSe utilizaron 10 equivalentes de clorohidrato de hidroxilamina.

Los rendimientos de la Tabla 09 fueron calculados mediante patrón interno. Un patrón interno es una cantidad conocida de un compuesto diferente al que se desea conocer su concentración en una mezcla, el cual se añade al crudo de reacción antes del análisis por RMN de ¹H. Una señal del compuesto de interés se compara con la del patrón interno, y de ese modo se determina su concentración en la muestra. Los patrones internos son especialmente útiles para determinar rendimientos en etapas de optimización sin necesidad de purificaciones cromatográficas que llevan tiempo y gasto de solvente orgánico. En nuestro caso se utilizó mesitileno como patrón interno.¹³⁴

De acuerdo con la Tabla 09, la condición que arrojó mejores resultados para la síntesis de la amidoxima **42f** fue la condición de la entrada 2 de la Tabla 09.

Posteriormente, se llevó a cabo las síntesis de los anillos 1,2,4-oxadiazólicos empleando la serie de amidoximas **42** y el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (Esquema 83). Se utilizaron dos metodologías. Por un lado, el **Método C**, ya empleado, en el cual utiliza HATU, HOBt, DIPEA en CH₂Cl₂/tolueno (anhídros) durante 30 min. a temperatura ambiente y luego a reflujo durante toda la noche.¹³⁵ Por otro lado, el **Método D**, empleando las

amidoximas **42** y EDC en diglima como solvente de reacción.¹³⁶ La mezcla de reacción se dejó toda la noche a 50°C y luego 3 horas a 110°C. Los rendimientos utilizando ambos métodos se muestran en la Tabla 10.



Esquema 83: Síntesis general de 1,2,4-oxadiazoles unidos a restos aminoácidos y penicínicos.

Tabla 10: Rendimientos de las 1,2,4-oxadiazoles derivados de penicilinas y aminoácidos.

Entrada	Compuesto	Rto. (%)	
		Método C	Método D
1	44a (Phe)	NE	8
2	44b (Leu)	8	64
3	44d (Ala)	8	NE
4	44e (Pro)	NE	NR
5	44g (Thr)	NE	NR
6	44h (Ile)	NE	7
7	44i (Tyr)	NE	NR

NR: no hubo reacción
NE: no fue ensayado

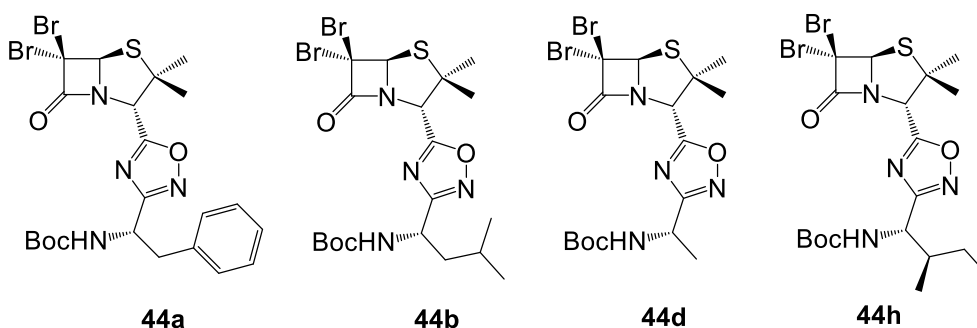


Figura 55: Quimioteca de compuestos 1,2,4-oxadiazólicos conteniendo el anillo de penicilina y residuos aminoácidos.

Debido a que los rendimientos de la obtención de los oxadiazoles **44** (Tabla 10) no fueron los esperados, se probaron otras tres metodologías para la síntesis de este sistema híbrido de 1,2,4-oxadiazoles. Por un lado, se ensayaron los **métodos E y F** y por otro lado el método **A** (utilizado en las primeras síntesis de 1,2,4-oxadiazoles, ver sección 3.2.3). Ningún método arrojó resultados positivos. El **método E**¹³⁷ consiste en una reacción *one-pot* utilizando el éster metílico del ácido 6,6-dibromopenicilánico **34**, la amidoxima con carbonato de potasio como base. El **método F** es similar al **método C**, pero se utiliza calentamiento por microondas.¹³⁸

Con ninguno de los métodos anteriores se observaron señales características provenientes de los protones del carbono 3 y 5 del anillo penicilínico en los espectros de RMN de ¹H de los crudos de reacción, con lo cual inferimos que los oxadiazoles correspondientes no se obtuvieron.

Considerando la posibilidad de que el ácido penicilánico **34** no sea estable a las condiciones utilizadas en el caso del **método A**, se realizó un ensayo en cromatografía en capa delgada (CCD) con el fin de corroborar su estabilidad. En primer lugar, se corrió el derivado penicilánico **34** disuelto en acetato de etilo a temperatura ambiente, lo cual se tomó como testigo (T). A continuación, se realizó la corrida de **34** sometido en tres condiciones:

- **Condición 1 (C1):** ácido penicilánico **34**, disuelto en DMF a 115°C.
- **Condición 2 (C2):** ácido penicilánico **34**, disuelto en DMF con CDI a temperatura ambiente.
- **Condición 3 (C3):** ácido penicilánico **34** disuelto en DMF con CDI a 115°C.

Para **C1**, el derivado penicilánico **34** se observa al revelado con luz UV con el mismo R_f que el testigo (T) y revelado color amarillo con solución de *p*-anisaldehído (Figura 56). Para **C2 y C3**, no se observa el derivado de penicilina en la placa de CCD.

Conforme a estos resultados, podemos inferir que el activante CDI es posiblemente el responsable de la apertura del anillo de penicilina. Esto es coherente con el mecanismo de activación propuesto llevado a cabo por el CDI. En dicho mecanismo se formaría imidazol en el medio de reacción, el cual podría

ser el causante del ataque nucleofílico al grupo carbonilo β -lactámico (Esquema 84).

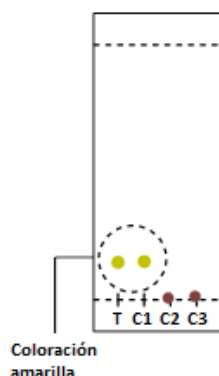
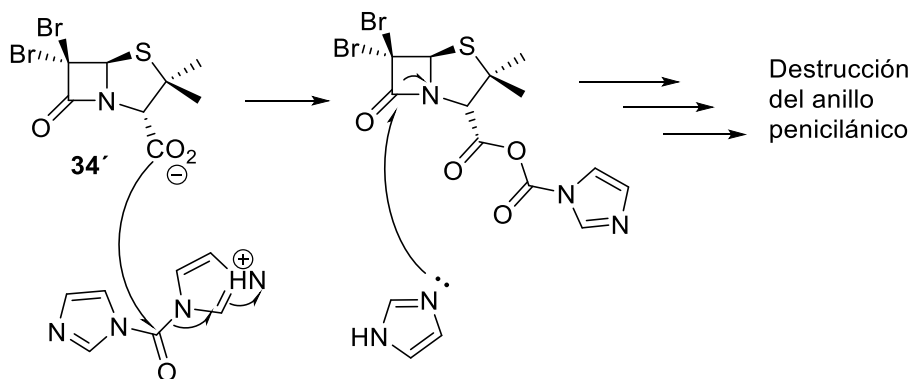


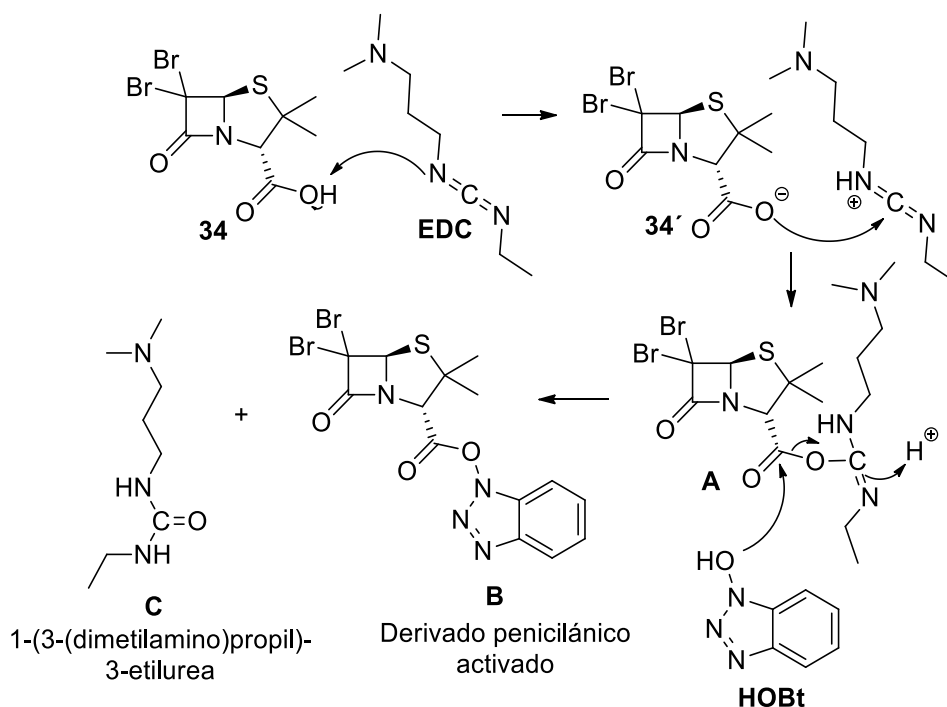
Figura 56: CCD de **34** las condiciones **C1**, **C2** y **C3**



Esquema 84: Mecanismo de la apertura probable del anillo β -lactámico por CDI

Si bien los métodos anteriores no han sido probados con gran variedad de amidoximas distintas, el **método D** parecería ser el mejor para los materiales de partida empleados, aunque, en general, no se lograron buenos rendimientos. El proceso de ciclación para la formación del anillo 1,2,4-oxadiazólico conduce a la pérdida de una molécula de agua por lo que la utilización de solventes anhidros es crucial. El solvente diglima utilizado en este método es un poliéter con un alto grado de higroscopicidad. A su vez por su alto punto de ebullición (162°C) dificulta mucho su eliminación por evaporación simple. Debido a esto planteamos la posibilidad de usar una mezcla de solventes anhidros, por un lado, acetonitrilo, como solvente de disolución de los reactivos utilizados y, por otro lado, tolueno, como solvente que permita llegar a una temperatura de ciclación en un tiempo no muy prolongado. De esta manera, utilizando estas nuevas condiciones, que

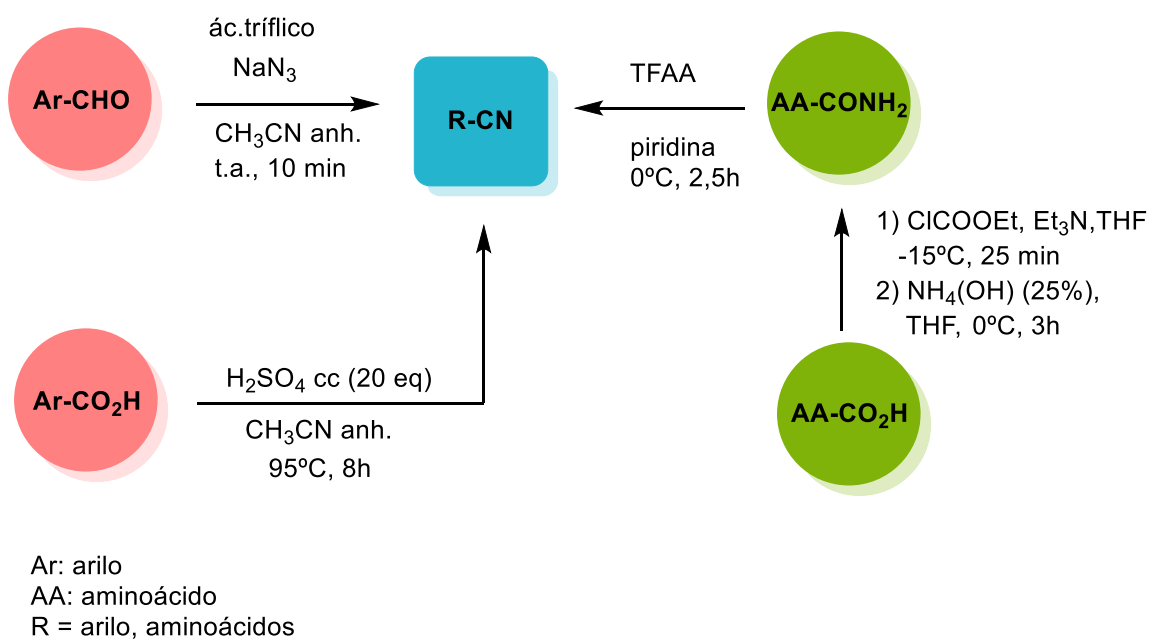
denominaremos **Método G**, ampliamos y mejoramos los rendimientos de la quimioteca de los compuestos híbridos (Tabla 11 y 12) combinando la estructura penicilínica a una porción aminoacídica o arílica por medio del anillo 1,2,4-oxadiazólico. En primer lugar, se activó el ácido 6,6-dibromopenicilánico **34** utilizando la cupla activante EDC/HOBt¹³⁹ durante 1 hora a temperatura ambiente usando acetonitrilo anhidro como solvente (Esquema 85). En esta primera etapa es posible visualizar la formación de la urea **C** insoluble correspondiente, lo que nos indicaría que la activación ha sido exitosa.¹⁴⁰ Una vez activado **34**, se incorpora al balón de reacción la amidoxima correspondiente (**15** o **42**) disuelta en el mismo solvente. En caso de que ésta no pueda disolverse se la agrega en su estado sólido cuidando de no perder demasiado las condiciones anhidras. Luego se incorpora la trampa de Dean Stark con tamices moleculares activados y el sistema de refrigeración. Por último, se agrega el tolueno anhidro y se lleva el sistema a reflujo durante 3 a 4 horas.



Esquema 85: Mecanismo de activación de **34** con EDC/HOBt.

El derivado amidoxima **15** o **42** fue obtenido a partir del nitrilo correspondiente, utilizando hidrocloreuro de hidroxilamina e hidróxido de sodio. Se emplea metanol como solvente y la reacción se mantiene a reflujo y se sigue por cromatografía en placa delgada hasta visualizar la formación del producto y

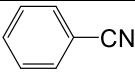
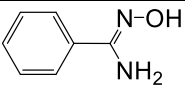
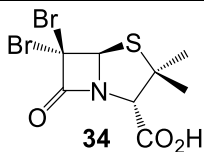
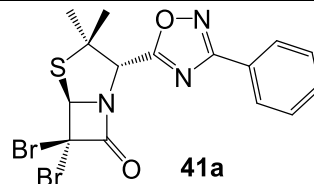
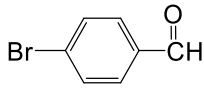
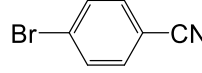
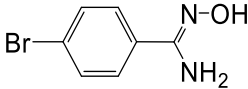
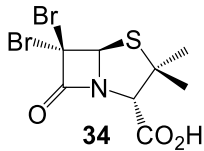
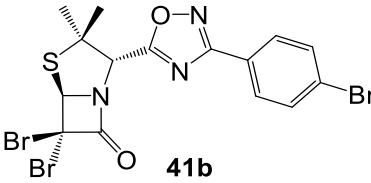
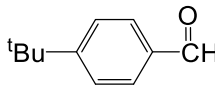
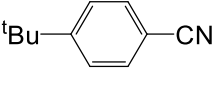
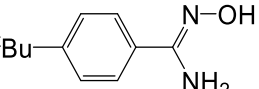
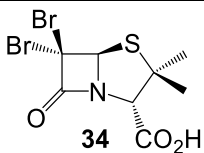
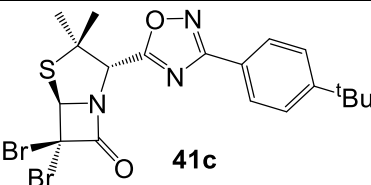
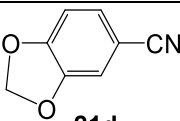
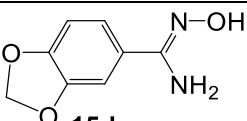
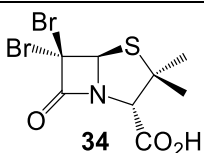
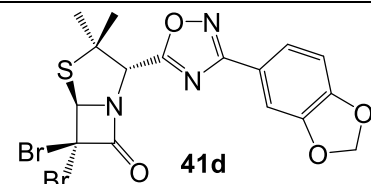
el consumo del material de partida.¹⁴¹ En el Esquema 86 se resumen los distintos caminos para la obtención de las series de nitrilos de acuerdo con los materiales de partida empleados. En el caso de utilizar ácidos carboxílicos, como en el caso de los aminoácidos, estos fueron derivatizados a la función amida¹³¹ y a partir de ella se llevó a cabo la formación del nitrilo¹³¹ utilizando anhídrido trifluoroacético y piridina como solvente. Cuando el material de partida era un aldehído, como en la mayoría de los compuestos aromáticos utilizados, la formación del nitrilo se llevó a cabo utilizando ácido trifílico, azida de sodio y acetonitrilo como solvente.¹³⁰ En el caso de que el material de partida sea un ácido carboxílico aromático, la formación del nitrilo derivado se realizó usando ácido sulfúrico concentrado a reflujo en acetonitrilo como solvente.¹²⁹

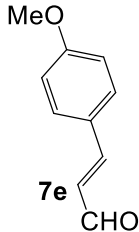
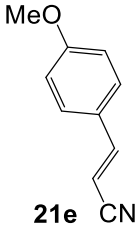
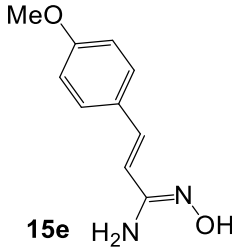
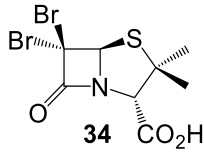
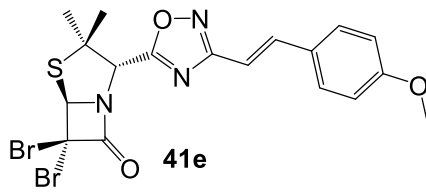
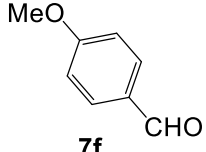
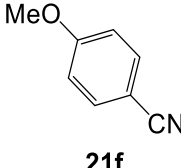
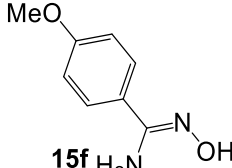
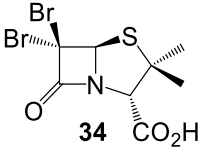
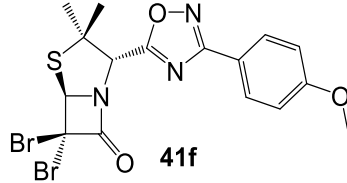
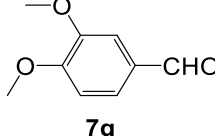
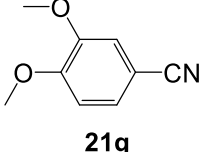
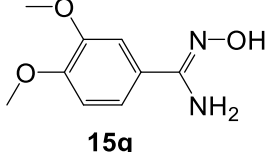
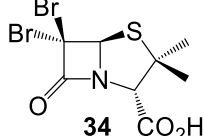
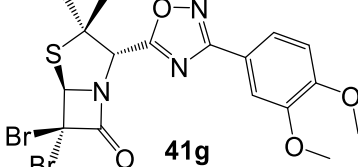
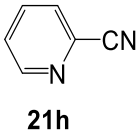
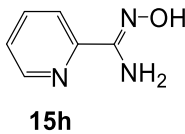
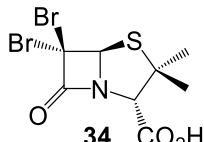
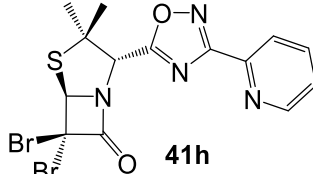
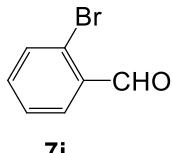
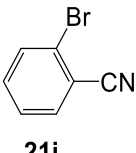
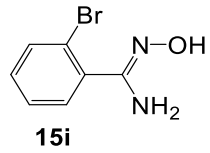
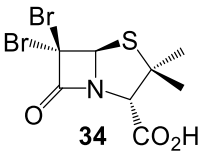
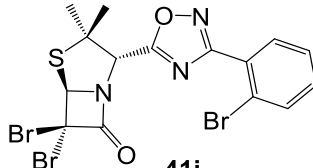


Esquema 86: Caminos de síntesis para la obtención de nitrilos.

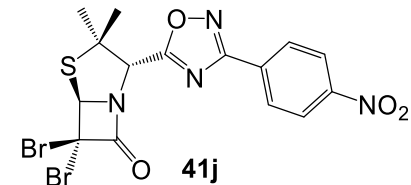
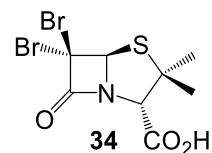
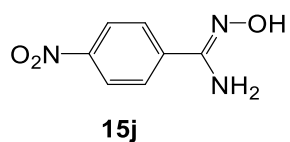
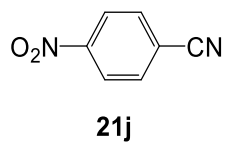
Como se mencionó, el desarrollo del **método G** nos permitió ampliar la quimioteca de compuestos híbridos oxadiazólicos y mejorar los rendimientos de algunos compuestos híbridos sintetizados por otros métodos (Tablas 11 y 12).

Tabla 11: Compuestos híbridos derivados de arilos utilizando el **Método G**

ENTRADA	ALDEHÍDO	NITRILO	AMIDOXIMA	DERIVADO PENICILÁNICO	PRODUCTO HÍBRIDO OXADIAZÓLICO	RTO ^a (%) ^b
1		 21a	 15a	 34	 41a	74 (37) ^b
2	 7b	 21b	 15b	 34	 41b	20 (16) ^b
3	 7c	 21c	 15c	 34	 41c	21 (20) ^b
4		 21d	 15d	 34	 41d	20

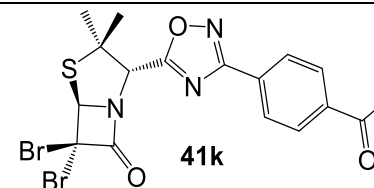
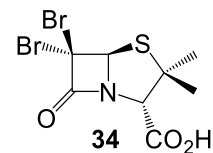
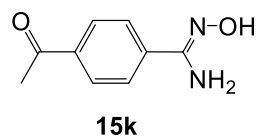
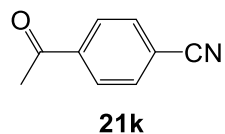
5	 7e	 21e	 15e	 34	 41e	70
6	 7f	 21f	 15f	 34	 41f	70
7	 7g	 21g	 15g	 34	 41g	35
8		 21h	 15h	 34	 41h	30
9	 7i	 21i	 15i	 34	 41i	22

10

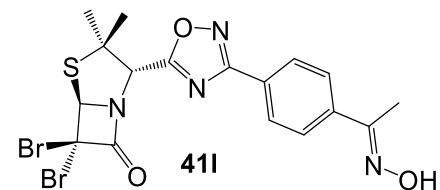


23

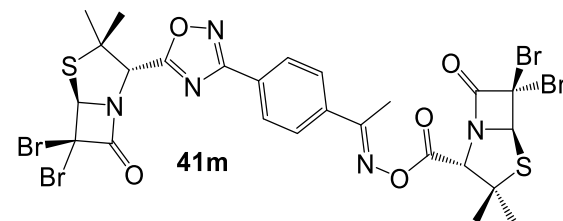
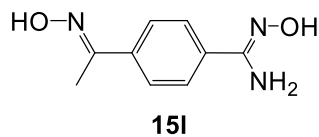
11



20



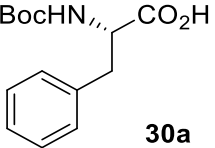
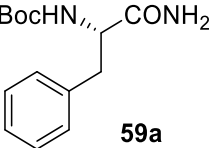
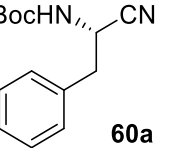
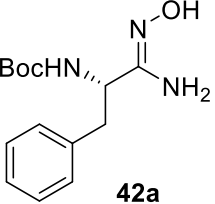
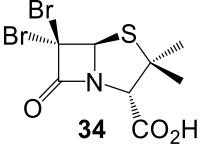
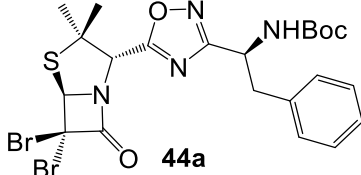
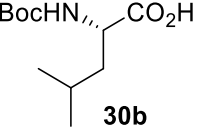
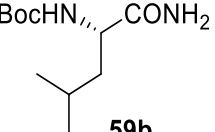
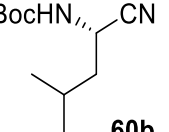
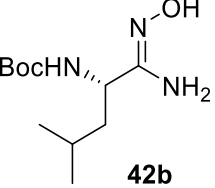
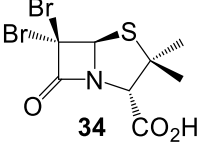
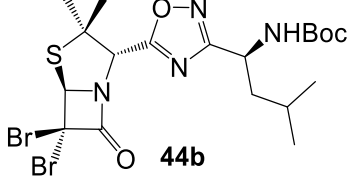
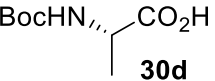
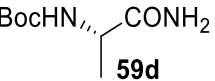
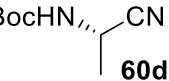
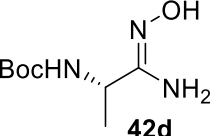
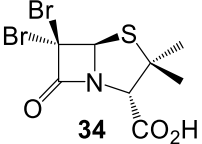
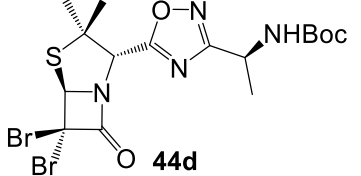
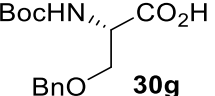
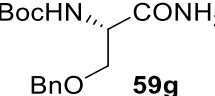
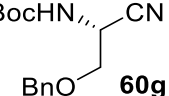
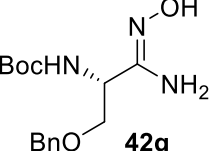
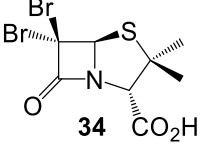
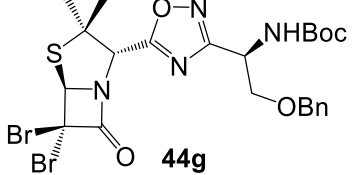
11



10

a) Los rendimientos corresponden a la reacción de formación del anillo 1,2,4- oxadiazólico luego de purificar por columna cromatográfica; b) Entre paréntesis rendimiento obtenido con el Método C.

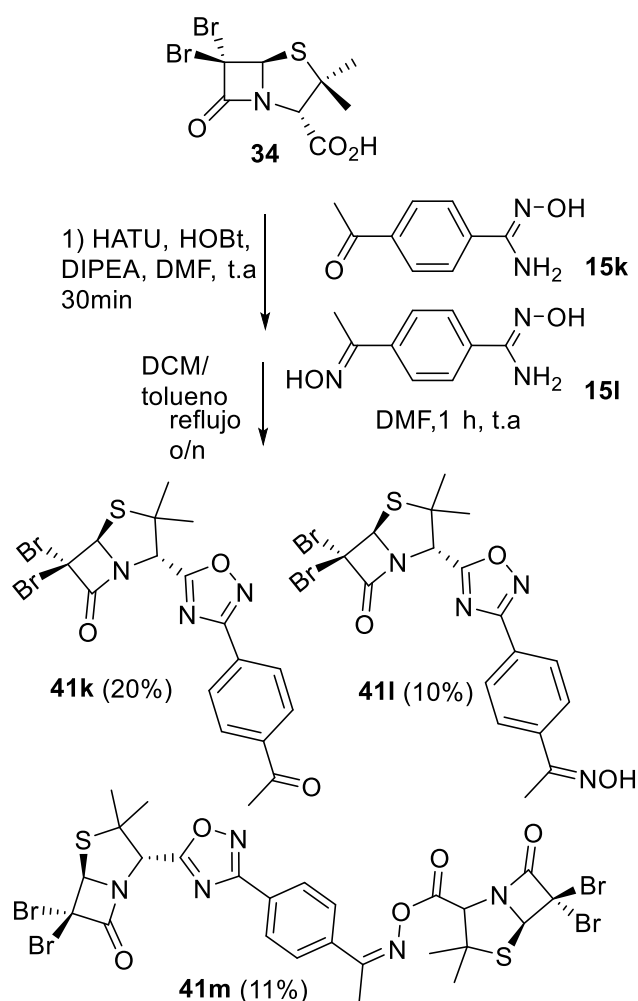
Tabla 12: Compuestos híbridos derivados de aminoácidos utilizando el **Método G**

ENTRADA	AMINOÁCIDO	AMINOAMIDA	AMINONITRILO	AMIDOXIMA	DERIVADO PENIC.	PRODUCTO HÍBRIDO	RTO ^a (%) ^{b,c}
1	 30a	 59a	 60a	 42a	 34	 44a	36 (8)^c
2	 30b	 59b	 60b	 42b	 34	 44b	70 (8)^b (64)^c
3	 30d	 59d	 60d	 42d	 34	 44d	40 (8)^b
4	 30g	 59g	 60g	 42g	 34	 44g	11,5

5							67 (7)^c
6							10
7							25
8							51

a) Los rendimientos corresponden a la reacción de formación del anillo 1,2,4- oxadiazólico luego de purificar por columna cromatográfica; b) Entre paréntesis rendimiento obtenido con el Método C; c) Entre paréntesis rendimiento obtenido con el Método D

Como era de esperar, cuando se utilizó 4-acetilbenzonitrilo (**21k**) como material de partida (entrada 11, Tabla 11), se obtuvo 4-acetil-benzamidoxima (**15k**) en una mezcla con la correspondiente oxima (**15l**). En consecuencia, durante el acoplamiento y la ciclación se obtuvo una mezcla de tres 1,2,4-oxadiazoles diferentes: oxadiazoles de los derivados acetil y oxima (**41k** y **41l**, respectivamente), y un dímero *O*-aciloxima (**41m**) de la reacción de **15l** y una fracción de ácido carboxílico **34** sin reaccionar (Esquema 87).

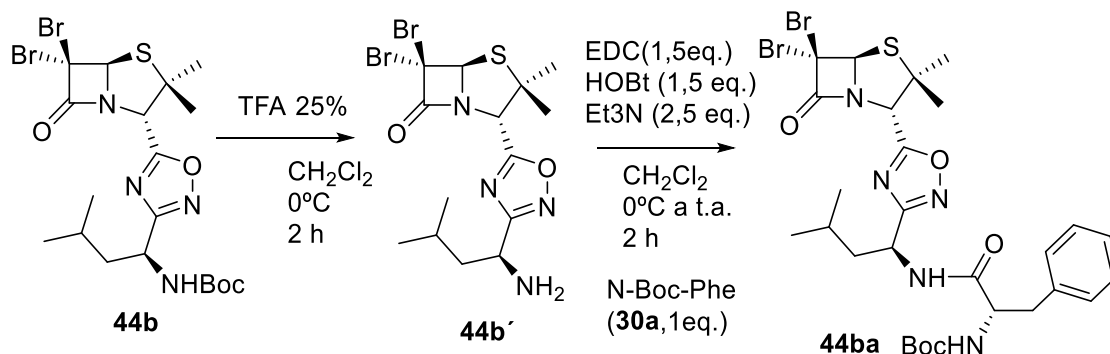


Esquema 87: Formación de los derivados **41k**, **41l** y **41m** a partir de **34**, **15k** y **15l**.

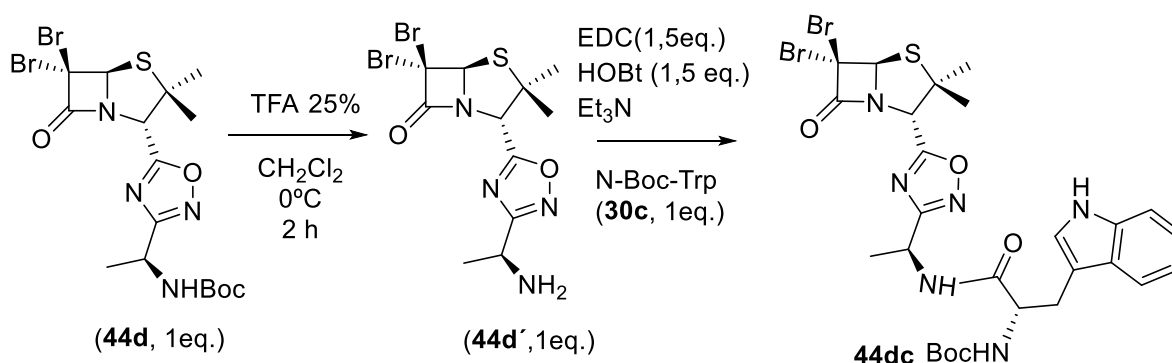
3.2.8. Síntesis de derivados dipeptídicos

Con el objetivo de generar derivados 1,2,4-oxadiazólicos con sustituyentes dipeptídicos se utilizaron dos compuestos de la quimioteca anterior (**44b** y **44f**) como materiales de partida.¹⁴² A ambos se le eliminó el grupo protector Boc y se le acopló otro *N*-Boc-aminoácido. Las reacciones de acoplamiento fueron llevadas a cabo utilizando EDC/HOBt como activantes y trietilamina (Esquema 88 y 89). Finalmente, los derivados dipeptídicos se purificaron por cromatografía en columna

utilizando gradiente de polaridad hexano-AcOEt. Los compuestos finales fueron identificados por RMN de ^1H y ^{13}C .



Esquema 88: Formación de **44ba**.



Esquema 89: Formación de **44dc**.

3.2.9. Estudio de la síntesis de derivados 1,2,4-oxadiazólicos en fase sólida

Como ya se mencionó en la Introducción, debido a la gran demanda de compuestos requerida por la industria farmacéutica tomó relevancia la Química Combinatoria como una estrategia para obtener rápidamente grandes colecciones de compuestos que presentan una importante diversidad estructural.¹⁸ La síntesis en fase sólida fue la metodología de elección para el desarrollo de la química combinatoria ya que facilita la etapa más laboriosa y consumidora de tiempo del proceso de síntesis de un nuevo compuesto: el aislamiento del producto puro luego de la reacción. En la síntesis en fase sólida el material que va a ser transformado se encuentra unido a un soporte sólido, polimérico e insoluble en solventes orgánicos llamado resina.

La estructura general de un soporte sólido es la siguiente: (Figura 57).

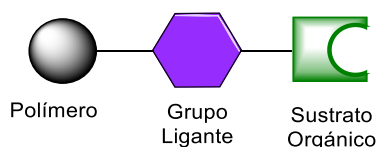


Figura 57: Estructura general de un soporte sólido.

El grupo ligante o linker¹⁴³ es usualmente bifuncional, contienen un grupo que se une al soporte sólido, y otro grupo que permite una unión con el compuesto que se está sintetizando, la cual es selectivamente rota al final de la síntesis. La Resina de Wang¹⁴⁴ es la resina empleada en nuestro trabajo de síntesis (Figura 58). Es un polímero funcionalizado con un linker *p*-alcoxibencilo por lo que se requieren condiciones ácidas relativamente suaves para producir la ruptura la final de la síntesis. Ácido trifluoroacético (TFA) entre 10% y el 50% en diclorometano es suficiente para la separación del sustrato.

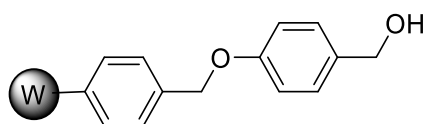
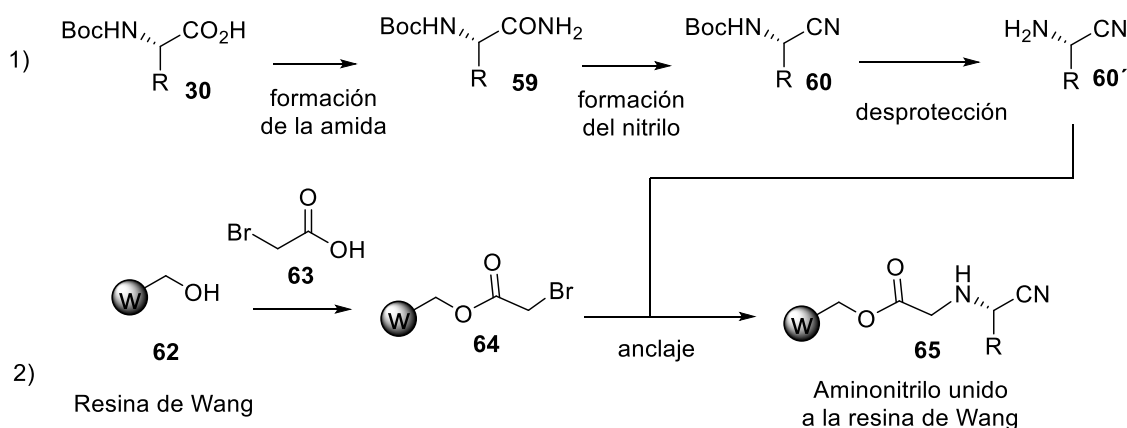


Figura 58: Estructura de la resina de Wang.

Para aplicar la metodología de fase sólida en la obtención de los compuestos híbridos de nuestro interés fue necesario idear una estrategia para anclar al soporte sólido la estructura a modificar y, a su vez, un proceso sintético que nos permita llegar a la formación del anillo oxadiazólico. Si bien gran parte de las síntesis en fase sólida se llevar a cabo por unión a la resina mediante un grupo ácido carboxílico, en nuestro caso, dicha funcionalidad es vital para la generación de la amidoxima de aminoácidos y los derivados arílicos, y en el caso del derivado penicilánico, el grupo ácido carboxílico es esencial para generar el anillo 1,2,4-oxadiazólico. Por lo tanto, se pensó trabajar en una primera instancia solamente con compuestos aminoácidos y anclarlos desde su grupo amino de manera de dejar libre el extremo ácido carboxílico.

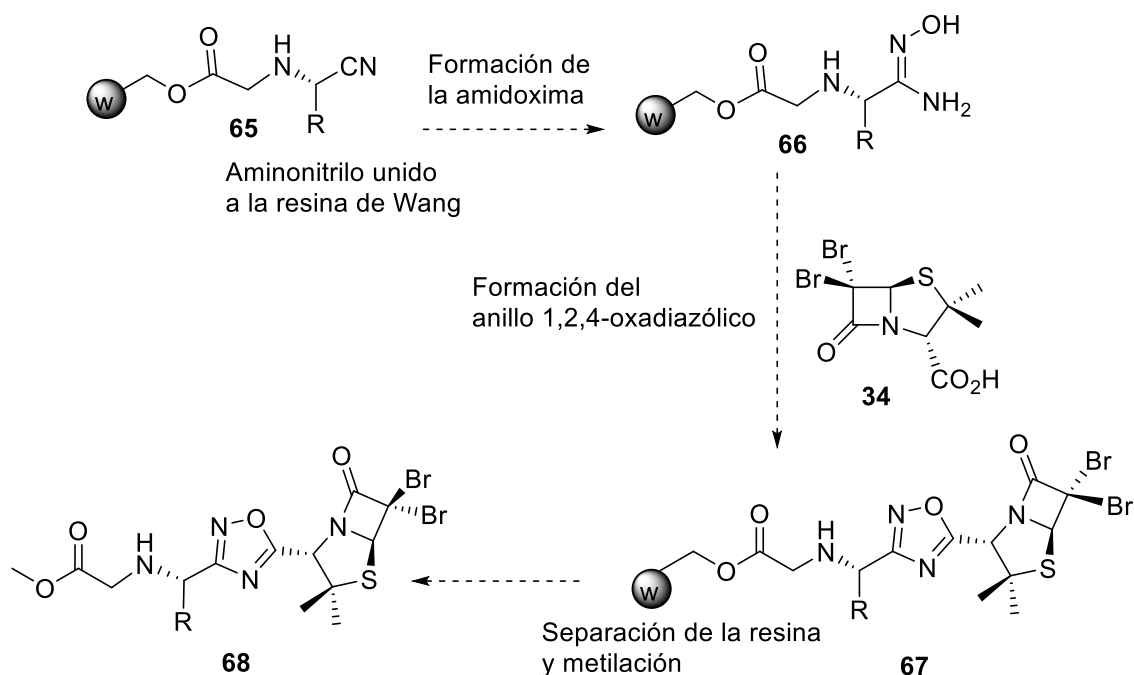
La estrategia planeada se muestra en el Esquema 90. El grupo ácido carboxílico libre del aminoácido iba a resultar inconveniente en el desarrollo de esta etapa por la probabilidad de generar reacciones secundarias indeseadas. Se pensó

en transformar esta funcionalidad en un nitrilo, menos reactiva y que además era útil para las posteriores transformaciones hacia los oxadiazoles híbridos. Por lo tanto, en una primera etapa en solución se obtendrían los aminonitrilos **60'** con su grupo amino libre, partiendo de *N*-Boc-aminoácidos **30**. Por otro lado, la resina de Wang **62** se uniría al ácido bromoacético (**63**) para permitir el anclaje del aminonitrilo a la resina (**65**) (Esquema 90).



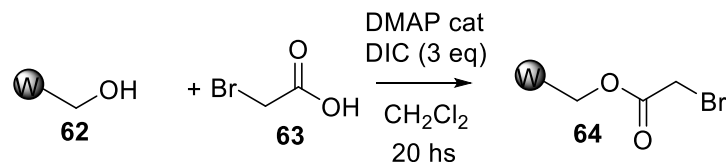
Esquema 90: Camino general de formación de nitrilos derivados de aminoácidos unidos a la resina de Wang.

Una vez obtenido el aminonitrilo anclado a la resina de Wang **65**, se generaría la funcionalidad amidoxima **66** y por último el anillo 1,2,4-oxadiazólico incorporando el derivado penicilánico **67** (Esquema 91).



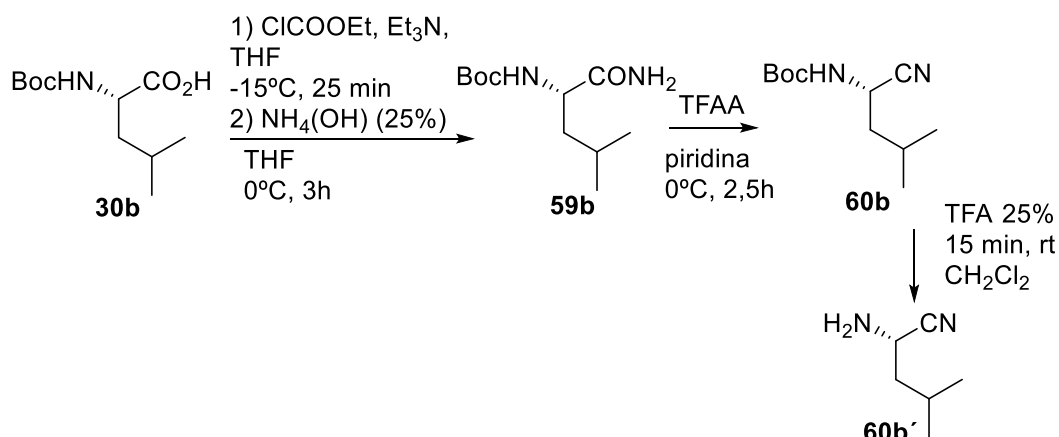
Esquema 91: Camino de síntesis general del 1,2,4-oxadiazol en fase sólida.

En primer término, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento del ácido 2-bromoacético (**68**) a la resina de Wang (Esquema 92).¹⁴⁰



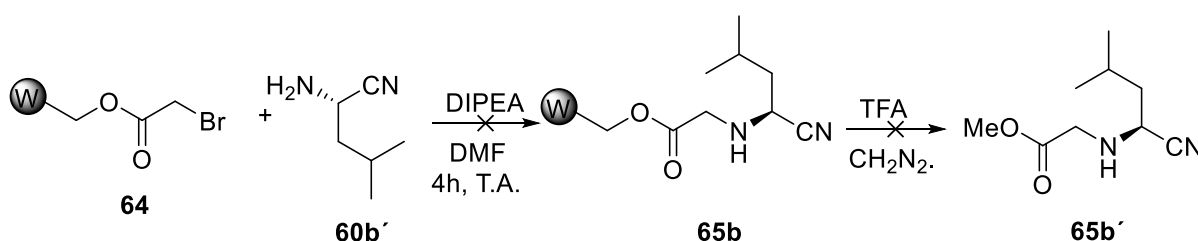
Esquema 92: Unión del ácido 2-bromoacético a la resina de Wang.

Por otro lado, se llevó a cabo la síntesis del nitrilo derivado de *N*-Boc-Leu (**60b**) que se utilizó como modelo para probar la secuencia. Para ello se partió de *N*-Boc-Leu (**30b**) y se lo transformó a la amida¹³¹ correspondiente (**59b**) utilizando cloroformiato de etilo y trietilamina en THF como solvente e hidróxido de amonio. Luego se derivatizó a la funcionalidad nitrilo¹³¹ utilizando anhídrido trifluoroacético (TFAA) y piridina como solvente. Finalmente se desprotegió la amina mediante ácido trifluoroacético (TFA) al 25% en diclorometano como solvente.¹⁴⁵ El crudo obtenido se lo usó directamente en la siguiente reacción (Esquema 93).



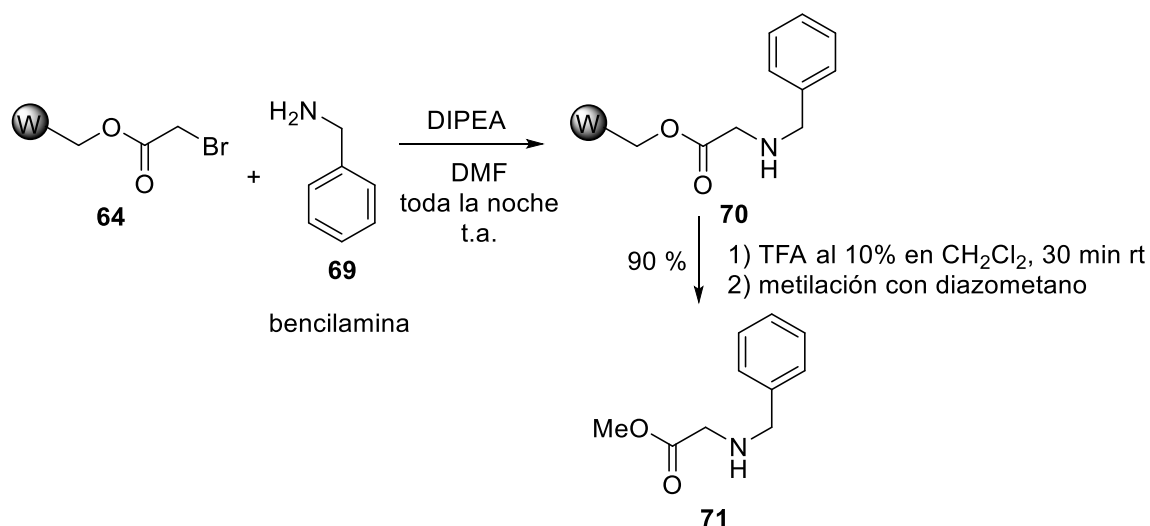
Esquema 93: Formación del nitrilo de *N*-Boc-Leu **60b'**.

Inmediatamente, se llevó a cabo la reacción de sustitución para anclar el aminonitrilo **60b'** a la resina de Wang **64** usando el crudo de la reacción anterior (Esquema 94). Luego de la reacción se separaron unos pocos miligramos de la resina y se separó la resina del producto usando TFA, para verificar la unión exitosa del aminonitrilo **60b'**.¹⁴⁶ Lamentablemente no se obtuvo el compuesto esperado **65b'**, tampoco pudo detectarse el grupo nitrilo del producto en fase sólida (**65b**) en los espectros de RMN de ¹³C en fase gel.



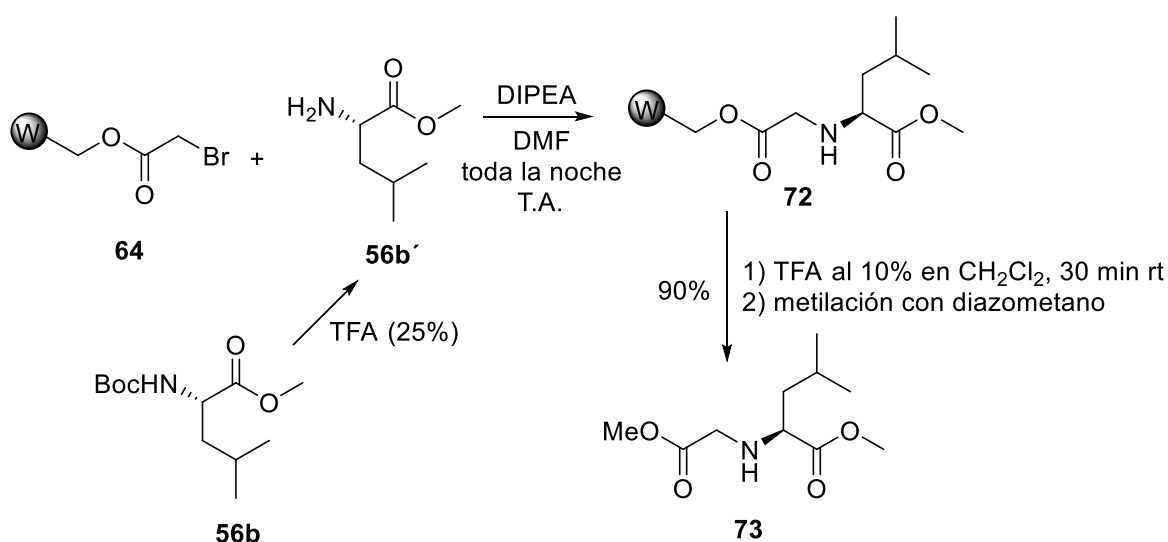
Esquema 94: Estudio del acoplamiento del nitrilo **60b'** con el 2-bromoacetato unido a la resina de Wang (**64**).

Intentando detectar cual fue el problema, se probó recrear la reacción en solución, es decir, en vez de usar el 2-bromoacetato soportado **64**, se utilizó el éster bencílico del ácido 2-bromoacético. Nuevamente, no se obtuvo el producto de alquilación del aminonitrilo esperado. Al no haber un resultado positivo en este último ensayo posiblemente el problema estaría en el aminonitrilo. Por lo tanto, se probó realizar la reacción de alquilación en fase sólida en las mismas condiciones, pero usando bencilamina en reemplazo del aminonitrilo (Esquema 95).



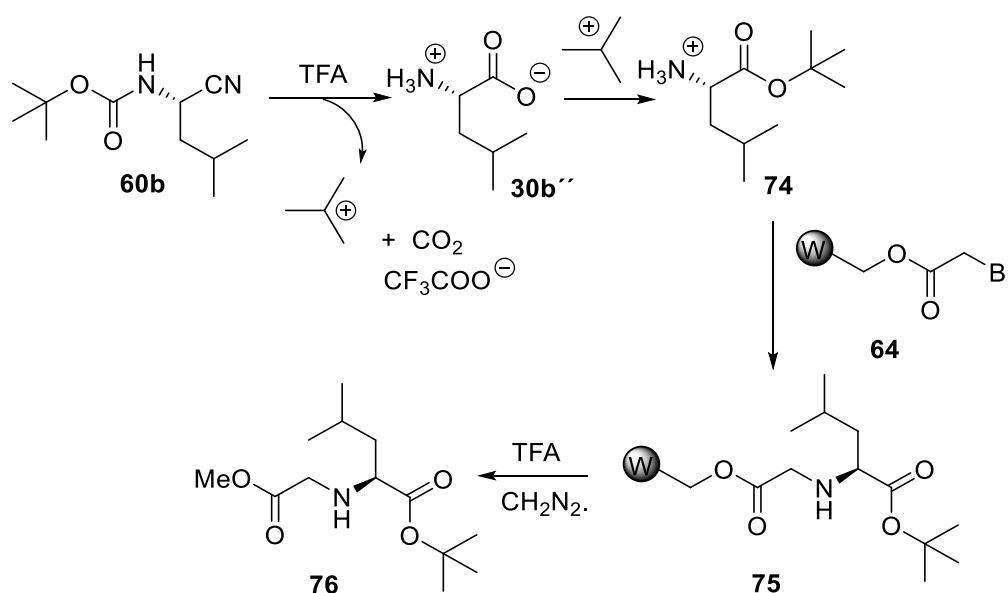
Esquema 95: Acoplamiento de bencilamina (**69**) con el 2-bromoacetato unido a la resina de Wang (**64**).

Al ser exitoso este último ensayo pensamos que posiblemente había un problema en la desprotección de los aminonitrilos **60**. Por ello, se decidió probar el acoplamiento entre el éster metílico de leucina (**56b'**) con el 2-bromoacetato unido a la resina de Wang (**64**) (Esquema 96). A diferencia de los casos anteriores, la desprotección del derivado **56b** fue evidenciable por cromatografía de capa delgada, observándose una única mancha que al revelarse con ninhidrina se coloreaba violeta. La reacción de acoplamiento fue exitosa, al comprobarse la formación del diéster **73** en alto rendimiento.



Esquema 96: Acoplamiento del aminoéster **56b'** al 2-bromoacetato Wang (**64**) y posterior separación de la resina.

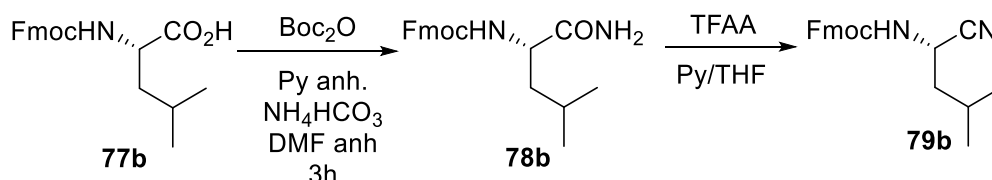
Con estos resultados pudimos comprobar que el problema estaba en la eliminación del grupo Boc en presencia del grupo nitrilo en los aminonitrilos **60**. Decidimos efectuar nuevamente la desprotección del aminonitrilo derivado de leucina **60b** de forma más controlada, usando TFA, pero bajando la temperatura a -15°C y siguiendo la reacción por cromatografía en placa delgada. Seguidamente usamos el crudo de la reacción anterior en la reacción de alquilación con el 2-bromoacetato Wang (**64**) en condiciones similares a las del Esquema 96. Al igual que en el caso anterior, luego de la reacción se separaron unos pocos miligramos de la resina y se separó la resina del producto usando TFA, para verificar si la unión había sido exitosa¹⁴⁶ Desafortunadamente no obtuvimos el producto deseado, pero sí pudimos identificar por RMN de la mezcla obtenida la formación del compuesto **76** (Esquema 97). Posiblemente en la reacción de desprotección el grupo nitrilo de **60** haya sufrido una hidrólisis ácida debido a la presencia de agua en el ácido trifluoroacético utilizado, generando el ácido carboxílico. El grupo ácido carboxílico pudo luego haber sido esterificado debido a la presencia del catión *tert*-butilo originado por la eliminación del grupo Boc (Esquema 97). El producto **74** fue entonces el que reaccionó con el 2-bromoacetato Wang (**64**) para generar **76**, luego de la separación de la resina.



Esquema 97: Esquema del proceso que llevó a la obtención del diéster **75**

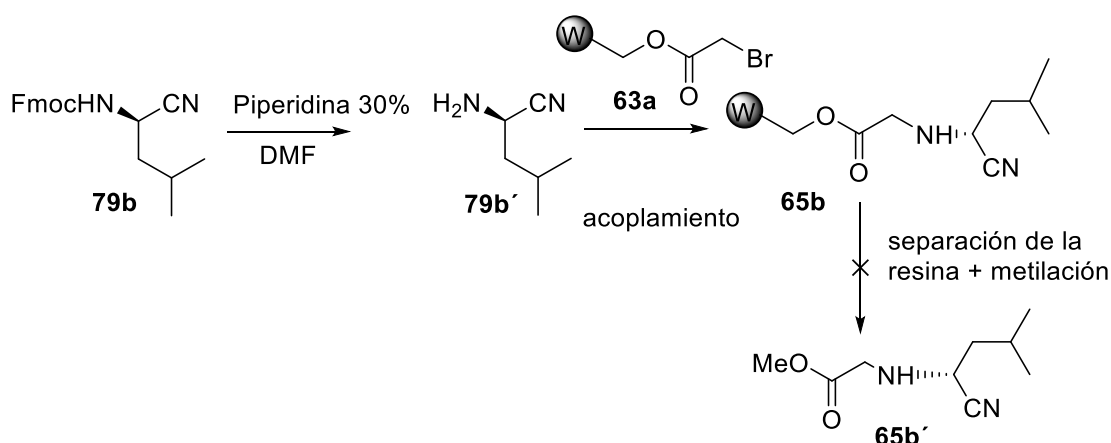
Con el resultado de estos ensayos la eliminación del grupo protector Boc en presencia del grupo nitrilo no resulta conveniente, por ello decidimos intentar con

aminoácidos con otros grupos protectores, tal como el 9- fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc). Este protector se elimina en condiciones básicas, a diferencia de las condiciones ácidas que requiere el protector Boc. Partiendo de la *N*-Fmoc-Leu (**76b**) obtuvimos el correspondiente nitrilo (**79**) en dos etapas (Esquema 98).



Esquema 98: Síntesis del aminonitrilo derivado de *N*-Fmoc-Leu

Seguidamente, desprotegimos el aminonitrilo **79b** utilizando piperidina al 30% en DMF¹⁴⁵ y utilizamos el crudo **79b'** en la reacción de acoplamiento al bromuro **64** (Esquema 99).



Esquema 99: Estudio del acoplamiento del nitrilo **79b'** con el 2-bromoacetato unido a la resina de Wang (**64**).

Desafortunadamente, el producto obtenido no fue el esperado y sólo se pudo aislar una pequeña cantidad del compuesto **80**, producto de la reacción de alquilación sobre piperidina, la cual no se había eliminado completamente luego de la desprotección de **79b** (Figura 59).

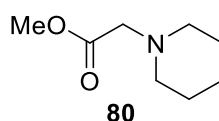
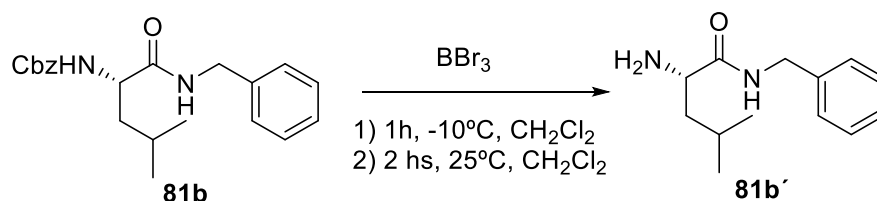


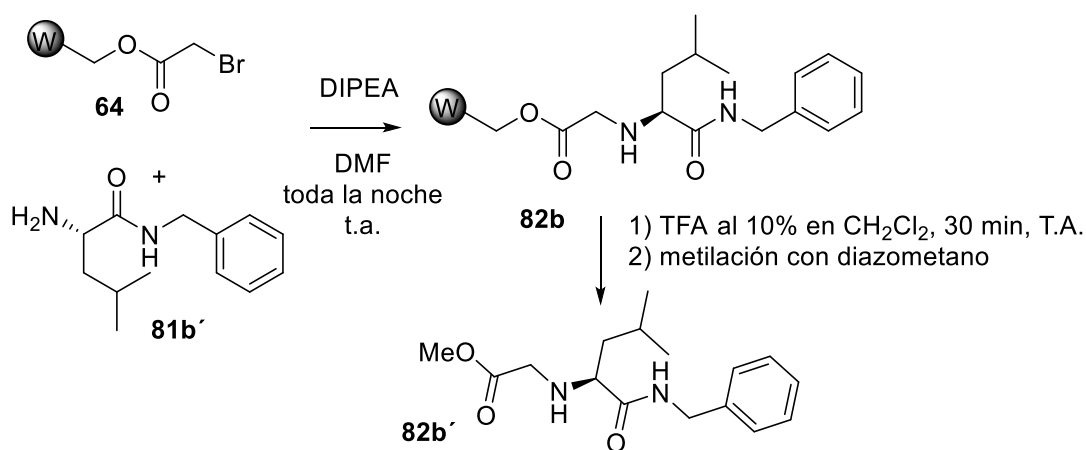
Figura 59: producto obtenido a partir de la reacción de alquilación sobre piperidina

También se investigaron otros grupos protectores como el Cbz (benciloxycarbonil) con el fin de intentar llevar a cabo el proceso sintético planeado. Como modelo utilizamos el éster bencílico de la Cbz-Leu (**81b**). La metodología usualmente utilizada para la eliminación del grupo Cbz es la de hidrogenación catalítica utilizando Pd/C,¹⁴⁵ pero la misma sería incompatible con la presencia de nitrilos. Investigando en bibliografía encontramos que la utilización de tribromuro de boro podría ser compatible (Esquema 100).¹⁴⁷



Esquema 100: Desprotección del grupo Cbz de **81b** usando BBr₃.

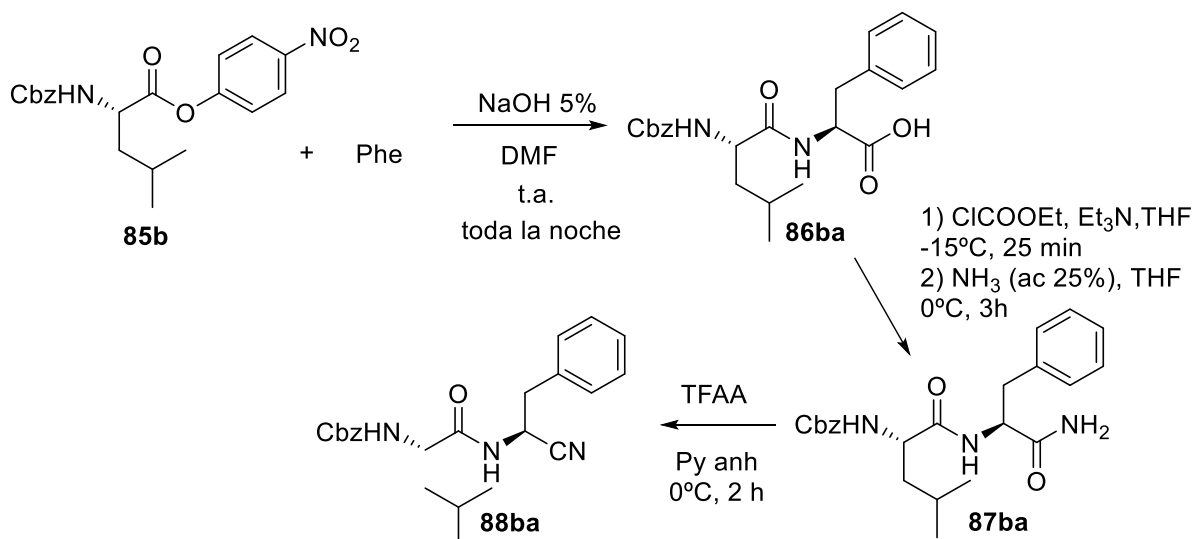
Inmediatamente acoplamos el crudo de la reacción anterior a la resina **64**. Luego de la reacción, la resina fue tratada con TFA y el compuesto separado de la resina fue metilado con diazometano, obteniéndose el compuesto esperado **82b'** (Esquema 101).



Esquema 101: Acoplamiento de **82b'** a **63a** y posterior separación de la resina.

La formación del compuesto **82b'** fue corroborada por RMN de ¹H y ¹³C, principalmente por las señales correspondientes a los grupos carbonilos, a ambos grupos NH, a la cadena alifática de la leucina y al anillo aromático. Este resultado nos permitió continuar con esta estrategia. Para ello sintetizamos el dipéptido Cbz-Leu-Phe-CO₂H (**86ba**), a partir del Cbz-Leu-*p*-nitrofenilester (**84b**), y Phe. Luego,

86ba fue convertido en dos etapas en el correspondiente nitrilo **88ba** el cual se comprobó su presencia mediante los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Esquema 102).¹⁴⁸



Esquema 102: Formación del aminonitrilo **88ba**.

La obtención del derivado **88ba** nos abre camino para continuar la secuencia con la desprotección con BBr_3 , acoplamiento al 2-bromoacetato unido a resina de Wang **64**, generación de la amidoxima correspondiente y formación del 1,2,4-oxadiazol por reacción con el ácido 6,6-dibromopenicilánico **34**.

Si bien los resultados obtenidos nos permitieron mejorar nuestro conocimiento sobre el proceso de síntesis de sistemas 1,2,4-oxadiazólicos en fase sólida, la implementación total de la secuencia todavía requiere más estudios. Debido al tiempo que se necesitaría invertir para concluirlo, decidimos postergar este trabajo con el objetivo que la información acumulada pueda ser usada en el futuro para completar la secuencia sintética.

3.2.10. Ensayos biológicos de derivados oxadiazólicos.

3.2.10.1. Ensayos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA – CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Una serie de compuestos oxadiazólicos fueron ensayados por el equipo de investigación de la Dra. Leonor Roguin del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA – CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Se determinó la actividad antiproliferativa in vitro de 29 compuestos híbridos a una concentración de 20 μ M en dos líneas tumorales murinas: B16-F0 (melanoma) (Figura 60a) y LM3 (adenocarcinoma de mama) (Figura 60b). Para evaluar la selectividad frente a células tumorales, también se determinó el efecto citotóxico frente a la línea NMuMG no tumoral (epitelio mamario murino normal) (Figura 60c).

Como puede verse en la Figura 60c, se encontró que solo dos compuestos (**36a** y **41l**) eran citotóxicos contra las células NMuMG (Figura 61). De los compuestos no citotóxicos contra las células NMuMG, la diacilhidrazida **35a**, y los oxadiazoles **44b**, **44h** y **36b** (Figura 62) fueron los más activos contra B16-F0 (Figura 60a), mientras que **44b**, **44h** y **36b** (Figura 62) fueron los más activos contra LM3 (Figura 60b). La presencia del componente penicilina parece ser crucial ya que todos los compuestos activos tienen ese resto orgánico. Curiosamente, los compuestos activos **44b**, **44h** y **36b** están estrechamente relacionados: Son penicilinas unidas a una leucina o isoleucina por un 1,2,4-oxadiazol o el isómero 1,3,4.

La actividad de **35a** es muy interesante ya que las diacilhidrazidas se han descrito como peptidomiméticos y resultan interesantes en terapias inmuno-oncológicas¹⁴⁹. Por ejemplo, se ha informado que el compuesto **89** es un inhibidor del punto de control inmunológico dirigido al ligando de la proteína PD-1 (Muerte programada-1, CD279).¹⁵⁰

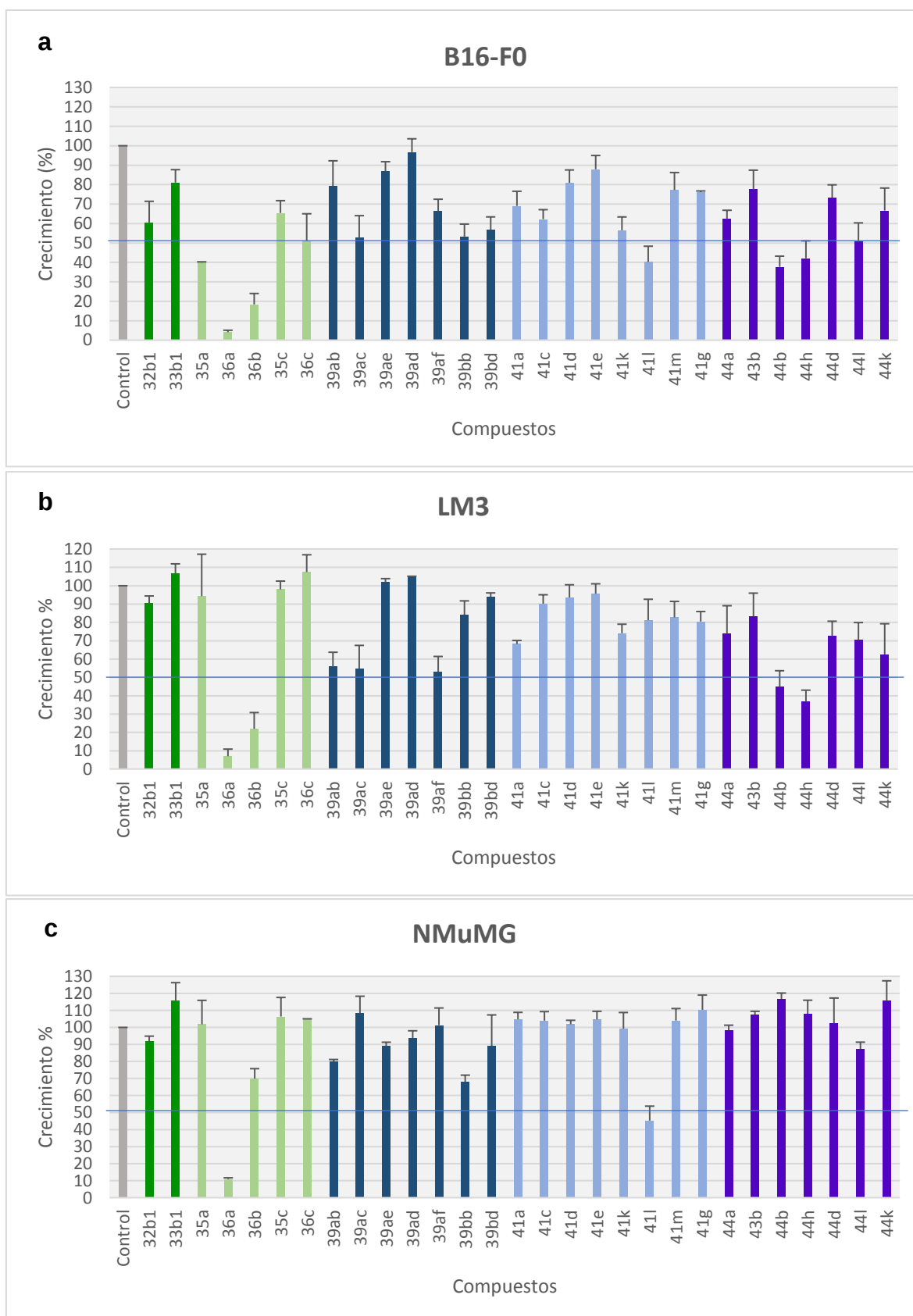


Figura 60: Efecto de compuestos híbridos sobre la proliferación de líneas celulares tumorales y no neoplásicas. Se incubaron 2 x 10⁴ células por pocillo (NMuMG y LM3) o 1 x 10⁴ células por pocillo (B16-F0) en presencia o ausencia de 20 µM de diferentes compuestos durante 72 hs 37 ° C. La proliferación celular se midió por

determinación colorimétrica de los niveles de hexosaminidasa. Los resultados se expresan como el porcentaje de crecimiento obtenido en ausencia de compuestos (control) y se representan como media $\pm$ S.E.M. de tres experimentos diferentes.

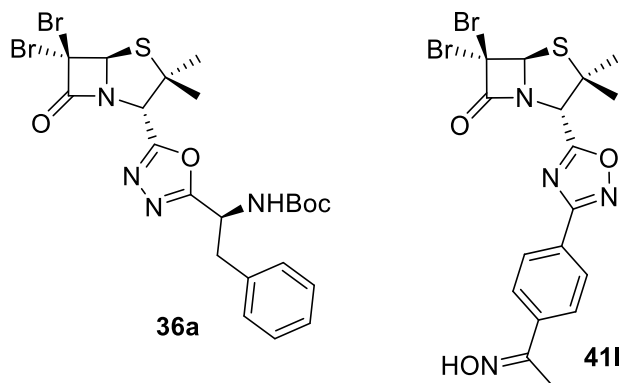


Figura 61: compuestos citotóxicos contra las células NMuMG

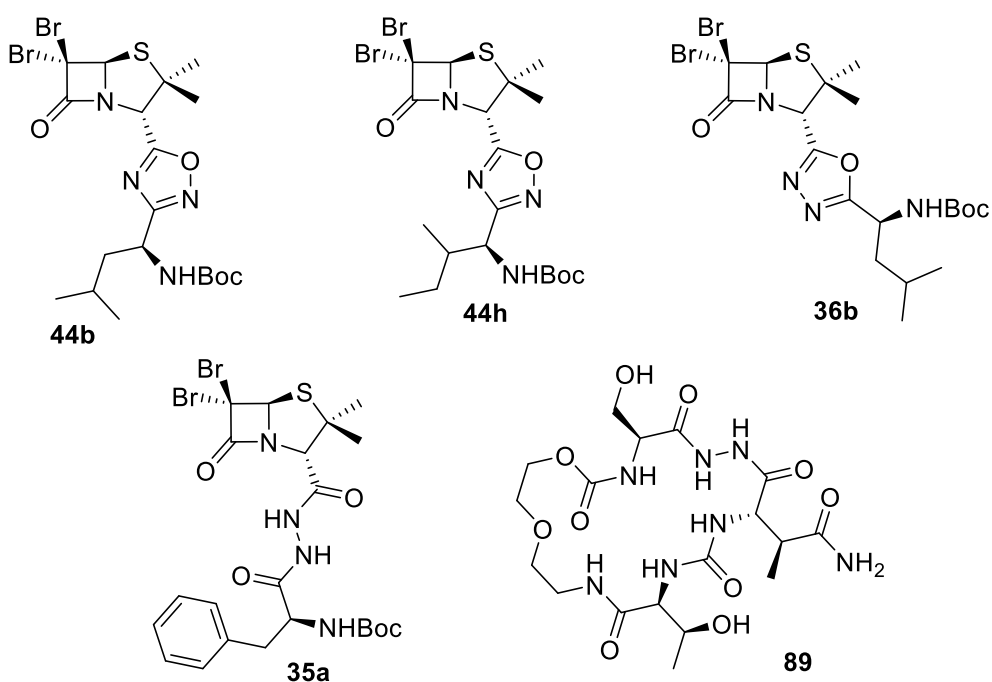


Figura 62: compuestos activos contra B16-F0 (melanoma) y LM3 (adenocarcinoma de mama), pero no citotóxicos contra las células NMuMG.

Los interesantes resultados de los híbridos activos de penicilina-oxadiazol-aminoácido (**44b**, **44h** y **36b**) se reflejaron en sus respectivos valores de IC₅₀, los cuales son una medida de la potencia de una sustancia determinada para inhibir una función biológica o bioquímica específica (Tabla 13, entradas 1-6). El índice de selectividad (SI), el cual representa la relación entre IC₅₀ para la línea celular normal y IC₅₀ para la línea celular cancerosa para **44b** y **44h** oscila entre 3,06 y 4,13, para ambas líneas celulares (B16F0 y LM3), lo que indica que la citotoxicidad hacia células tumorales es al menos tres veces mayor que frente a células normales. De manera similar, los valores de IC₅₀ para **35a** frente a B16F0 también mostraron un SI de alrededor de cuatro (3,75). Muchos medicamentos contra el cáncer de uso clínico se ven obstaculizados por sus efectos secundarios altamente tóxicos. El cis-platino, ampliamente utilizado en la terapia clínica del cáncer, muestra un SI menor que uno.¹⁵¹

Tabla 13: Valores de IC₅₀ de los híbridos activos.

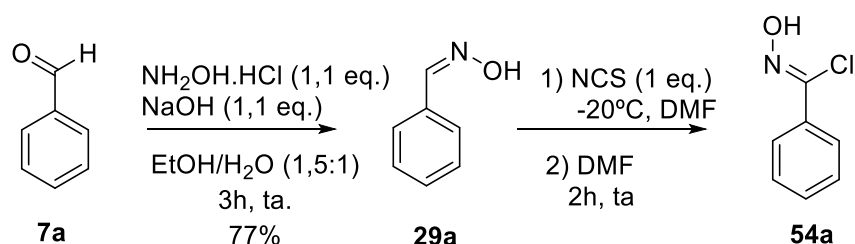
Entrada	Compuestos	IC ₅₀ B16F0 (μM)	IC ₅₀ LM3 (μM)	IC ₅₀ NMuMG (μM)	SI
1	44b	15 ± 2	--	62 ± 5	4.13
2	44b		18 ± 4	62 ± 5	3.44
3	44h	19 ± 1	--	62 ± 2	3.06
4	44h		15 ± 1	62 ± 2	4.13
5	36b	13 ± 3	--	34 ± 8	2.61
6	36b	--	12 ± 1	34 ± 8	2.83
7	35a	24 ± 8	--	90 ± 3	3.75

Estos resultados prometedores abren la puerta para un mayor desarrollo de híbridos que contienen penicilina como nuevos agentes antitumorales quimioterapéuticos potenciales, particularmente aquellos que portan el resto de diacilhidrazida, 1,3,4- o 1,2,4-oxadiazol.

3.3. Síntesis de derivados isoxazólicos.

Los isoxazoles son heterociclos de cinco miembros que contienen átomos de oxígeno y nitrógeno en posiciones adyacentes. Un método popular para conjugar dos restos orgánicos a través de un anillo de isoxazol es la cicloadición 1,3-dipolar entre un alquino y un óxido de nitrilo. En 2005, Fokin y colaboradores informaron el primer ejemplo de una síntesis catalizada por metales de isoxazoles mediante una cicloadición 1,3-dipolar, como una variación de la reacción clásica de Huisgen catalizada por Cu (I) entre alquinos y azidas para producir triazoles.⁹⁶ La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente con una selectividad muy alta para el regioisómero 3,5.⁹⁷

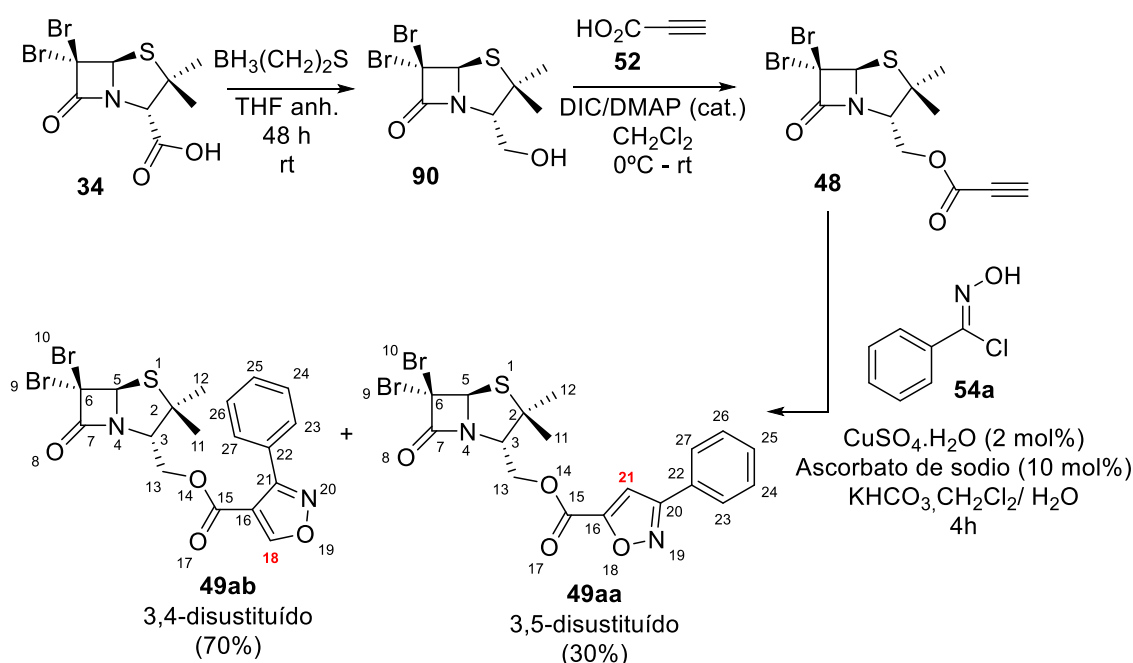
Teniendo en cuenta la importancia de las penicilinas en Química Medicinal, decidimos sintetizar un derivado de penicilina que contenga un grupo alquino terminal como sustrato para llevar a cabo la cicloadición 1,3-dipolar con un óxido de nitrilo generado *in situ*. Nuevamente, las condiciones básicas necesarias para la generación de la oxima intermediaria nos impidieron probar el acoplamiento usando una penicilina que lleve el componente nitrogenado. Por un lado, el cloruro de *N*-hidroxibencimidoílo (**54a**) se preparó en dos pasos a partir de benzaldehído (**7a**), usando hidroxilamina para obtener la oxima (**29a**) y NCS para la posterior cloración (Esquema 103).¹⁵²



Esquema 103: Obtención del cloruro de *N*-hidroxibencimidoílo (**54a**) a partir de benzaldehído (**7a**).

Por otro lado, el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) se redujo con un complejo de borano-sulfuro de dimetilo¹⁵³ seguido de la esterificación del alcohol correspondiente **90** con ácido propiólico (**52**) usando DIC y DMAP como catalizador, para producir el alquino derivado de penicilina **48** (Esquema 104).

Para obtener el producto de cicloadición, la deshidrohalogenación promovida por una base de **54a** generó *in situ* el correspondiente óxido de nitrilo que reaccionó con el alquino **48** bajo catálisis de Cu (I). El catalizador se preparó mediante la combinación de sulfato de cobre (II) y ascorbato de sodio como agente reductor. Sorpresivamente, se obtuvo una mezcla de los dos regiosómeros con el isómero menos esperado 3,4-disustituido (**49ab**) en mayor proporción (70%), que está más de acuerdo con la cicloadición catalizada por Ru (II) selectiva para la generación del isómero 3,4, la cual fue reportada por el grupo Fokin¹⁵⁴ (Esquema 104).



Esquema 104: Síntesis de penicilin-3,4-isoxazol y penicilin-3,5-isoxazol.

La formación de ambos regioisómeros fue claramente demostrada por RMN de ^1H (Figura 63) donde se aprecian las señales de cada molécula. Se observa un leve corrimiento a campos más bajos de aquellas señales correspondientes al regioisómero **49aa** que está en menor proporción. Una de las señales que claramente se diferencia en ambos regioisómeros es la del protón unido al anillo isoxazólico. El H18 del anillo en **49ab**, vecino al oxígeno queda fuertemente desapantallado dando una señal tipo singlete a 9,10 ppm. Mientras que la señal de H21 en **49aa**, unido a un carbono flanqueado por otros dos tiene un desplazamiento químico a campos más altos (7,31 ppm) respecto a **49ab**.

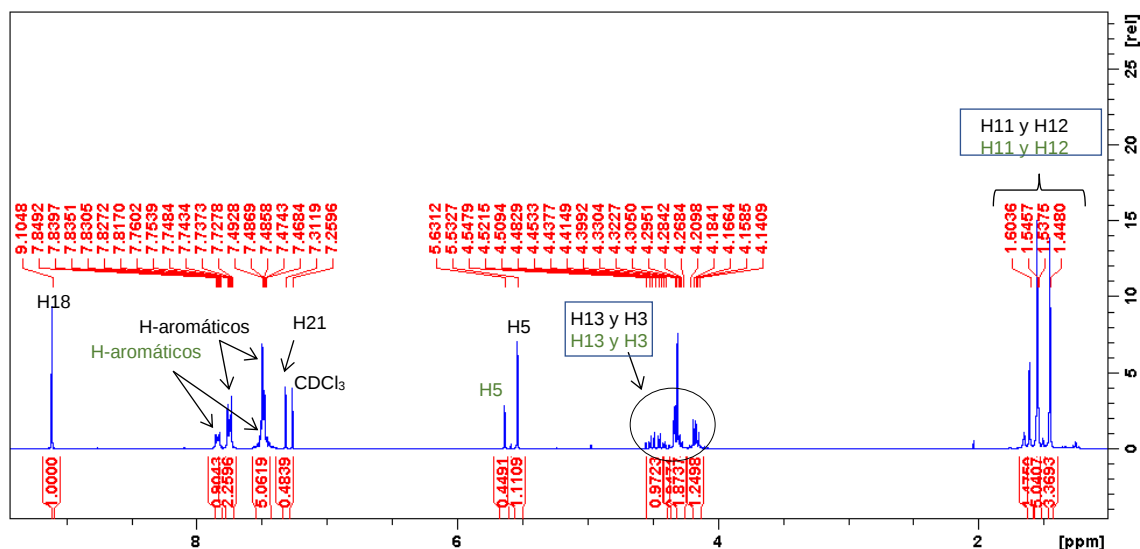


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de regioisómeros **49aa** y **49ab**.^a
^aEn negro, señales correspondientes a **49ab** y en verde, señales correspondientes a **49aa**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 61) se puede apreciar la diferencia en desplazamiento químico de los carbonos de cada regioisómero, especialmente los que corresponden al anillo isoxazólico. El C18 en **49ab** queda más desapantallado (164,8 ppm) que su análogo, C16, en **49aa** (159,80 ppm). También se observa una diferencia de desplazamientos químicos entre los carbonos análogos C16 en **49ab** con una señal a 112,10 y C21 en **49aa** con una señal a campos más altos (108,22 ppm).

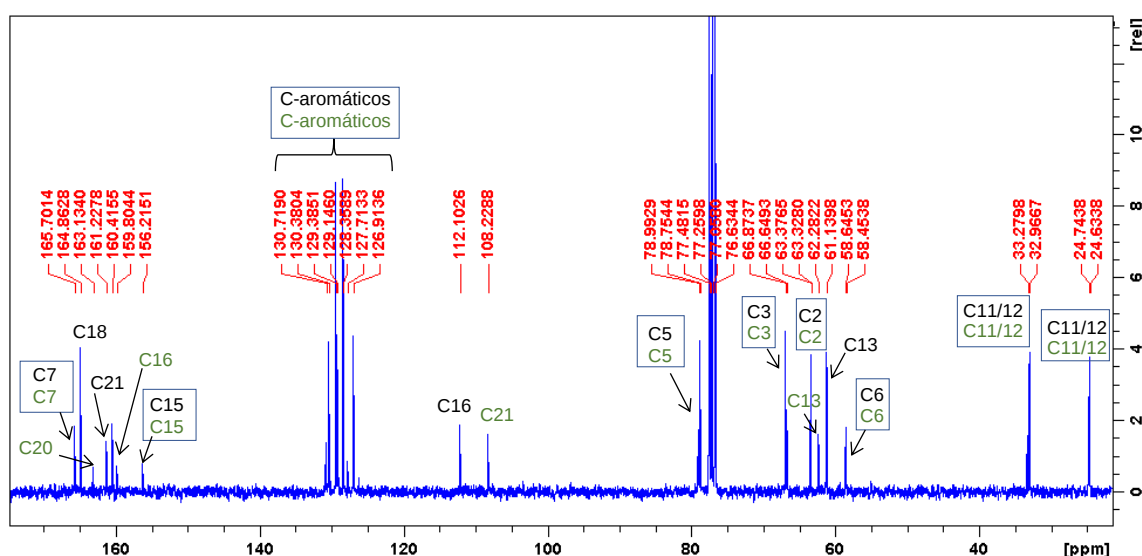
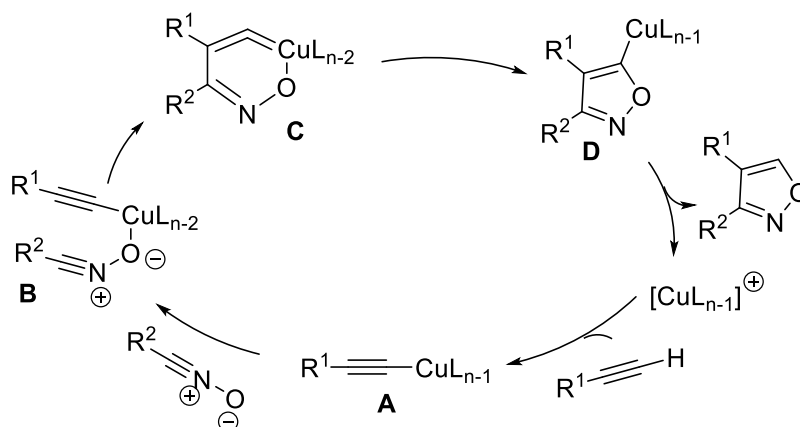


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla de regioisómeros **49aa** y **49ab**.^a

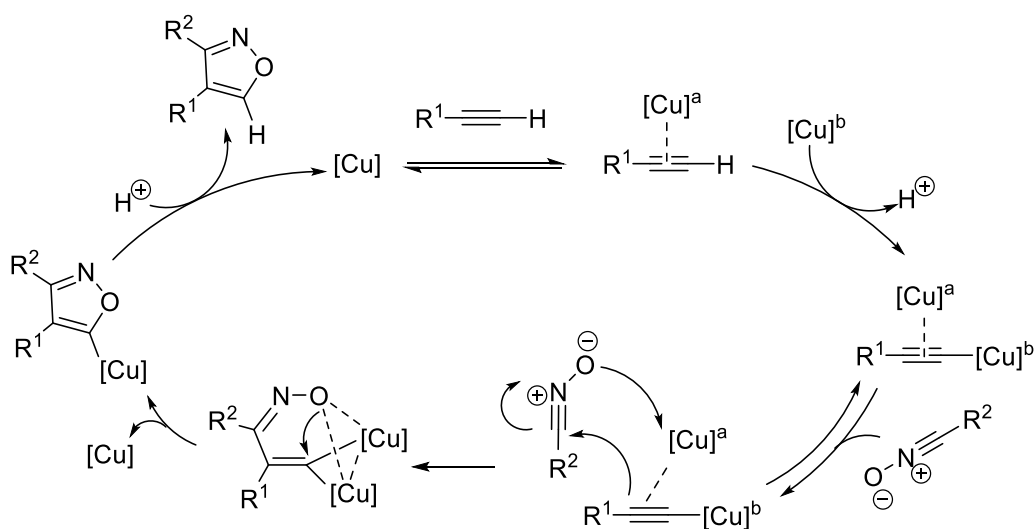
^aEn negro, señales correspondientes a **49ab** y en verde, señales correspondientes a **49aa**.

No se ha propuesto ningún mecanismo para la síntesis mediada por Cu (I) de isoxazoles 3,4-disustituidos. De manera análoga a otros procesos

catalizados por Cu (I), en el Esquema 105 se representa un mecanismo plausible.¹⁵⁵ Comienza con la formación del acetiluro de cobre (I) (**A**), seguido de la sustitución de uno de los ligandos de cobre por el óxido de nitrilo y la formación del metalociclo de cobre (III) de seis miembros (**C**). Con la contracción del anillo, que forma el derivado de isoxazolil-cobre (**D**), y la liberación del isoxazol, se completa el ciclo catalítico. Asimismo, siguiendo el intermedio de cobre dinuclear descrito por Fokin,¹⁵⁶ se muestra un mecanismo alternativo en el Esquema 106.



Esquema 105: Posible mecanismo para la síntesis mediada por Cu (I) de isoxazoles 3,4-disustituidos

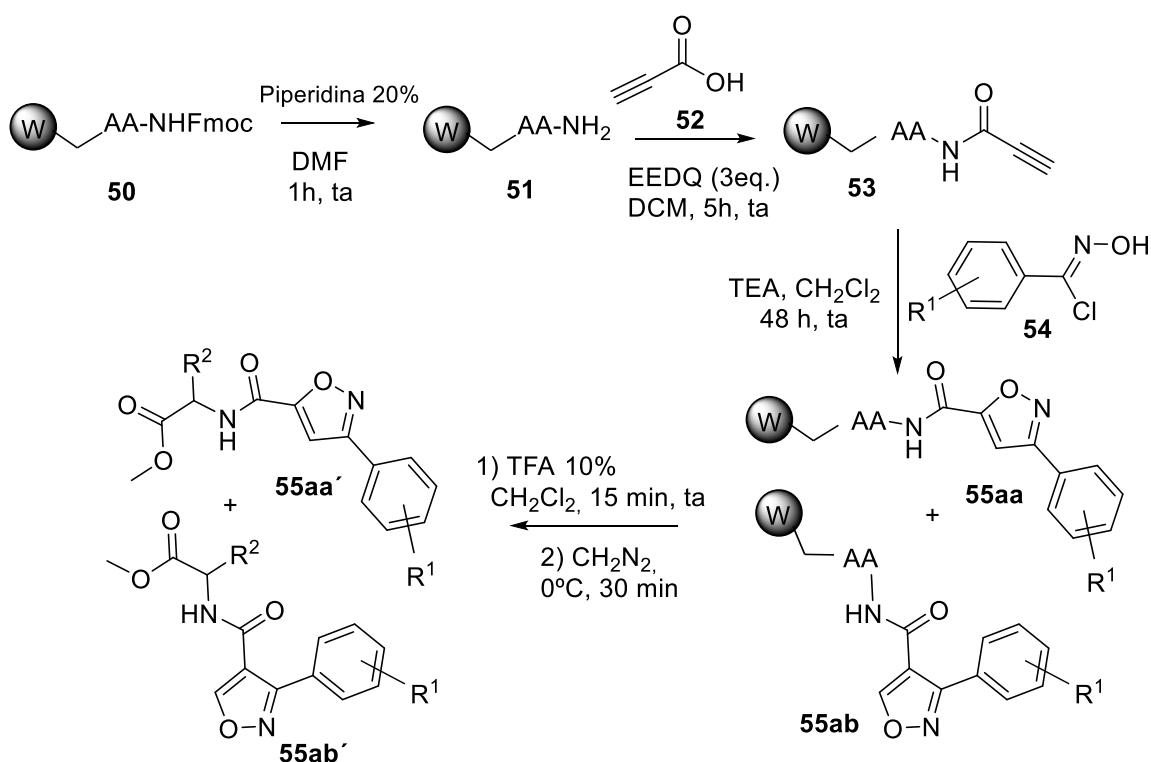


Esquema 106: Mecanismo alternativo para la síntesis mediada por Cu (I) de isoxazoles 3,4-disustituidos.

3.3.2. Síntesis de derivados isoxazólicos en fase sólida

Como continuación de este trabajo de tesis dirigido hacia el diseño y desarrollo de derivados heterocíclicos novedosos, desarrollamos una estrategia paralela de cicloadición de óxido de nitrilo en fase sólida para sintetizar una variedad de isoxazoles utilizando nuevamente la química de cicloadición 1,3-dipolar. Los precursores de alquino requeridos se sintetizaron a partir de un aminoácido *N*-protegido con Fmoc unido a la resina de Wang.

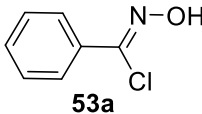
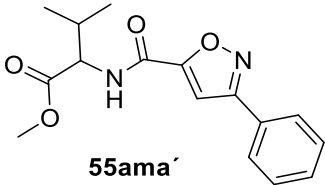
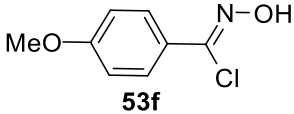
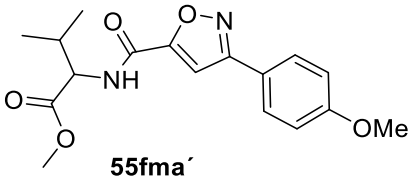
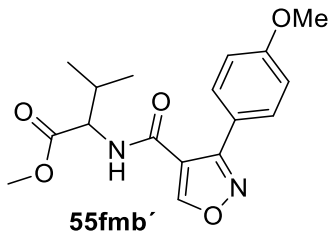
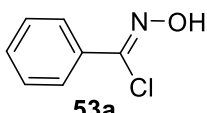
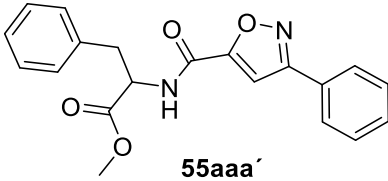
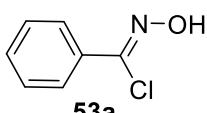
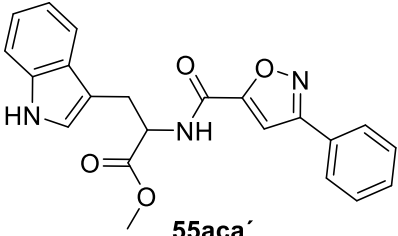
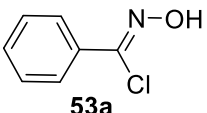
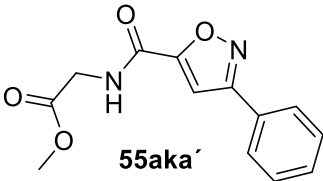
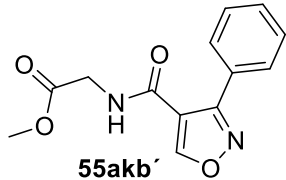
Inicialmente, se llevó a cabo la desprotección de los *N*-Fmoc-aminoácidos unida a la resina de Wang (**50**) y el acoplamiento con el ácido propiónico (**52**) utilizando EEDQ como activante de ácidos carboxílicos.¹⁵⁷ Finalmente, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar se llevó a cabo utilizando la cloroxima **54** (que es deshidrogenada *in situ* con TEA para dar el óxido de nitrilo correspondiente) en DCM durante 24 horas, sin catálisis metálica (Esquema 107).¹⁵⁸



Esquema 107: Ruta de síntesis de aminoacil isoxazoles en fase sólida.

En la Tabla 14 se muestran los derivados aminoacil isoxazólicos obtenidos mediante síntesis en fase sólida.

Tabla 14: Derivados aminoacil-isoxazólicos obtenidos mediante síntesis en fase sólida

Entrada	Wang-Fmoc-AA	Cloroxima	Aminoacil isoxazol	Rto (%) [*]
1	Wang-Fmoc.Val (90m , 0,61 mmol/g)	 53a	 55ama'	31
2	Wang-Fmoc.Val (90m , 0,61 mmol/g)	 53f	 55fma'	20
			 55fmb'	04
3	Wang-Fmoc.Phe (90a , 0,70 mmol/g)	 53a	 55aaa'	18
4	Wang-Fmoc.Trp (90c , 0,50 mmol/g)	 53a	 55aca'	07
5	Wang-Fmoc.Gly (90k , 0,70 mmol/g)	 53a	 55aka'	33
			 55akb'	05

^{*} Rendimiento basado en la carga inicial de la resina de Wang.

En todos los ensayos se obtuvo el regiosómero 3,5-disustituído. En los casos de las entradas 2 y 5 de la Tabla 13, fue posible aislar el regioisómero 3,4-

disustituído en menor proporción. En las Figuras 65 se muestra los espectros comparativos de RMN de ^1H de los regioisómeros **55fma'** y **55fmb'**. Estos resultados son opuestos a los alcanzados cuando se obtuvo, mediante catálisis de cobre y en fase homogénea, la mezcla de regioisómeros penicilánicos **49aa** y **49ab**, donde el regioisómero 3,4-disustituído era el mayoritario.

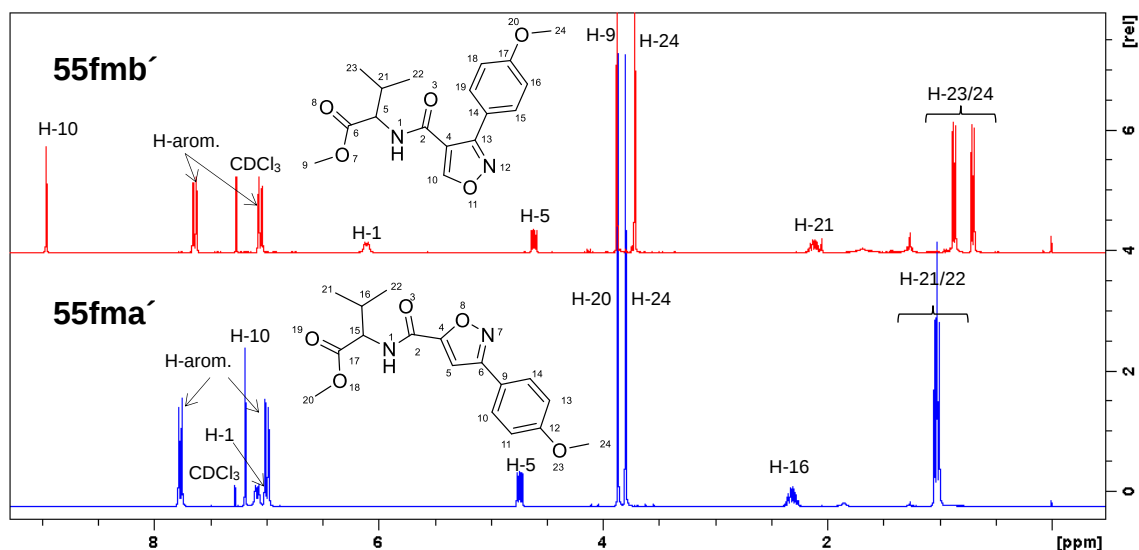
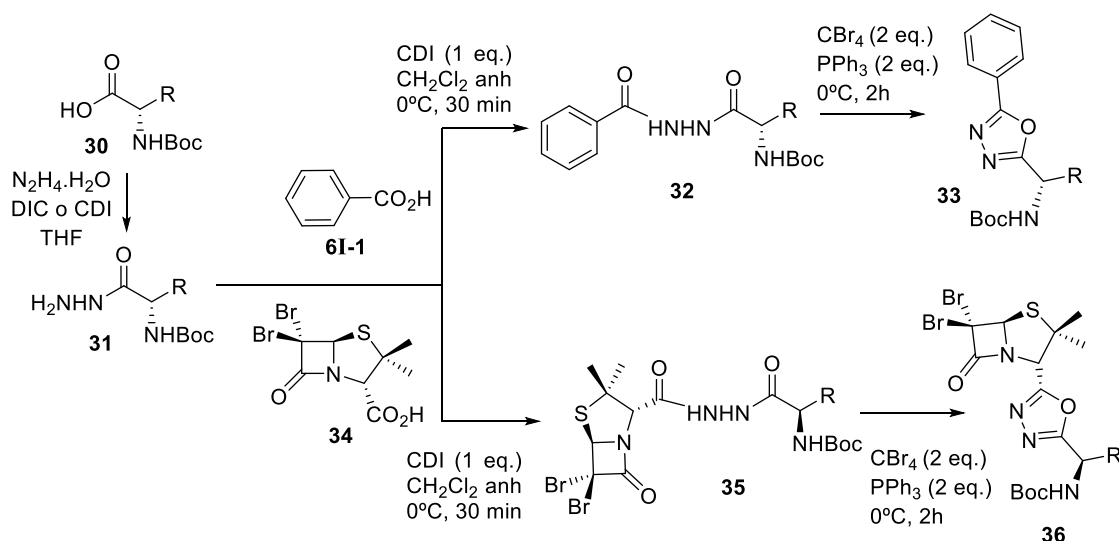


Figura 65: Comparación de espectros de RMN de ^1H de **55fma'** y **55fmb'**

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

Como conclusión podemos decir que hemos desarrollado una serie de estrategias para la síntesis de algunos híbridos novedosos para conjugar tres estructuras biológicamente interesantes en un solo compuesto.

En una primera etapa, se probaron una serie de metodologías destinadas a la obtención de compuestos híbridos conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazol. Inicialmente, se han estudiado diferentes métodos para la síntesis de hidrazidas formadas a partir de distintos aminoácidos protegidos. Encontramos que el empleo de CDI o DIC como agentes activantes y promotores del acoplamiento entre los aminoácidos y el monohidrato de hidrazina en THF resultaban satisfactorios para la obtención de las hidrazidas. Posteriormente, se llevaron a cabo distintos ensayos de acoplamiento y ciclación de las hidrazidas derivadas de aminoácidos **31** con ácido benzoico (**6I-1**) con el propósito de encontrar la metodología que nos permitiera la obtención del anillo 1,3,4-oxadiazol, resultando exitosa la dupla $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$ como agentes de ciclodeshidratación. Este proceso se aplicó también a la síntesis de compuestos conteniendo una estructura derivada de penicilinas, tal como el híbrido **36**. En algunos casos se aislaron también las estructuras acíclicas intermediarias **32/35** (aductos diacilhidrazinas). (Esquema 107).



Esquema 107: Secuencia sintética de formación de 1,3,4-oxadiazoles.

En la Figura 66 se muestran los compuestos híbridos obtenidos conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazol.

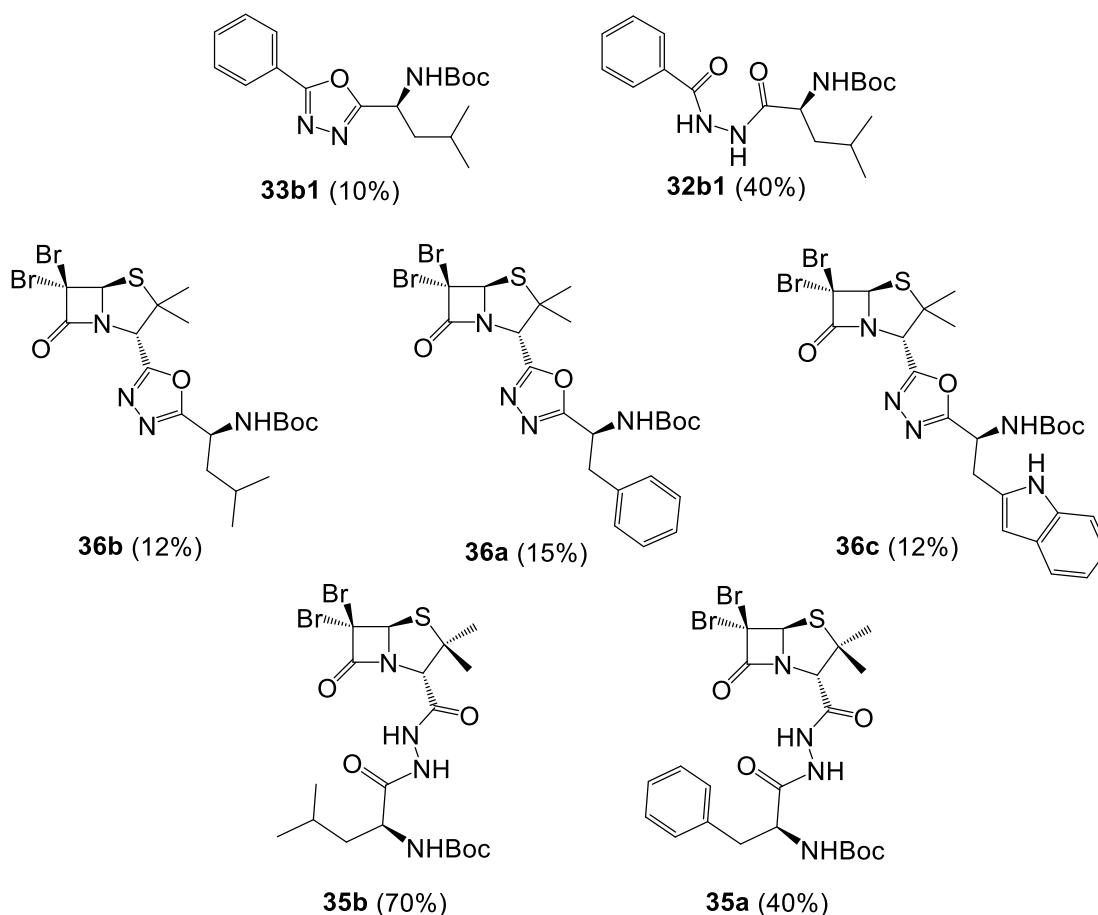
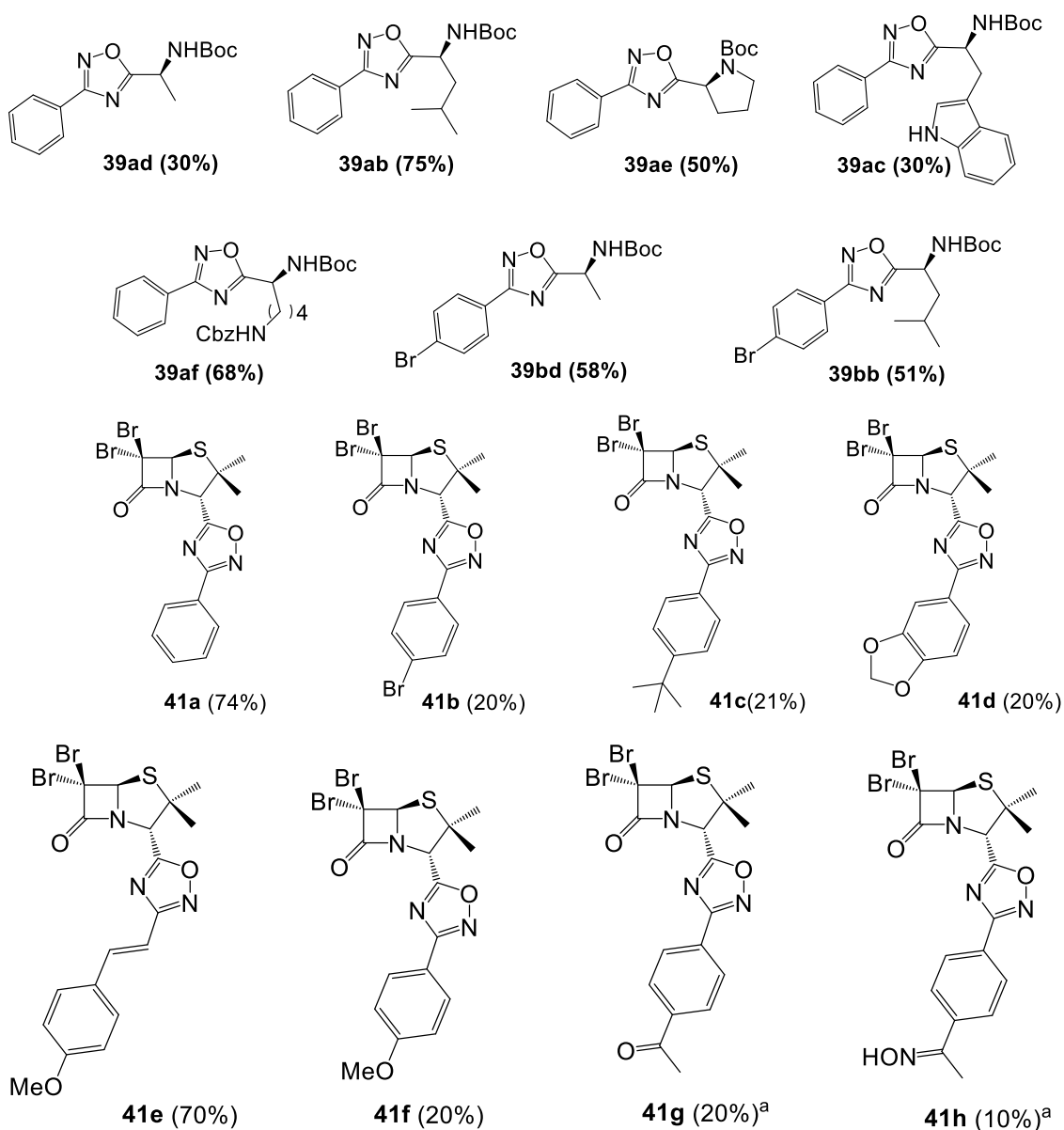


Figura 66: Quimioteca de 1,3,4-oxadiazoles e intermediarios.

La segunda etapa fue dirigida a la formación de compuestos híbridos 1,2,4-oxadiazólicos. Mediante la activación del grupo ácido carboxílico del derivado penicilánico **34** utilizando la dupla HATU/HOBt fue posible la formación del anillo 1,2,4-oxadiazólico empleando amidoximas derivadas de aril-nitrilos (**15**). Posteriormente, se decidió realizar la síntesis de amidoximas derivadas de aminoácidos protegidos con Boc. Para ello fue necesario derivatizarlas primero a la funcionalidad amida y luego a la funcionalidad nitrilo. Una vez obtenidos los nitrilos derivados de aminoácidos se formaron las amidoximas **42** correspondientes con rendimientos que fueron de moderados a buenos. Las amidoximas derivadas de aminoácidos se emplearon para la formación del anillo 1,2,4-oxadiazólico en el acoplamiento con penicilinas probando una variedad de métodos. Si bien estas metodologías no han sido ensayadas con gran diversidad de amidoximas, el **Método D** (EDC en diglima) parecería ser el mejor para los materiales de partida empleados. Aun así, los rendimientos no fueron buenos a excepción del compuesto **44b**, para el cual se empleó la amidoxima derivada de

la leucina. Una posible explicación de estos resultados sería la presencia de impurezas en los derivados amidoxima que afectarían el curso de la reacción y/o la estabilidad del anillo penicilánico, por ejemplo, la presencia de nucleófilos originados como posibles productos secundarios que provoquen la apertura del anillo penicilánico. En una tercera etapa, logramos ampliar y mejorar los rendimientos de la quimioteca de compuestos híbridos conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazol utilizando el **Método G** (EDC/HOBt).

En la figura 67 se resumen los 1,2,4-oxadiazoles obtenidos



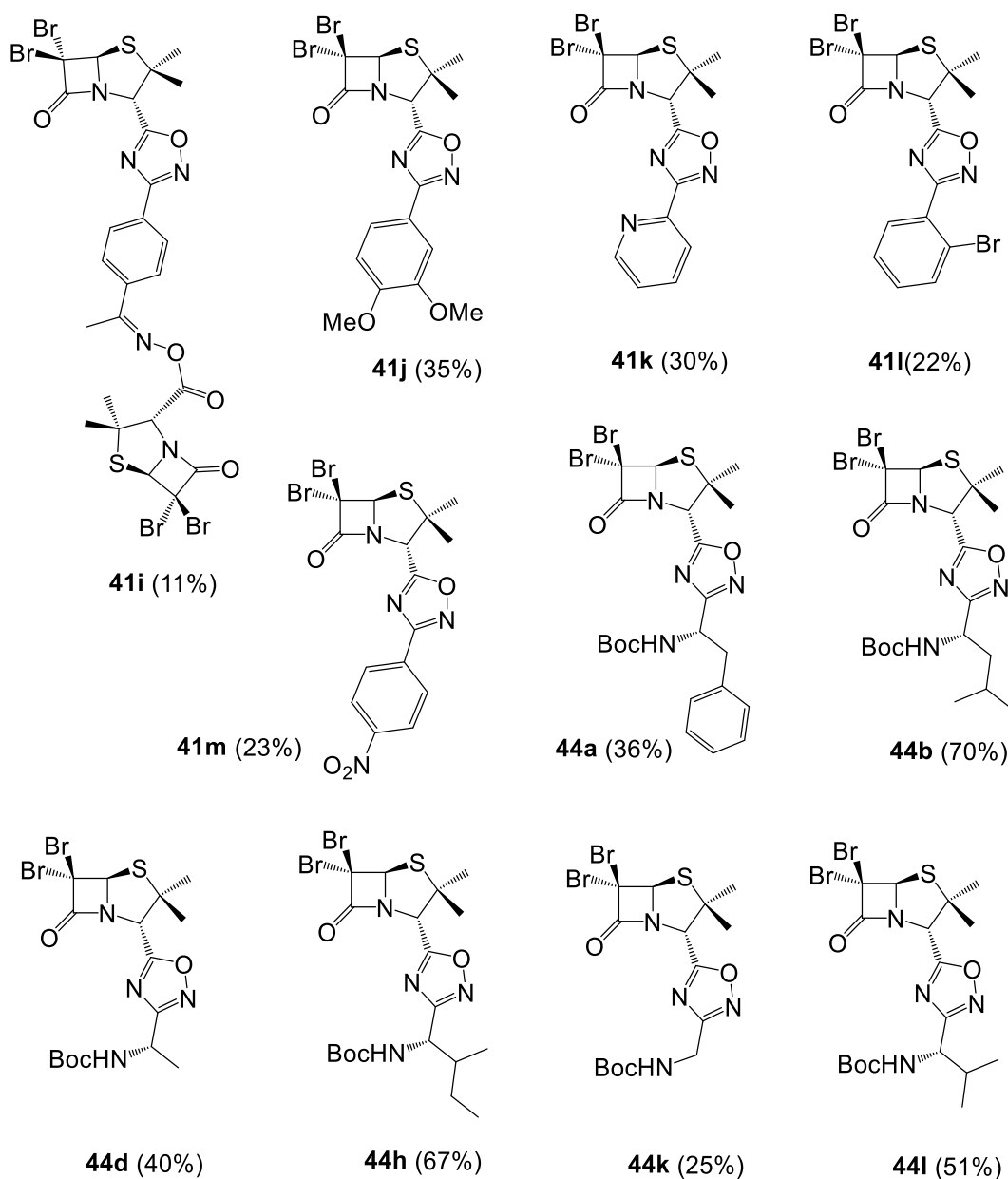


Figura 67: Quimioteca de 1,2,4-oxadiazoles.

Se determinó la actividad antiproliferativa in vitro de 29 compuestos híbridos oxazólicos (1,2,4 y 1,3,4-disustituídos) en dos líneas tumorales murinas: B16-F0 (melanoma) y LM3 (adenocarcinoma de mama). Para evaluar la selectividad frente a células tumorales, también se determinó el efecto citotóxico frente a la línea NMuMG no tumoral (epitelio mamario murino normal). De todos los compuestos híbridos probados, los más activos fueron la diacilhidrazida **35a** contra la línea B16-F0, y los oxadiazoles **44b**, **44h** y **36b**, contra ambas líneas tumorales, B16-F0 y LM3. (Figura 68).

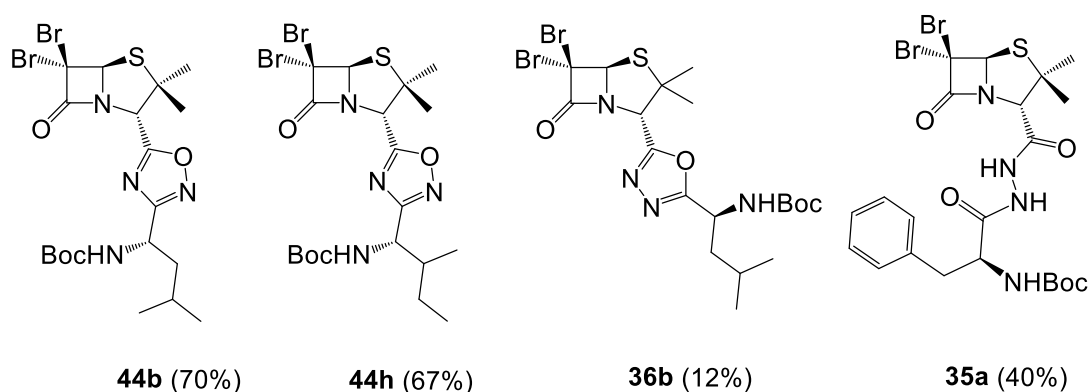


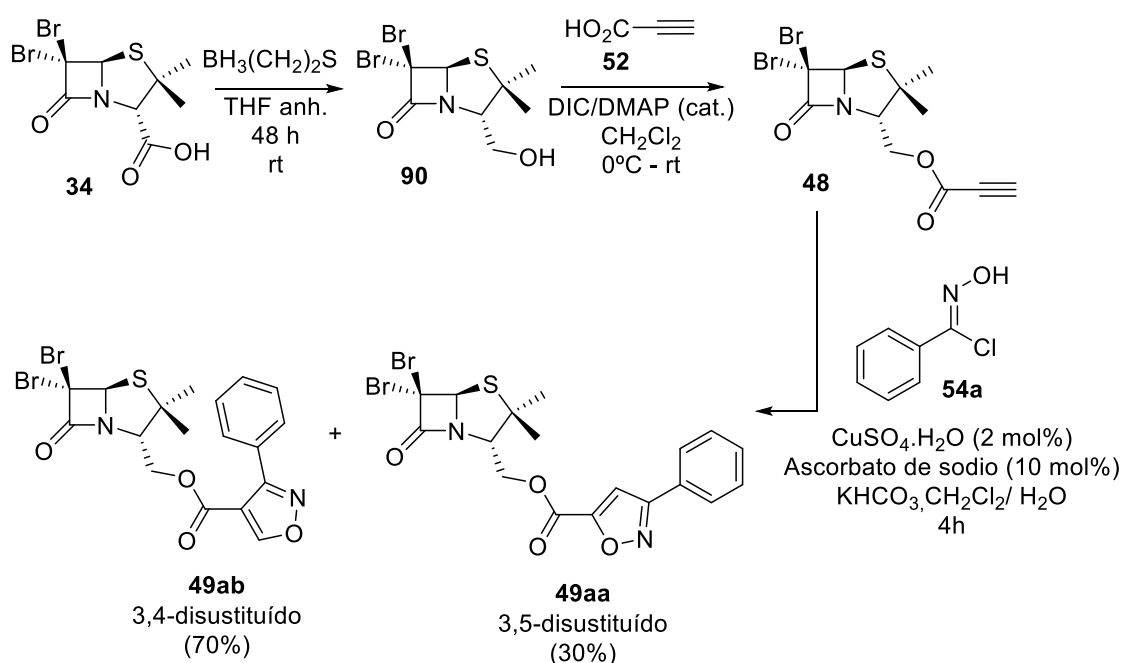
Figura 68: Compuestos que resultaron más activos contra las líneas celulares tumorales ensayadas

Se descubrió que la hidrazida **35a** era 3,75 veces más activa contra las células B16-F0 que contra NMuMG, mientras que los derivados de 1,3,4-oxadiazol **44b** y **44i** tenían entre tres y cuatro veces más potencia contra las células tumorales. Debido a los interesantes niveles de selectividad, estos compuestos pueden considerarse estructuras prometedoras para encontrar los mejores candidatos para desarrollar nuevos agentes antitumorales quimioterapéuticos. Mayor cantidad de estudios sobre el mecanismo de la muerte celular o sobre la cascada de eventos moleculares que conducen a la muerte celular podrían proporcionar más información sobre estos resultados alentadores.

En una cuarta y última etapa, iniciamos un estudio de síntesis de compuestos híbridos 1,2,4-oxadiazólicos en fase sólida que nos permitieron mejorar nuestro conocimiento sobre este tipo de síntesis, pero la implementación total de la secuencia todavía requiere más estudios. Debido al tiempo que se necesitaría invertir para concluirlo, decidimos postergar este trabajo con el objetivo que la información acumulada pueda ser usada en el futuro para completar la secuencia sintética.

Finalmente, teniendo en cuenta la importancia de las penicilinas en la Química Medicinal, decidimos generar híbridos con un anillo isoxazólico que, por otro lado, muestra un amplio espectro de efectos biológicos con algunas propiedades fisicoquímicas interesantes y distintivas. Para lograr este objetivo, se sintetizó un derivado penicilánico con un grupo alquino (**48**) como sustrato para la cicloadición 1,3-dipolar con el cloruro de *N*-hidroxibencimidoílo (**54a**), el

cual se preparó en dos pasos a partir de benzaldehído. Para obtener el producto de cicloadición, la deshidrohalogenación promovida por una base generó *in situ* el correspondiente óxido de nitrilo que reaccionó con el alquino **48** bajo catálisis de Cu (I). El catalizador se preparó mediante la combinación de sulfato de cobre (II) y ascorbato de sodio como agente reductor. Sorprendentemente, se obtuvo una mezcla de los dos regiosómeros con el isómero 3,4-disustituido (**49ab**) en mayor proporción (70%), a pesar de ser, de acuerdo a la literatura, el que debía formarse en menor proporción. Este resultado está más de acuerdo con la cicloadición 3,4-selectiva catalizada por Ru (II) reportada por el grupo Fokin. (Esquema 108).



Esquema 108: Síntesis de penicilin-3,4-isoxazol y penicilin-3,5-isoxazol.

Como continuación de este trabajo de tesis dirigido hacia el diseño y desarrollo de derivados heterocíclicos novedosos, desarrollamos una estrategia paralela de cicloadición de óxido de nitrilo en fase sólida para sintetizar una variedad de isoxazoles utilizando nuevamente la química de cicloadición 1,3-dipolar. (Figura 69).

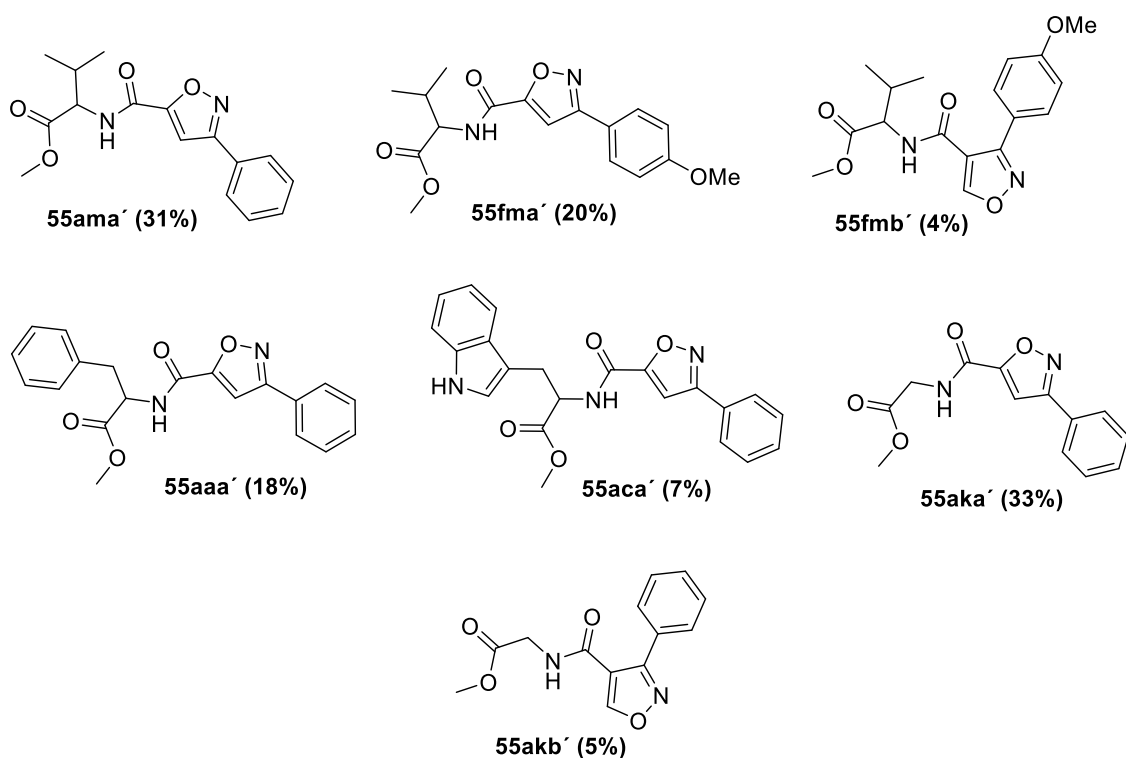


Figura 69: Quimioteca de aminoacil isoxazoles.

En definitiva, los resultados obtenidos representan una interesante contribución a la generación de compuestos híbridos de interés biológico. Mediante el desarrollo de procesos sintéticos desafiantes se logró generar una biblioteca de híbridos que contienen anillos oxadiazol e isoxazol. Algunos de ellos presentaron interesantes niveles de selectividad en estudios de actividad antiproliferativa, lo cual puede considerarse un punto de partida atractivo en la búsqueda de nuevos potenciales agentes antitumorales quimioterapéuticos.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Condiciones generales.

- Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno seco o de argón de alta pureza. Los solventes y reactivos se transfirieron con jeringa con presión de nitrógeno seco o argón de alta pureza.
- Las soluciones se evaporaron a presión reducida en evaporador rotatorio.
- Los restos de solventes fueron eliminados mediante una bomba de vacío (5 mm de Hg).
- Los criterios para determinar pureza en productos fueron:
 - ✓ la aparición de una única mancha en CCD al desarrollarlas en diversos sistemas de solventes.
 - ✓ presencia de los picos correspondientes a la estructura del compuesto en resonancia magnética nuclear de protones y de carbono (RMN de ^1H y RMN de ^{13}C).
 - ✓ En la asignación, la numeración de átomos fue arbitraria, con lo cual no necesariamente coincide con la correspondiente numeración IUPAC.

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. Las muestras de resinas se midieron como dispersiones en pastillas de KBr, realizadas por compresión de una mezcla finamente pulverizada en un mortero de ágata, cuya composición aproximada fue de 3 mg de muestra de resina en 100 mg de KBr.

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).

Los espectros de RMN utilizados para la caracterización incluyen:¹⁵⁹

1. Espectro totalmente desacoplado BB (*Broad Band*).

2. Espectros con intensificación sin distorsión por transferencia de polarizabilidad DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) que permiten diferenciar carbonos cuaternarios, metínicos, metilénicos y metílicos.
3. Correlación cuántica heteronuclear (HSQC): correlaciona dos tipos de núcleos (protones y carbonos) unidos entre sí.
4. Correlación cuántica heteronuclear múltiple (HMBC): correlaciona desplazamientos químicos de dos tipos de núcleos separados uno de otro por dos o más enlaces.
5. Espectros de correlación homonuclear entre protones (HH-COSY): nos permite conocer qué protones se encuentran acoplados entre sí desde J^2 hasta J^4 inclusive.

En la preparación de las muestras para RMN de ^{13}C fase gel se colocan 50-80 mg de resina en un tubo de RMN convencional y se agregan 0,5 mL de CDCl_3 lentamente con el fin de obtener un gel, el cual se homogeniza por sonicación. Los espectros fueron realizados acorde a la literatura.¹⁶⁰

Espectrometría de Masas: Los espectros de HRMS fueron realizados en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro Científico y Tecnológico Rosario o en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR) de la UBA, utilizando un espectrómetro de masas Bruker micrOTOF-Q II. La detección de iones se llevó a cabo por ionización por electrospray (ESI), modo positivo.

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 silica gel 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.

Las separaciones preparativas fueron llevadas a cabo mediante cromatografía líquida en columna utilizando sílica gel Merck 60 H (malla 230-400). La siembra fue sólida y las eluciones se realizaron con cantidades crecientes de AcOEt en hexano con ayuda de presión por aire comprimido.

5.3. Gases, reactivos y solventes

El $N_{2(g)}$ empleado fue secado por pasaje a través de ácido sulfúrico concentrado. El Ar se utilizó directamente el extraído del tubo.

A menos que se indique el procedimiento de preparación, los reactivos utilizados fueron obtenidos de fuentes comerciales y usados sin purificación adicional. La resina de Wang utilizadas fueron comerciales marca Sigma-Aldrich (USA).

Los solventes utilizados como eluyentes en técnicas cromatográficas (CCD o cromatografía en columna) fueron purificados por destilación. Los solventes empleados en las reacciones en atmósfera inerte fueron de calidad “Pro análisis” y se han secado y destilado antes de su uso según las técnicas habituales,¹⁶¹ tal como se describe a continuación para los solventes más relevantes, o bien a través del equipo de purificación de solventes MBraun MB-SPS mediante columnas rellenas de alúmina activada Innovative Technology, Modelo PS-400-7 (sistema adaptado para metanol, tetrahidrofurano, diclorometano y éter etílico).

Diclorometano: secado sobre CaH_2 y luego destilado sobre el mismo bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas herméticas sobre tamices moleculares de 3 Å.

N,N-dimetilformamida: secada sobre BaO, destilada a presión reducida y almacenada en botellas herméticas sobre tamices moleculares de 3 Å.

Trietilamina: destilada sobre CaH_2 bajo atmósfera inerte.

Tetrahidrofurano: destilado sobre Na° con benzofenona como indicador y almacenado en botellas herméticas sobre tamices moleculares de 3 Å.

Tolueno: destilado sobre Na° con benzofenona como indicador y almacenado en botellas herméticas sobre tamices moleculares de 3 Å

Acetonitrilo: secado sobre CaCl₂ y luego destilado sobre el mismo bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas herméticas sobre tamices moleculares de 3 Å.

5.4. Metodología general para el desarrollo de la síntesis en fase sólida.

Las reacciones en fase sólida realizadas a 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 Whatman) o utilizando un kitasato del tamaño adecuado, lavando con los solventes indicados en cada caso.

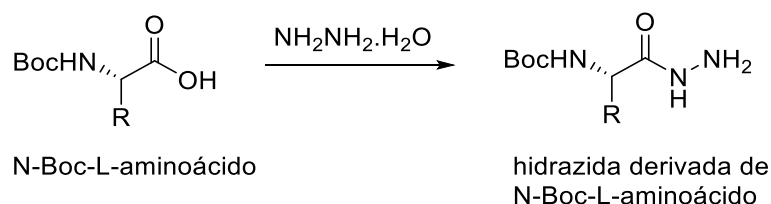
La carga teórica de la resina se determinó asumiendo la completa conversión del sustrato unido a la resina, y calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:¹⁶²

$$\text{Carga teórica} = \frac{\text{Carga de la resina de partida}}{1 + \left(\frac{\text{carga de la resina de partida} \cdot \text{masa ganda o perdida}}{1000} \right)}$$

5.5. Procedimientos generales y datos analíticos

5.5.1. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,3,4-oxadiazólico.

5.5.1.1. Procedimientos generales para la síntesis de hidrazidas



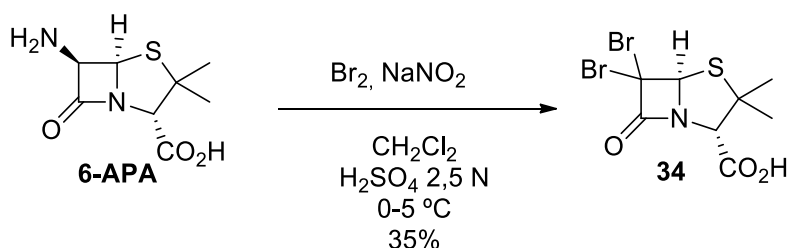
5.5.1.1.1. Método A para la síntesis de hidrazidas.

Se agrega lentamente CDI (1,1 eq.) a una solución del *N*-Boc-(L)-aminoácido (1 eq.) en 5 ml THF anhidro. Luego, la solución se agita durante 50 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega hidrazina monohidrato (11 eq.) y la solución resultante se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotatorio. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente y una mezcla de Hexano:AcOEt como solvente de elusión.

5.4.1.1.2. Método B para la síntesis de hidrazidas.

Se agrega lentamente DIC (1,1 eq.) a una solución del *N*-Boc-(L)-aminoácido (1 eq.) en 5 ml THF anhidro. Luego, la solución se agita durante 50 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega hidrazina monohidrato (11 eq.) y la solución resultante se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotatorio. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente y una mezcla de Hexano:AcOEt como solvente de elusión.

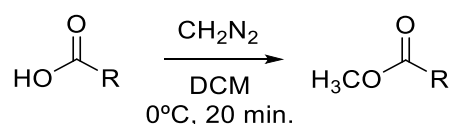
5.5.1.2. Procedimiento para la síntesis del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**)



En un baño de hielo se coloca un balón con 55,5 mL de DCM. Luego, se agrega lento y secuencialmente bromo líquido (13,3 mg, 83,3 mmol) y 22,2 mL de solución acuosa de H_2SO_4 2,5N y 3,83 g de NaNO_3 . La mezcla se agita hasta homogeneizar. Se agrega cuidadosamente 6-APA (6 g, 27,7 mmol) y se mantiene la temperatura entre 4 y 10°C. Se continúa agitando por 35 minutos y

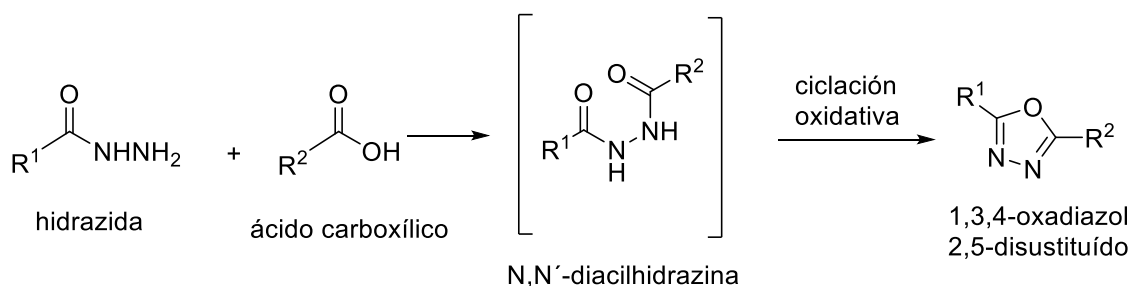
luego se agrega gota a gota una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta notar la desaparición de la coloración debida al bromo. En ampolla de decantación, se separa la fase orgánica de la acuosa, y se extrae con DCM. Se recolectan las fases orgánicas, se lavan con solución saturada de cloruro de sodio (*brine*) y finalmente se seca con Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido se recrystaliza disolviéndolo en agua destilada a 100°C (75 mL de agua por cada gramo de residuo obtenido). Se continúa calentando la solución durante unos minutos y posteriormente se filtra utilizando embudo y algodón. Las aguas madres se conservan en heladera hasta la formación de los cristales, los cuales se filtran con vacío.

5.5.1.3. Procedimiento general para la esterificación de ácidos con diazometano.



En una campana de extracción, el ácido se disuelve en DCM (3 mL) o Et_2O (3mL) y se lleva a 0°C con baño de hielo. Seguidamente se adiciona bajo agitación magnética, una solución de diazometano en éter 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.

5.5.1.4. Procedimiento general para la síntesis de 1,3,4-oxadiazoles.

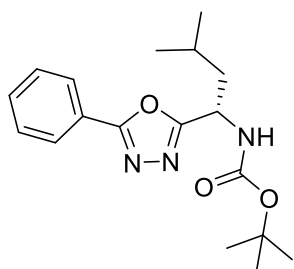


A una solución del ácido carboxílico (1 eq.) en DCM a 0°C se agrega CDI (1eq.). Después de 30 minutos se incorpora la hidrazida (1eq.). El proceso de acoplamiento se lleva a cabo durante 45 minutos a 0°C . Luego, CBr_4 (2eq.) y

PPh_3 (2eq.) se agregan en una sola porción. El paso de ciclodeshidratación se realiza a 0°C durante 2 horas. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente y una mezcla de Hexano:AcOEt como solvente de elusión.

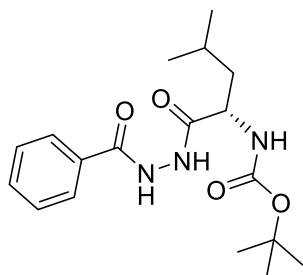
5.5.1.5. Caracterización de 1,3,4-oxadiazoles.

tert-Butil (S)-(3-metil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il) butil) carbamato (33b1):



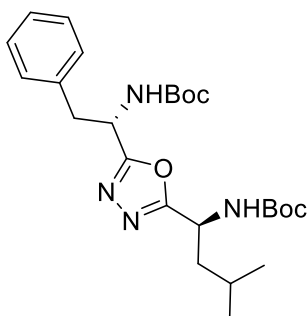
Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.1.4., utilizando ácido benzoico (**6II-1**) (0,40 mmol), CDI (0,40 mmol, 63,86 mg), CBr_4 (0,80 mmol, 265 mg), PPh_3 (0,80 mmol, 211 mg), hidrazida **31b** (0,40 mmol, 98 mg) en 5 mL de DCM. Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 10% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **33b1**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.98 (d, $J=6.21$ Hz, 3H), 1.00 (d, $J=6.21$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.70-1.86 (m, 3H), 5.02-5.08 (m, 1H), 5.09-5.20 (m, 1H, NH), 7.46-7.57 (m, 5H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 22.00, 22.60, 24.68, 28.27, 43.01, 45.74, 80.38, 123.77, 126.91, 129.01, 131.74, 154.96, 164.85, 167.19. HRMS (ESI) m/z encontrado: 354,17875 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 354,17881.

tert-butil (S) (1-(2-benzoilhidrazinil)-4-metil-1-oxopentan-2-il) carbamato (32b1):



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un 40% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **32b1**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.89 (d, $J=4.50$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J=4.50$ Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.60-1.71 (m, 3H), 4.42-4.53 (m, 1H), 5.46 (d, $J=8.37$, 1H), 7.32-7.55 (m, 3H), 7.81-7.84 (m, 2H), 9.73 (sa, 1H, NH), 9.98 (sa, 1H, NH). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 21.80, 22.94, 24.66, 28.30, 41.46, 51.63, 80.71, 127.53, 128.33, 128.50, 129.79, 130.09, 131.50, 132.17, 133.30, 155.88, 164.71, 170.02, 170.69.

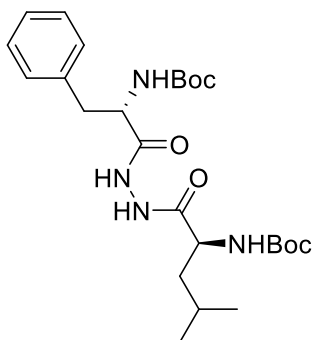
tert-butil ((S)-1-(5-((S)-1-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-feniletil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-3-metilbutil) carbamato (33ba):



Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.1.4, utilizando *N*-Boc-(L)-fenilalanina (**30a**) (0,41 mmol, 108 mg), CDI (0,40 mmol, 63,86 mg), CBr₄ (0,78 mmol, 265 mg), PPh₃ (0,80 mmol, 211 mg), hidrazida **31b** (0,40 mmol, 98 mg) en 5 mL de DCM. Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se

obtuvo el producto deseado con un 15% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **33ba**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0.93 (d, *J*=6.20 Hz, 3H), 0.95 (d, *J*=6.20 Hz, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.55-1.70 (m, 3H), 3.21 (m, 2H), 4.85-5.07 (m, 2H), 5.08-5.32 (m, 2H), 7.04-7.10 (m, 2H), 7.20-7.29 (m, 3H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 21.95, 22.52, 24.57, 28.22, 40.00, 42.82, 45.55, 48.40, 80.45, 127.21, 128.65, 129.31, 135.25, 154.75, 154.86, 166.26, 167.45. HRMS (ESI) *m/z* encontrado: 475,29273 (*M*+*H*⁺), calculado para C₂₅H₃₉N₄O₅: 475,29150

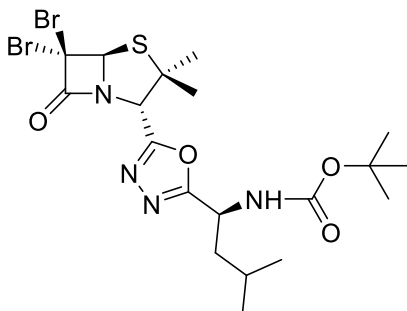
tert-butyl ((S)-1-(2-((tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl) hydrazinyl)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl) carbamate (32ba):



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un 33% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **32ba**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0.93 (d, *J*=2.10 Hz, 3H), 0.95 (d, *J*=2.10 Hz, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.59-1.76 (m, 3H), 2.97-3.19 (m, 2H), 4.48-4.64 (m, 1H), 4.80-4.84 (m, 1H), 5.74-5.79 (m, 2H, NH, NH),

7.21 (m, 5H), 10.01-10.10 (m, 2H, NH, NH).

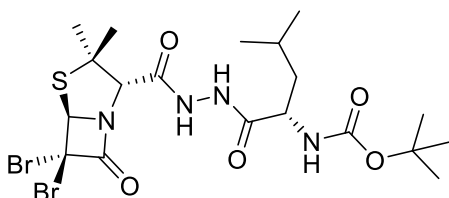
tert-Butil ((1S)-1-(5-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabibiclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-3-metilbutil) carbamato (36b)



Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.1.4, utilizando el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (0,33 mmol, 117 mg), CDI (0,33 mmol, 48 mg), CBr₄ (0,66 mmol, 219 mg), PPh₃ (0,66 mmol, 173 mg), *N*-Boc-(L)-Leu-hidrazida (**31b**) (0,33 mmol, 81 mg) en 5 mL de DCM. Luego de purificación por columna

cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 12% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **36b**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0.96 (d, J=6.24 Hz, 3H), 0.98 (d, J=6.24 Hz, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.55-1.83 (m, 3 H), 1.65 (s, 3H), 4.87-4.98 (m, 1H), 4.99-5.08 (m, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.88 (s, 1H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 21.97, 22.48, 24.68, 25.58, 28.26, 33.10, 42.36, 45.66, 58.59, 63.87, 65.41, 80.61, 154.79, 161.27, 164.28, 168.14.

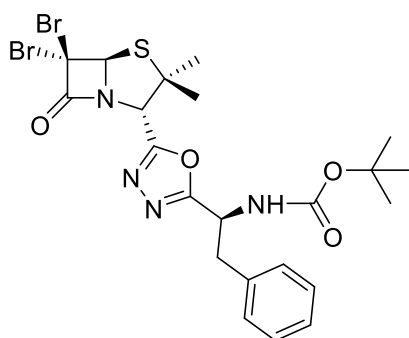
tert-butyl ((S)-1-(2-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carbonil)hidrazinil)-4-metil-1-oxopentan-2-yl) carbamato (35b).



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un 70% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **35b**

:RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0.91 (d, J=6.65 Hz, 3H), 0.93 (d, J= 6.6 Hz, 3H), 1.41 (s, 9 H), 1.50 (s, 3H), 1.56-1.77 (m, 6 H), 4.34-4.45 (m, 1H), 4.83 (s, 1H), 5.55 (d, J=8.02 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 9.80 (sa, 1H), 10.08 (sa, 1H).

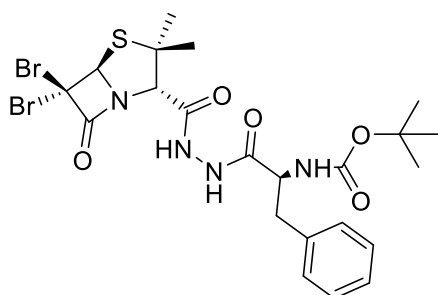
tert-butyl ((S)-1-(5-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-2-pheniletil)carbamato (36a).



Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.1.4, utilizando el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (0,53 mmol, 193 mg), CDI (0,53 mmol, 84 mg), CBr₄ (1,06 mmol, 339 mg), PPh₃ (1,06 mmol, 269 mg), *N*-Boc-(L)-Phe-hidrazida (**31a**) (0,53 mmol, 150 mg) en 5 mL de DCM. Luego de purificación por columna

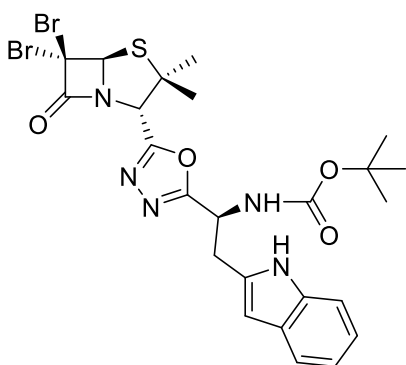
cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 15% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **36a**: RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ (ppm): 1.22 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.74 (s, 3H), 3.34-3.37 (m, 2H), 5.19-5.27 (m, 1H), 5.60 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 6.83-6.86 (m, 1H), 7.26-7.33 (m, 5H). RMN de ¹³C (acetona-d₆, 75 MHz) δ (ppm): 24.32, 27.34, 31.93, 48.55, 58.43, 63.34, 65.10, 78.65, 80.04, 126.60, 128.14, 129.04, 136.38, 154.79, 161.12, 164.03, 167.25. HRMS (ESI) m/z encontrado: 601,01030 (M+H⁺), calculado para C₂₂H₂₇Br₂N₄O₄S: 601,01143.

tert-Butil((2S)-1-(2-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-carbonil) hidrazinil)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il) carbamato (35a).



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un 40% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **35a**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 1.33 (s, 9H), 1.48 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.93-3.16 (m, 2H), 4.66-4.68 (m, 1H), 4.84 (s, 1H), 5.66 (d, J = 7.72 Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 7.17-7.24 (m, 5H), 9.93 (sa, 1H, NH), 10.15 (sa, 1H, NH).

tert-Butil((1S)-1-(5-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-2-(1H-indol-2-il)etil)carbamate (36c).

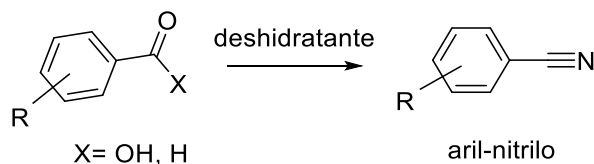


Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.1.4, utilizando el ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (0,47 mmol, 170 mg), CDI (0,53 mmol, 75 mg), CBr₄ (0,94 mmol, 312,5 mg), PPh₃ (0,94 mmol, 246,5 mg), *N*-Boc-(L)-Trp-hidrazida (**31c**) (0,47 mmol, 150 mg) en 5 mL de DCM. Luego de purificación por columna

cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 12% de rendimiento como sólido blanco. Caracterización de **36c**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 1.01 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.60 (s, 3H), 3.34-3.48 (m, 2H), 5.16 (s, 1H), 5.27-5.36 (m, 2H), 5.69 (s, 1H), 6.97-7.50 (m, 5H), 8.15 (s, 1H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 25.27, 28.24, 32.94, 48.14, 58.61, 63.79, 65.22, 67.07, 80.38, 80.67, 111.37, 118.30, 119.81, 120.04, 122.54, 123.10, 127.21, 136.08, 155.02, 161.18, 164.27, 167.74.

5.5.2. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo 1,2,4-oxadiazólico.

5.5.2.1. Procedimientos generales para la síntesis de aril-nitrilos.



5.5.2.1.1. Método A para la síntesis de aril-nitrilos.

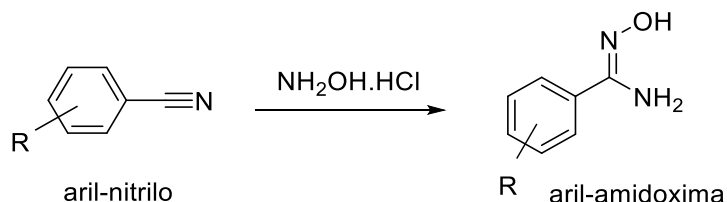
A una solución del aril-aldehído (1 eq.) y azida de sodio (1,5 eq.) en MeCN, se incorpora ácido triflico (9 eq.) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 min (controlado por CCD). Después de la remoción del disolvente a presión reducida, el residuo se extrae con AcOEt y el extracto orgánico se lava con agua, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se purifica mediante cromatografía en columna utilizando gradiente de polaridad hexano:AcOEt.

5.5.2.1.2. Método B para la síntesis de aril-nitrilos.

A una solución agitada del ácido aril carboxílico (1eq.) en MeCN a temperatura ambiente se agrega gota a gota 20 eq. de H₂SO₄ concentrado. Luego la mezcla se agita a 95°C durante 8 horas. El exceso de MeCN es luego evaporado y el crudo de reacción se disuelve en DCM y agua (1:1). Se separan

las capas en ampolla de decantación y se extrae la capa acuosa con DCM. Se juntan las capas orgánicas y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Se evapora el solvente a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna utilizando gradiente de polaridad hexano:AcOEt.

5.5.2.2. Procedimientos generales para la síntesis de aril-amidoximas.



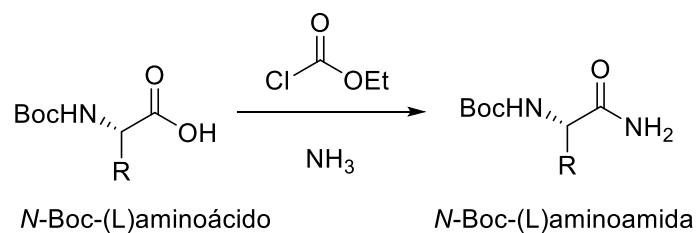
5.5.2.2.1. Método A para la síntesis de aril-amidoximas.

A una solución acuosa de clorhidrato de hidroxilamina (1 eq.) se agrega, Na_2CO_3 (1eq.), seguido de la adición del aril-nitrilo (1 eq.) en etanol a temperatura ambiente, (agua-etanol, 1:1). La mezcla de reacción se irradia con una sonda de ultrasonido durante 40 minutos a una temperatura de 50°C (la reacción se controla mediante CCD). Con la concentración por evaporación rotatoria a presión reducida se obtiene un aceite incoloro que se disuelve en DCM, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El producto se recrystaliza usando cloroformo-hexano para obtener las aril-amidoximas puras.

5.5.2.2.2. Método B para la síntesis de aril-amidoximas.

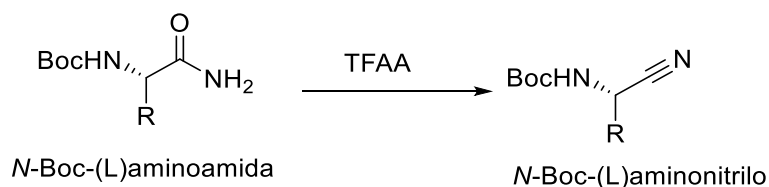
A una solución acuosa de clorhidrato de hidroxilamina (1 eq.) se agrega clorhidrato de hidroxilamina (1 eq.), Na_2CO_3 (1eq.), seguido de la adición del aril-nitrilo (1 eq.) en etanol a temperatura ambiente, (agua-etanol, 1:1). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. La concentración por evaporación rotatoria a presión reducida da un aceite incoloro que se disolvió en DCM, se seca sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se elimina a presión reducida. El producto se recrystaliza usando cloroformo-hexano para obtener las aril-amidoximas puras.

5.5.2.3. Procedimientos generales para la síntesis de amidas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.



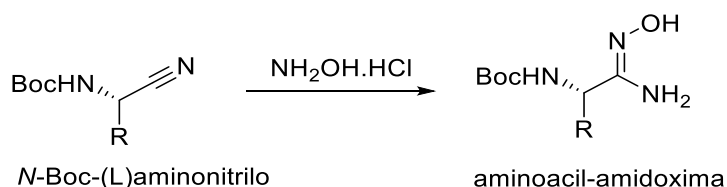
Una solución del *N*-Boc-(L)-aminoácido (1 eq.) y Et₃N (1,1 eq.) en THF es enfriada a -15°C (baño de hielo-sal) bajo atmósfera de N₂. Se agrega gota a gota una solución de cloroformiato de etilo (1,1 eq.) en THF. Se agita durante 25 minutos a -15°C, luego se agrega una solución acuosa de NH₃ al 25% (5 eq.) en una sola porción y se continúa agitando a 0°C durante 3 horas. Se evapora el solvente a presión reducida y se ajusta el pH a 2-3 con una solución 1N de KHSO₄. La fase acuosa se extrae con AcOEt (2 veces) y las fases acuosas combinadas se lavan con solución 1 N de NaHCO₃, agua y solución saturada de cloruro de sodio. Se separa nuevamente la fase orgánica y se seca sobre Na₂SO₄. No se requiere purificación por cromatografía en columna cromatográfica.

5.5.2.4. Procedimiento general para la síntesis de nitrilos derivados de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.



Bajo atmósfera de N₂, una solución de la amida deriva del *N*-Boc-L-aminoácido (1eq.) en piridina es enfriada a 0°C con baño de hielo y se le agrega gota a gota anhídrido trifluoroacético (1,4 eq.). Se agita durante 2,5 horas a 0°C. Finalmente se evapora el solvente en rotavapor. El residuo se disuelve en AcOEt y se lava con 1N de KHSO₄, agua, solución saturada de cloruro de sodio y secado sobre Na₂SO₄. El crudo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.5. Procedimientos generales para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.



5.5.2.5.1. Método A para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.

A una solución clorohidrato de hidroxilamina (2,5 eq.) en etanol-agua (1:1) en baño de hielo, se agrega lenta y cuidadosamente NaOH (1M, 2,5 eq.), la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el *N*-Boc-(L)-aminonitrilo (1 eq.) y la reacción se deja agitando toda la noche a temperatura ambiente. Se evapora el solvente a presión reducida y se realiza extracción en ampolla de decantación con AcOEt. Las fases orgánicas recolectadas se secan sobre Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía en columna usando hexano-AcOEt como eluyente.

5.5.2.5.2. Método B para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.

A una solución clorohidrato de hidroxilamina (2,5 eq.) en etanol-agua (1:1) en baño de hielo, se agrega lenta y cuidadosamente NaOH (1M, 2,5 eq.), la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el *N*-Boc-(L)-aminonitrilo (1 eq.) y la reacción se deja agitando 1 hora a 100°C. Se evapora el solvente a presión reducida y se realiza extracción en ampolla de decantación con AcOEt. Las fases orgánicas recolectadas se secan sobre Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.5.3. Método C para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.

A una solución clorohidrato de hidroxilamina (2,5 eq.) en metanol-agua (1:1) en baño de hielo, se agrega lenta y cuidadosamente KO^tBu (1M, 2,5 eq.), la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el *N*-Boc-(L)-aminonitrilo (1 eq.) y la reacción se deja agitando 1 hora a 100°C. Se evapora el solvente a presión reducida y se realiza extracción en ampolla de decantación con AcOEt. Las fases orgánicas recolectadas se secan

sobre Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.5.4. Método D para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.

A una solución clorohidrato de hidroxilamina (2,5 eq.) en metanol-agua (1:1) en baño de hielo, se agrega lenta y cuidadosamente KO^tBu (1M, 2,5 eq.), la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el *N*-Boc-(L)-aminonitrilo (1 eq.) y la reacción se deja agitando toda la noche a temperatura ambiente. Se evapora el solvente a presión reducida y se realiza extracción en ampolla de decantación con AcOEt. Las fases orgánicas recolectadas se secan sobre Na₂SO₄. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.4.2.5.5. Método E para la síntesis de amidoximas derivadas de *N*-Boc-(L)-aminoácidos.

Se disuelven 10 eq. de clorohidrato de hidroxilamina en DMSO anhidro y se enfría la solución a 0°C en baño de hielo. Luego se agrega KO^tBu (2,5 eq.) bajo atmósfera de N₂. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se agrega el *N*-Boc-(L)-aminonitrilo (1 eq.) disuelto en DMSO y se agita toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se vuelve sobre hielo-agua y se espera a que precipite, se filtra y el precipitado se recrystaliza con mínima cantidad de etanol.

5.5.2.6. Procedimiento general para la formación de cloruros de ácido.

Una solución del ácido carboxílico (1 eq.) y trietilamina (2 eq.) en THF se enfría entre -20 y -30 °C, se agrega gota a gota cloruro de oxalilo (1 eq.) y la reacción se agita a esa temperatura durante 30 minutos. Finalmente, la mezcla se filtra y el filtrado se utiliza inmediatamente en el siguiente paso de síntesis.

5.5.2.7. Procedimiento general para la síntesis de la amida derivada del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**57**).

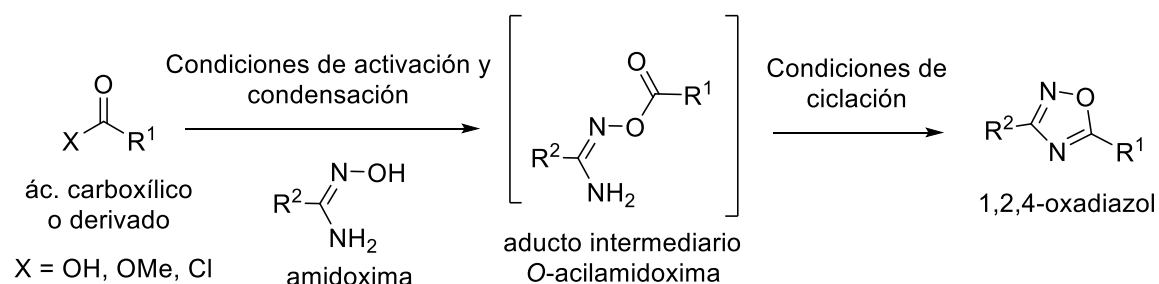
Una solución del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (1,20 g, 3,34 mmol) se disuelve en cloroformo anhidro (15 mL) junto a Et₃N (1 eq., 3,34 mmol) para generar la sal de amonio correspondiente. La mezcla se enfría a 0°C y tratada

con cloroformiato de etilo (1,1 eq., 3,67 mmol) y se deja agitando durante 30 minutos. Posteriormente, se agrega una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ al 15% (33,5 mL) y se deja agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Pasado el tiempo se deja separar las capas y se agrega solución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ al 15% (8 mL). Se separa la fase orgánica, se la seca con Na_2SO_4 anh., se evapora el solvente en rotavapor y el residuo (sólido amarillo) se recrystaliza con cloroformo:hexano.

5.5.2.8. Procedimiento general para la síntesis del ciano derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**61**).

Se agrega cloruro de oxalilo (0,24 mL, 2,76 mmol) a una solución de DMF (0,23 mL) en MeCN anhidro (3,53 mL) a 0°C. De inmediato se genera un precipitado blanco acompañado de la formación de gas. A continuación, se agrega una solución de la amida **57** en MeCN anhidro. Cuando la mezcla se torna homogénea se agrega piridina (0,46 mL) y la reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se evapora el solvente y el residuo oleoso se purifica por cromatografía en columna hexano:AcOEt (80:20) para dar un sólido blanco.

5.5.2.9. Procedimientos generales para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.



5.5.2.9.1. Método A para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

El ácido carboxílico (1eq.) disuelto en DMF anhidra se activa con CDI (1,1 eq.) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se incorpora la amidoxima (1eq.) y la O-acilación transcurre durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lleva a cabo la ciclodeshidratación agregando de nuevo CDI (1,1 eq.) y llevando el sistema a 115°C durante 6 horas. El crudo de reacción se concentra en rotavapor y se

purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.2. Método B para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

El ácido carboxílico (1eq.) disuelto en DMF anhidra se activa con HATU (1 eq.), HOBt (0,2 eq.), DIPEA (5 eq.) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se agrega la amidoxima (1eq.) y la mezcla se deja 1 hora a temperatura ambiente mientras transcurre la *O*-acilación. Finalmente, se lleva el sistema a 115°C durante 2 horas. El crudo de reacción se concentra en rotavapor y se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.3. Método C para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

El ácido carboxílico (1eq.) disuelto en DCM anhidro se activa con HATU (1 eq.), HOBt (0,2 eq.), DIPEA (5 eq.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agrega la amidoxima (1eq.) y la mezcla se deja 1 hora a temperatura ambiente mientras transcurre la *O*-acilación. Finalmente, se agrega tolueno anhidro y se lleva el sistema a reflujo toda la noche. El crudo de reacción se concentra en rotavapor y se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.4. Método D para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

Se trata la amidoxima (1 eq.) con el ácido carboxílico (1 eq.) en presencia de EDC (1eq.) en diglima a 50°C bajo atmósfera de N₂ y la mezcla se deja agitando durante toda la noche a la misma temperatura. Luego, se calienta el sistema a 110°C durante 3 horas. Después de eliminar el solvente al vacío, el residuo orgánico se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.5. Método E para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

A una solución del éster metílico derivado del ácido carboxílico empleado (1eq.) en tolueno anhidro se añade la amidoxima (2eq.) seguido del agregado de K₂CO₃ (2 eq.). La mezcla se agita durante toda la noche a reflujo. Finalmente, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se diluye con AcOEt y se realizan sucesivos lavados con agua y solución satura de cloruro de sodio. Se

separan las fases en ampolla de decantación y las fases orgánicas se secan sobre Na₂SO₄. Se filtra y concentra en rotavapor y crudo es purificado en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.6. Método F para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

Se disuelven la amidoxima (1 eq.) y el ácido carboxílico (1 eq.) en diglima en presencia de los reactivos de acoplamiento HATU (1 eq.) y HOBt (0,2 eq.) y DIPEA (5 eq.). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno, durante la noche. Luego se transfiere la mezcla a un recipiente para reacciones en microondas y se la irradia a 300 W a 70°C durante 10 minutos. Después de eliminar el solvente al vacío, el residuo orgánico se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

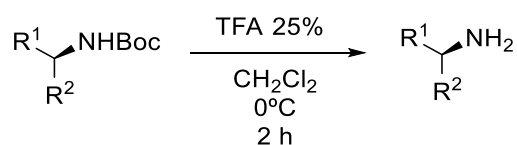
5.5.2.9.7. Método G para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

El ácido carboxílico (1eq.) disuelto en MeCN anhidro se activa con EDC (1,15 eq.) y HOBt (1,2 eq.), durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agrega la amidoxima (1eq.). Luego se incorpora una trampa de Dean Stark con tamices moleculares activados y un sistema de refrigeración. Por último, se agrega tolueno anhidro y se lleva el sistema a reflujo durante 3-4 horas. El crudo de reacción se concentra en rotavapor y se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.9.8. Método H para la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles.

Se disuelve la amidoxima (1 eq.) en CHCl₃, luego se agrega cloruro de ácido (1 eq.) y piridina (CHCl₃: piridina 1:1). La mezcla se calienta a reflujo durante 5 horas. El crudo de reacción se concentra a presión reducida en rotavapor y se purifica en cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano-AcOEt.

5.5.2.10. Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Boc.



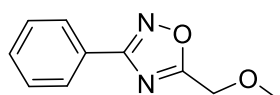
Una solución de la *N*-Boc amina en DCM se enfría a 0°C con baño de hielo y se agrega lenta y cuidadosamente TFA 25%. La reacción se agita a esa temperatura durante 2 horas o hasta ver desaparición del material de partida por CCD. Posteriormente, se elimina el exceso de TFA en campana por arrastre de N₂ gaseoso y se evapora el solvente a presión reducida en rotavapor. Finalmente, el residuo orgánico se seca en bomba de vacío.

5.5.2.11. Procedimiento general para la formación de derivados dipeptídicos **44ba** y **44fc**.

Una solución en del aminoácido *N*-protegido (1eq.), EDC (1,5 eq.), HOBT (1,5 eq.) y Et₃N (2,5 eq.) en DCM es enfriada a 0°C. Luego, se agrega el derivado 1,2,4-oxadiazólico con el grupo amino libre y la mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se evapora el solvente a presión reducida en rotavapor y el residuo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano:AcOEt.

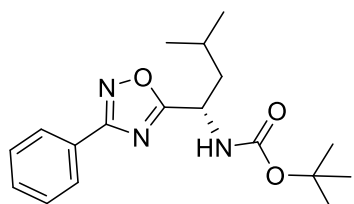
5.5.2.12. Caracterización de 1,2,4-oxadiazoles.

5-(Metoximetil)-3-fenil-1,2,4-oxadiazol (**17a1**)



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.8. (método H) utilizando la amidoxima **15a** (50 mg, 0.367 mmol), cloruro metoxiacético (**6II-1**) (0, 367 mmol, 33,3 µL), CHCl₃ (1 mL) y piridina (1 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (80/20,hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 51% de rendimiento. Caracterización de **17a1**: RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 3.55 (s, 3H), 4.74 (s, 3H), 7.45-7.50 (m, 3H), 8.08-8.11 (m, 2H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 59.57, 65.12, 126.41, 127.47, 128.82, 131.28, 168.36, 175.85.

tert-Butil (*S*)-(3-metil-1-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butil)carbamato (**39ab**)



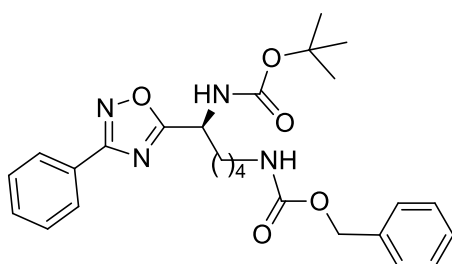
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Leu-OH (**30b**) (70 mg, 0,30 mmol), HATU (115,07 mg, 0,30 mmol), HOBT (8,16 mg, 0,06 mmol), DIPEA (0,26 mL, 1,51 mmol) y amidoxima **15a** (41,11 mg, 0,30 mmol), DMF (5 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30,hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado

con un 75% de rendimiento. Caracterización de **39ab**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.97 (d, $J = 6.22$ Hz, 3H), 0.99 (d, $J = 6.22$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.65-1.84 (m, 3H), 4.94-5.28 (m, 2H), 7.44-7.49 (m, 3H), 8.05-8.08 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 21.95, 22.53, 24.66, 28.25, 43.23, 46.79, 80.41, 126.63, 127.48, 128.79, 131.20, 154.96, 168.26, 180.01.

***tert*-Butil (S)-(1-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)etil)carbamato (39af).**

Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Ala-OH (**30f**) (200 mg, 1,057 mmol), HATU (401,90 mg, 1,057 mmol), HOBT (28,6 mg, 0,21 mmol), DIPEA (0,91 mL, 5,28 mmol) y amidoxima **15a** (143,9 mg, 1,057 mmol), DMF (10 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 30% de rendimiento. Caracterización de **39af**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1.43 (s, 9H), 1.60 (d, $J = 7.05$ Hz, 3H), 5.07-5.23 (m, 1H), 5.26-5.47 (m, 1H), 7.40-7.50 (m, 3H), 8.03-8.06 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 19.86, 28.17, 44.16, 80.34, 126.48, 127.37, 128.72, 131.14, 154.74, 168.16, 180.04. HRMS (ESI) m/z encontrado: 312,1394 ($\text{M} + \text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 312,13186.

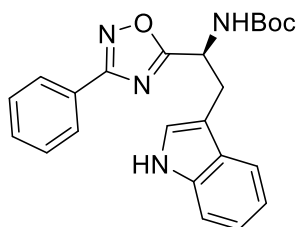
(S)-Bencil *tert*-butil (1-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)pentano-1,5-diil) dicarbamato (39ah).



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Lys(Cbz)-OH (**30h**) (110 mg, 0,30 mmol), HATU (114,83 mg, 0,30 mmol), HOBT (8,16 mg, 0,06 mmol), DIPEA (0,26 mL, 5,28 mmol) y amidoxima **15a** (41,11 mg, 0,30 mmol), DMF (10 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 68% de rendimiento. Caracterización de **39ah**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1.44 (s, 9H), 1.50-1.60 (m, 4H), 1.86-2.03 (m, 2H), 3.18-3.20 (m, 2H), 4.90-4.94 (m, 1H), 5.04-5.14 (m, 3H), 5.37-5.39 (m, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H), 7.42-7.50 (m, 3H), 8.05-8.08 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 22.34,

28.29, 29.35, 33.64, 40.43, 48.20, 66.67, 80.50, 126.56, 127.51, 128.09, 128.51, 128.84, 131.28, 136.55, 155.18, 156.56, 168.27, 179.49.

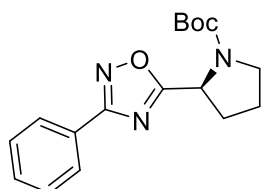
***tert*-Butil (S)-(2-(1*H*-indol-3-il)-1-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-yl)etil) carbamato (39ac)**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Trp-OH (**30c**) (70 mg, 0,23 mmol), HATU (87,87 mg, 0,23 mmol), HOBt (6,25 mg, 0,046 mmol), DIPEA (0,20 mL, 1,15 mmol) y amidoxima **15a** (31,46 mg, 0,23 mmol), DMF (10 mL). Luego de

purificación por columna cromatográfica (70/30,hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 25% de rendimiento. Caracterización de **39ac**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.45 (s, 9H), 3.49-3.50 (d, J = 3.98 Hz, 2H), 5.23-5.40 (m, 1H), 5.41-5.55 (m, 1H), 6.87 (sa, 1H), 7.07-7.19 (m, 2H), 7.25-7.32 (m, 1H), 7.46-7.54 (m, 4H), 8.04-8.04 (d, J = 6.24, 2H), 8.27 (sa, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 28.30, 49.47, 80.51, 109.20, 119.79, 122.29, 123.13, 126.60, 127.52, 128.86, 131.28, 136.14. 155.07, 168.28, 179.35.

***tert*-Butil (S)-2-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)pirrolidin-1-carboxilato (39ae).**

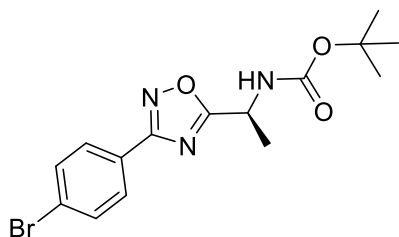


Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Pro-OH (**30e**) (74.38 mg, 0,30 mmol), HATU (114,83 mg, 0,30 mmol), HOBt (8,16 mg, 0,06 mmol), DIPEA (0,26 mL, 5,28 mmol) y amidoxima **15a** (41,11mg,

0,30 mmol), DMF (10 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30,hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 50% de rendimiento. Caracterización de **39ae** : RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.29 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.94-2.24 (m, 2H), 2.24-2.49 (m, 2H), 3.43-3.78 (m, 2H), 5.04-5.26 (m, H), 7.42-7.54 (m, 3H), 8.02-8.11 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 23.66, 24.30, 28.11, 31.46, 46.32, 53.78, 80.50, 126.68, 127.41, 128.70, 128.84, 131.02, 131.19, 153.56, 154.26, 168.32, 180.19, 180.62.

***tert*-Butil (S)-(1-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)etil)carbamato (39bf).**

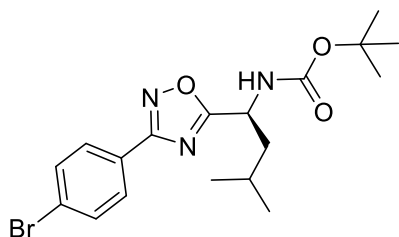
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-



Ala-OH (**30f**) (57,15 mg, 0,30 mmol), HATU (130 mg, 0,30 mmol), HOBt (10 mg, 0,06 mmol), DIPEA (0,30 mL, 1,51 mmol) y amidoxima **15b** (65 mg, 0,30 mmol), DMF (5 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30,hexano/AcOEt) se

obtuvo el producto deseado con un 58% de rendimiento. Caracterización de **39bf**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1.45 (s, 9H), 1.62 (d, J = 6.87 Hz, 3H), 5.15 (sa, 2H), 7.61 (d, J = 8.58 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.61 Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 20.03, 28.28, 44,28, 80.61, 125.55, 125.85, 128.98, 132.15, 154.74, 167.60, 180.34.

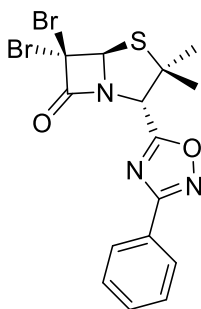
***tert*-Butil(S)-(1-(3-(4-bromofenil)1,2,4-oxadiazol-5-il)-3-metilbutil)carbamato (39bb)**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.2. (método B), utilizando *N*-Boc-(L)-Leu-OH (**30b**) (70 mg, 0,30 mmol), HATU (130 mg, 0,30 mmol), HOBt (10 mg, 0,06 mmol), DIPEA (0,30 mL, 1,51 mmol) y amidoxima **15b** (65 mg, 0,30 mmol), DMF

(5 mL). Luego de purificación por columna cromatográfica (70/30,hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 51% de rendimiento. Caracterización de **39bb**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.98 (d, J =6.22 Hz, 3H), 1.00 (d, J =6.22 Hz, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.71-1.77 (m, 3H), 4.77-5.12 (m, 2H), 7.60 (d, J = 8.58 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.55 Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 750 MHz) δ 20.91, 21.54, 21.96, 27.25, 42.16, 45.80, 79.51, 124.60, 124.64, 127.98, 131.10, 153.94, 166.57, 179.29.

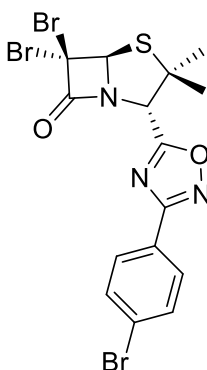
(2*S*,5*R*)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-2-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41a).



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (200 mg, 0,55 mmol), EDC (121,25 mg, 0,63 mmol), HOBt (89,2 mg, 0,66 mmol) y amidoxima **15a** (74 mg, 0,55 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (95/05, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 74% de rendimiento.

Caracterización de **41a**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 5.38 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 7.60 – 7.44 (m, 3H), 8.14 – 8.04 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 24.54, 32.23, 57.54, 63.65, 64.57, 79.76, 124.91, 126.58, 127.95, 130.66, 163.3, 167.46, 172.16. HRMS (ESI) m/z encontrado: 457,91598 ($\text{M}+\text{H}^+$), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 457,91680

(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicciclo [3.2.0]heptan-7-ona (41b).

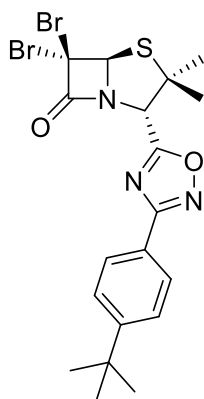


Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.3. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (25 mg, 0,07 mmol), EDC (15,4 mg, 0,08 mmol), HOBt (11,35 mg, 0,084 mmol) y amidoxima **15b** (15 mg, 0,07 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (95/05, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 20% de rendimiento.

Caracterización de **41b**: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 5.36 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 7.64 (d, $J=8.49$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J=8.46$ Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.59, 33.23, 58.47, 64.66, 65.57, 80.78, 124.87, 126.36, 129.08, 132.30, 164.34, 167.83, 173.48.

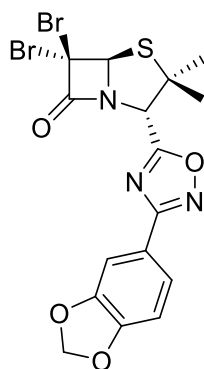
(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(4-(*tert*-butyl)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicciclo[3.2.0]heptan-7-ona (41c).

Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.3. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (39,2 mg, 0,11 mmol), EDC (24,25 mg, 0,126 mmol), HOBt (17,8 mg, 0,132 mmol) y amidoxima **15c** (21 mg, 0,11 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (95/05, hexano/AcOEt) se obtuvo el



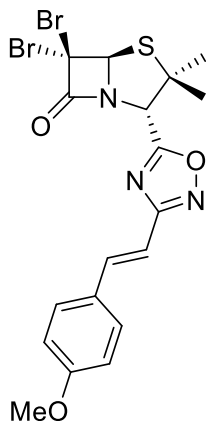
producto deseado con un 20% de rendimiento. Caracterización de **41c**: RMN DE ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.29 (s, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.74 (s, 3H), 5.37 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8.61 Hz, 2H), 8.01 (d, J =8.58 Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.55, 31.15, 33.28, 35.04, 58.60, 64.68, 65.61, 80.80, 123.08, 125.95, 127.38, 155.25, 164.32, 168.41, 172.97. HRMS (ESI) m/z encontrado: 535,95862 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_3\text{NaO}_2\text{S}$: 535,96134.

(2S,5R)-2-(3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41d).



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (200 mg, 0,55 mmol), EDC (122,8 mg, 0,64 mmol), HOBt (90,31 mg, 0,66 mmol) y amidoxima **15d** (100,3 mg, 0,55 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (85/15, hexano/ AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 20% de rendimiento. Caracterización de **41d**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.29 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 5.34 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 6.90 (d, J = 8.13 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 1.56 Hz, 1H), 7.64 (dd, J =8.16, 1.65 Hz, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.51, 33.20, 58.52, 64.59, 65.54, 80.72, 101.68, 107.48, 108.69, 119.66, 122.65, 148.16, 150.48, 164.26, 168.06, 172.88. HRMS (ESI) m/z encontrado: 523,88711($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$: 523,88857.

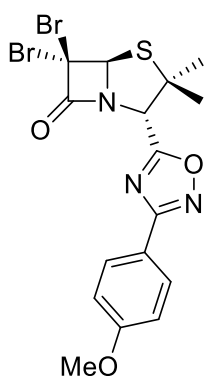
(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-((E)-4-metoxiestiril)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41e).



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (443 mg, 1,23 mmol), EDC (271,16 mg, 1,41 mmol), HOBt (1,47 mg, 200 mmol) y amidoxima **15e** (237,1 mg, 1,23 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (80/20, hexano/ AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 70% de rendimiento. Caracterización de **41e**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.29

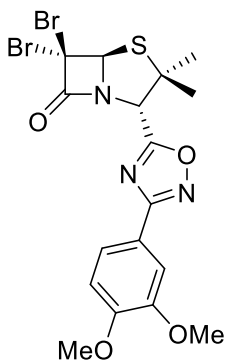
(s, 3H), 1.73 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.32 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.91 (d, $J=16,14$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=8.70$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.65$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=16.12$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.52, 33.20, 55.34, 58.52, 64.62, 65.51, 80.69, 109.46, 114.33, 127.74, 129.05, 139.81, 160.90, 164.29, 168.13, 172.23. HRMS (ESI) m/z encontrado: 535,92426 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$: 535,92496.

(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41f)



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (323,1 mg, 0,9 mmol), EDC (205,02 mg, 1.07 mmol), HOBt (150,8 mg, 1,11 mmol) y amidoxima **15f** (149,5 mg, 0,9 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 20% de rendimiento. Caracterización de **41f**: RMN DE ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H), 1.74(s, 3H), 3.87 (s, 3H), 5.35 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 6.99 (d, $J=8.88$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J=8.88$ Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.53, 33.23, 55.40, 58.56, 64.63, 65.57, 80.74, 114.33, 118.31, 129.23, 162.26, 164.28, 168.13, 172.82. HRMS (ESI) m/z encontrado: 487,92594 ($\text{M}+\text{H}^+$), calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 487,92736.

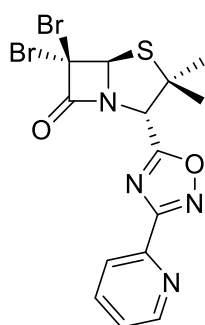
(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(3,4-dimethoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimethyl-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41g)



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (275 mg, 0,76 mmol), EDC (167,5 mg, 0,87 mmol), HOBt (123,2 mg, 0,9 mmol) y amidoxima **15g** (150 mg, 0,76 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 35% de rendimiento. Caracterización de **41g**. RMN DE ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H, CH_3), 1.74(s, 3H), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 3H), 5.35 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 6.96 (d, $J=8.42$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=1.95$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J=8.42, 1.95$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.54, 33.19, 55.98, 56.04,

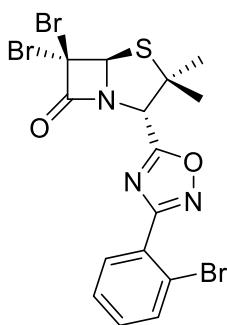
58.50, 64.65, 65.54, 80.72, 109.83, 111.04, 118.39, 121.25, 149.23, 151.91, 164.29, 168.29, 172.87. HRMS (ESI) m/z encontrado: 539,918273 ($M+Na^+$), calculado para $C_{17}H_{17}Br_2N_3NaO_4S$: 539,919872.

(2S,5R)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-2-(3-(piridin-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-7-ona (41h).



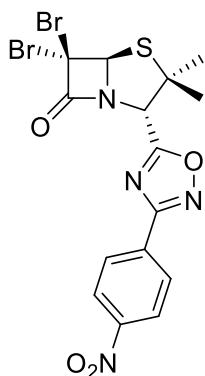
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (987,25 mg, 2,75 mmol), EDC (632,6 mg, 3,33 mmol), HOBt (371,6 mg, 3,16 mmol) y amidoxima **15k** (374,3 mg, 2,75 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (80/20, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 30% de rendimiento. Caracterización de **41h**. RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 1.31 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 5.43 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 7.44-7.49 (m, 1H), 7.85-7.91 (m, 1H), 8.13-8.16 (m, 1H), 8.80-8.83 (m, 1H). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 25.69, 33.18, 58.43, 64.82, 65.59, 80.69, 123.498, 125.93, 137.18, 145.58, 150.58, 164.42, 168.23, 173.99.

(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(2-bromophenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-7-ona. (41i)



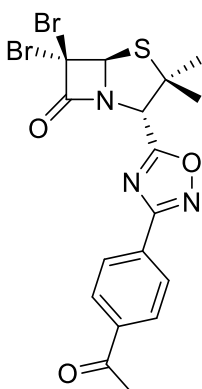
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (215,4 mg, 0,6 mmol), EDC (132,3 mg, 0,69 mmol), HOBt (97,3 mg, 0,72 mmol) y amidoxima **15i** (126,3 mg, 0,6 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (95/05, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 22% de rendimiento. Caracterización de **41i**: RMN DE 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 1.33 (s, 3H), 1.75(s, 3H), 5.40 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 7.38 (td, $J=7.62, 1.62$ Hz, 1H), 7.46 (td, $J=7.62, 1.62$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=7.76, 1.56$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J=7.76, 1.56$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 25.63, 33.21, 58.47, 64.63, 65.72, 80.77, 122.29, 127.33, 127.53, 131.93, 132.24, 134.29, 164.36, 168.16, 172.86.

(2S,5R)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-2-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41j)



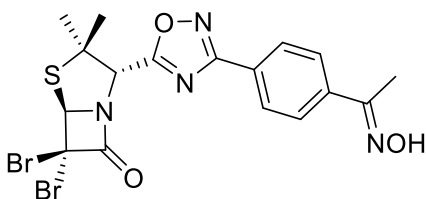
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (425 mg, 1,18 mmol), EDC (263 mg, 1,37 mmol), HOBt (193,2 mg, 1,43 mmol) y amidoxima **15m** (216 mg, 1,18 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 23% de rendimiento. Caracterización de **41j**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.31 (s, 3H, CH_3), 1.76 (s, 3H, CH_3), 5.40 (s, 1H, CH), 6.01 (s, 1H, CH), 8.29 (d, $J=8.98$ Hz, 2H), 8.36 (d, $J=8.98$, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.59, 33.15, 58.33, 64.65, 65.53, 80.77, 124.18, 128.63, 131.71, 149.73, 164.34, 168.99, 174.16.

(2S,5R)-2-(3-(4-Acetilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-7-ona (41k).



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (305,1 mg, 0,85 mmol), EDC (187,38 mg, 0,97 mmol), HOBt (137,8 mg, 1,02 mmol) y amidoxima **15k/15l** (150 mg, 0,8 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 20% de rendimiento. Caracterización de **41k**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 5.39 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 8.07 (d, $J=8.62$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J=8.67$ Hz, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.57, 26.76, 33.18, 58.42, 64.65, 65.54, 80.76, 127.83, 129.95, 139.29, 164.33, 167.73, 173.66, 197.29.

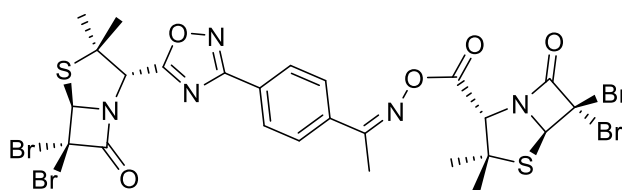
(2S,5R)-6,6-Dibromo-2-(3-(4-(1-(hidroxiimino)etil)phenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-7-ona (41l).



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un 10% de rendimiento. Caracterización de **41l**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.30 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 5.40 (s, 1H), 6.02

(s, 1H), 7.77 (d, $J=8.61$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J=8.60$ Hz, 2H), 8.57 (sa, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 11.98, 25.57, 33.21, 58.48, 64.65, 65.58, 80.76, 126.43, 126.52, 127.71, 139.57, 155.25, 164.36, 168.03, 173.32.

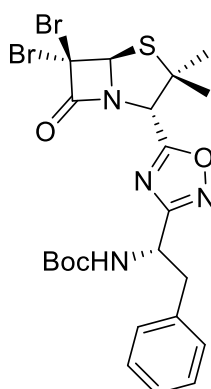
(2*S*,5*R*)-6,6-Dibromo-2-((((*Z*)-(1-(4-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil)etiliden)amino)oxi)carbonil)-3,3-dimetil-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-7-ona (41m).



Obtenido como subproducto de la reacción anterior, luego de la purificación cromatográfica, con un rendimiento del 11%.

Caracterización de **41m**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.25 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 4.82 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 7.89 (d, $J=8.70$, 2H), 8.15 (d, $J=8.64$, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 14.85, 25.62, 26.02, 33.28, 33.53, 58.48, 64.70, 64.82, 65.58, 69.02, 80.79, 80.94, 127.72, 127.93, 128.38, 136.95, 163.67, 163.98, 164.36, 164.57, 167.78, 173.60. HRMS (ESI) m/z encontrado: 875,772517 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{Br}_4\text{N}_5\text{NaO}_5\text{S}_2$: 875,776630.

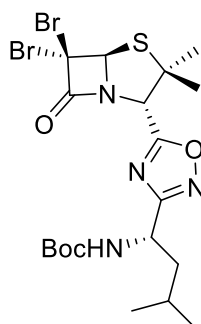
***tert*-Butil ((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2-phenyletil) carbamato (44a).**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (310,6 mg, 0,865 mmol), EDC (190,7 mg, 0,99 mmol), HOBT (140,2 mg, 1,03 mmol) y amidoxima **42a** (241,7 mg, 0,865 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/ AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 36% de rendimiento. Caracterización de **44a**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.16 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.69 (s, 3H), 3.18 (d, $J=6.61$ Hz, 2H), 5.03-5.05 (m, 1H), 5.17-5.23 (m, 1H), 5.26 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 7.08-7.11 (m, 2H), 7.22-7.25 (m, 3H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.44,

28.26, 33.19, 40.04, 48.63, 58.50, 64.55, 65.61, 80.35, 80.69, 127.12, 128.59, 129.41, 135.54, 154.72, 164.33, 170.35, 173.48.

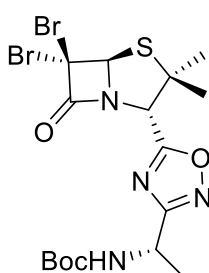
***tert*-Butil ((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-3-metilbutil) carbamato (**44b**).**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (359 mg, 1 mmol), EDC (220,45 mg, 1,15 mmol), HOBt (162,14 mg, 1,2 mmol) y amidoxima **42b** (250 mg, 1,01 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (85/15, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 70% de rendimiento. Caracterización

de **44b**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.95 (d, $J=5.90$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J=5.90$ Hz, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.70 (s, 3H), 4.80-5.05 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 5.92 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 22.11, 24.47, 24.64, 25.48, 28.26, 29.66, 33.14, 43.16, 45.89, 58.44, 64.61, 65.49, 80.10, 80.65, 154.87, 164.30, 171.44, 173.30. HRMS (ESI) m/z encontrado: 567,02560 ($\text{M}+\text{H}^+$), calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: 567,02708

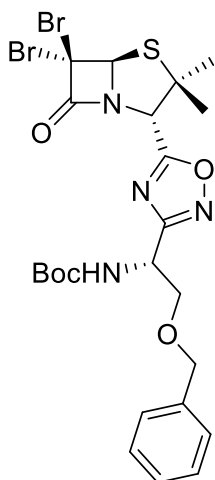
***tert*-Butil ((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il) etil) carbamato (**44d**).**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (191,30 mg, 0,53 mmol), EDC 117,5 mg, 0,61 mmol), HOBt (86,40 mg, 0,64 mmol) y amidoxima **42d** (108,3 mg, 0,53 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (92/08, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 40% de

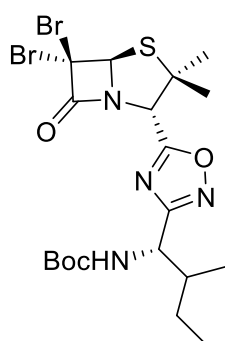
rendimiento. Caracterización de **44d**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.21 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.51 (d, $J=6.75$ Hz, 3H), 1.69 (s, 3H), 4.92-5.12 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 5.91 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 20.29, 25.49, 28.30, 29.68, 33.15, 43.59, 58.43, 64.60, 65.51, 80.21, 80.66, 154.75, 164.32, 172.02, 173.46. HRMS (ESI) m/z encontrado: 546,96042 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4\text{S}$: 546,96207.

tert-butil ((R)-2-(benziloxi)-1-(5-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)ethyl)carbamato (44g).



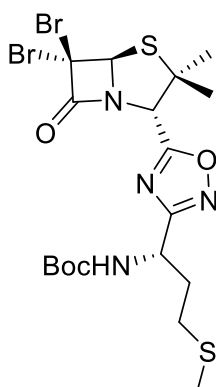
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (132,8 mg, 0,37 mmol), EDC (81,6 mg, 0,42 mmol), HOBt (60 mg, 0,44mmol) y amidoxima **42g** (116,9 mg, 0,37 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (85/15, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 11,5% de rendimiento. Caracterización **44g**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.17 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.68 (s, 3H), 3.69-3.90 (m, 2H), 4.46 (d, $J=12.03$ Hz, 1H), 4.52 (s, $J=12.06$ Hz, 1H), 5.10-5.13 (m, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.46 (d, $J=8.23$ Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 7.19-7.36 (m, 5H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.44, 28.20, 28.30, 33.15, 48.35, 58.46, 64.56, 65.57, 70.22, 73.34, 80.38, 80.67, 126.97, 127.64, 127.91, 128.43, 137.28, 155.15, 164.33, 169.84, 173.37. HRMS (ESI) m/z encontrado: 631,02138 ($\text{M}+\text{H}^+$), calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$: 631,02199.

tert-Butil ((1S)-1-(5-((2S,5R)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2-methylbutil) carbamato (44h).



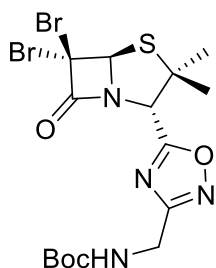
Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (440 mg, 1,22 mmol), EDC (269 mg, 1,40 mmol), HOBt (198 mg, 1,46 mmol) y amidoxima **42h** (300 mg, 1,22 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (85/15, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 67% de rendimiento. Caracterización de **44h**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.86 (d, $J=6.75$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J=7.37$ Hz, 3H), 1.17-1.46 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.70 (s, 3H), 1.84-1.97 (m, 1H), 4.86-4.91 (m, 1H), 5.05-5.08 (m, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.93 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 11.34, 15.25, 24.97, 25.48, 28.28, 33.17, 38.52, 51.64, 58.48, 64.56, 65.54, 80.09, 80.69, 155.11, 164.31, 170.18, 173.11. HRMS (ESI) m/z encontrado: 589,00935 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4\text{S}$: 589,00902.

***tert*-Butil ((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-3-(metiltio)propil) carbamato (44j)**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (166,7 mg, 0,46 mmol), EDC (102,3 mg, 0,53 mmol), HOBt (73,23 mg, 0,55 mmol) y amidoxima **42j** (122,2 mg, 0,46 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 10% de rendimiento. Caracterización de **44j**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.22 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.70 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.11-2.19 (m, 2H), 2.54 (t, $J=7.20$ Hz, 2H), 5.00-5.18 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 5.92 (s, 1H). HRMS (ESI) m/z encontrado: 606,966688 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4\text{S}_2$: 606,965442.

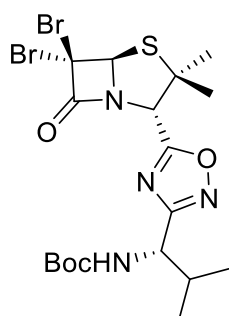
***tert*-Butil ((5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil) carbamato (44k).**



Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (282,13 mg, 0,79 mmol), EDC (174,1 mg, 0,908 mmol), HOBt (128,09 mg, 0,948 mmol) y amidoxima **42k** (148,7 mg, 0,79 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 25% de rendimiento. Caracterización de **44k**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.23 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.70 (s, 3H), 4.48 (d, $J=5.73$ Hz, 2H), 5.10 (sa, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.92 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 25.51, 28.30, 29.69, 33.15, 36.71, 58.39, 64.55, 65.50, 80.44, 80.66, 155.41, 164.31, 168.43, 173.69. HRMS (ESI) m/z encontrado: 532,946137 ($\text{M}+\text{Na}^+$), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4\text{S}$: 532,946421.

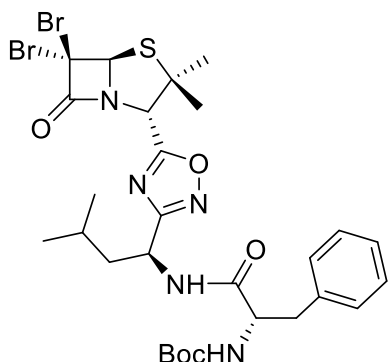
***tert*-Butil((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2-metilpropil) carbamato. (44l)**

Obtenido a partir del procedimiento 5.4.2.9.7. (método G), utilizando ácido 6,6-dibromopenicilánico (**34**) (200 mg, 0,55 mmol), EDC (121,3 mg, 0,63 mmol),



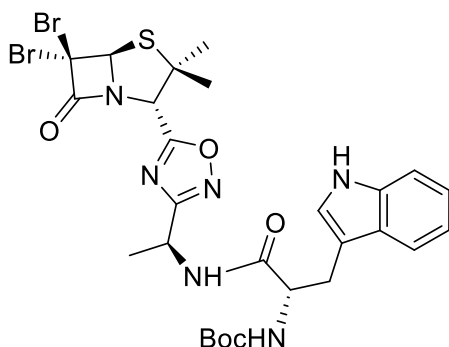
HOBt (89,1 mg, 0,66 mmol) y amidoxima **42I** (127 mg, 0,55 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (90/10, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 51% de rendimiento. Caracterización de **44I**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.90-0.95 (m, 6H), 1.20 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.70 (s, 3H), 2.12-2.19 (m, 1H), 4.78-4.83 (m, 1H), 5.03-5.06 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.92 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 17.81, 18.81, 25.48, 28.27, 32.09, 33.16, 52.70, 58.48, 64.55, 65.54, 80.09, 80.68, 155.22, 164.31, 170.37, 173.19.

***Tert*-Butil((2*S*)-1-(((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-3-metilbutil)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)carbamato (**44ba**)**



Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.2.11., utilizando **44b** (82,2 mg, 0,14 mmol, al cual se le eliminó el grupo protector Boc mediante el procedimiento general 5.4.2.10), *N*-Boc-Phe (**30a**) (38,36 mg, 0,14 mmol), EDC (40,25 mg, 0,21 mmol), HOBt (28,4 mg, 0,21 mmol), Et_3N (48,8 μL , 0,35 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (80/20, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 27% de rendimiento. Caracterización de **44ba**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.91 (d, $J=6.44$ Hz, 6H), 1.17 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.44-1.65 (m, 3H), 1.69 (s, 3H), 2.21 (sa, 1H), 3.02 (d, $J=6.75$ Hz, 2H), 4.23-4.36 (m, 1H), 5.05 (sa, 1H), 5.26 (s, 1H), 5.26-5.35 (m, 1H), 5.88 (s, 1H), 6.31 (d, $J=8.67$ Hz, 1H), 7.31-7.24 (m, 5H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 21.99, 22.52, 24.58, 25.47, 28.23, 33.18, 38.13, 42.84, 44.11, 55.90, 58.51, 64.46, 65.53, 80.40, 80.66, 126.87, 128.56, 129.24, 129.55, 136.37, 155.45, 164.30, 170.56, 170.80, 173.41.

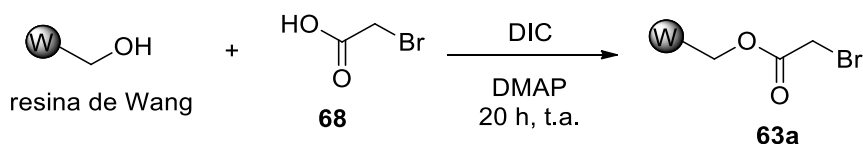
***Tert*-Butil((2*S*)-1-(((1*S*)-1-(5-((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)etil)amino)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-oxopropan-2-yl)carbamato (**44dc**).**



Obtenido a partir del procedimiento general 5.4.2.11, utilizando **44d** (59,10 mg, 0,16 mmol, al cual se le eliminó el grupo protector Boc mediante el procedimiento general 5.4.2.10), *N*-Boc-Trp (**30c**) (34,17 mg, 0,16 mmol), EDC (47,07 mg, 0,245 mmol), HOBt (33,13 mg, 0,245 mmol), Et₃N (56 μ L, 0,4 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (80/20, hexano/AcOEt) se obtuvo el producto deseado con un 44,5 % de rendimiento. Caracterización de **44dc**. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ . 1.16 (s, 3H), 1.38 (d, *J*=6.96 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.69 (s, 3H), 1.82 (sa, 1H), 3.12-3.32 (m, 2H), 4.36-4.51 (m, 1H), 5.20-5.26 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 6.39 (d, *J*=7.99 Hz, 1H), 7.04-7.18 (m, 3H), 7.32 (d, *J*= 8.02 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*= 7.75 Hz, 1H), 8.25 (sa, 1H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 19.86, 25.49, 28.29, 32.94, 42.05, 55.31, 58.24, 64.53, 65.51, 80.23, 80.55, 110.42, 111.10, 118.75, 122.24, 123.23, 127.38, 136.16, 155.47, 164.49, 170.99, 171.26, 173.40.

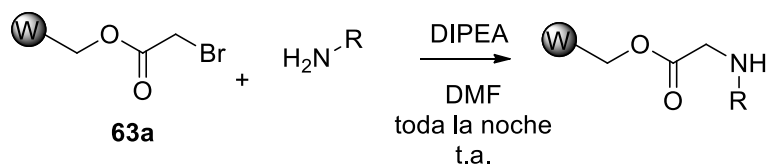
5.5.2.12 Procedimientos generales en los estudios dirigidos a la síntesis de 1,2,4-oxadiazoles en fase sólida.

5.5.2.12.1. Procedimiento para la unión del ácido 2-bromoacético a la resina de Wang.



Se coloca en un balón el ácido 2-bromoacético (**68**) (3 eq., 2,31 mmol, 321 mg), DMAP (cantidad catalítica) y se disuelve en DCM (8 mL). Una vez todo disuelto se agrega DIC (3 eq., 2.31 mmol, 360 μ L) y de inmediato se agrega la resina de Wang seca (700 mg, 1,1mmol/g) y la mezcla se deja agitando suavemente a temperatura ambiente durante 20 horas bajo atmósfera de N₂. Finalmente, la resina se filtra en un cartucho de polipropileno y se lava con agua, MeOH, AcOEt y DCM y se deja secando en desecador. Se obtiene así el 2-bromoacetato unido a la resina de Wang (**63a**).

5.5.2.12.2. Procedimiento general para la unión de aminas primarias a la resina **63a**.



La resina **63a** (1 g) se solvata en mínima cantidad de DMF y se agrega una solución de la amina primaria (10 eq.) y la DIPEA (10 eq.) en DMF (10 mL). La mezcla se agita suavemente toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, la resina se filtra y se lava tres veces con DMF y DCM.

5.5.2.12.3. Procedimiento general para la formación de amidas derivadas de Fmoc-aminoácidos.

A una solución del Fmoc-aminoácido (5 mmol), piridina (250 μL , 3 mmol) y NH_4HCO_3 (500 mg, 6,30 mmol) en DMF (7 mL) se le agrega anhídrido de Boc (1,5 mL, 6,50 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente 3 horas. Finalmente, la mezcla se agita con HCl 1N hasta formar un precipitado, el cual es filtrado y lavado con hexano.

5.5.2.12.4. Procedimiento general para la desprotección del grupo Cbz en solución.

El sustrato (2 mmol) se disuelve en DCM (50 mL) y enfriado a -10°C . Luego se agrega cuidadosamente gota a gota una solución de BBr_3 1M en DCM (10 mmol). La mezcla se agita 1 hora a -10°C y luego 2 horas a 25°C . La reacción se finaliza agregando cuidadosamente agua gota a gota (50 mL). Se separan las capas y la fase orgánica fue lavada tres veces con agua (25 mL) y las fases acuosas fueron evaporadas hasta sequedad.

5.5.2.13. Ensayos biológicos de derivados oxadiazólicos.

5.5.2.13.1. Ensayos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA – CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

5.5.2.13.1.1. Líneas celulares

B16-F0: La línea celular B16-F0 (melanoma murino, ATCC CRL-6322) se cultivó en RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mmol/l, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml.

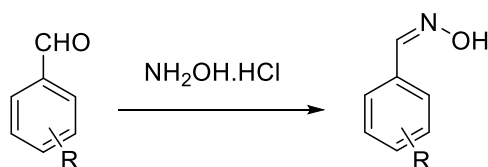
LM3 y NMuMG: La línea celular LM3¹⁶³ (adenocarcinoma mamario) y las células NMuMG (glándula mamaria murina normal, ATCC CRL-1636), amablemente proporcionadas por el Instituto de Oncología 'Angel H. Roffo' (Buenos Aires, Argentina), se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dubecco. F12 que contiene FBS al 10%, L-glutamina 2 mmol/l, HEPES al 0,6%, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg / ml. Para la recolección, las células se trataron con tripsina/EDTA al 0,05% usando procedimientos estándar.

5.5.2.13.1.2. Ensayo de proliferación

Las células se incubaron en microplacas de 96 pocillos a una densidad de 1x10⁴ células/pocillo (B16-F0) o 2x10⁴ células / pocillo (LM3 o NMuMG) durante 72 h a 37 ° C en presencia de una concentración de 20 µM de los diferentes compuestos híbridos o vehículo (control) (dimetilsulfóxido diluido 1/10 en etanol; concentración final 20 µl de vehículo / ml de medio), en un volumen total de 0,2 ml del medio de cultivo correspondiente. El número de células se evaluó por determinación colorimétrica de los niveles de la enzima lisosomal ubicua hexosaminidasa.¹⁶⁴

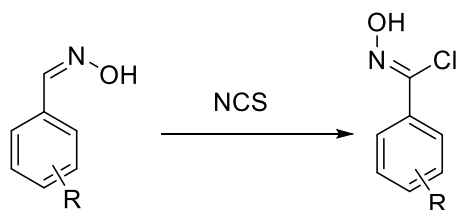
5.5.3. Síntesis de estructuras híbridas conteniendo el anillo isoxazol.

5.5.3.1. Procedimiento general para la síntesis de aldoximas.

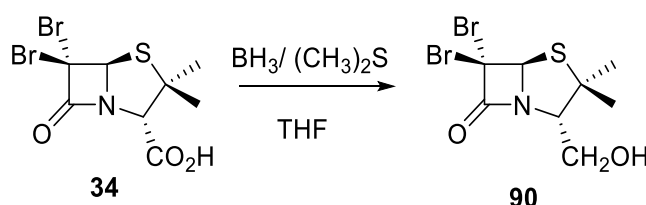


A una solución del aldehído (1eq.) en 1:1: agua/etanol en baño de hielo, se agrega clorhidrato de hidroxilamina (1,1 eq.) seguido de hidróxido de sodio (1,1 eq., como una solución al 50% en agua). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto es extraído con éter y se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano/AcOEt.

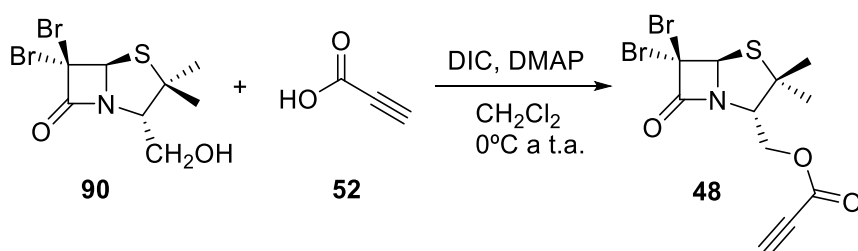
5.5.3.2. Procedimiento general para la síntesis de cloro-oximas.



A una solución de la aldoxima (1 eq.) en DMF se enfría a -20°C y se agrega gota a gota NCS (1 eq.). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y el producto se extrae con éter y se usa directamente en el siguiente paso de síntesis.

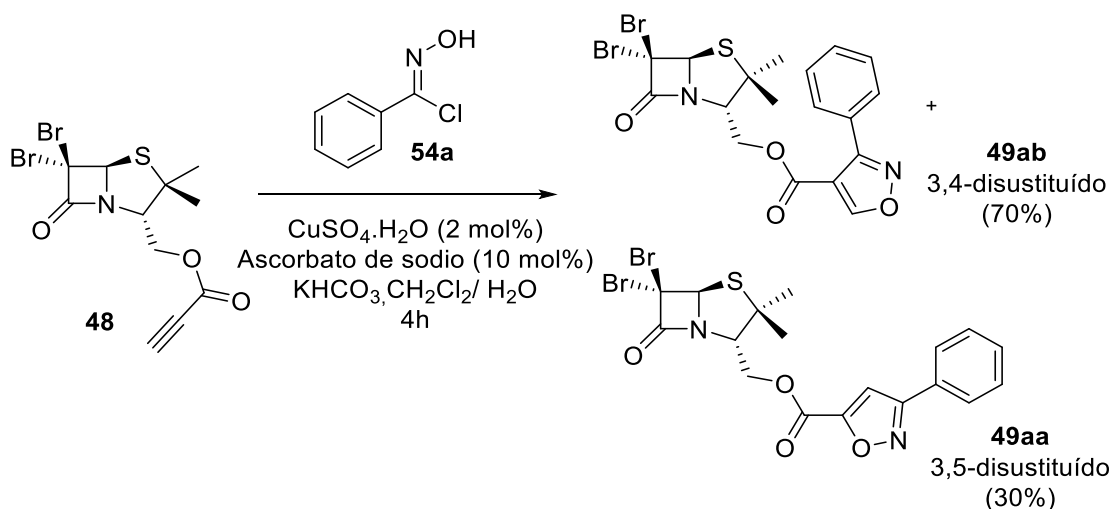
 5.5.3.3. Procedimiento para la obtención del alcohol derivado del ácido 6,6-dibromopenicilánico (**90**).


A un balón secado en estufa y mantenido bajo atmósfera de nitrógeno seco, se agregan 2,78 mmol, (1g) de ácido 6,6-dibromopenicilánico **34** 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 y con precaución 0,6 mL de agua destilada, se evapora el solvente y se purifica mediante columna cromatográfica (hexano:AcOEt, 60:40) obteniéndose el producto deseado con un 82% de rendimiento).

 5.5.3.4. Procedimiento para la esterificación del alcohol **90** con ácido propiólico.


Una solución enfriada a 0°C del alcohol **88** (105,9 mg, 0,3 mmol, 1 eq.) y el ácido propiónico (**52**) (0,18 µL, 0,30 mmol, 1eq.) en 3 mL de DCM se transfiere a una solución combinada de DIC (46,5 µL, 0,30 mmol, 1eq.) y DMAP (cat.) en 3 mL de DCM y la mezcla se deja agitando a temperatura ambiente 6 horas. Se evapora el solvente en rotavapor a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano:AcOEt (70:30) con un rendimiento del 39%.

5.5.3.5. Procedimiento para la obtención de los derivados 3,4 y 3,5 penicilin-fenil-isoxazol **49a-a** y **49a-b** mediante cicloadición 1,3 dipolar catalizada por cobre en solución.

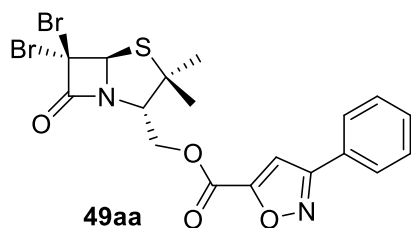
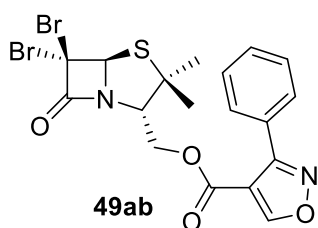


Se disuelven el éster penicilánico **48** (198,5 mg, 0.5 mmol) y la cloroxima **54a** (145 mg, 0,93 mmol) en DCM (2 mL)/H₂O (2 mL). Mientras se agita la mezcla se agrega ascorbato de sodio (0,05 mmol, 50 µL, 1M, 10 mol%), seguido de CuSO₄·H₂O (0,01 mmol, 1,60 mg). La mezcla de reacción es luego tratada con KHCO₃ (2,36 mmol, 236,2 mg) y se deja agitando durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluye con 10 mL de agua y se extraen los productos con DCM. Las fases orgánicas se secan sobre Na₂SO₄ se filtra y se evapora el solvente a presión reducida en rotavapor. Los productos se purifican por cromatografía en columna usando gradiente de polaridad hexano:AcOEt.

5.5.3.6. Caracterización **49aa** y **49ab** .

((2*S*,5*R*)-6,6-Dibromo-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptan-2-il) metil 3-fenilisoxazol-4-carboxilato (**49ab**) y ((2*S*,5*R*)-6,6-dibromo-3,3-

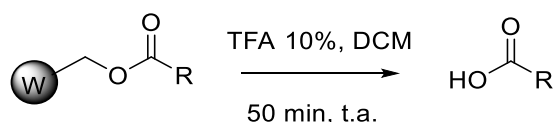
dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-il)metil 3-fenilisoxazol-5-carboxilato (49aa).



RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.45 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 4.14-4.19 (m, 1H), 4.27-4.33 (m, 3H), 4.40-4.55 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.45-7.51 (m, 6H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.81-7.85 (m, 2H), 9.10 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 24.57, 24.68, 32.90, 33.21, 58.39, 58.58, 61.07, 62.21, 63.26, 63.31, 66.58, 66.81, 78.69, 78.93, 108.16, 112.04, 126.85, 127.65, 128.29, 129.08, 129.32,

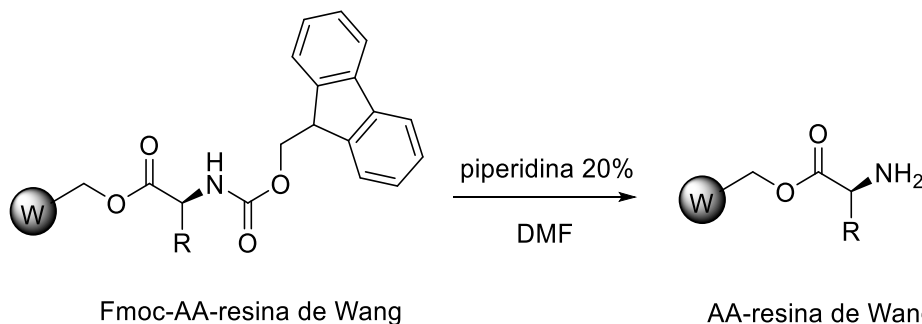
130.31, 130.65, 156.15, 159.74, 160.35, 161.16, 163.07, 164.80, 165.63.

5.5.3.8. Procedimiento 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.

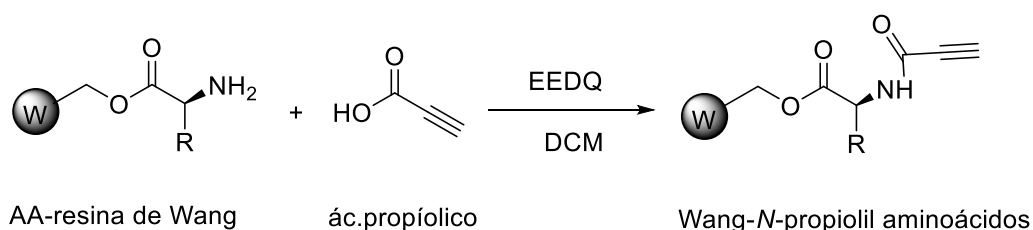
5.5.3.9. Procedimiento general para la desprotección del grupo amina en Fmoc-AA-resina de Wang.



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

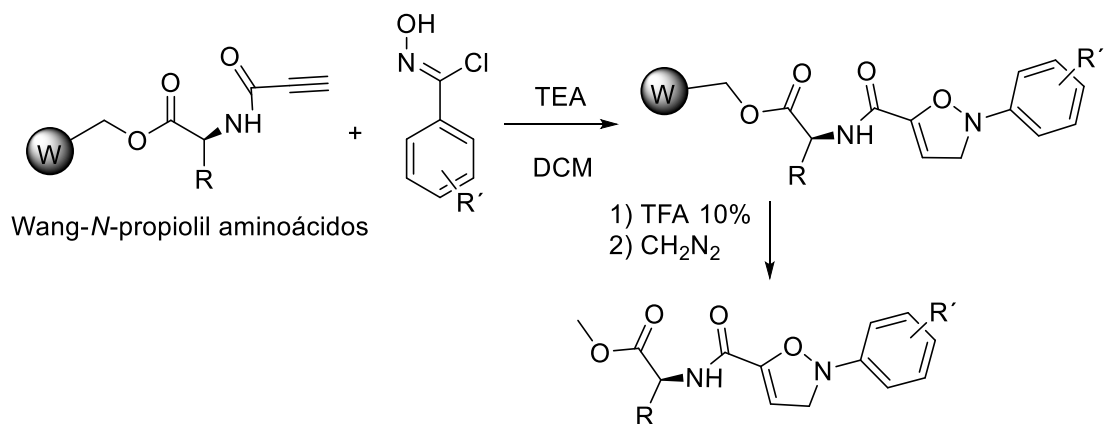
solución de piperidina al 20% (v/v) en DMF (4 mL). Se agita magnéticamente a temperatura ambiente durante 50 minutos. Luego de este tiempo, se filtra y lava la resina sucesiva y alternativamente con DMF (3 x 5 mL), DCM (3 x 5mL) y MeOH (3 x 5 mL), y un último lavado con DCM. Se seca en desecador y se usa directamente en la próxima reacción.

5.5.3.10. Procedimiento general para la obtención de *N*-propiolil aminoácidos unidos a resina de Wang.



Se mezclan ácido propiólico (3 eq.) y EEDQ (3 eq.) en DCM y la solución resultante se transfiere al cartucho con la resina unida al aminoácido (1eq.) solvatada en DCM y se agita magnéticamente, a temperatura ambiente, durante 6 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 unida al *N*-propiolil aminoácido que se utiliza directamente en el siguiente paso de síntesis.

5.5.3.11. Procedimiento general para obtención de aminoacilisoxazoles en fase sólida mediante cicloadición 1,3-dipolar.

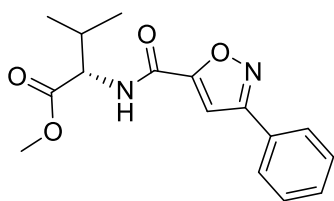


En un cartucho de polipropileno, la resina de Wang unida a los *N*-propiolil aminoácidos (1eq.) es solvatada con DCM y se le agrega TEA (9,4 eq.) y la

cloroxima (8 eq.) disuelta en mínima cantidad de DCM. La mezcla se deja con agitación suave a temperatura ambiente por 48 horas. Luego, se filtra el solvente 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. Posteriormente, se separa la resina del producto con TFA 10% siguiendo el procedimiento 5.4.3.8. y se metila con diazometano según el procedimiento 5.4.1.3.

5.5.3.12. Caracterización de aminoacil-isoxazoles.

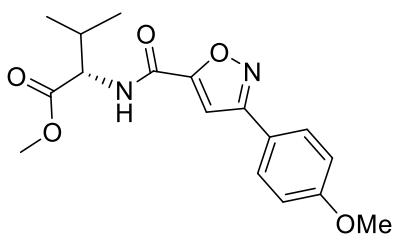
(S) Metil (3-fenilisoxazol-5-carbonil)-L-valinato (**55ama'**).



Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11. a partir de **53m** (250 mg), **54a** (188 mg, 1,21 mmol), Et₃N (0,20 mL, 1,43 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se

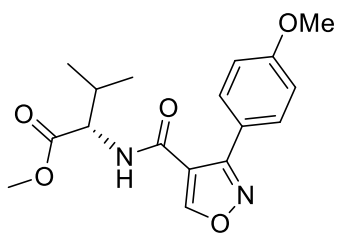
obtuvo el producto con un 31% de rendimiento. Caracterización de **55ama'**. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.99-1.03 (m, 6H), 2.28-2.34 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.71-4.76 (m, 1H), 7.06 (d, J=8.01 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.47-7.49 (m, 3H), 7.80-7.84 (m, 2H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) δ 17.80, 18.97, 31.49, 52.44, 57.21, 105.54, 126.92, 127.94, 129.10, 130.60, 155.69, 163.29, 163.42, 171.46.

(S) Metil (3-(4-metoxifenil) isoxazol-5-carbonil)-L-valinato (**55fma'**)



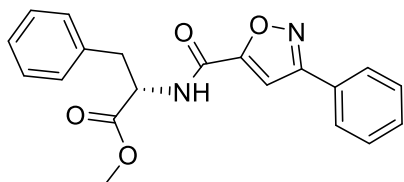
Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11. a partir de **53m** (1 g), **54f** (906 mg, 4,88 mmol), Et₃N (0,20 mL, 1,43 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el producto con un 20% de rendimiento

Caracterización de **55fma'**. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.98-1.02 (m, 6H), 2.26-2.32 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.69-4.74 (m, 1H), 6.97 (d, J=8.79 Hz, 2H), 7.06 (d, J= 8.82 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.74 (d, J=8.82 Hz, 2H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) δ 17.80, 18.96, 31.47, 52.40, 55.37, 57.19, 105.30, 114.47, 120.39, 128.35, 155.78, 161.44, 162.99, 163.03, 171,46.

(S) Metil (3-(4-metoxifenil) isoxazol-4-carbonil)-L-valinato (55fmb')

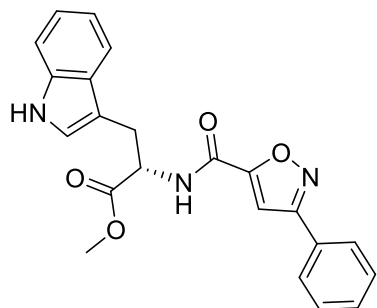
Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11 como subproducto de **55fma'**. Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el producto con un 4% de rendimiento. Caracterización de **55fmb'**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300

MHz) δ 0.69 (d, J = 6.90 Hz, 3H), 0.86 (d, J =6.87 Hz, 3H), 2.03-2.14 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.58-4.62 (m, 1H), 6.09 (d, J = 8.39 Hz, 1H), 7.04 (d, J =8.76 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 8.76 Hz, 2H), 8.95 (s, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 17.44, 18.96, 30.80, 52.21, 55.45, 57.19, 114.70, 116.49, 119.19, 130.62, 159.07, 160.31, 161.43, 162.44, 171.75.

(S) Methyl (3-phenylisoxazole-5-carbonyl)-L-phenylalaninate (55aaa')

Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11. a partir de **53a** (521,5 mg), **54a** (454,3 mg, 2,92 mmol), Et_3N (0,50 mL, 3.43 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica

(Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el producto con un 18% de rendimiento. Caracterización de **55aaa'**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 3.18-3.31 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 5.02-5.09 (m, 1H), 7.05 (d, J = 7.82 Hz, 1H), 7.14-7.17 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 3H), 7.46-7.48 (m, 3H), 7.79-7.82 (m, 2H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 37.85, 52.57, 53.23, 105.48, 126.85, 127.38, 128.77, 129.05, 129.15, 130.57, 135.19, 155.29, 163.09, 163.29, 170.96.

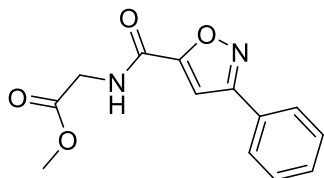
(S) Metil (3-fenilisoxazol-5-carbonil)-L-triptofanato (55aca')

Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11. a partir de **53c** (560,4 mg), **54a** (311,15 mg, 2 mmol), Et_3N (0,35 mL, 3,35 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el producto con un 7% de rendimiento. Caracterización de **55aca'**. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300

MHz) δ 3.45 (d, J =5.45 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 5.07-5.13 (m, 1H), 7.07-7.22 (m, 6H), 7.37 (d, J = 8.16 Hz, 1H), 7.46-7.47 (m, 3H), 7.56 (d, J =7.86 Hz, 1H), 7.78-7.82 (m, 2H), 8.13 (sa, 1H). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 27.75, 52.64, 52.82,

105.42, 109.51, 111.33, 118.48, 119.89, 122.49, 122.85, 126.90, 127.32, 127.94, 129.09, 130.59, 136.18, 155.42, 163.29, 171.38.

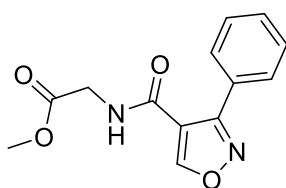
Metil (3-fenilisoxazol-5-carbonil) glicinato (55aka')



Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11. a partir de **53k** (500 mg), **54a** (436,1 mg, 2,8 mmol), Et₃N (0,34 mL, 3,29 mmol). Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el

producto con un 33% de rendimiento Caracterización de **55aka'**.RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.73 (s, 3H), 4.08 (d, J= 5.24 Hz, 2H), 6.16 (sa, 1H), 7.53-7.55 (m, 3H), 7.68-7.71 (m, 2H), 8.98 (s, 1H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) δ 41.26, 52.47, 116.17, 127.07, 129.10, 129.21, 130.68, 159.40, 160.24, 162.49, 169.60.

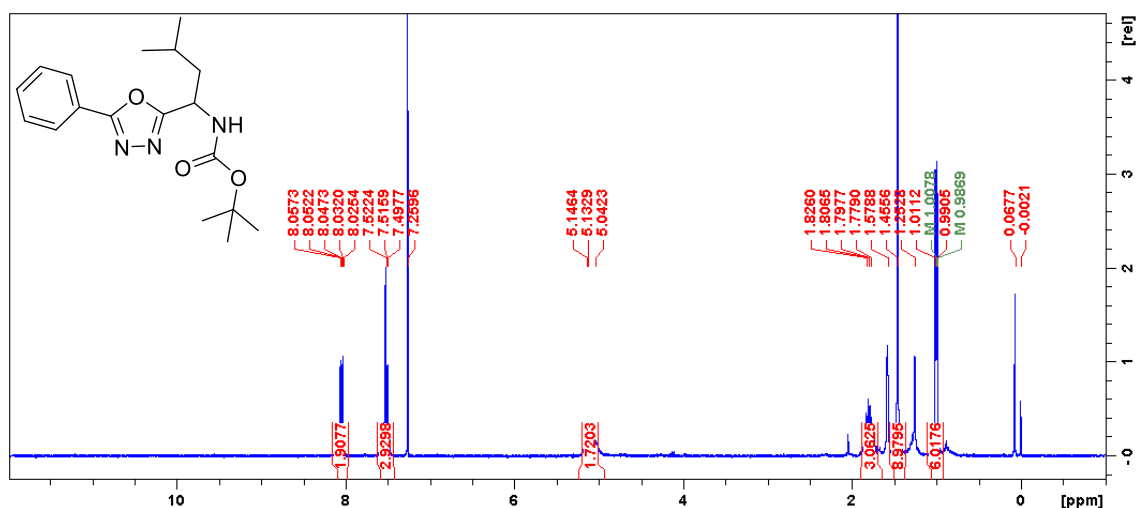
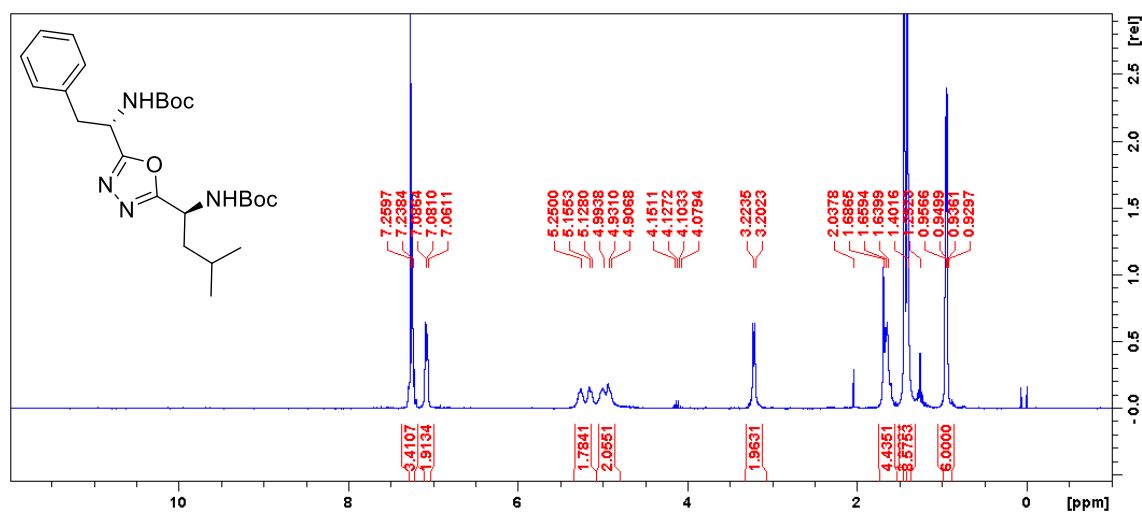
Metil (3-fenilisoxazol-4-carbonil) glicinato (55akb')

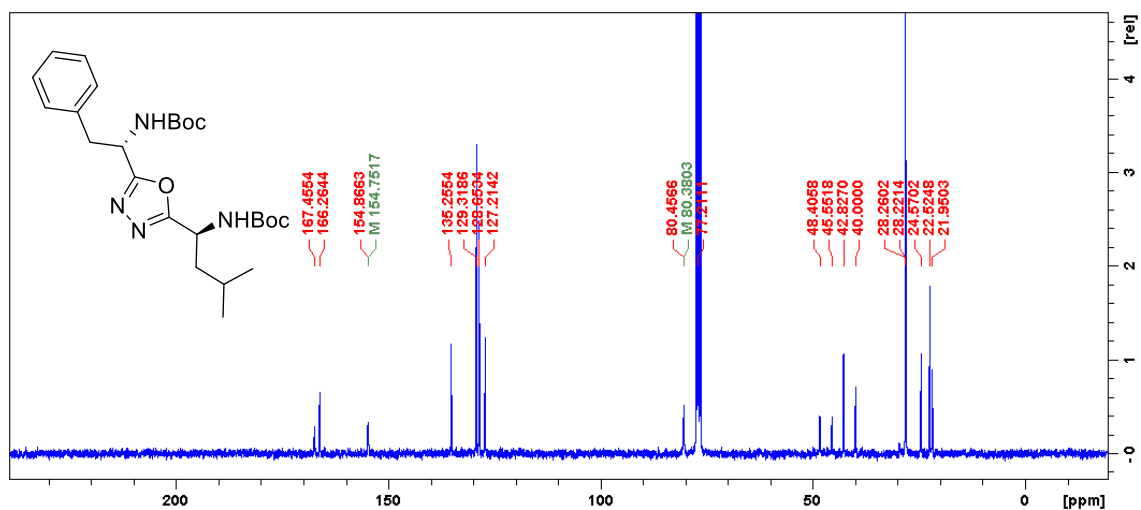
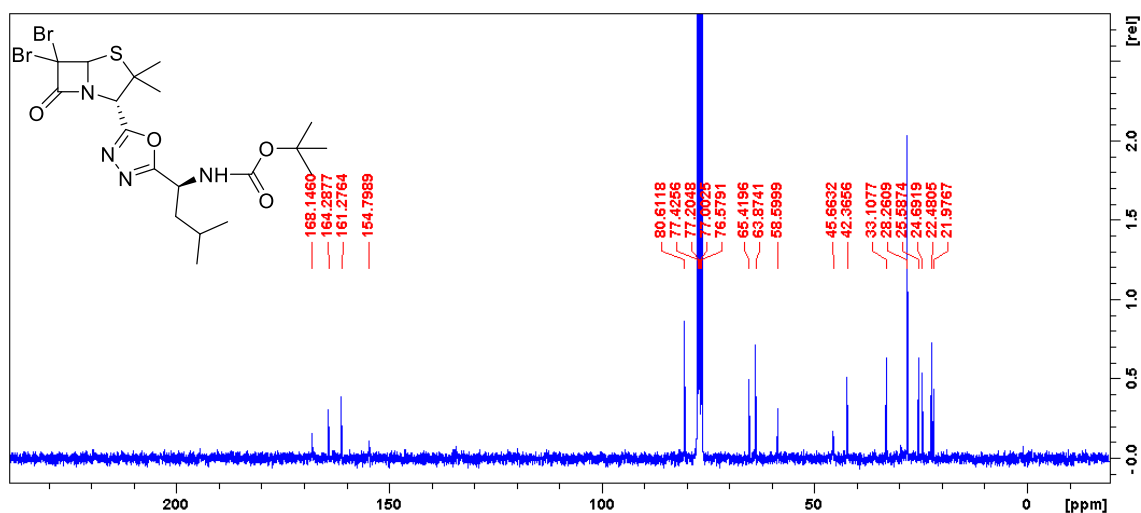
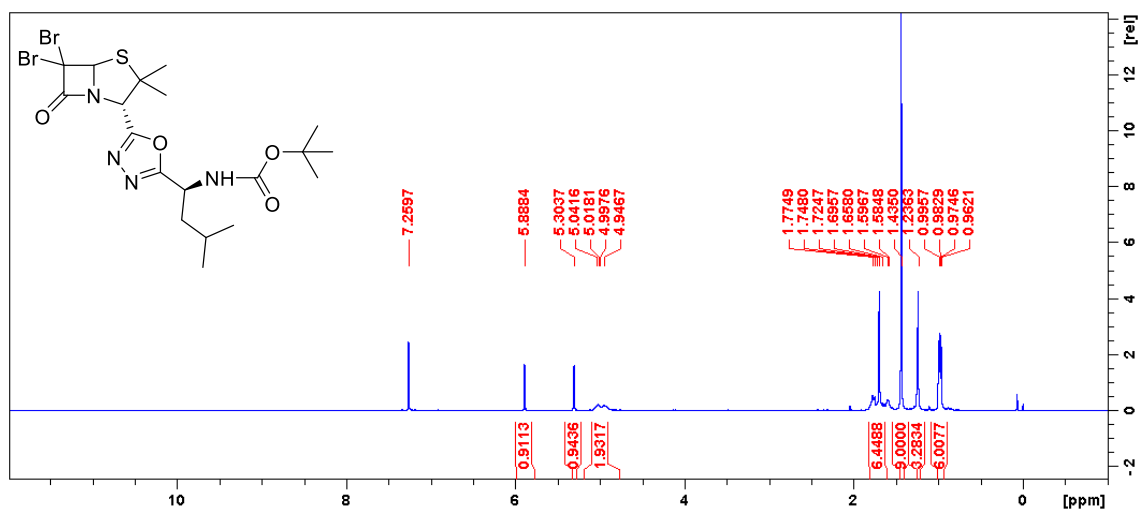


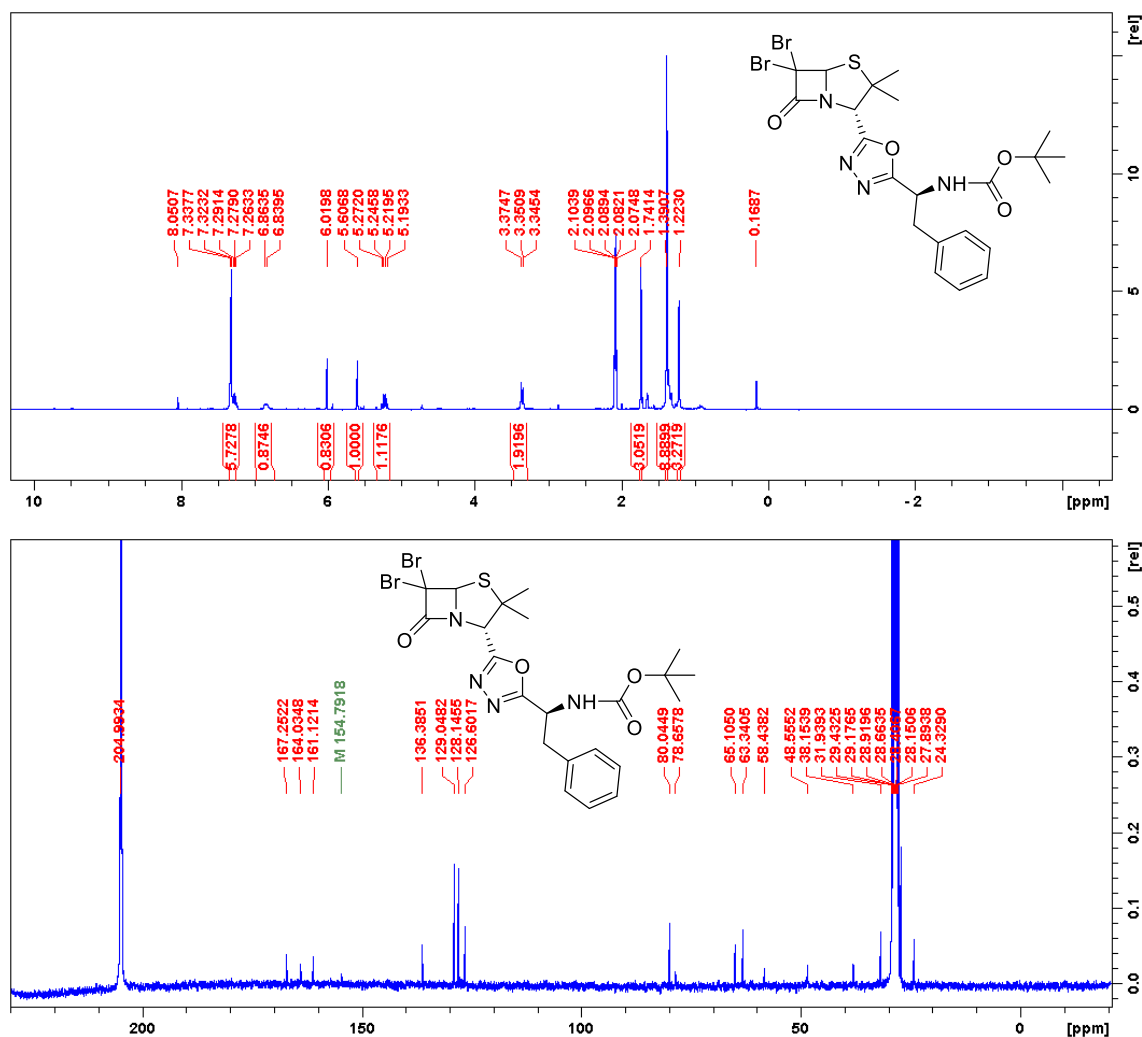
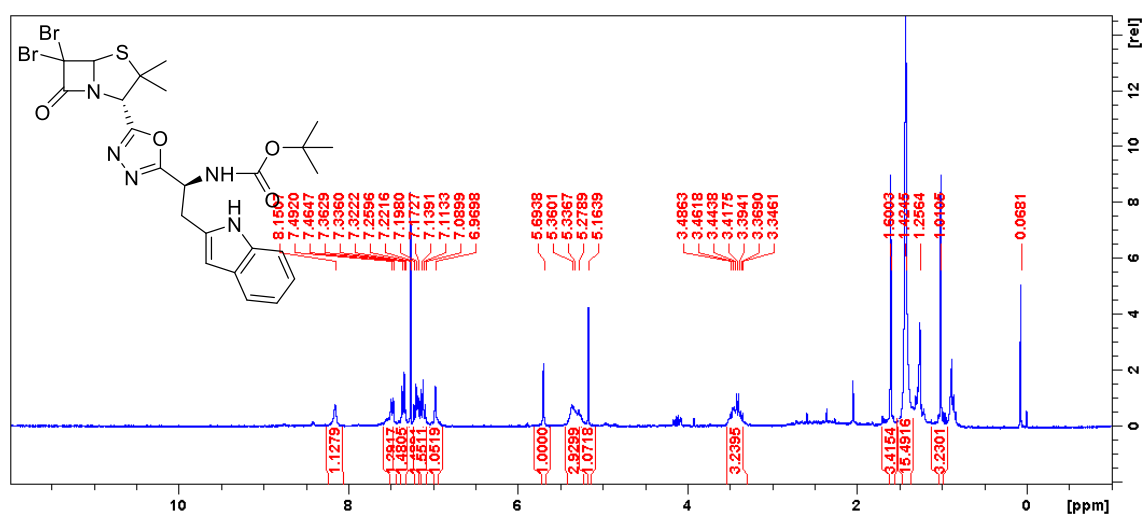
Obtenido por el procedimiento general 5.4.3.11 como subproducto de **55aka'**. Luego de purificación por columna cromatográfica (Hexano:AcOEt, 7:3) se obtuvo el producto con un 5% de rendimiento Caracterización de **55akb'**.

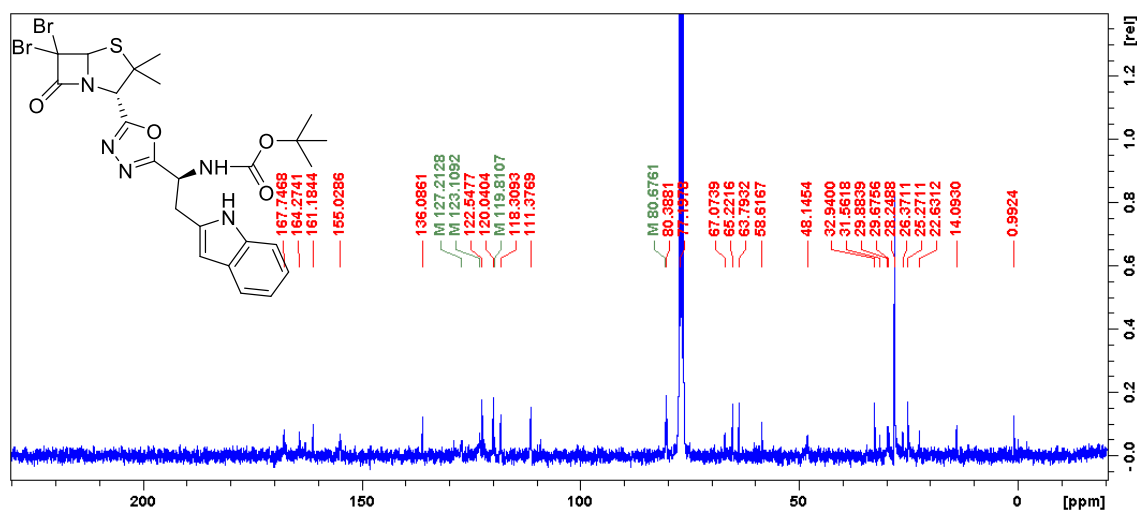
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.80 (s, 3H), 4.26 (d, J= 5.42 Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.45-7.48 (m, 3H), 7.80-7.83 (m, 2H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) δ 41.12, 52.65, 105.58, 126.90, 127.89, 129.09, 130.61, 155.97, 163.11, 163.36, 169.40.

CAPÍTULO 6: ESPECTROS SELECCIONADOS

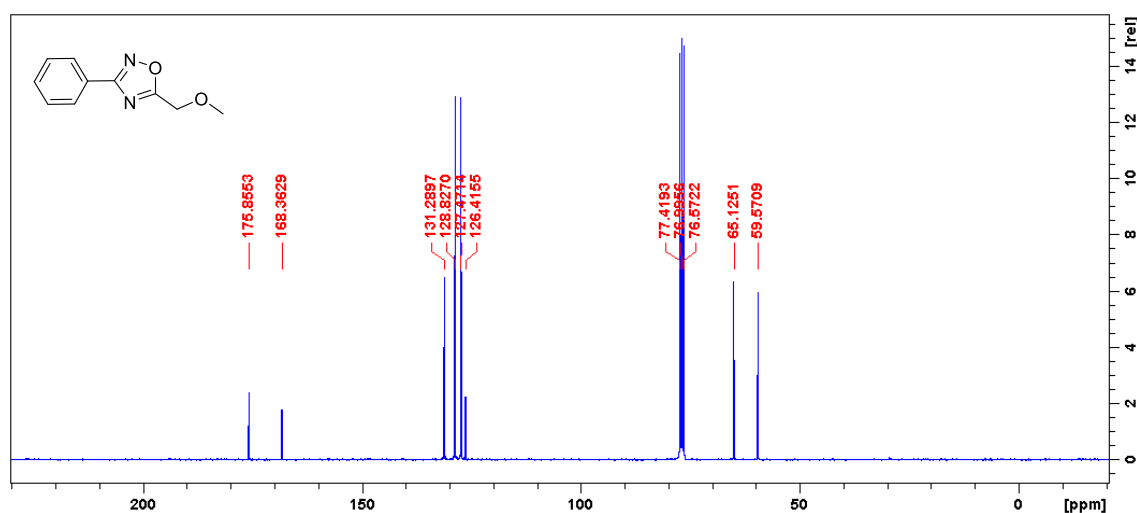
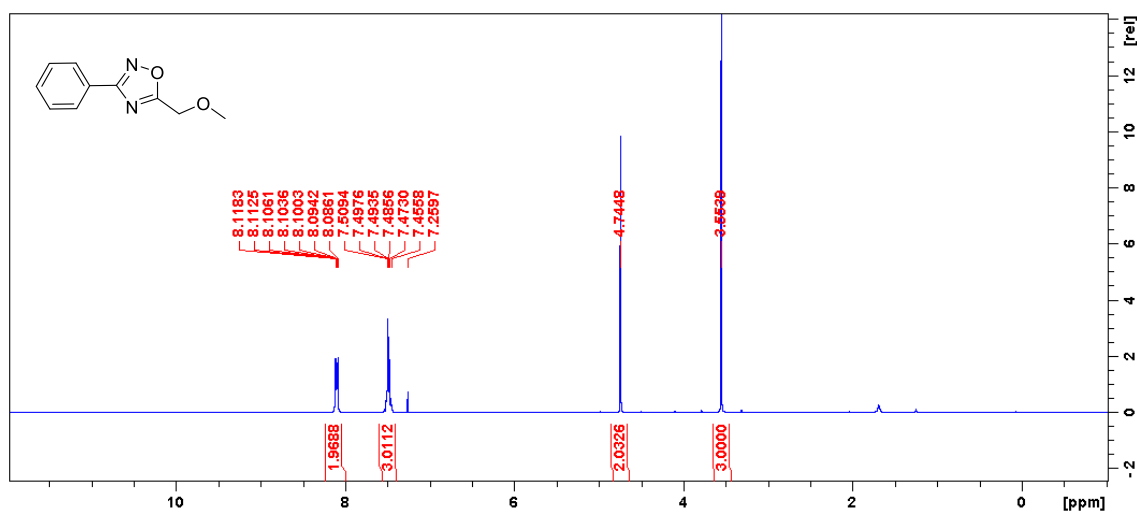
6.1. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **33b1**.

 6.2. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **33ba**.



 6.3. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **36b**.


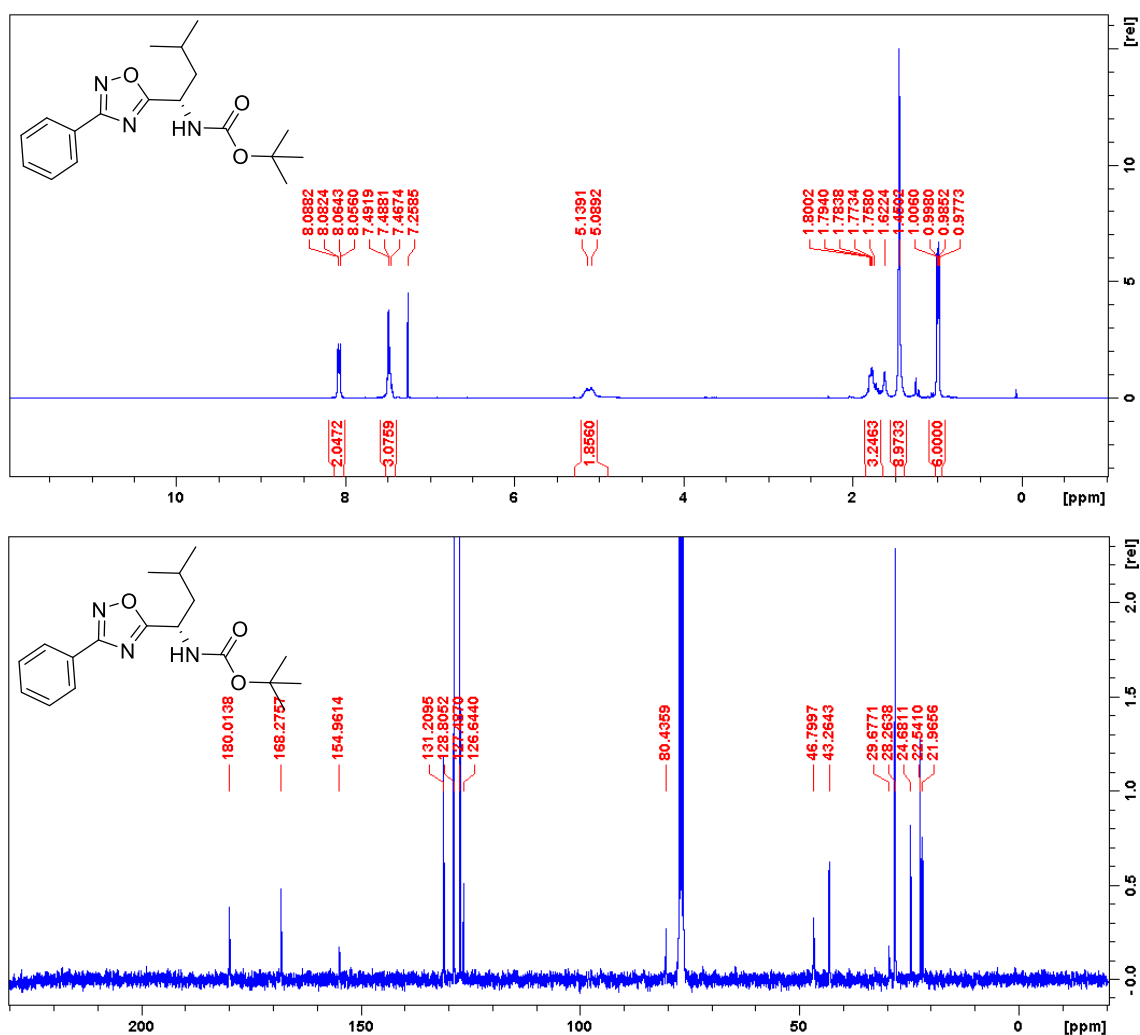
6.4. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **36a** (En acetona- d)

 6.5. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **36c**




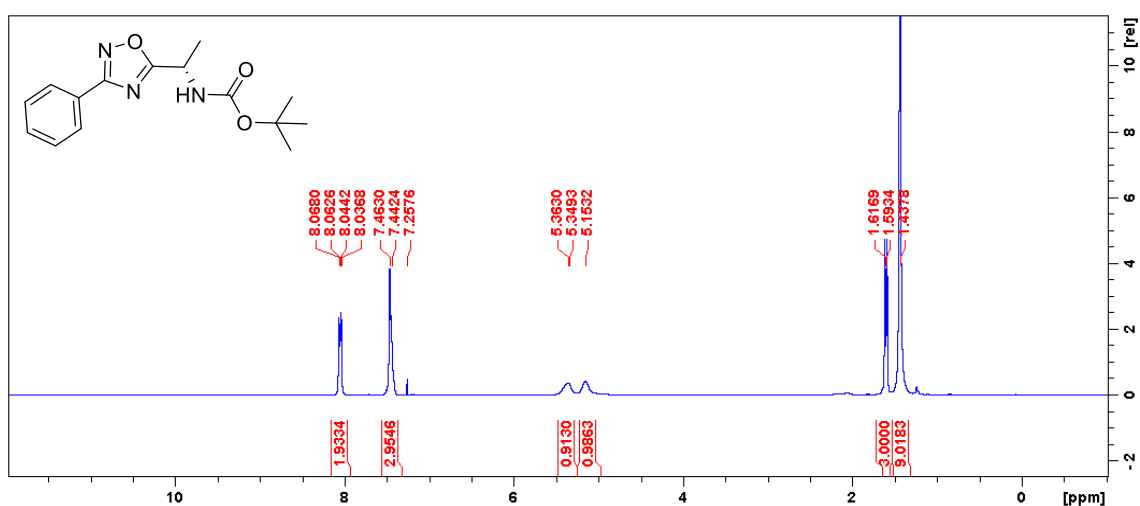
6.6. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **17a1**.

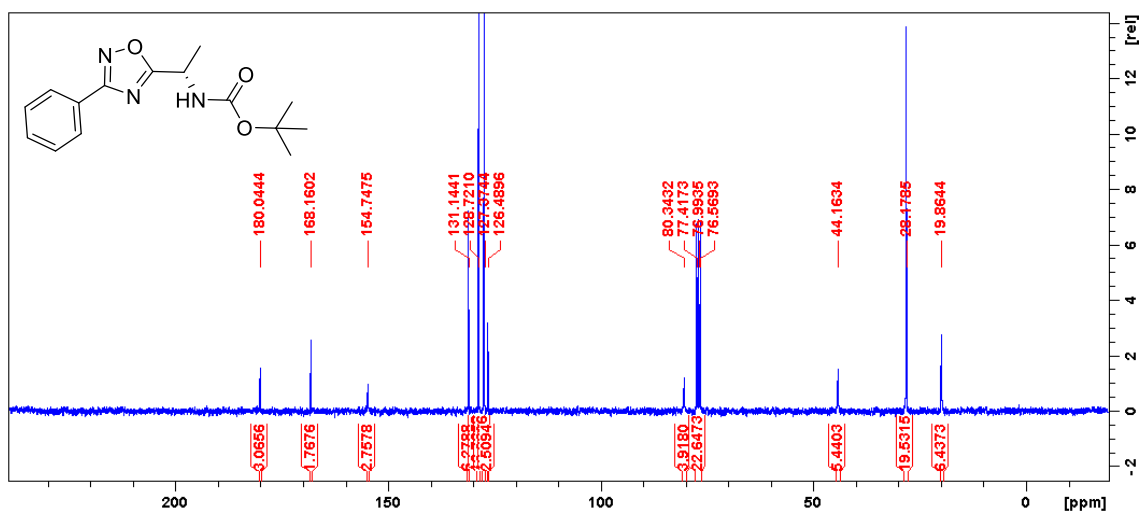


6.7. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **39ab**.

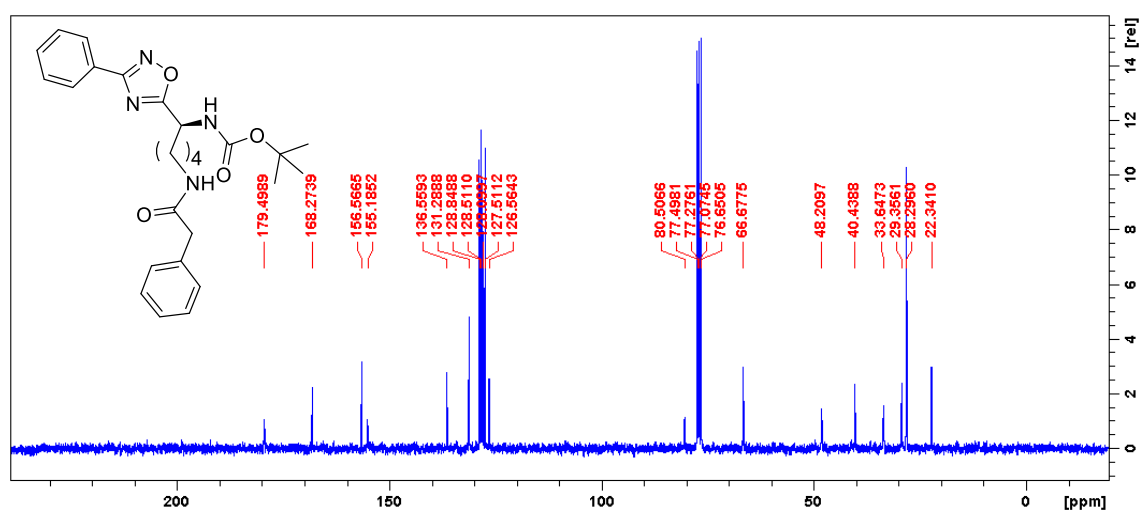
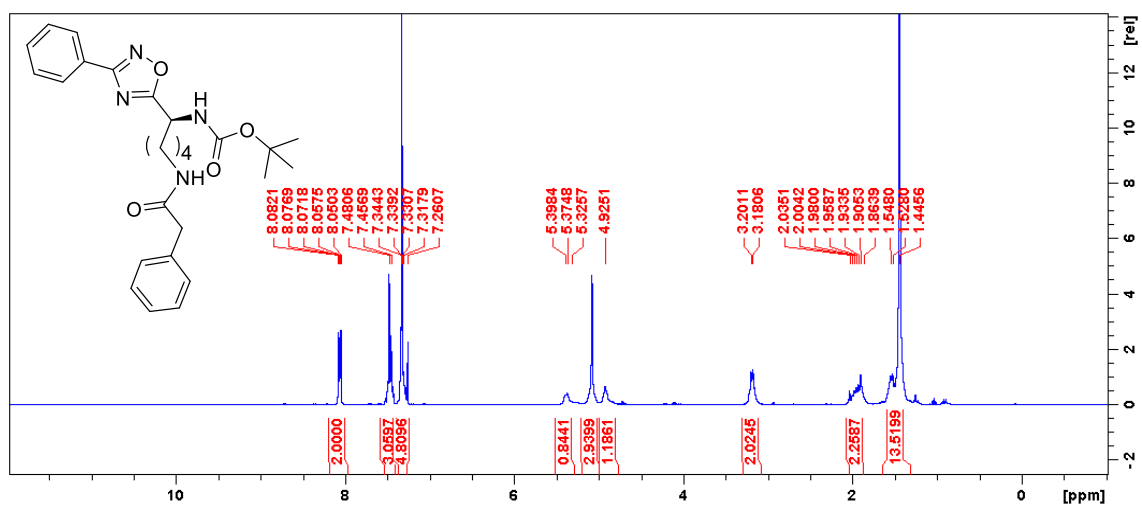


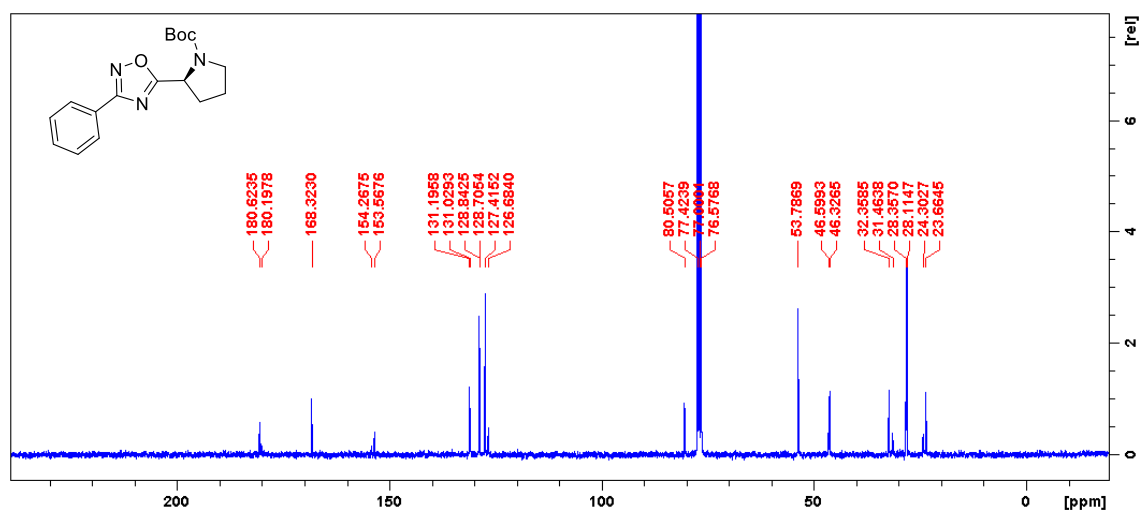
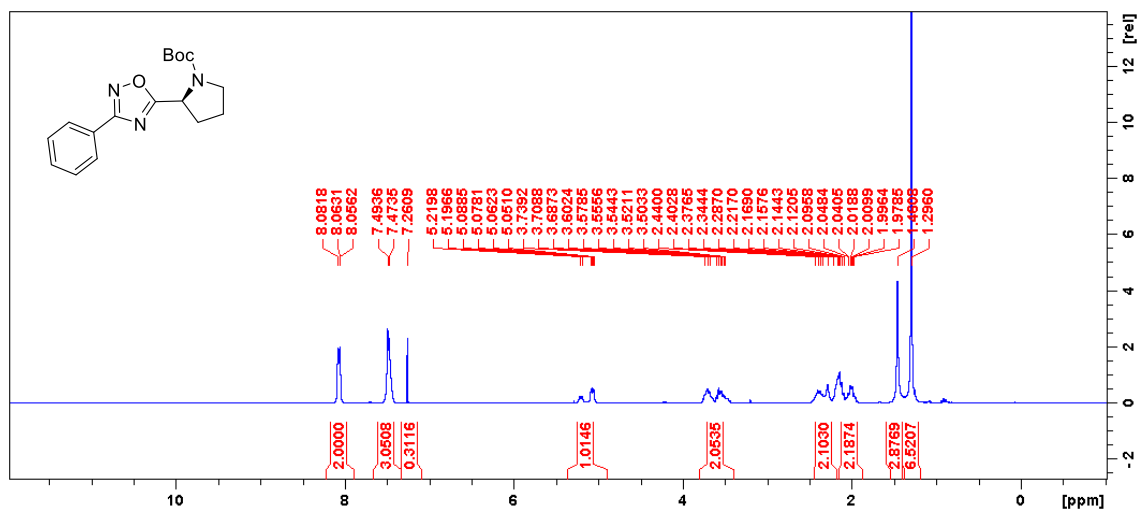
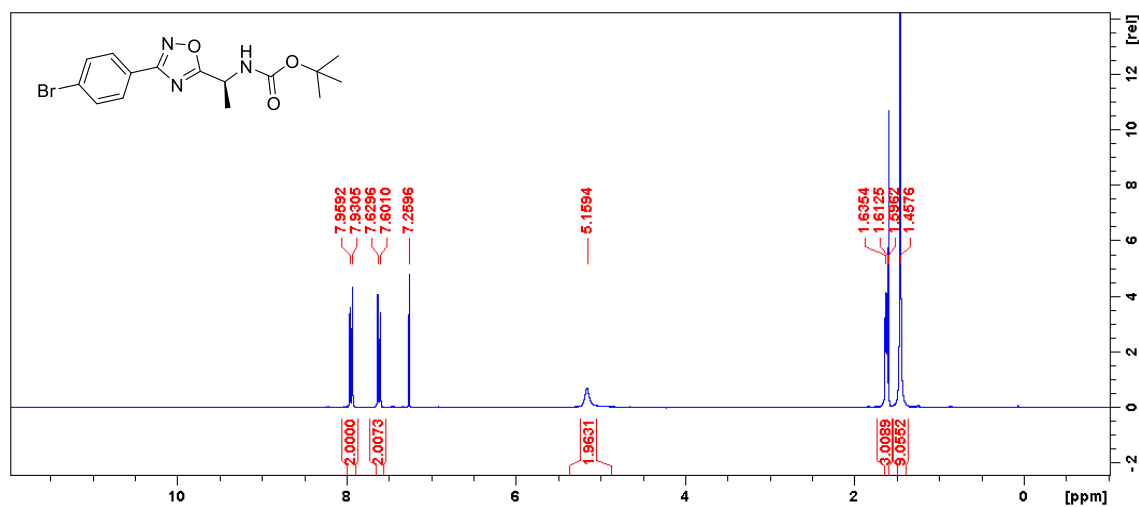
6.8. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **39af**.

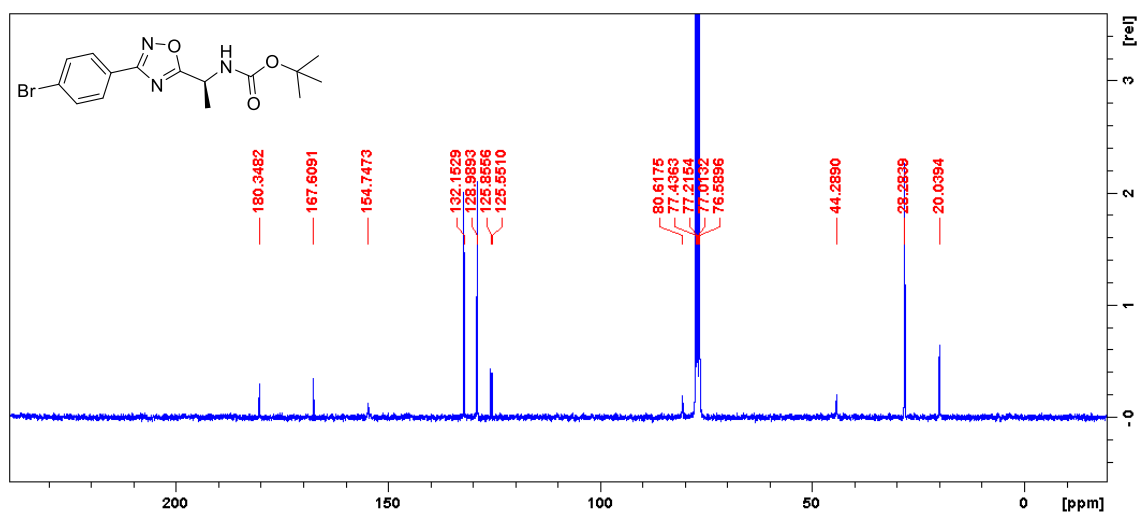
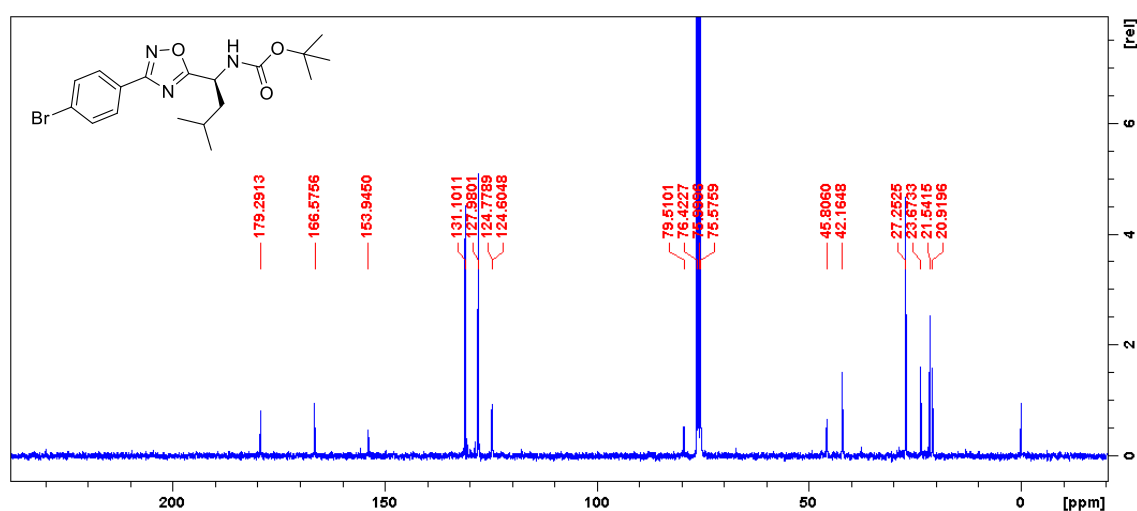
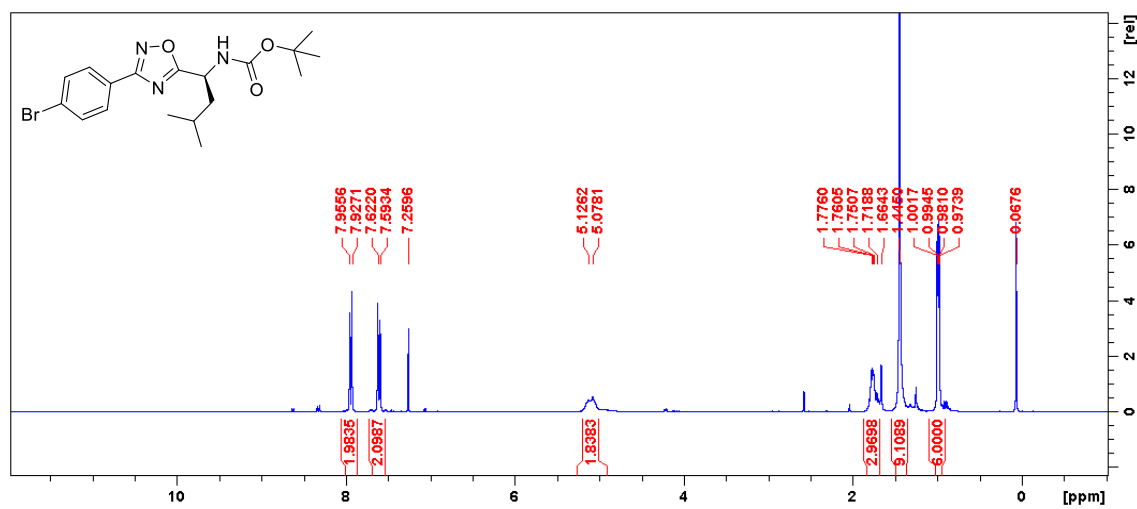


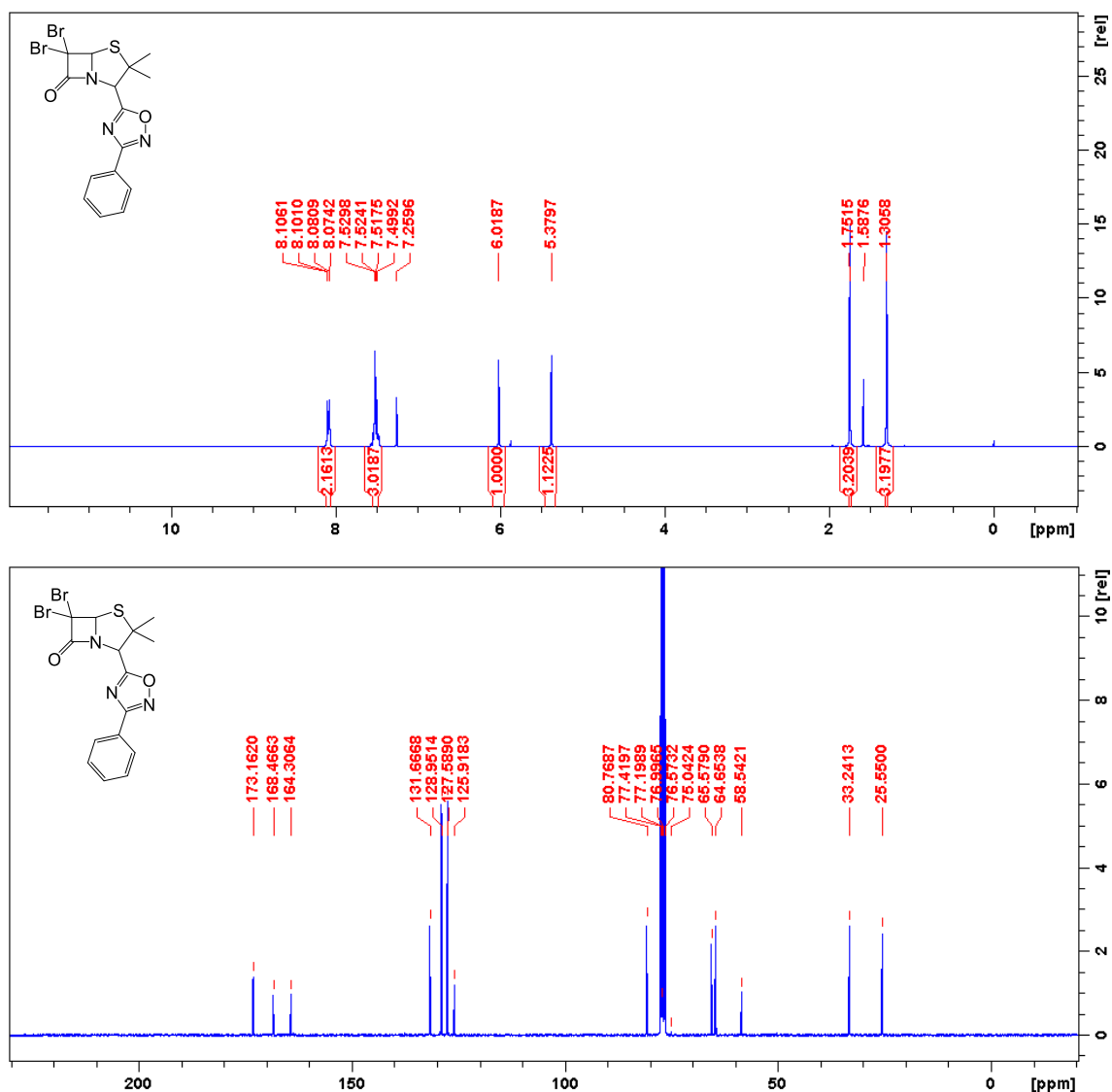
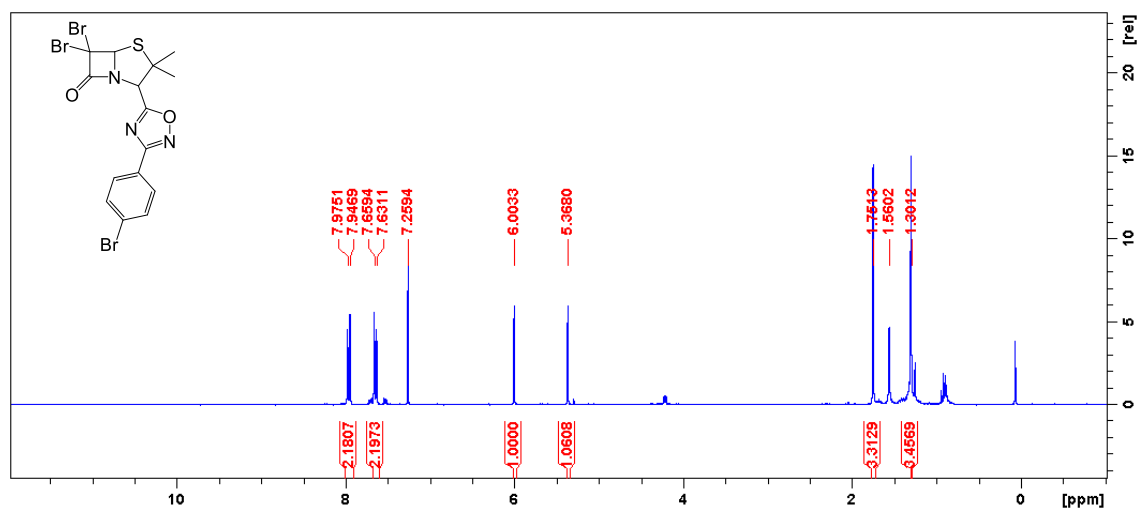


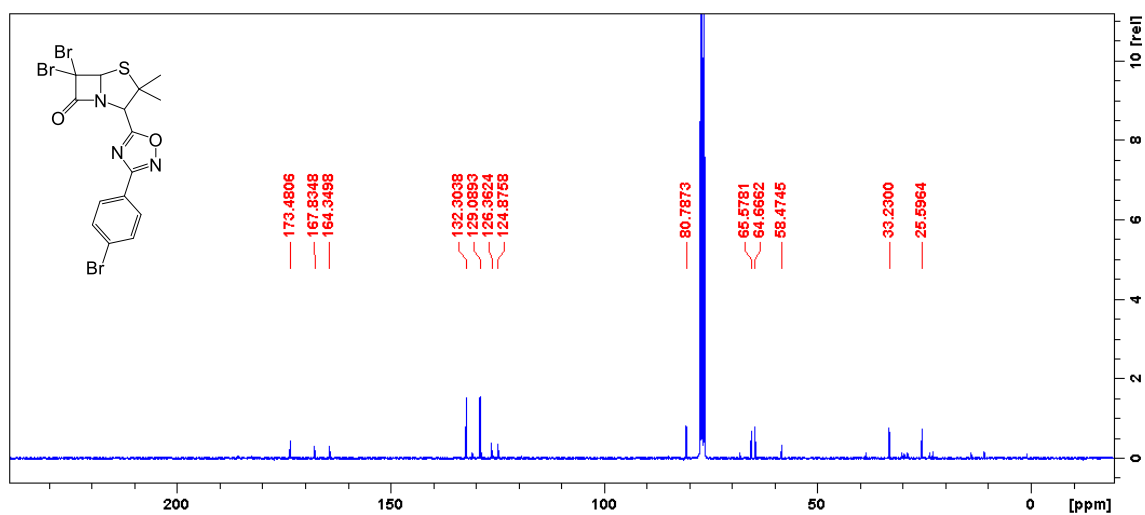
6.9. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **39ah**.



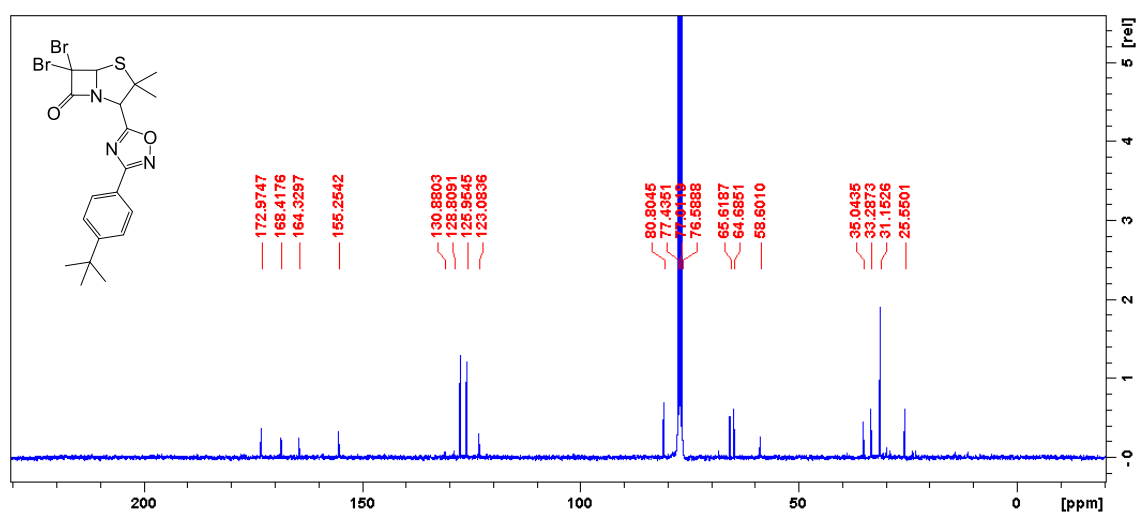
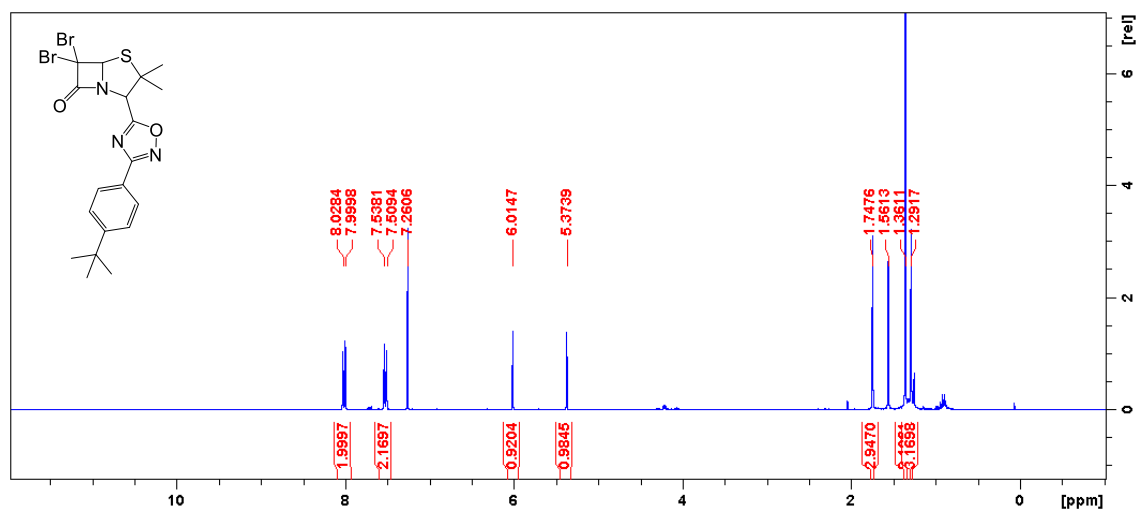
6.10. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **39ae**.

 6.11. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **39bf**.


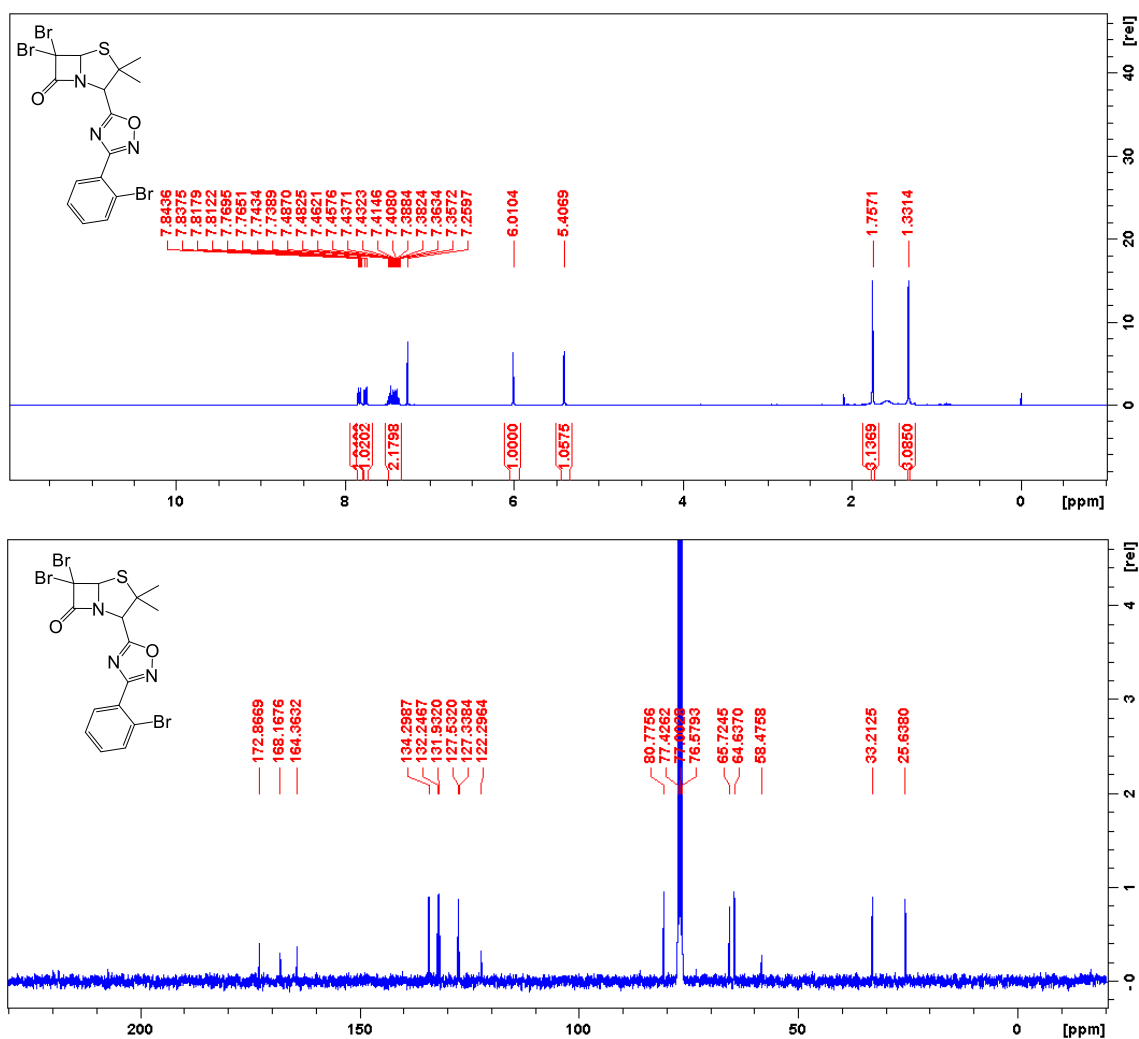
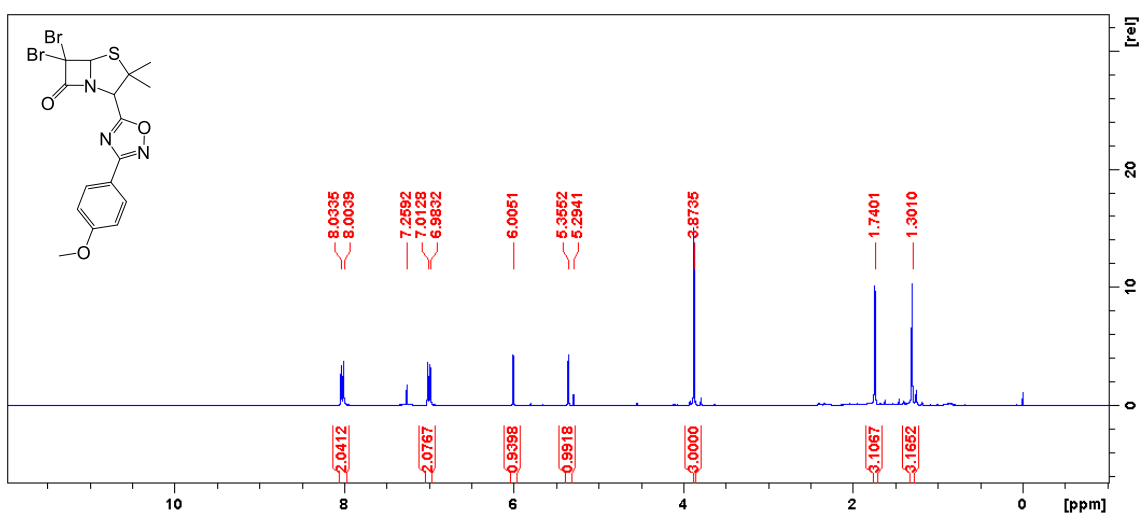

 6.12. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **39bb**.


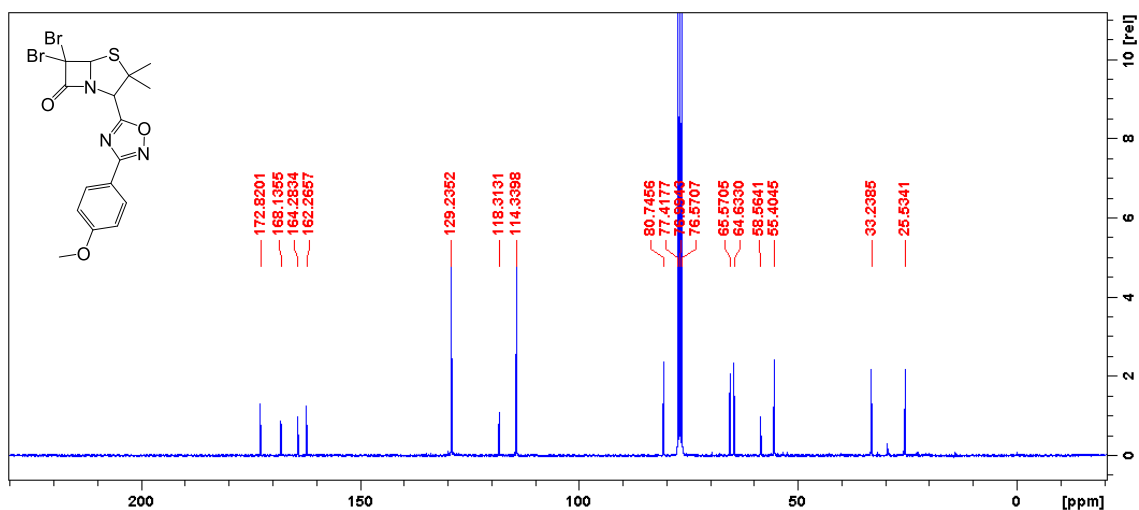
6.13. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41a**.

 6.14. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41b**.




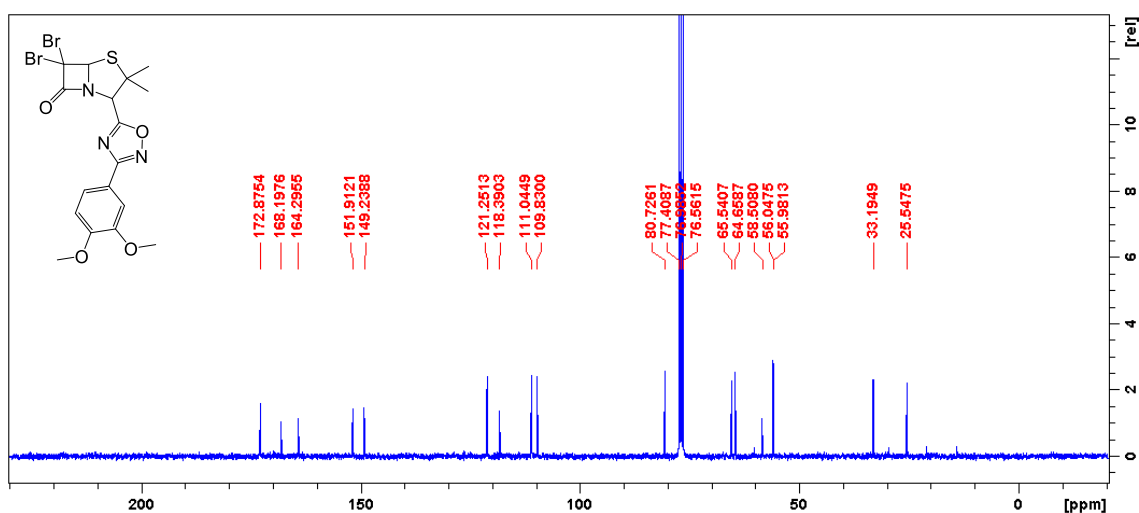
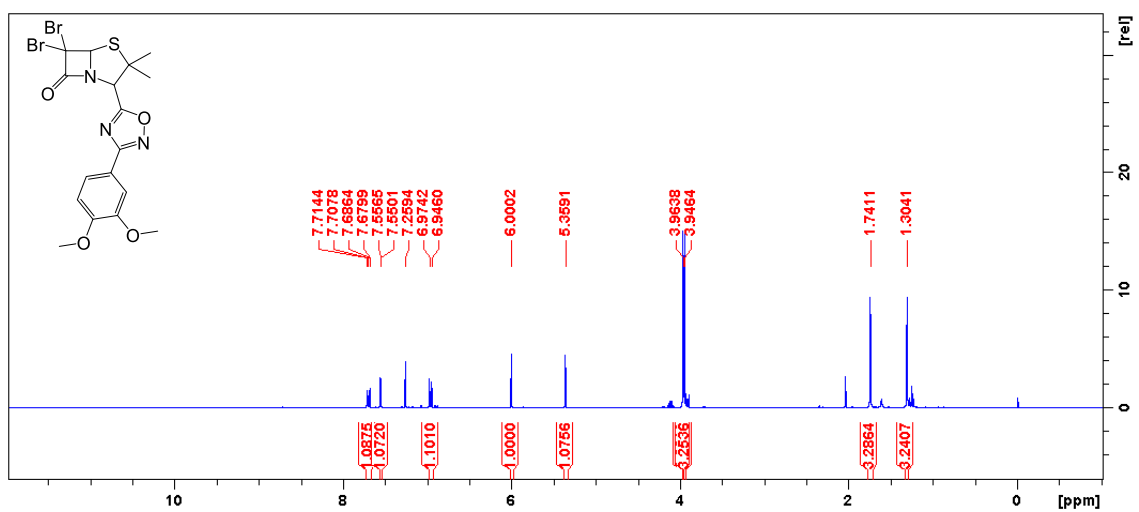
6.15. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41c**.

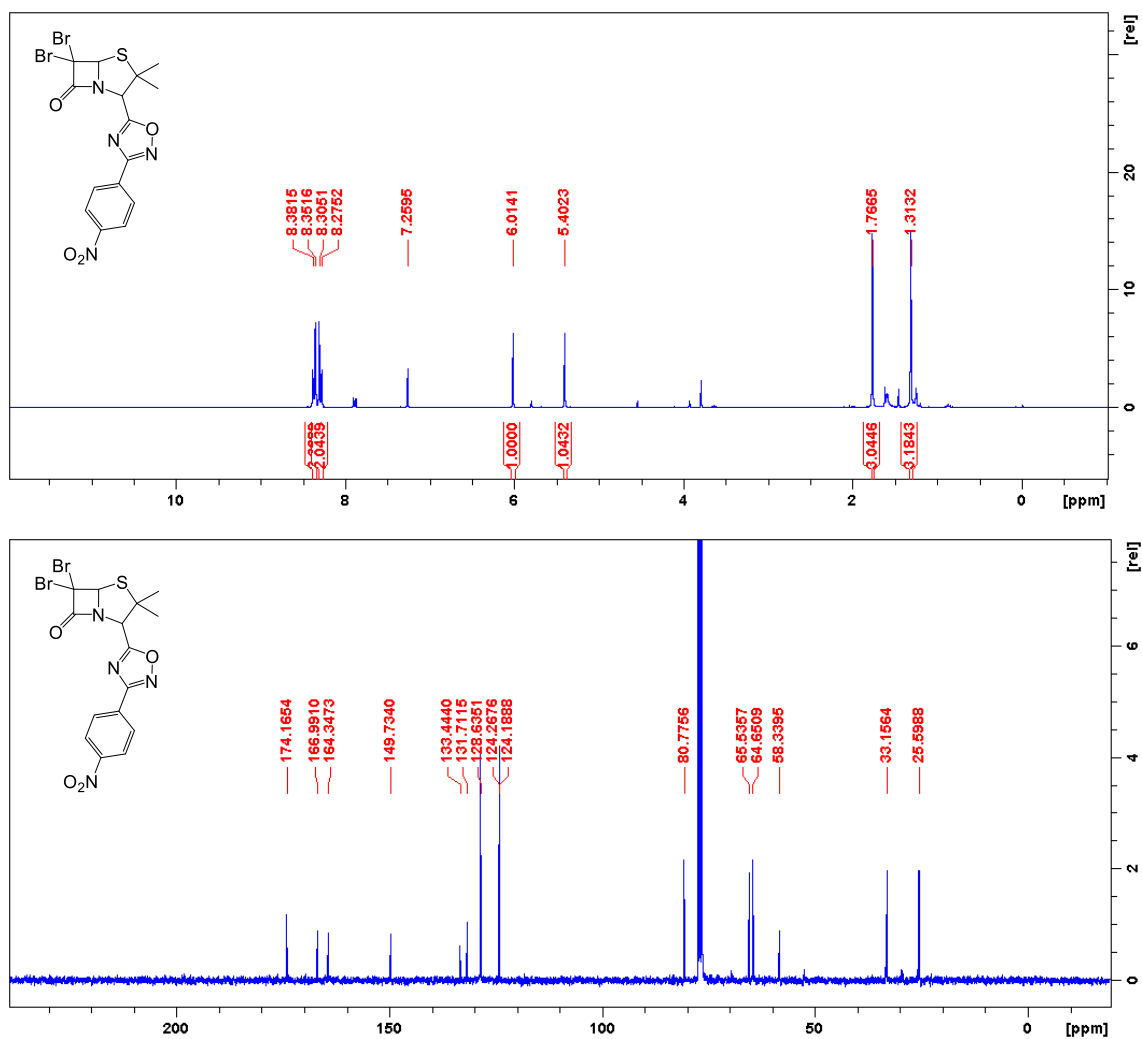
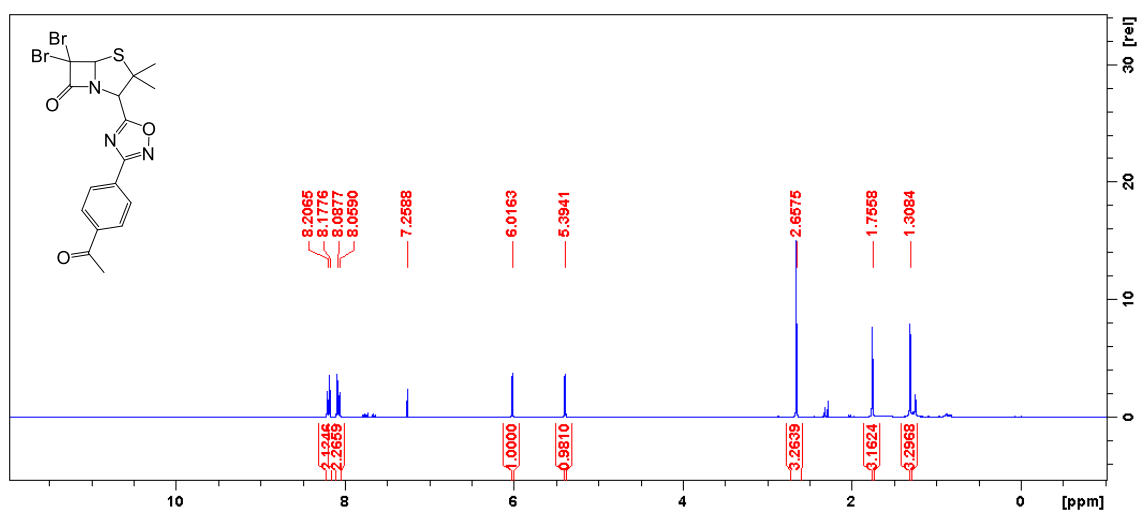


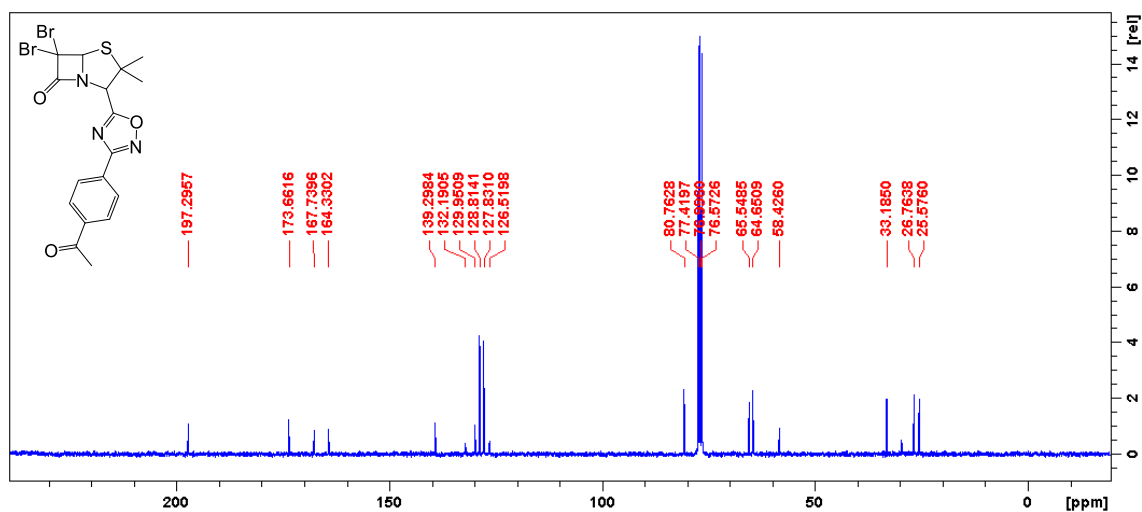
6.16. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41i**.

 6.17. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41f**.




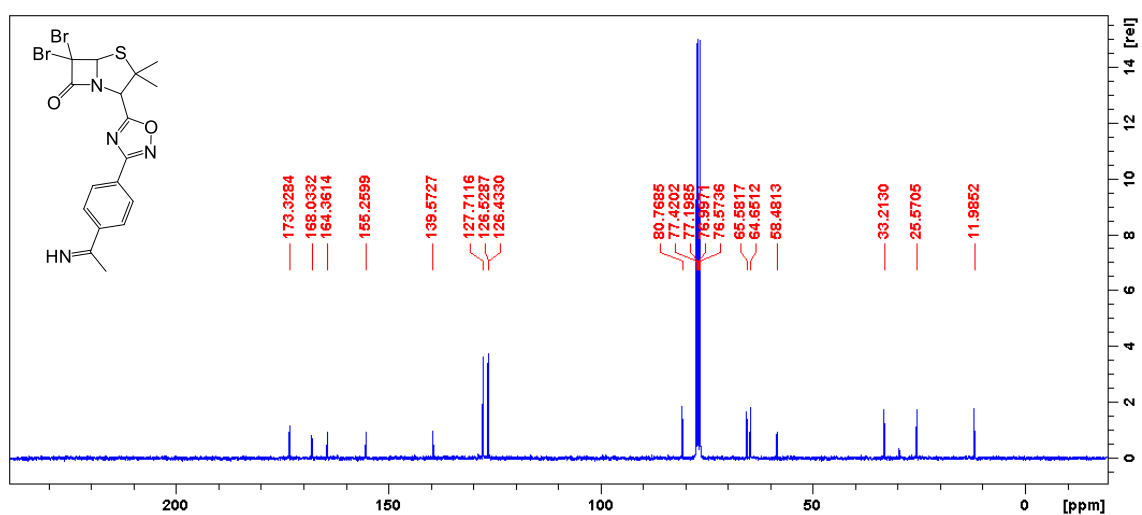
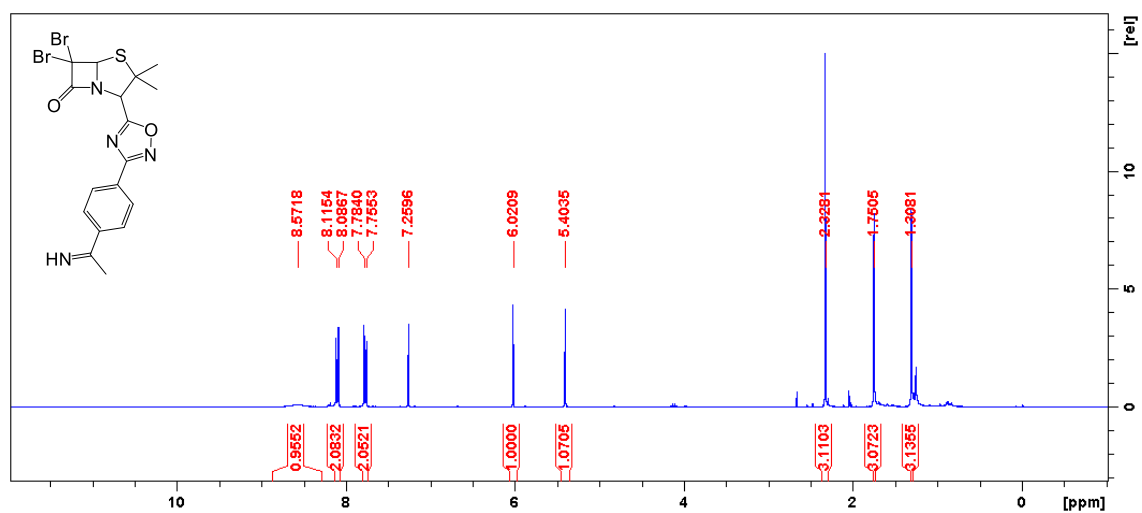
6.18. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41g**.

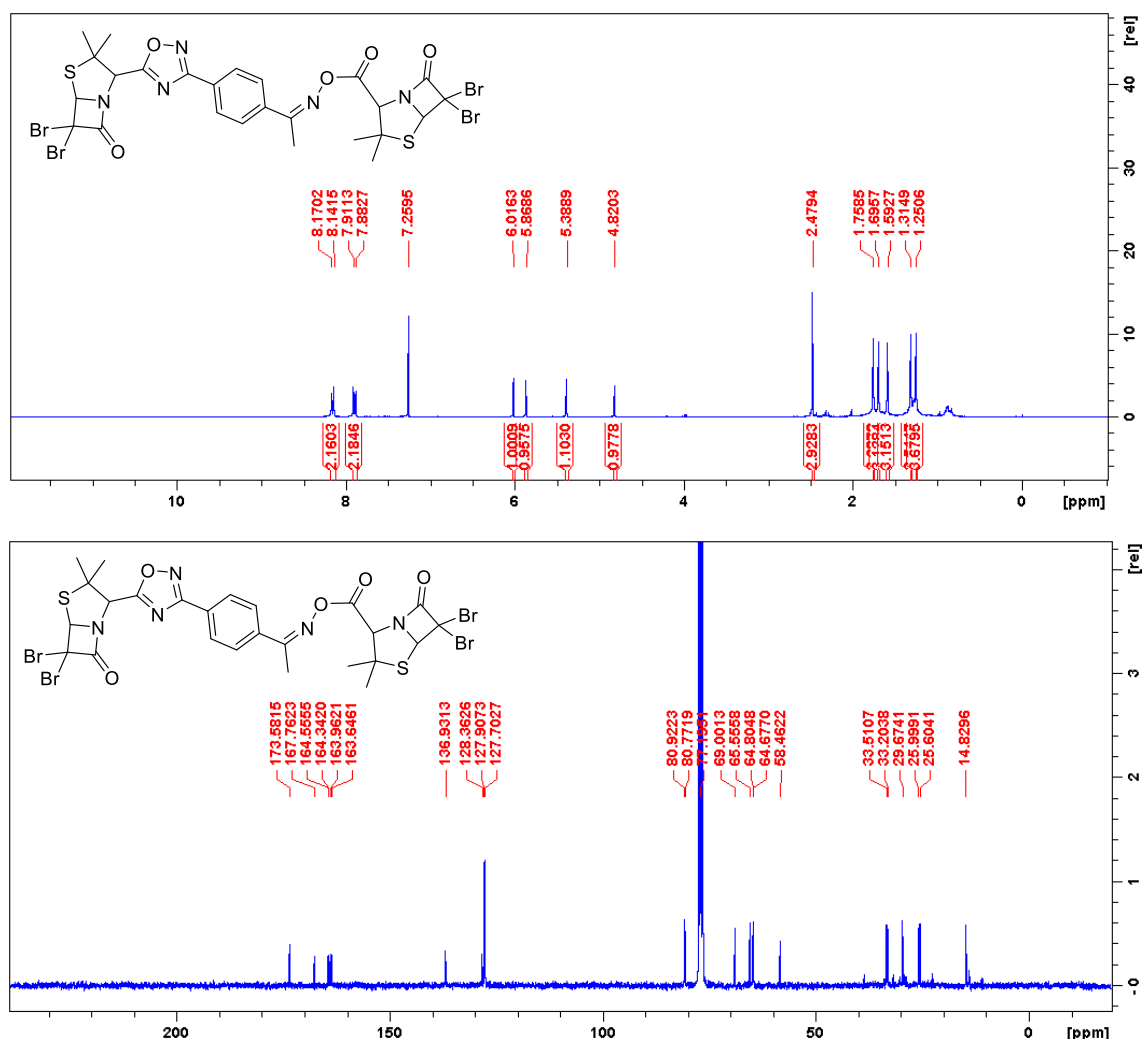
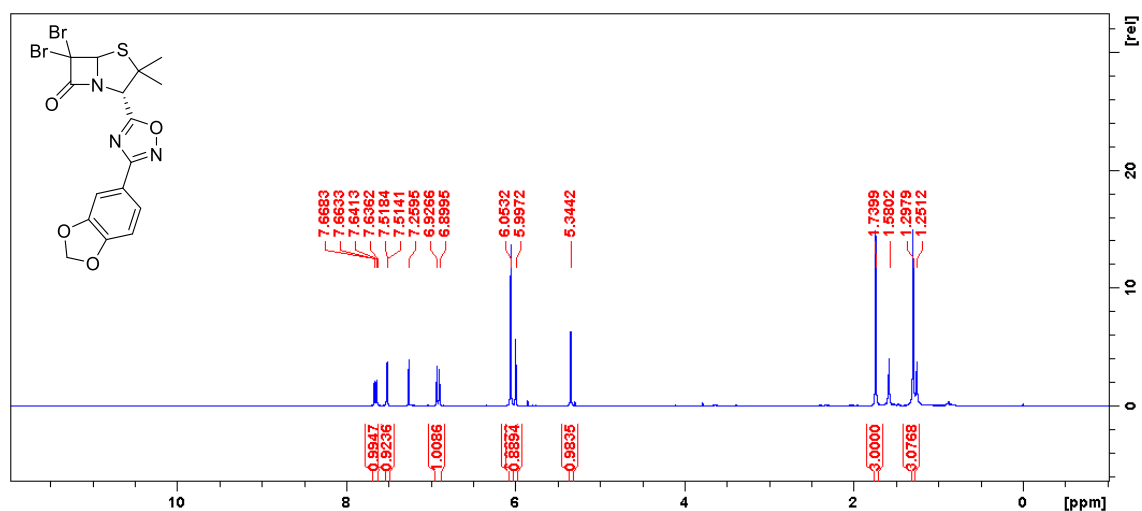


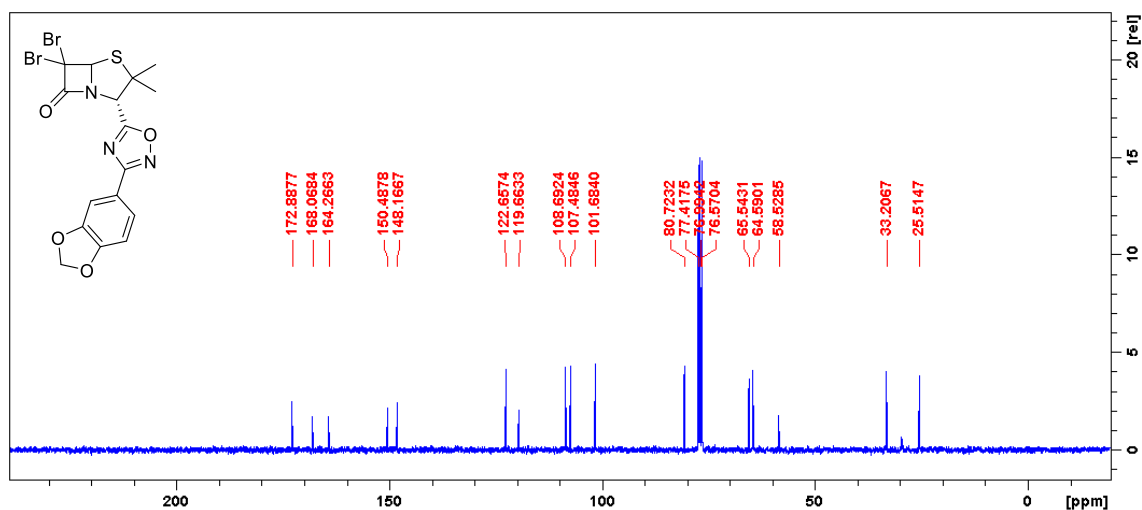
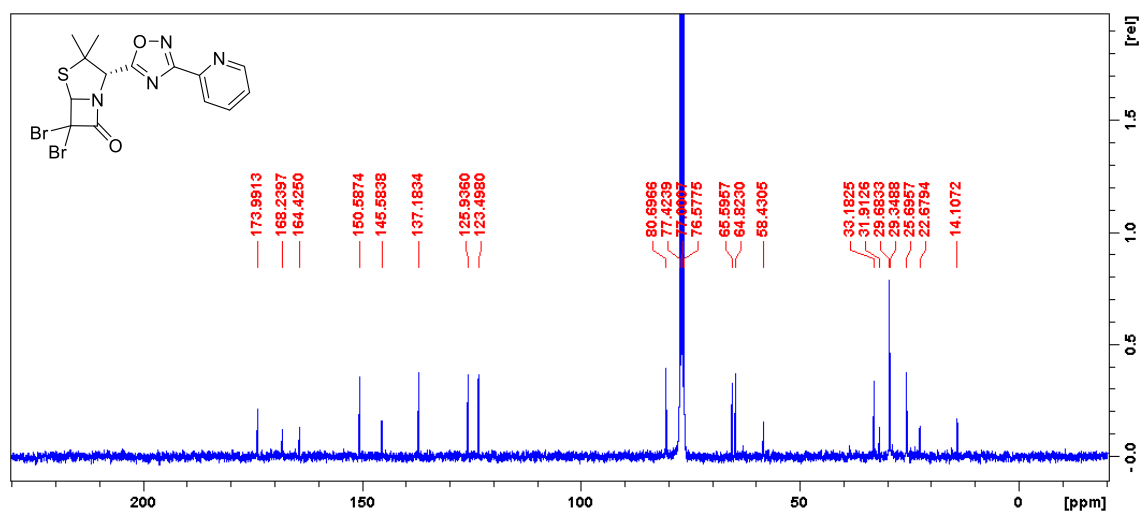
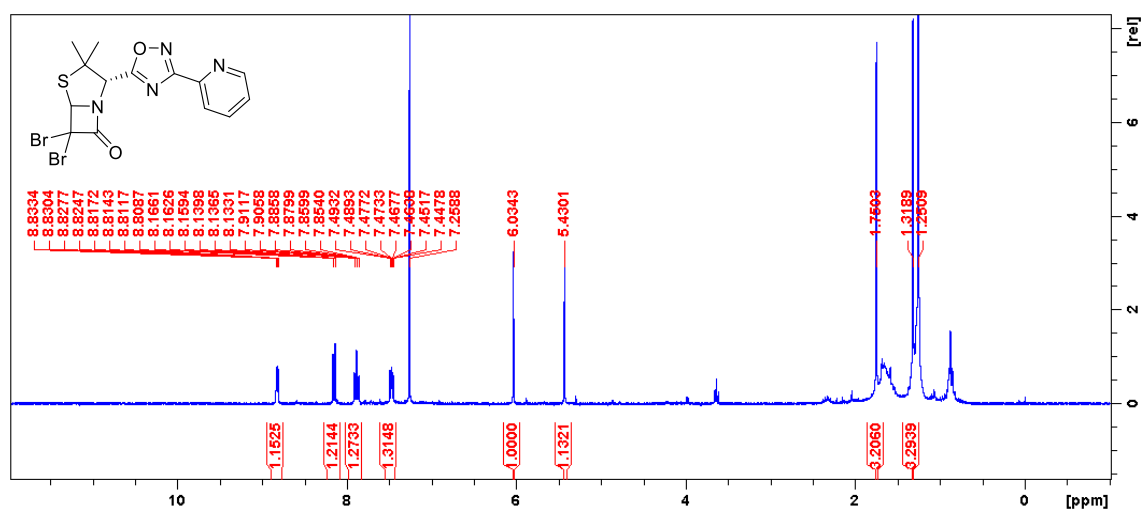
6.19. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41j**.

 6.20. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41k**.




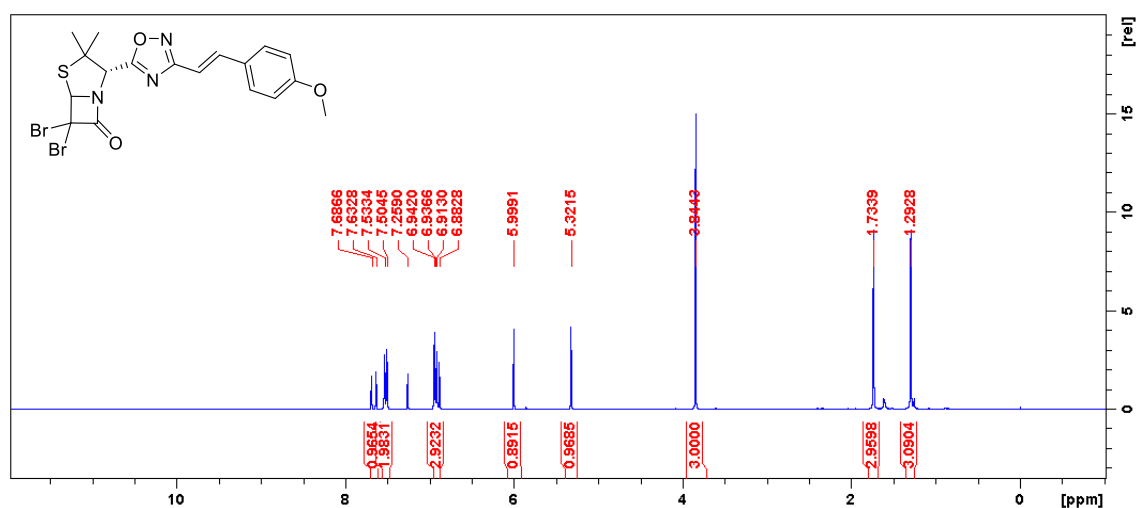
6.21. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **41I**.



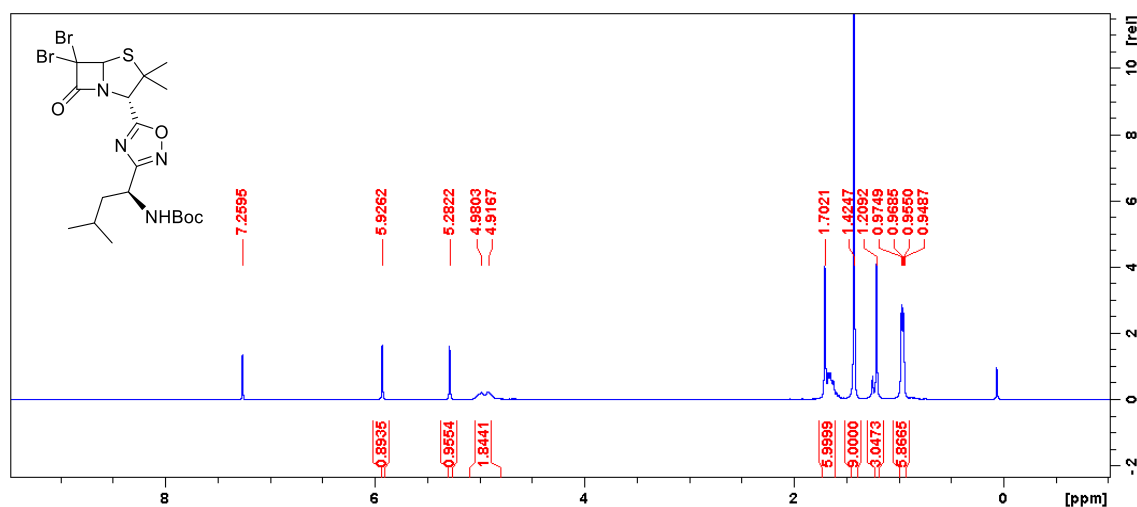
6.22. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41m**.

 6.23. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41d**.


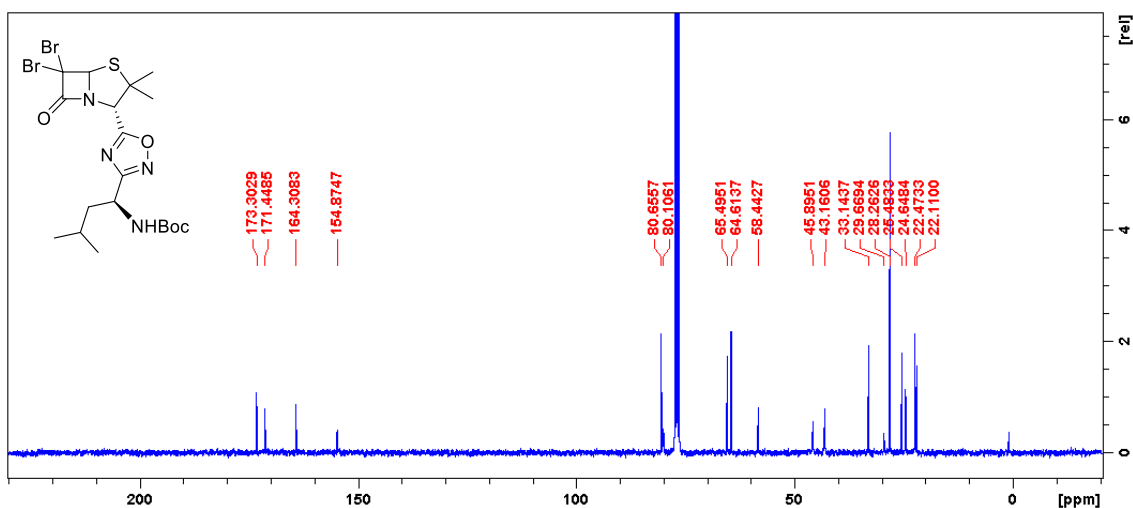
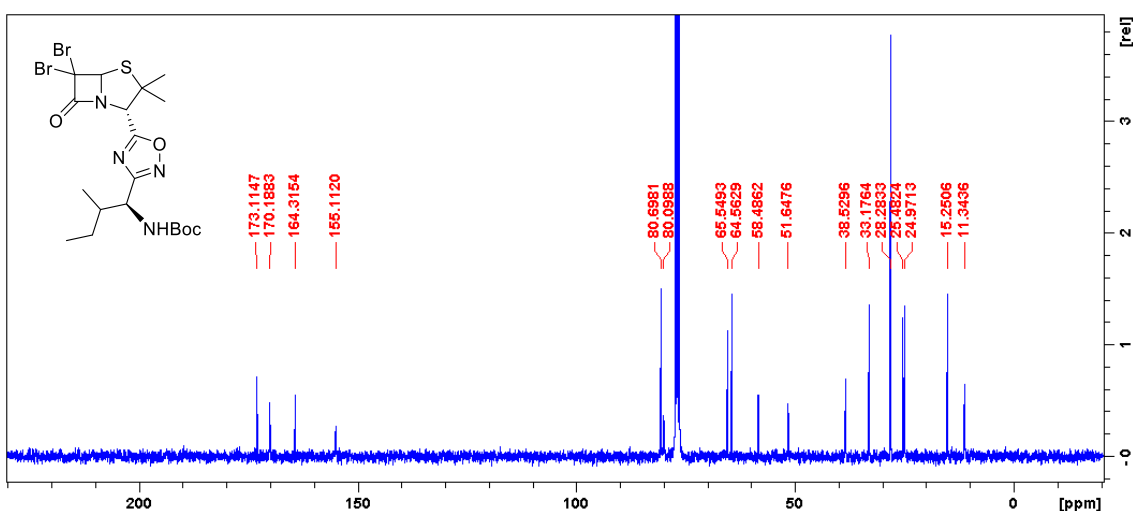
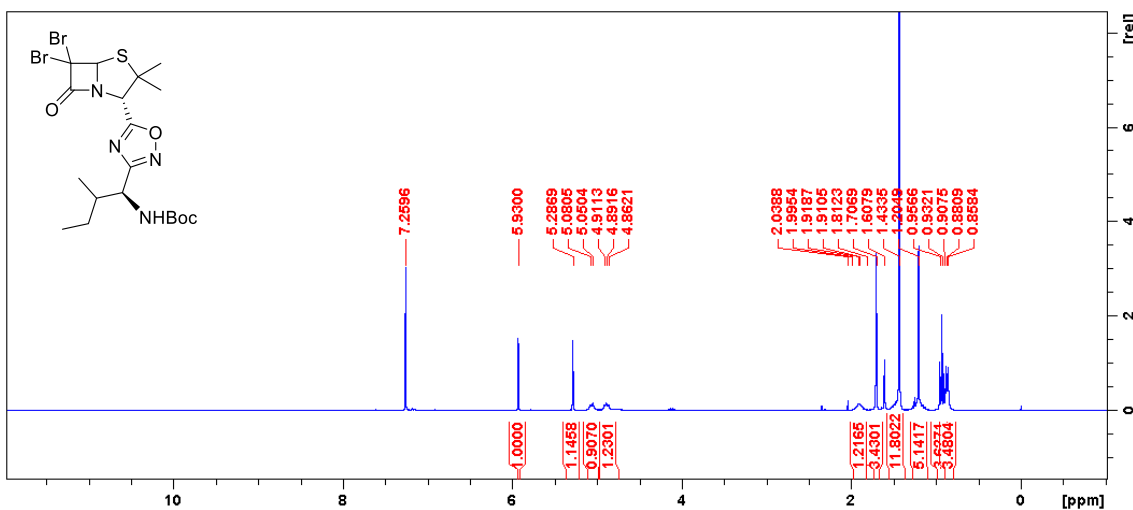

 6.24. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de 41h.


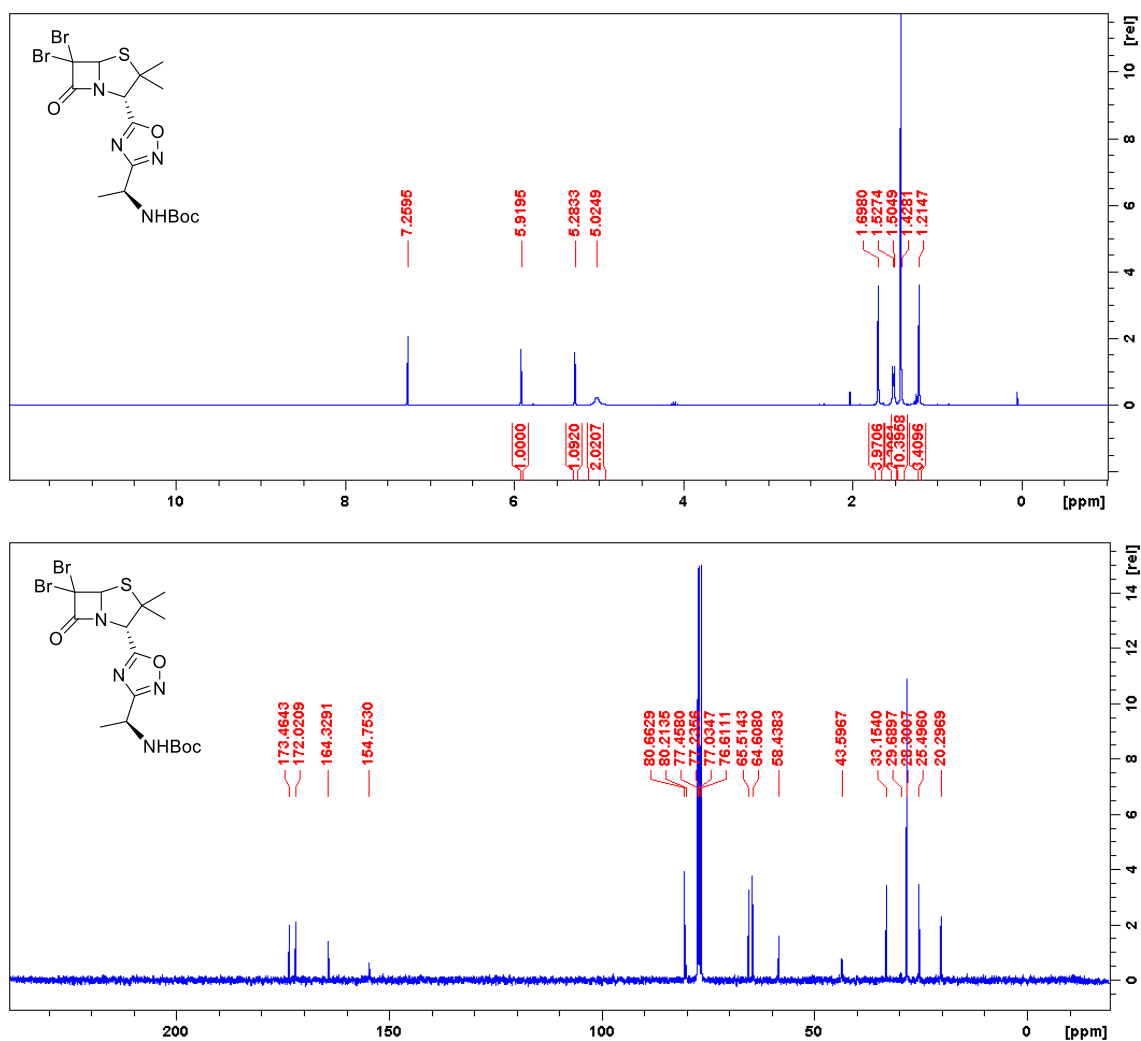
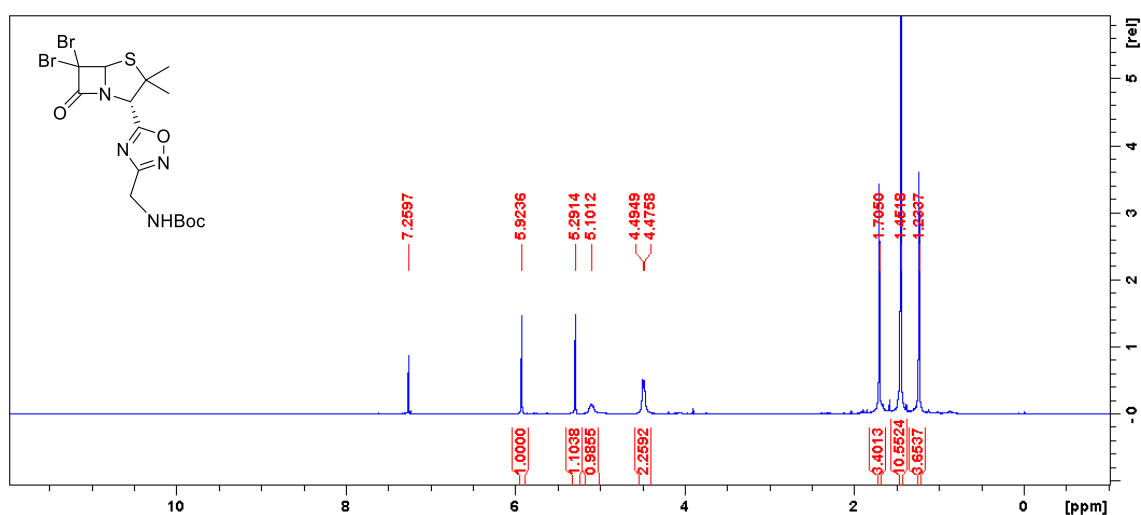
6.25. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **41e**.

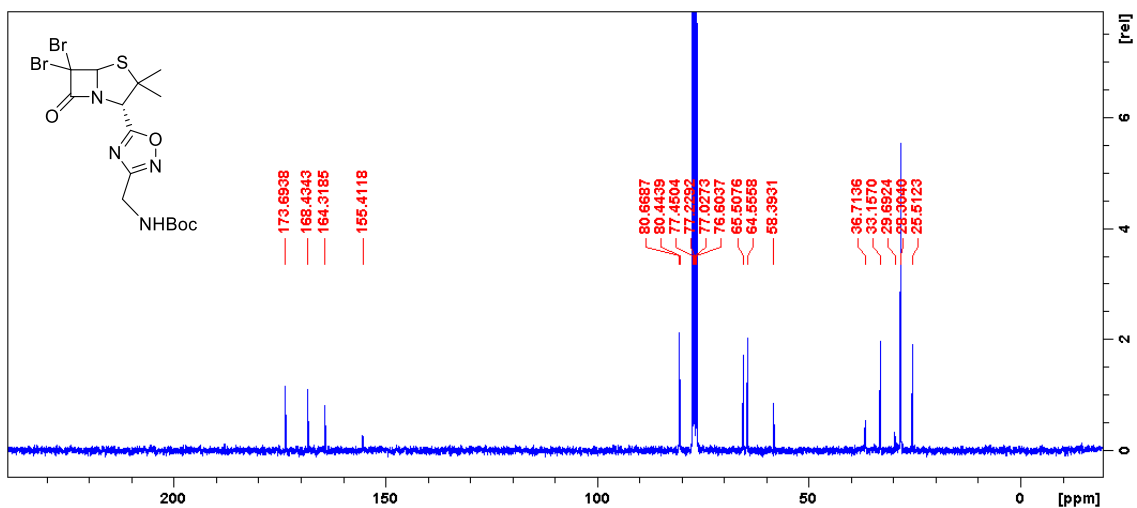
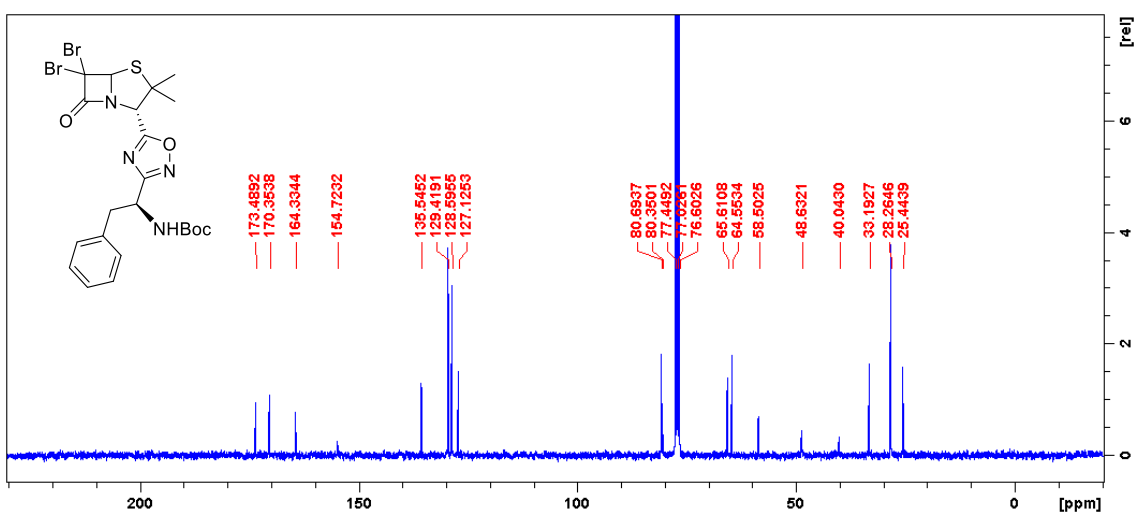
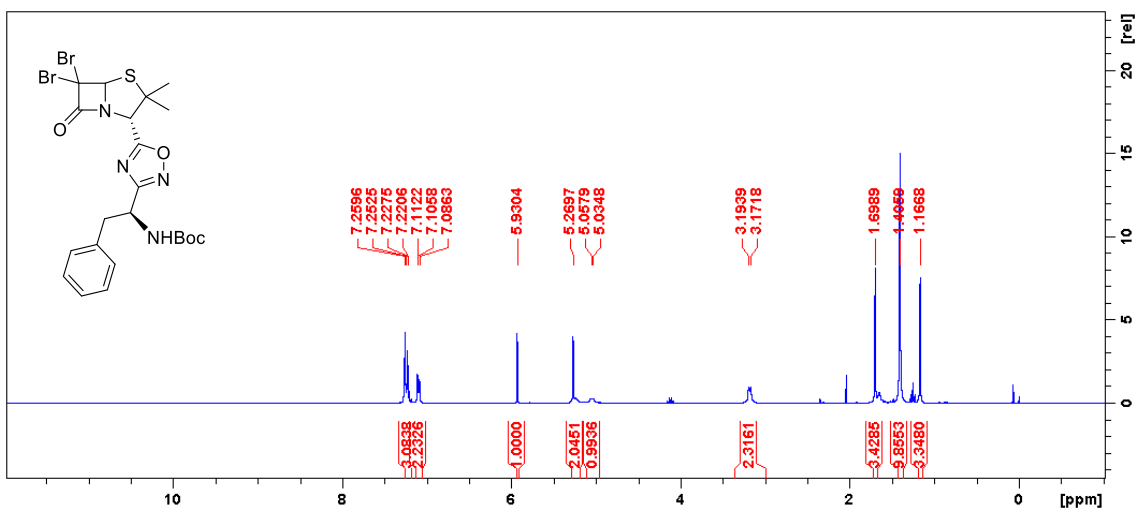


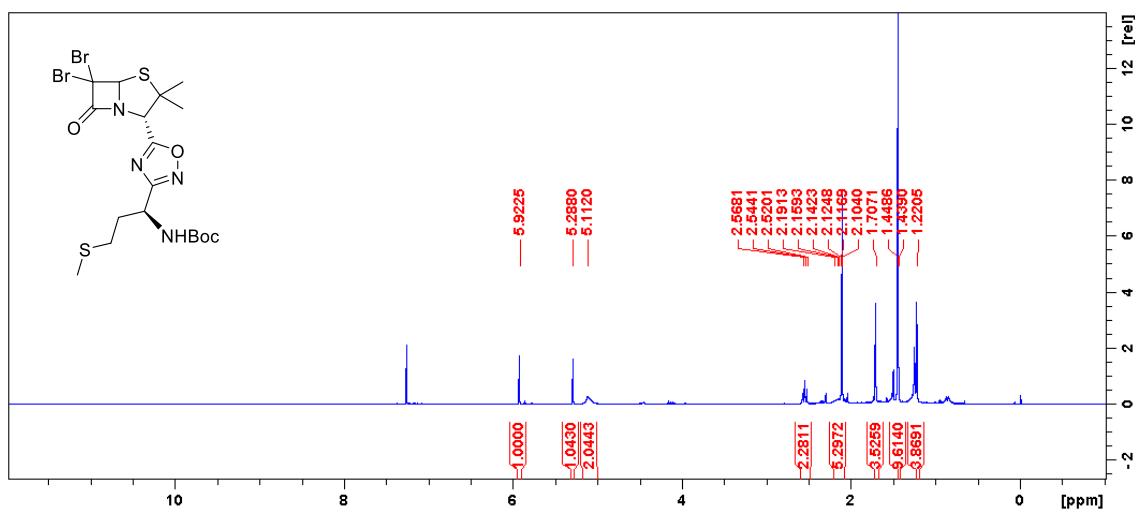
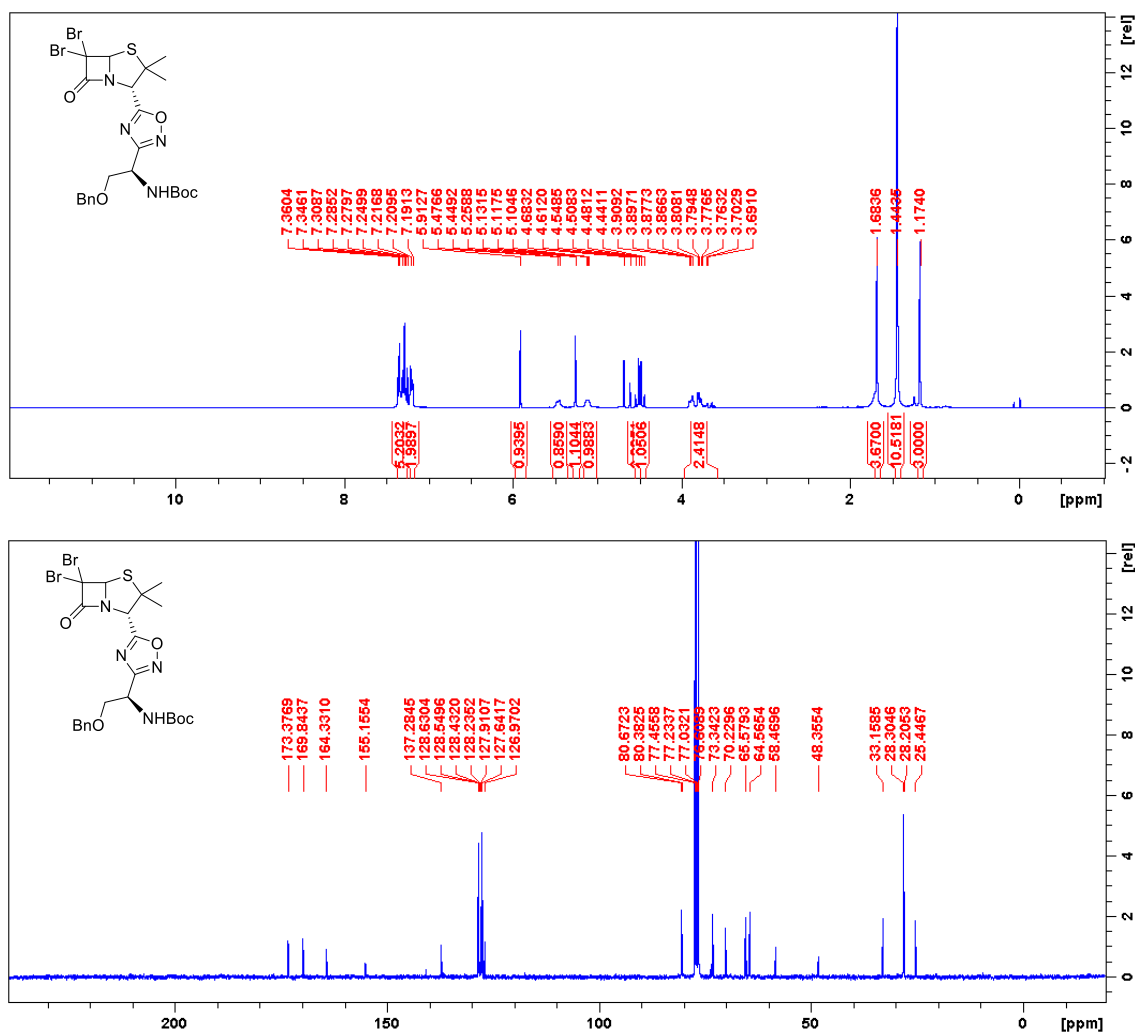
6.26. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44b**.

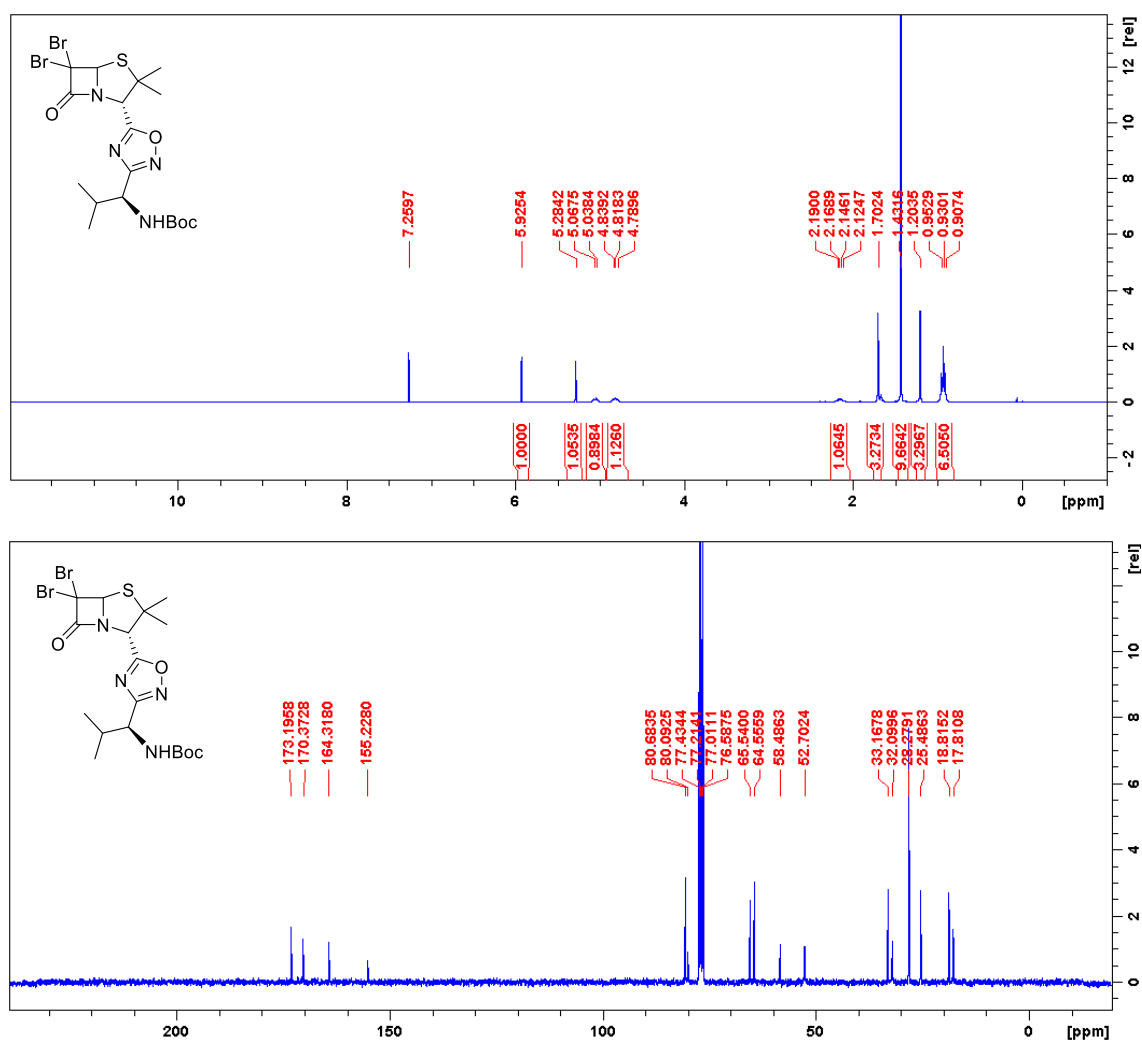
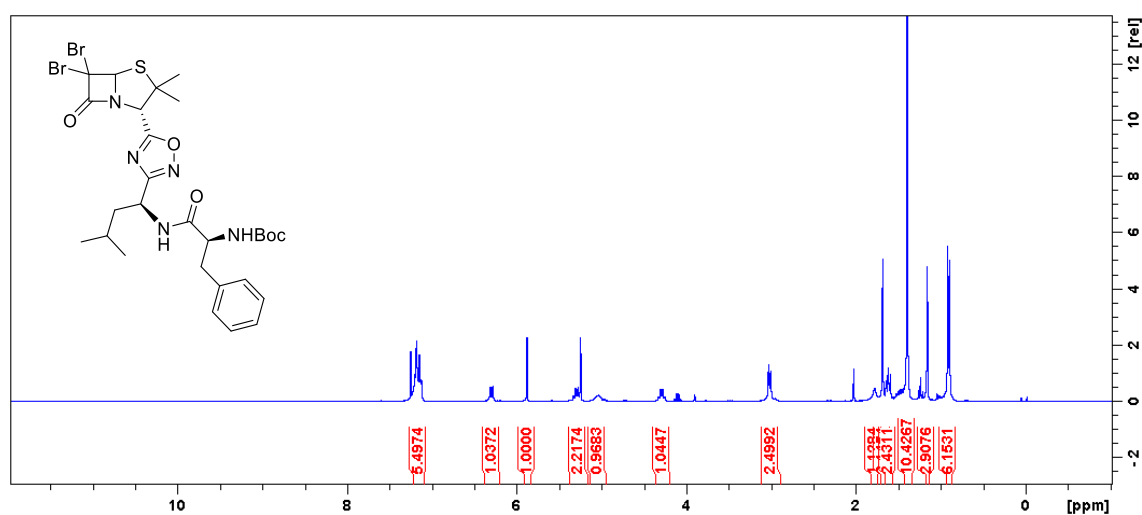


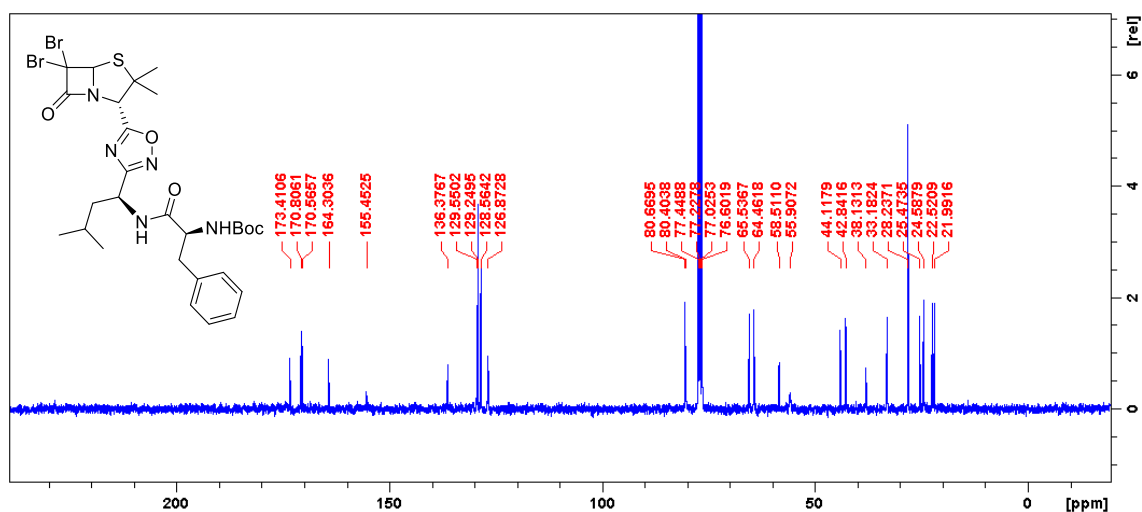
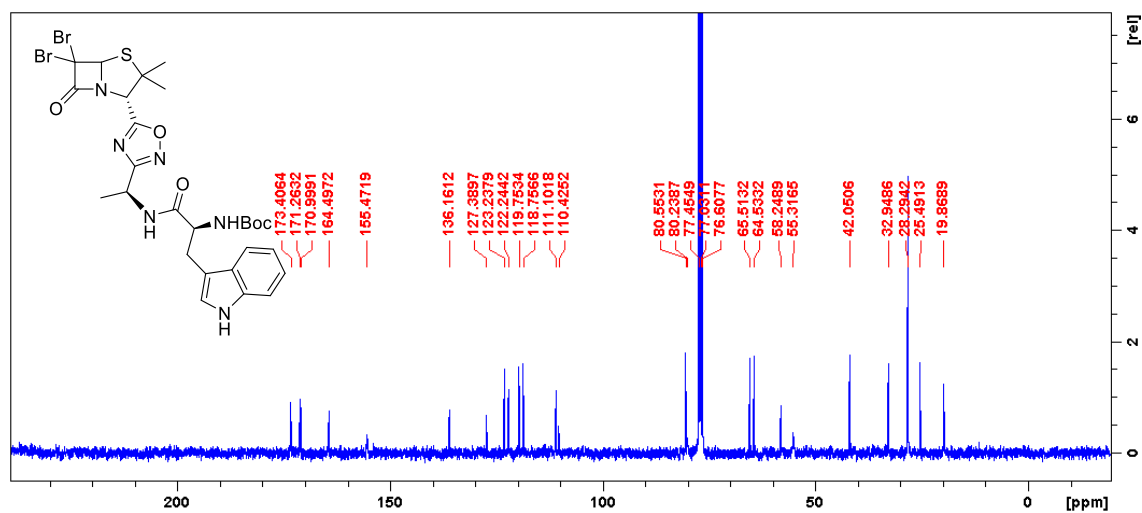
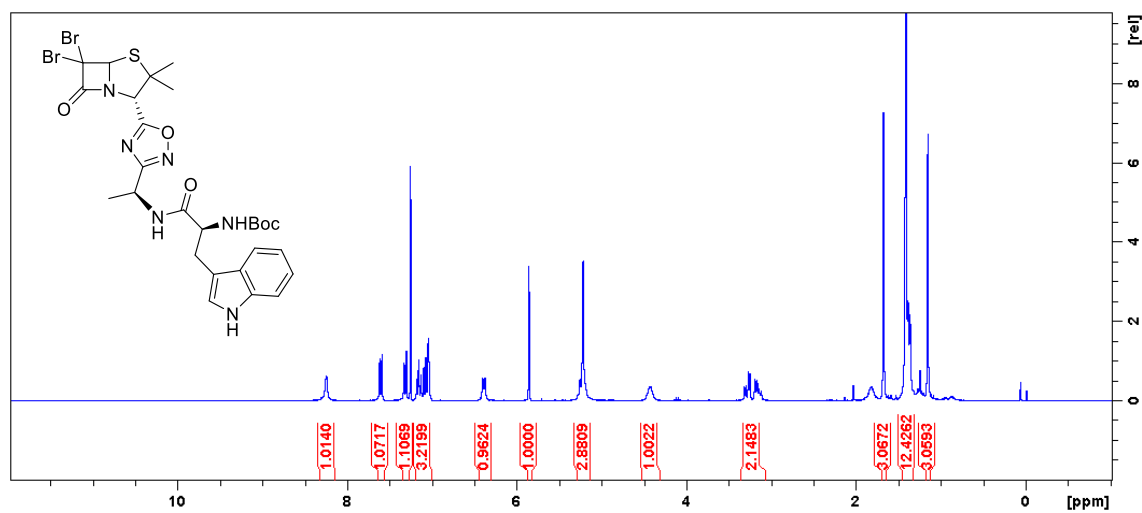

 6.27. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de 44h.


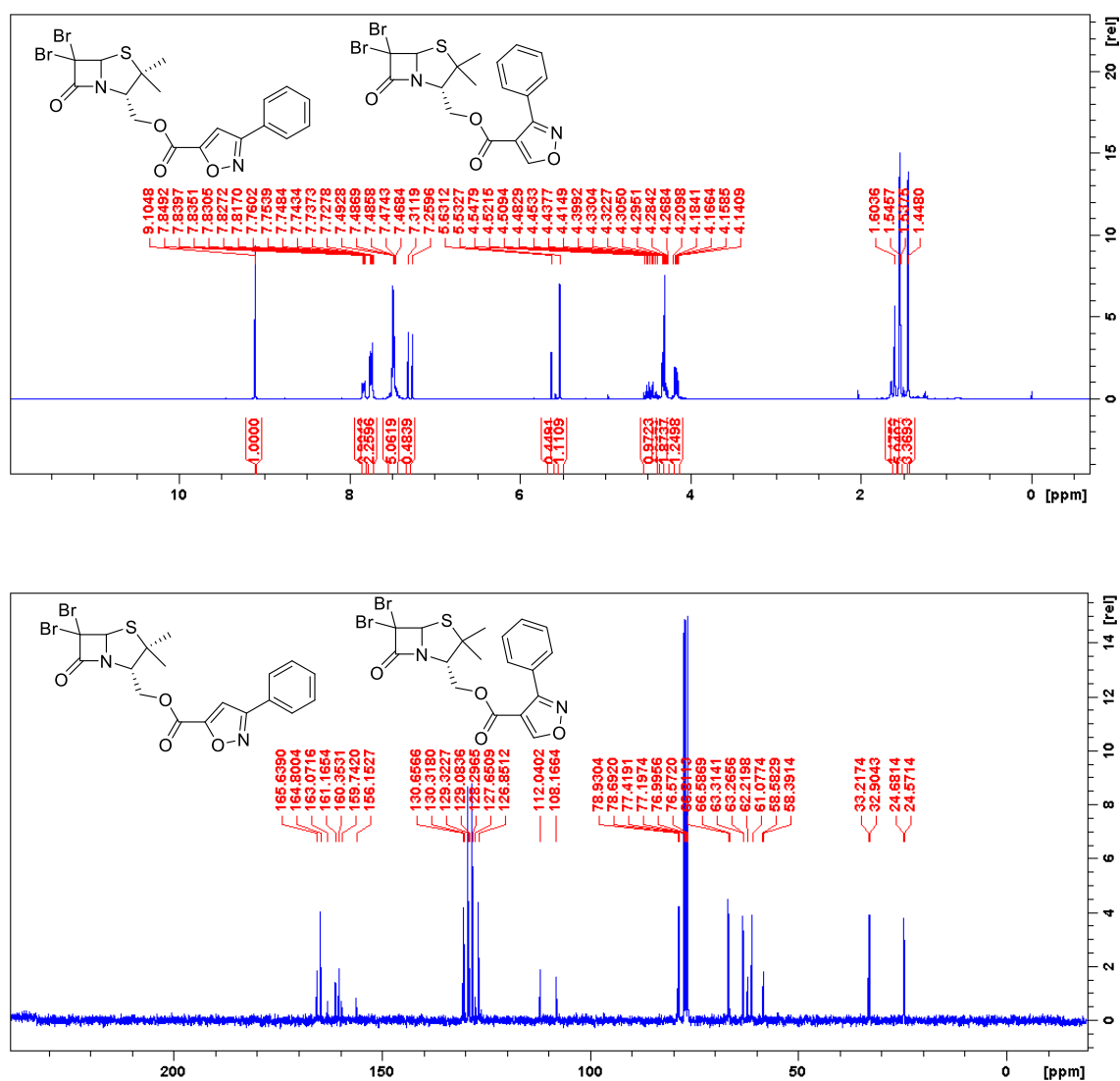
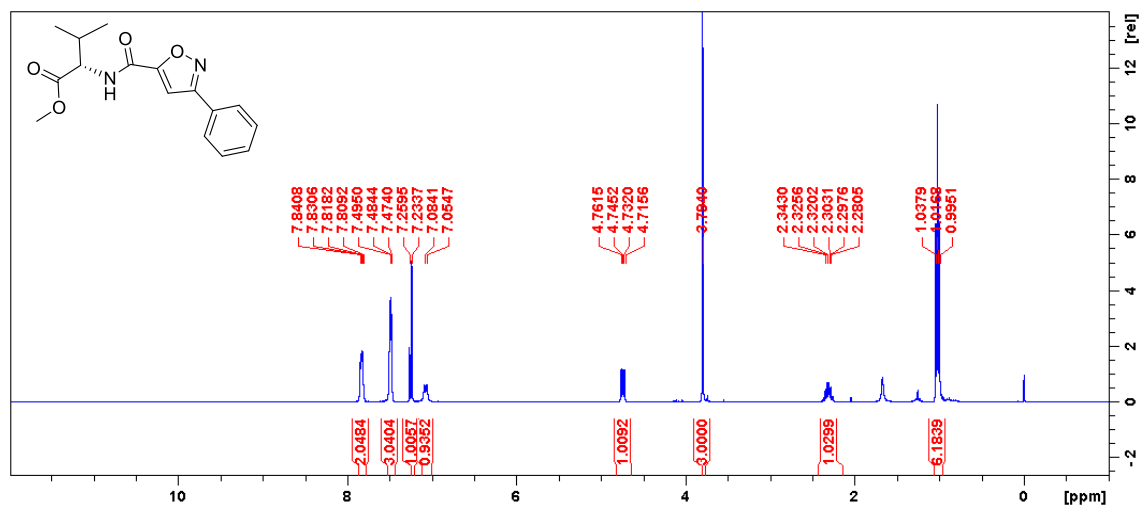
6.28. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44d**.

 6.29. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44k**.


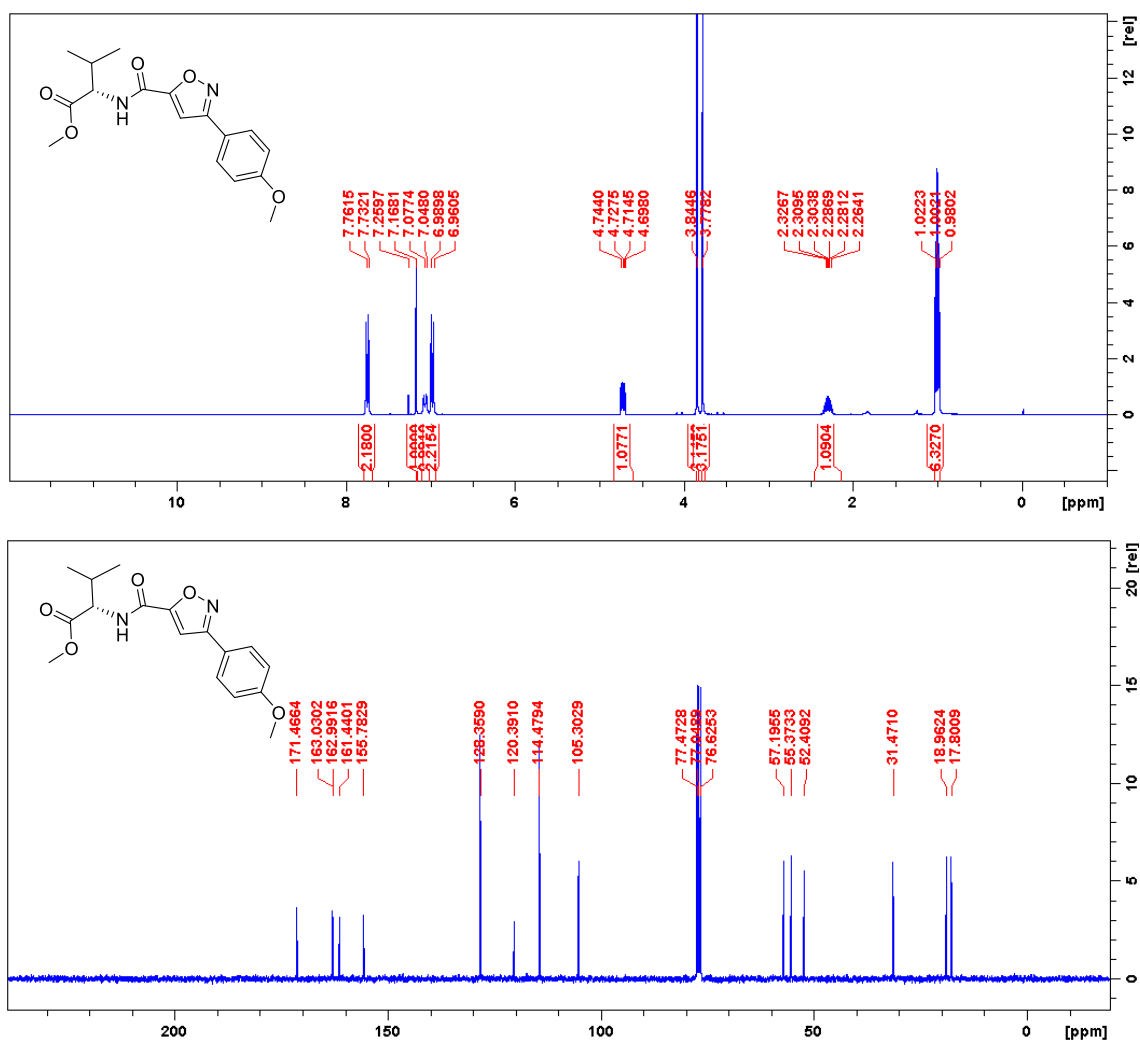
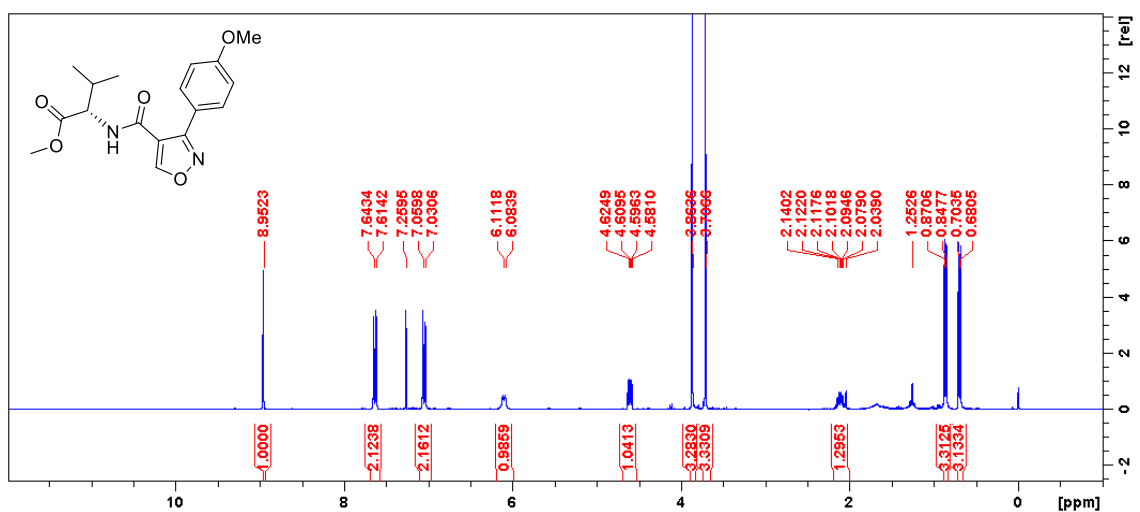

 6.30. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **44a**.


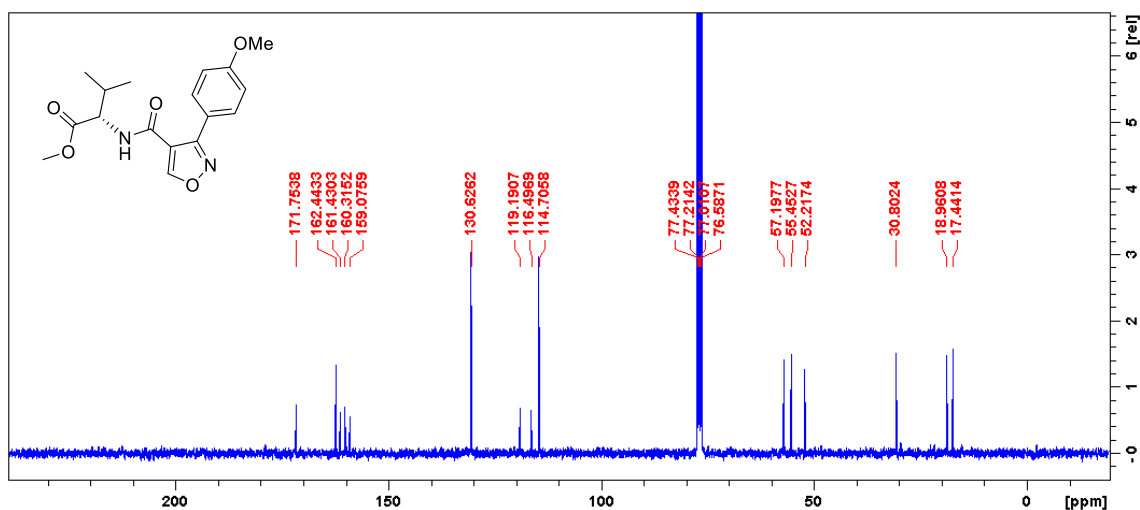
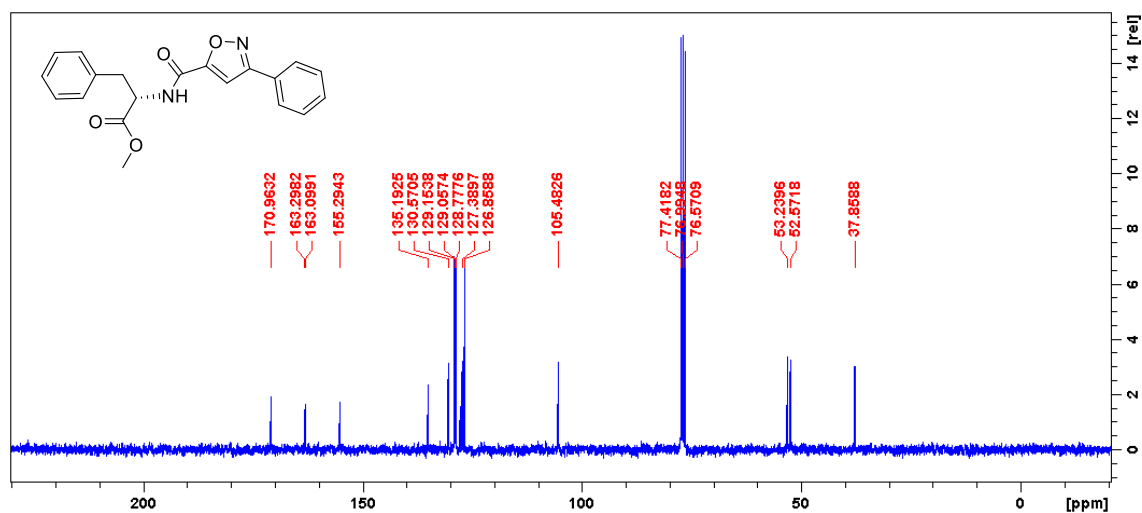
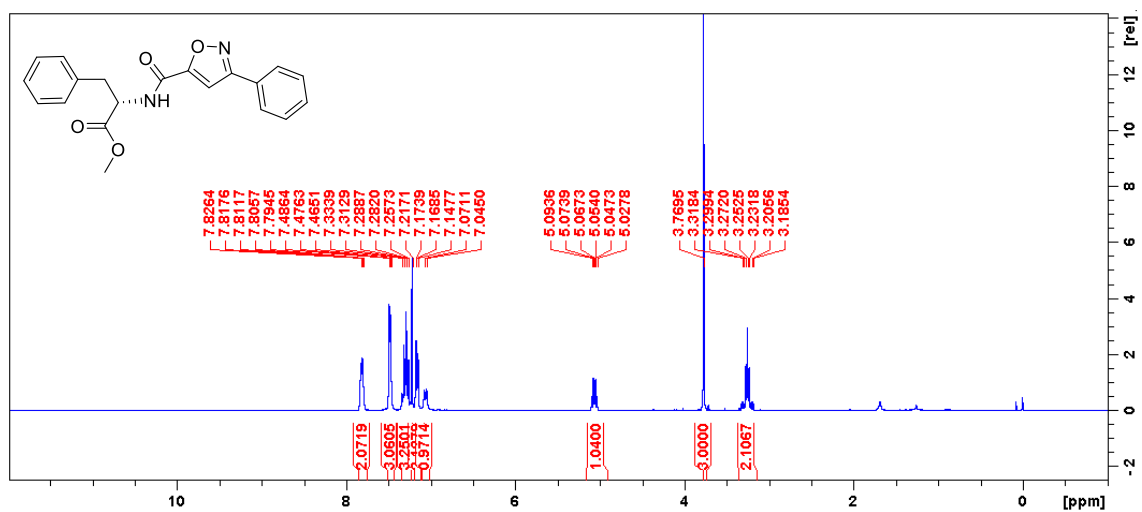
6.31. Espectro de RMN de ^1H (arriba) de **44j**.

 6.32. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44g**.


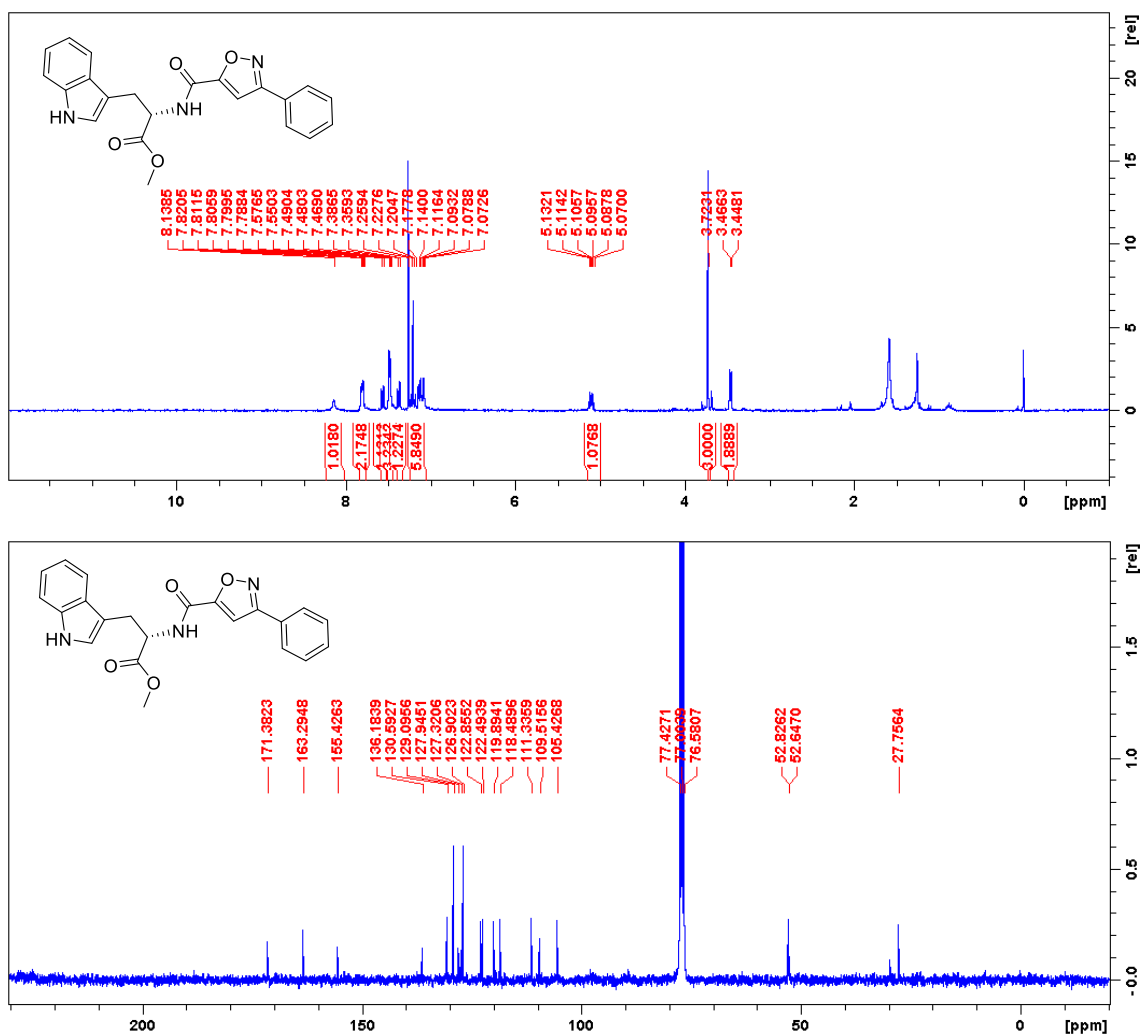
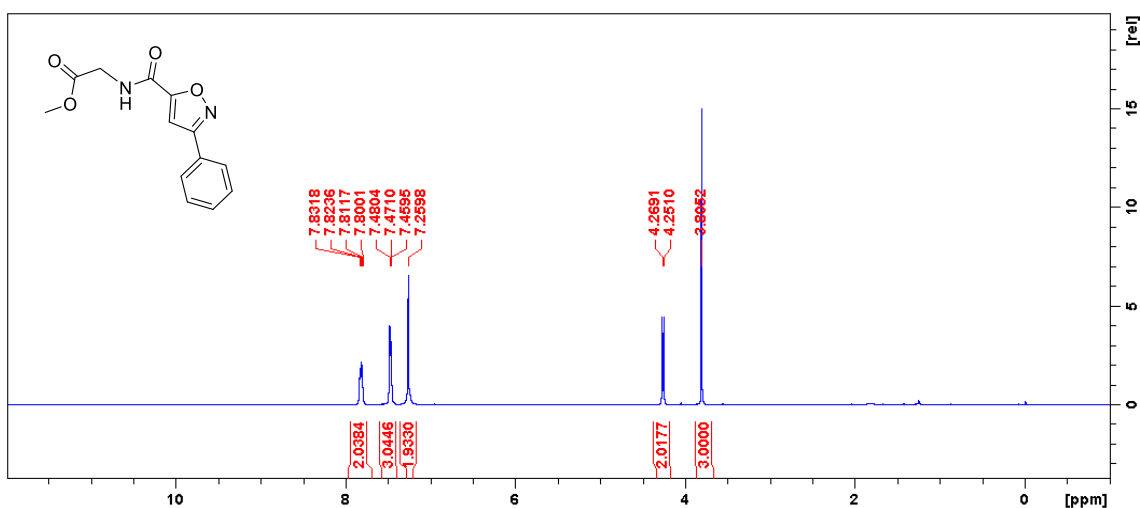
6.33. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44l**.

 6.34. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **44ba**.


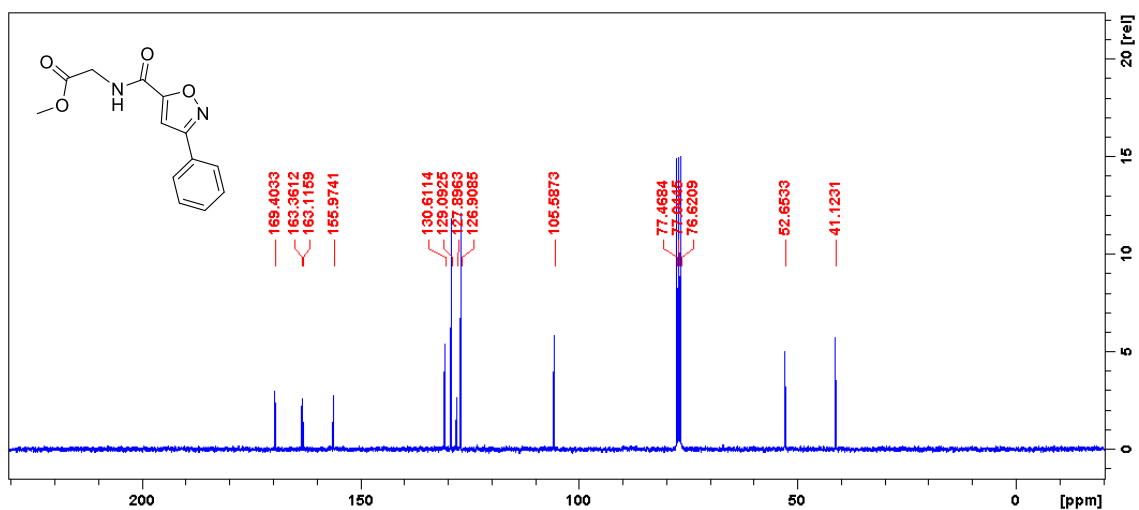

 6.35. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de 44dc.


6.36. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **49aa** y **49ab**.

 6.37. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **55ama'**.


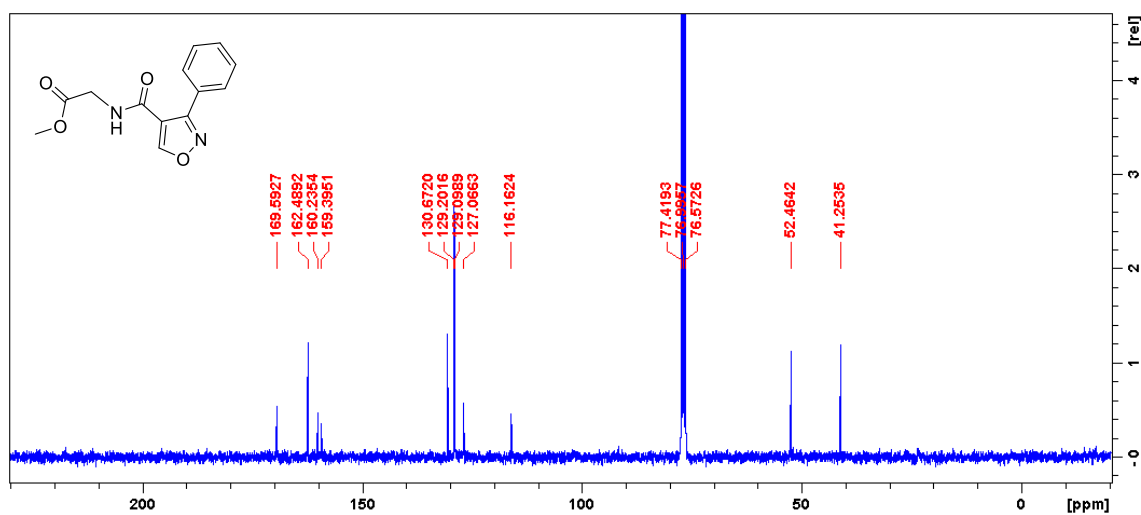
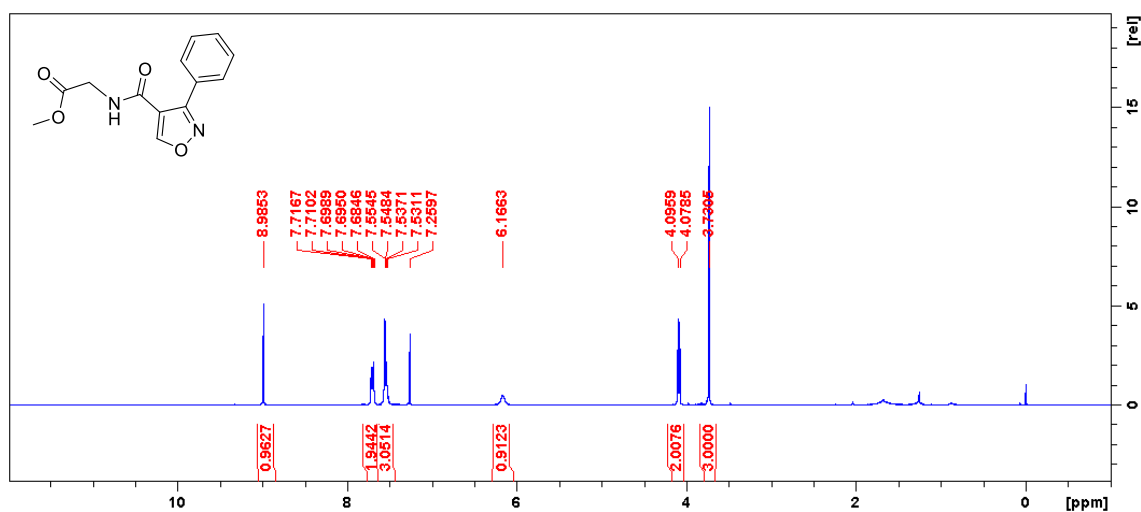
6.38. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **55fma'**.

 6.39. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **55fmb'**.



 6.40. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de 55aaa'.


6.41. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **55aca'**.

 6.42. Espectro de RMN de ^1H (arriba) y de ^{13}C (abajo) de **55aka'**.




6.42. Espectro de RMN de ¹H (arriba) y de ¹³C (abajo) de **55akb'**.



CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

01. IUPAC, Boletín N°13, 1970.
02. Ekinici, D. *Medicinal Chemistry and Drug Desing*. InTechOpen, **2012**.
03. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press, **2009**.
04. Williams, D.A.; Foye, W.O.; Lemke, T.L. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins (pp 56), **2002**.
05. Arranz Nicolas, J.; Sanz Fraile, A.I. Empleo de ensayos de High Throughput Screening (HTS) aplicado al estudio de canales ionicos y otras dianas terapéuticas. *dianas*. **2014**, e20140910.
06. Mahan, V. Methods for Analyzing Binary Repeated Measures: The Small Sample Case *Int. J. Clin. Med.* **2014**, 5, 1374-1383.
07. Wallace, T.A.; Martin, D.N.; Ambs, S. Interactions among genes, tumor biology and the environment in cancer health disparities: examining the evidence on a national and global scale. *Carcinogenesis*. **2011**, 32, 1107–1121.
08. Urruticoechea, A.; Alemany R.; Balart J.; Villanueva A.; Viñals F.; Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des.* **2010**, 16, 3-10.
09. Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature*. **2004**, 432, 294–297
10. Sinha, T, Tumors: benign and malignant. *Canc Therapy & Oncol Int J.* **2018**, 10, 555790.
11. Liu, F. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy—a quick review. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **2009**, 48, 239-244
12. Williams, D.A.; Foye, W.O.; Lemke, T.L. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins (pp 924), **2002**.
13. a) Christakis, P. Bicentennial: The Birth of Chemotherapy at Yale: Bicentennial Lecture Series: Surgery Grand Round. *Yale J. Biol. Med.* **2011**, 84, 169-172. b) Chabner, B., Roberts, T. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, 5, 65-72.
14. Farber, S.; Diamond, L. K. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793
15. Skipper, H.E.; Thomson, J.R., Elion, G.B.; Hitchings G.H. Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* **1954**, 14, 294-298.
16. Johnson, I. S.; Armstrong, J. G.; Gorman, M.; Burnett, J. P. Jr. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.* **1963**, 23, 1390–1427.
17. Guchelaar, H.-J.; Ten Napel; C. H. H.; de Vries, E. G. E.; Mulder, N. H. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review. *Clinical Oncology* **1994**, 6, 40–48.

18. a) Mata, E.G. Química Combinatoria. *Ciencia Hoy*. **1997**, 40, 10-18. b) Barbero, C.; Furlán, R.L.E; Mata, E.G. Química combinatorial. *Ciencia Hoy*. **2011**, 124, 39-45 c) Handbook of Combinatorial Chemistry; Nicolaou, K. C., Hanks, R., Hartwig, W., Editores, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
19. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E. J; Fraga, C.A.M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**,14, 1829–1852.
20. Bhukya, B. *Microbial Biotechnology. Technological Challenges and Developmental Trends*. Published August. Academic Press (p 32), **2016**.
21. Kuduk, S. D.; Zheng, F.F.; Sepp-Lorenzino, L.; Rosen, N. Danishefsky, S. J. Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids. *Bioorg Med Chem Lett*. **1999**, 9, 1233-1238.
22. a) Singh, G.S. β -Lactams in the new millennium. Part-I: monobactams and carbapenems. *MiniRev.Med.Chem.* **2004**, 4, 69-92. b) Singh, G.S. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheems, oxacepheems, penams and sulbactam. *MiniRev. Med. Chem.* **2004**, 4, 93-109.
23. Miyata, T.; Tokunaga, F.; Yoneya T.; Yoshikawa, K.; Iwanaga, S.; Niwa, M.; Takao, T.; Shimonishi, Y. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* **1989**, 106, 663-668.
24. a) Testero, S.A.; Poeylout-Palena, A.A.; Mata, E.G. en *Modern Approaches to the Synthesis of O- and N-Heterocycles*, Kaufman, T.K., Larghi, E.L. Eds.; Research Signpost, Trivandrum, **2007**, 1, 341-372. b) Kumar H., Javed S. A., Khan, S.A., Amir, M. 1, 3, 4-Oxadiazole/thiadiazole and 1, 2, 4-triazole derivatives of biphenyl-4-yloxy acetic acid: synthesis and preliminary evaluation of biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 2688-2698.
25. Cornier, P.G.; Boggián, D.B.; Mata, E.G.; Delpiccolo, C.M.L. Solid-phase based synthesis of biologically promising triazolyl aminoacyl (peptidyl) penicillins. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 632-636.
26. Williams, D.A.; Foye, W.O.; Lemke, T.L. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins (pp 833), **2002**.
27. Novak, I.; Chua, P. Computational study of pharmacophores: β -Lactams. *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 10521-10524.
28. Smith, D. M. A novel β -lactam antibiotic activates tumor cell apoptotic program by inducing DNA damage. *Molecular Pharmacology*. **2002**, 61, 1348–1358.
29. Balderas-Renteria, I.; Gonzalez-Barranco, P.; Garcia, A.; Banik, B. K.; Rivera, G. Anticancer drug design using scaffolds of β -lactams, sulfonamides, quinoline, quinoxaline and natural products. Drugs advances in clinical trials. *Curr Med Chem*, **2012**, 19, 4377-4398.

30. Chen, D.; Falsetti, S. C.; Frezza, M.; Milacic, V.; Kazi, A.; Cui, Q. C.; Long, T.E.; Turos, E.; Dou, Q. P. Anti-tumor activity of *N*-thiolated β -lactam antibiotics. *Cancer Letters*, **2008**, 268, 63-69.
31. Tiemann, F.; Kruger, P. Ueber amidoxime und azoxime. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 1685.
32. Somani, R. S.; Shirodkar, P. Y. Oxadiazole: A biologically important heterocycle. *Der Pharma Chemica*. **2009**, 1, 130-140
33. de Oliveira, CS; Lira, BF; Barbosa-Filho, J.M.; Lorenzo, J.G., de Athayde-Filho, P.F. *Molecules*. **2012**; 17, 10192-10231
34. Popiołek, Ł.; Biernasiuk, A.; Paruch, K.; Malm, A.; Wujec, M. Synthesis and in Vitro Antimicrobial Activity Screening of New 3-Acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoline Derivatives. *Chem Biodivers*. **2019**, 16, e1900082.
35. Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem*. **2005**, 12, 23-49
36. Muscadet, J. F.; Tchertanov, L. Raltegravir: molecular basis of its mechanism of action. *Eur. J. Med. Res*. **2009**, 14, 5.
37. a) Hatti, I.; Sreenivasulu, R.; Jadav, S. S.; Ahsan, M. J.; Raju, R. R. Synthesis and biological evaluation of 1, 3, 4-oxadiazole-linked bisindole derivatives as anticancer agents. *Monatshefte Für Chemie. Chemical Monthly*, **2015**, 146, 1699–1705. b) James, N.D.; Growcott, J.W. Zibotentan endothelin ETA receptor antagonist oncolytic. *Drugs of the Future* **2009**, 34, 624-633.
38. Vaidya, A.; Jain, S.; Jain, P.; Jain, P.; Tiwari, N.; Jain, R.; Jain, R.; Jain, A.K.; Agrawal, R.K. Synthesis and biological activities of oxadiazole derivatives: A review. *Mini-Rev. Med. Chem*. **2016**, 16, 825-845
39. a) Namani, V.; Goud, B.B.K.; Kumari, Y.B.; Kumbham, R. Synthesis and Biological Evaluation of 2-methoxy-N-phenyl-6-(5-phenyl-1, 3,4-oxadiazol-2-yl) pyridin-3-amine Derivatives as Antimicrobial Agents. *Lett. Org. Chem*. **2016**, 13, 249-254. b) Namani, V.; Goud, K.; Bharath, B.; Kumari, Y. B. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Series of 3-Substituted 2-Methoxy-6-(5-phenyl-[1, 3, 4]oxadiazol-2-yl) pyridine Derivatives as Antimicrobial. *Asian J. Chem*. **2015**, 27, 4579-4582.
40. a) Raj, V.; Rai, A.; Singh, A. K.; Keshari, A. K.; Trivedi, P.; Ghosh, B.; Kamar, U.; Kumar, D.; Saha, S. Discovery of novel 2-amino-5-(substituted)-1, 3, 4-thiadiazole derivatives: new utilities for colon cancer treatment. *Anti-cancer Agents Med. Chem*. **2018**, 18, 719-738. b) Qiao, F.; Yin, Y.; Shen, Y. N.; Wang, S. F.; Sha, S.; Wu, X.; Lu, A-M.; Chen, X.; Zhang, W-M.; Zhu, H. L. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of quinazoline derivatives containing the 1, 3, 4-oxadiazole scaffold as novel inhibitors of VEGFR2. *RSC Advances*. **2015**, 5, 19914-19923.
41. Zarghi, A.; Tabatabai, S. A.; Faizi, M.; Ahadian, A.; Navabi, P.; Zanganeh, V.; Shafiee, A. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-(2-

- benzyloxyphenyl)-1, 3, 4-oxadiazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1863-1865.
42. Zarghi, A.; Faizi, M.; Shafaghi, B.; Ahadian, A.; Khojastehpoor, H. R.; Zanganeh, V.; Tabatabai, S.A.; Shafiee, A. Design and synthesis of new 2-substituted-5-(2-benzylthiophenyl)-1, 3, 4-oxadiazoles as benzodiazepine receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3126-3129.
 43. Maftai, C. V.; Fodor, E.; Jones, P. G.; Franz, M. H.; Kelter, G.; Fiebig, H.; Neda, I. Synthesis and characterization of novel bioactive 1,2,4-oxadiazole natural product analogs bearing the *N*-phenylmaleimide and *N*-phenylsuccinimide moieties. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2202–2215.
 44. Boström, J.; Hogner, A.; Llinàs, A.; Wellner, E.; Plowright, A. T. Oxadiazoles in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1817-1830.
 45. Jones, A.M.; Helem, J. M. Emerging treatments in cystic fibrosis. *Drugs* **2009**, *69*, 1903-1910
 46. Street, L.J.; Baker, R.; Book, T.; Kneen, C.O.; MacLead, A.M.; Merchant, K.J.; Showell, G.A.; Sounders, J.; Herbert, R.H.; Fredman, S.B.; Harley, E.A. Synthesis and biological activity of 1, 2, 4-oxadiazole derivatives: highly potent and efficacious agonists for cortical muscarinic receptors. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2690-2697.
 47. Zhang, H. Z.; Kasibhatla, S.; Kuemmerle, J.; Kemnitzer, W.; OllisMason, K.; Qiu, L.; Crogan-Grundy, C.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. Discovery and structure–activity relationship of 3-aryl-5-aryl-1, 2, 4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers and potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5215-5223.
 48. Li, Z.; Chen, W.; Hale, J.J.; Lynch, C.L.; Mills, S.G.; Hajdu, R.; Keohane, C.A.; Rosenbach, M.J.; Milligam, J.A.; Shein, G.J.; Chrebet, G.; Parent, S.A.; Bergstrom, J.; Card, D.; Forrest, M.; Quackenbush, E.J.; Wickham, L.A.; Vargas, H.; Evans, R.M.; Rosen, H.; Mandala, S. J. Discovery of Potent 3,5-Diphenyl-1,2,4-oxadiazole Sphingosine-1-phosphate-1 (S1P₁) Receptor Agonists with Exceptional Selectivity against S1P₂ and S1P₃. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6169-6173.
 49. O’Sullivan, C.; Dev, K. K. The structure and function of the S1P₁ receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 401–412.
 50. Kumar, A. K.; Govindaraju, M.; Renuka, N.; Vasanth Kumar, G. Isoxazolines: An insight to their synthesis and diverse applications. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 250-257.
 51. Sonu; Baby Rabiya Parveen; Himanshu Pal; Sabiya Praveen, A Short Review on Synthesis and Pharmacological Activity of Isoxazole. *World J Pharm Sci.* **2017**, *5*, 91-100
 52. Quilico, A. Isoxazoles and Related Compounds. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2008**, *17*, 1-4.

53. Ceresole, M. Ueber Benzoylacetone und Isonitrosobenzoylacetone. *Chem. Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1884**, 17, 812.
54. Perrone, M. G.; Vitale, P.; Panella, A.; Ferorelli, S.; Contino, M.; Lavecchia, A.; Scilimati, A. Isoxazole-Based-Scaffold Inhibitors Targeting Cyclooxygenases (COXs). *Chem. Med. Chem.* **2016**, 11, 1172-1187.
55. Madanes, A. E. Danazol. *Ann. Intern. Med.* **1982**, 96, 625-630.
56. Cali, P.; Naerum, L.; Mukhija, S.; Hjelmencrantz, A. Isoxazole-3-hydroxamic acid derivatives as peptide deformylase inhibitors and potential antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5997-6000.
57. Lee Y.S.; Kim, B.H. Heterocyclic nucleoside analogues: design and synthesis of antiviral, modified nucleosides containing isoxazole heterocycles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1395-1397
58. Vitale, P.; Perrone, M.G.; Malerba, P.; Lavecchia, A.; Scilimati, A. Selective COX-1 inhibition as a target of theranostic novel diarylisoxazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 606-618.
59. Zhao, H.Y.; Liu, G.; Xin, Z.L.; Serby, M.D.; Pei, Z.H.; Szczepankiewicz, B.G.; Hajduk, P.J.; Abad-Zapatero, C.; Hutchins, C.W.; Lubben, T.H.; Ballaron, S.J.; Haasch, D.L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C.M.; Trevillyan, J.M.; Jirousek, M.R., Isoxazole carboxylic acids as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5543-5546
60. Badio, B.; Garraffo, H.M.; Plummer, C.V; Padgett, W.L.; Daly, J.W. Synthesis and nicotinic activity of epiboxidine: an isoxazole analogue of epibatidine *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 321, 189-194.
61. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberge, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen S.; Mandelkow, E.; Schmidt B. Curcumin-Derived Pyrazoles and Isoxazoles: Swiss Army Knives or Blunt Tools for Alzheimer's Disease? *Chem Med Chem.* **2008**, 3, 165-172.
62. Taldone, T.; Gozman, A.; Maharaj, R.; Chiosis G. Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr. Opin. Pharmacol* **2008**, 8, 370-374
63. Csermely, P.; Schnaider, T.; Soti, C.; Prohászka, Z.; Nardai, G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacology & Therapeutics*, **1998**, 79, 129-168.
64. Neckers, L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol. Med.* **2002**, 8, S55-S61.
65. Jensen, M.R.; Schoepfer, J.; Radimerski, T.; Massey, A.; Guy, C.T.; Brueggen, J.; Quadl, C.; Buckler, A.; Cozens, R.; Drysdale, M.J.; Garcia-Echeverria, C.; Chene, P. VP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. *Breast Cancer Res.* **2008**, 10, 1-12

66. Shin, K.D.; Lee, M.Y.; Shin, D.S.; Lee, S.; Son, K.H.; Koh, S.; Paik, Y.K.; Kwon, B.M.; Han, D.C. Blocking Tumor Cell Migration and Invasion with Biphenyl Isoxazole Derivative KRIBB3, a Synthetic Molecule That Inhibits Hsp27 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41439-41448.
67. Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, *45*, 209-211.
68. Lin C. M.; Singh S. B.; Chu P. S.; Dempcy R. O.; Schmidt J. M.; Pettit G. R.; Hamel E. Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimetabolic agent combretastatin: a structure-activity study. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 200-208.
69. Kaffy, J.; Pontikis, R.; Carrez, D.; Croisy, A.; Monneret, C.; Florent, J.C. Isoxazole-type derivatives related to combretastatin A-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4067-4077.
70. Tokumaru, K.; Johnston, J. A convergent synthesis of 1,3,4-oxadiazoles from acyl hydrazides under semiaqueous conditions *J. Chem Sci.* **2017**, *8*, 3187-3191.
71. Rajapakse, H. A.; Zhu, H.; Young, M. B.; Mott, B. T. A mild and efficient one pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles from carboxylic acids and acyl hydrazides. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4827-4830.
72. Kangani, C. O.; Kelleys, D. E.; Day, B. W. One pot direct synthesis of oxazolines, benzoxazoles, and oxadiazoles from carboxylic acids using the Deoxo-Fluor reagent. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6497-6499.
73. Stabile, P.; Lamonica, A.; Ribecai, A.; Castoldi, D.; Guercio, G.; Curcuruto, O. Mild and convenient one-pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4801-4805.
74. Dobrota, C.; Paraschivescu, C. C.; Dumitru, I.; Matache, M.; Baci, I.; Ruta, L. L. Convenient preparation of unsymmetrical 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles promoted by Dess–Martin reagent. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1886–1888.
75. Pardeshi, S. P.; Patil, S. S.; Bobade, V. D. N-Chlorosuccinimide/1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)–Mediated Synthesis of 2,5-Disubstituted 1,3,4-Oxadiazoles. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 1601-1606.
76. Gao, P.; Wei, Y. Efficient oxidative cyclization of *N*-acylhydrazones for the synthesis of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles using *t*-BuOI under neutral conditions. *Heterocycl. Commun.* **2013**, *19*, 113–119.
77. Prakash, O.; Kumar, M.; Kumar, R.; Sharma, C.; Aneja, K. R. Hypervalent iodine(III) mediated synthesis of novel unsymmetrical 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as antibacterial and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4252-4257.
78. Musad, E. A.; Mohamed, R.; Saeed, B. A.; Vishwanath, B. S.; Rai, K. M. L. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of new

- substituted bis(1,3,4-oxadiazoles), 3,5-bis(substituted) pyrazoles and isoxazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3536–3540.
79. Rapolu, S.; Alla, M.; Bommenaa, V. R.; Murthy, R.; Jain, N.; Bommareddy, V. R.; Bommineni, M. R. Synthesis and biological screening of 5-(alkyl(1*H*-indol-3-yl))-2-(substituted)-1,3,4-oxadiazoles as antiproliferative and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 91–100.
 80. Guin, S.; Ghosh, T.; Rout, S. K.; Banerjee, A.; Patel, B. K. Cu(II) Catalyzed Imine C–H Functionalization Leading to Synthesis of 2,5-Substituted 1,3,4-Oxadiazoles. *Org. Lett.* **2011**, 13, 5976-5979.
 81. Dabiri, M.; Salehi, P.; Baghbanzadeha, M.; Bahramnejad, M. A facile procedure for the one-pot synthesis of unsymmetrical 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6983-6986.
 82. Pore, D. M.; Mahadik, S. M.; Desai, U. V. Trichloroisocyanuric Acid–Mediated One-Pot Synthesis of Unsymmetrical 2,5-Disubstituted 1,3,4-Oxadiazoles at Ambient Temperature. *Synth. Commun.* **2008**, 38, 3121-3128.
 83. Sangshetti, J.N.; Dharmadhikari, P.P.; Chouthi, R.S.; Fatema, B.; Lad, V.; Karande, V.; Darandale, S.N.; Shinde, D.B. Microwave assisted nano (ZnO–TiO₂) catalyzed synthesis of some new 4,5,6,7-tetrahydro-6-((5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)thieno[2,3-*c*]pyridine as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* **2013**; 23(7), 2250-2253
 84. Pitasse-Santos, P.; Sueth-Santiago, V.; Lima, M.E.F. 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles as Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents. *J. Braz. Chem. Soc.* **2018**, 29, 435-456.
 85. Kaboudin, B; Malekzadeh, L. Organic reactions in water: an efficient method for the synthesis of 1, 2, 4-oxadiazoles in water. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 6424-6426
 86. Gangloff, A. R.; Litvak, J.; Shelton, E. J.; Sperandio, D.; Wang, V. R.; Rice, K. D. Organic reactions in water: an efficient method for the synthesis of 1,2,4-oxadiazoles in water. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1441-1443.
 87. Sureshbabu, V. V.; HemanthA, H. P.; Naik, S. A. Synthesis of 1,2,4-oxadiazole-linked orthogonally urethane-protected dipeptide mimetics. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5133-5136.
 88. Augustine, J. K.; Vairaperumal, V.; Narasimhan, S.; Alagarsamy, P.; Radhakrishnan, A. Propylphosphonic anhydride (T3P®): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron* **2009**, 65, 9989-9996.
 89. Neves Filho, R.; Bezerra, N.; Guedes J.; Srivastava, R. An easy synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids and arylamidoximes mediated by ethyl chloroformate. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 1365-1369.

90. Mohammadi-Khanaposhtani, M.; Shabani, M.; Faizi, M.; Aghaei, I.; Jahani, R.; Sharafi, Z.; Zafarghnanadi, N. S.; Mahdavi, M.; Akbarzede, T.; Emami, S.; Shafiee, A.; Foroumadi, A. Design, synthesis, pharmacological evaluation, and docking study of new acridone-based 1,2,4-oxadiazoles as potential anticonvulsant agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 112, 91-98.
91. Outirite, M.; Lagrenée, M.; Hammouti, B.; Bentiss, F. A rapid and an efficient synthesis for 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under microwave irradiation. *Res. Chem. Intermed.* **2015**, 41, 1601-1606.
92. Bretanha, L. C.; Teixeira, V. E.; Ritter, M.; Siqueira, G. M.; Cunico, W.; Pereira, C. M.; Freitag, R. A. Ultrasound-promoted synthesis of 3-trichloromethyl-5-alkyl(aryl)-1,2,4-oxadiazoles. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, 18, 704-707.
93. Durden, J. A.; Heywood, D. L. Reaction of "activated" esters with amidoximes. Convenient synthesis of 1,2,4-oxadiazoles. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1306-1307.
94. Bokach, N. A.; Khripoun, A. V.; Kukushkin, V. Y.; Haukka, M.; Pombeiro, A. J. L. A Route to 1,2,4-Oxadiazoles and Their Complexes via Platinum-Mediated 1,3-Dipolar Cycloaddition of Nitrile Oxides to Organonitriles. *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 896-903.
95. Hu, F.; Szostak, M. Recent Developments in the Synthesis and Reactivity of Isoxazoles: Metal Catalysis and Beyond. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 2583-2614.
96. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovsev, V. V.; Fokin, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.
97. Hansen, T.V.; Wu, P.; Fokin, V. V. One-Pot Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7761-7764.
98. Grecian, S.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Nitrile Oxides and Alkynes: Practical Synthesis of Isoxazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8285-8287.
99. Hébert, N.; Hannah, A. L.; Sutton, S. C. Synthesis of oxadiazoles on solid support. *Tetrahedron Letters*. **1999**, 40, 8547-8550.
100. Haino, T.; Tanaka, M.; Ideta, K.; Kubo, K.; Mori, A.; Fukazawa, Y. Solid-phase synthesis of liquid crystalline isoxazole library. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2277-2279
101. Krysin, E. P.; Karel'skii, V. N.; Antonov, A. A.; Rostovskaya, G. E. Preparation of hydrazides of amino acids and peptides. *Chem. Nat. Compd.* **1979**, 15, 601-603.
102. Bondebjerg, J.; Fuglsang, H.; Valeur, K. R.; Kaznelson, D. W.; Hansen, J. A.; Pedersen, R. O.; Krogha, B.O.; Jensen B.S.; C.; Lauritzen, C.; Petersen, G.; Pedersen, J.; Næruma, L. Novel semicarbazide-derived inhibitors of human dipeptidyl peptidase I (hDPPI). *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4408-4424.

103. Khattab, S. Synthesis and Biological Activity of Novel Amino Acid-(N'-Benzoyl) Hydrazide and Amino Acid-(N'-Nicotinoyl) Hydrazide Derivatives. *Molecules*. **2005**, *10*, 1218-1228.
104. Armour, R.; Baxter, A.; Bryans, J.; Dack, K.; Johnson, P.; Lewthwaite, R.; Newman, J.; Rawson, D.; Ryckmans, T. *Triazole compounds for the treatment of dysmenorrhoea*. European Patent 1558598, Aug 3, **2005**.
105. Loupy, A. Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, *7*, 103–112.
106. Dornelles, L.; Rodrigues, O.E. D.; Heck, E. F.; Bender, C. R.; Cansian, M. B., Schwab, R. S.; Wolmar A. Severo Filhoc, W. A. Synthesis of 1,3,4-oxadiazole derivatives from α -amino acid and acyl hydrazides under thermal heating or microwave irradiation conditions. *ARKIVOC*. **2015** (vii) 131-144.
107. Bentiss, F.; Lagrenée, M. A. new synthesis of symmetrical 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, *36*, 1029-1032.
108. Gao, P.; Bai, Z. Carbon Tetrabromide/Triphenylphosphine-Activated Beckmann Rearrangement of Ketoximes for Synthesis of Amides. *Chin. J. Chem.* **2017**, *35*, 1673-1677.
109. Clayton, J.P. The chemistry of penicillanic acids. Part I. 6,6-Dibromo- and 6,6-diiodo-derivatives. *J. Chem. Soc. C.*, **1969**, *16*, 2123-2127.
110. Volkmann, R. A.; Carroll, R. D.; Drolet, R. B.; Elliot, M. L.; Moore, B. S. Efficient preparation of 6,6-dihalopenicillanic acids. Synthesis of penicillanic acid S,S-dioxide (sulbactam). *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3344-3345.
111. Jakopin, Z.; Dolenc, M. Recent Advances in the Synthesis of 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles. *Curr. Org. Chem*, **2008**, *12*, 850-898.
112. Lamb, L. D.; White, A. C. Some amidines and amidoximes with trypanocidal activity. *J. Chem. Soc.* **1939**, 1253-1257.
113. Buu-Hoi, N. P.; Welsch, M.; Xuong, N. D.; Thang, K. V.; Une nouvelle famille de composés tuberculostatiques: les amidoximes. *Experientia* **1954**, *10*, 169.
114. Nicolaidis, D. N.; Varella, E. A. *The Chemistry of Acid Derivatives*, Vol. 2, John Wiley: New York, p. 876, **1992**
115. Bandiera, T.; Albini, F. M.; Albini, E. Synthesis and antifungal activity of some allylamine derivatives. *J. Heterocycl. Chem*, **1987**, *24*, 1597-1598.
116. Sahyoun, T.; Arrault, A.; Schneider, R. Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors. *Molecules* **2019**, *24*, 2470.
117. a) Bohle, D.S.; Chua, Z.; Perepichka, I.; Rosadiuk, K. E/Z Oxime Isomerism in PhC(NO₂)CN. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4223-4229. b) Belmar, J.; Quezada, J.; Jiménez, C.A.; Díaz-Gallifa, P.; Pasán, J.; Ruiz-Pérez, C. Synthesis, crystal structures and tautomerism in novel oximes based on hydroxyalkylpyrazolones. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2002–2010.

118. Johnson, J. E.; Maia, J. A.; Tan, K.; Ghafouripour, A.; De Meester, P.; Chu, S. S. C. Syntheses, and configurations of some heterocyclic amidoximes. X-Ray crystal structure of 3-phenyl-5,6-dihydro-2(1*H*)-pyrazinone-O-methyloxime. *J. Heterocycl. Chem.*, **1986**, 23, 1861–1868.
119. Pimentel Barros, C. J.; Rufino de Freitas, J. J.; de Oliveira, R. N.; de Freitas, J. R. Synthesis of Amidoximes Using an efficient and rapid ultrasound method. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2011**, 56, 721-722.
120. Ashokkuma, M.; Lee, J.; Kentish, S.; Grieser, F. Bubbles in an acoustic field: An overview. *Ultrason Sonochem*, **2007**, 14, 470–475.
121. Srivastava, R. M.; Pereira, M.C.; Faustino, W. W. M.; Coutinho, K.; dos Anjos, J. V.; de Melo S. J. Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. *Monatsh. Chem.* **2009**, 140, 1319-1324.
122. Koryakova, A. G.; Ivanenkov, Y. A.; Ryzhova, E. A.; Bulanova, E. A.; Karapetian, R.N.; Mikitas, O. V.; Katrukha, E.A.; Kazey, V. I.; Okun, I.; Kravchenko, D. V.; Lavrovsky, Y. V.; Korzinov, O. M.; Ivachtchenko, A. V. Novel aryl and heteroaryl substituted N-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamides as selective GSK-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 3661-3666.
123. Pimentel Barros, C. J. et al. A convenient synthesis and cytotoxic activity of 3-aryl-5-pentyl-1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acid esters and arylamidoximes under solvent-free conditions. *J. Chil. Chem. Soc.* **2014**, 59, 2359-2362.
124. Johnson, D. A. Carboxy Derivatives of Benzylpenicillin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3636-3637.
125. Mata, E. G.; Boschetti, C. E.; Mascaretti, O. A. Simple and convenient procedure for the preparation of acid chlorides of penicillins. *Org Prep Proced Int.* **1995**, 27, 229-232.
126. Deegan, T.L.; Nitz T.J.; Cebzanov, D.; Pufko, D.E.; Porco Jr., J.A. Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation. *Bioorg Med Chem Lett.* **1999**, 9, 209-212.
127. Poulain, R. F.; Tartar, A. L.; Déprez, B.P. Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids using an improved, uronium-based, activation. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1495-1498.
128. Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 606–631.
129. Mlinarić-Majerski, K.; Margeta, R.; Veljković, J. A Facile and Efficient One-Pot Synthesis of Nitriles from Carboxylic Acids. *Synlett.* **2005**, 13, 2089-2091.
130. Rokade, B. V.; Prabhu, K. R. Chemoselective Schmidt Reaction Mediated by Triflic Acid: Selective Synthesis of Nitriles from Aldehydes. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 5364-5370.

- 131.** Boeijen, A.; Liskamp R.M.J. Solid-Phase Synthesis of Oligopeptide Mimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2127-2135.
- 132.** Raboisson, P.; Breitholtz-Emanuelsson, A.; Dahllöf, H.; Edwards, L.; Heaton, W.L.; Isaac, M.; Jarvie, K.; Kers, A.; Minidis, A.B.; Nordmark, A.; Sheehan, S.M.; Slassi, A.; Ström, P.; Terelius, Y.; Wensbo, D.; Wilson, J.M.; Xin, T.; McLeod, D.A. Discovery and characterization of AZD9272 and AZD6538—Two novel mGluR5 negative allosteric modulators selected for clinical development. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6974-6979.
- 133.** Ansede, J.H.; Anbazhagan, M.; Brun, R.; Easterbrook, J. D.; Hall, J. E.; Boykin, D. W. O-Alkoxyamidine Prodrugs of Furamidine: In Vitro Transport and Microsomal Metabolism as Indicators of in Vivo Efficacy in a Mouse Model of Trypanosoma brucei rhodesiense Infection. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4335-4338.
- 134.** Rundlöf, T.; Mathiasson, M.; Bekiroglu, S.; Hakkarainen, B.; Bowden, T.; Arvidsson, T. Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 52, 645–651.
- 135.** Poulain, R. F.; Tartar, A. L.; Déprez, B.P. Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids using an improved, uronium-based, activation. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1495-1498.
- 136.** Liang, G., Feng, D.D. An improved oxadiazole synthesis using peptide coupling reagents. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6627-6630.
- 137.** Amarasinghe, K. K.; Maier, M. B.; Srivastava, A.; Gray J. L. One-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acid esters and amidoximes using potassium carbonate. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 3629-3631.
- 138.** Santagada V; Frecentese, F.; Elisa Perissutti; E., Cirillo; D. Terracciano, S; Caliendo, G. A. Suitable 1,2,4-oxadiazoles synthesis by microwave irradiation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4491-4493.
- 139.** Pipik, B.; Hu, G.J.; Williams, J.M.; Conlon, D.A. A Preferred Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles. *Synth. Commun.* **2004**, 34, 1863-1870.
- 140.** Williams, P.L.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC: Boca Ratón, Florida, USA, **1997**.
- 141.** Vieira, E; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Fischli, W.; Güeller, R.; Hirth, G.; Märki, H.P.; Müller, M.; Oefner, C.; Scalone, M.; Stadler, H.; Wilhem, M.; Wostl, W.; Substituted piperidines - highly potent renin inhibitors due to induced fit adaptation of the active site. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1397-1402.
- 142.** Kumbhakonam, S.; Vellaisamy, K.; Saroj, S.; Venkatesan, N., D., Karunakaran; Kannoth Manheri, M. Serine- and threonine-derived diamine equivalents for site-specific incorporation of platinum centers in peptides, and the anticancer potential of these conjugates. *New J. Chem.* **2018**, 42, 2450–2458.

143. Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
144. Wang, S. *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
145. Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., USA, **1999**.
146. La-Venia, A.; Medran, N.; Krchňák, V.; Testero, S. A. Synthesis of a Small Library of Imidazolidin-2-ones using Gold Catalysis on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 482-489.
147. Felix A. M. Cleavage of protecting groups with boron tribromide. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1427-1429.
148. Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer-Verly Berlin Heidelberg Gmnh, **1984**.
149. Weinmann, H. Cancer Immunotherapy: Selected Targets and Small-Molecule Modulators. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 450-466.
150. Freeman, G. J. Structures of PD-1 with its ligands: Sideways and dancing cheek to cheek. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10275-10276.
151. Song, X. Q.; Ma, Z. Y.; Wu, Y. G.; Dai, M. L.; Wang, D. B.; Xu, J. Y.; Liu, Y. New NSAID-Pt(IV) prodrugs to suppress metastasis and invasion of tumor cells and enhance anti-tumor effect in vitro and in vivo. *Eur J. Med. Chem.* **2019**, *167*, 377-387.
152. Liu, K.-C.; Shelton, B. R.; Howe, R. K. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors). *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3916-3918.
153. Mata, E. G.; Setti, E. L.; Mascaretti, O. A.; Boggio, S. B.; Roveri, O. A. Synthesis of analogues of 6 β -bromopenicillanic acid and penicillanic acid S,S-dioxide. Part 1. Synthesis of 3 α -derivatives of 6 β -bromo-2,2-dimethylpenam and 2,2-dimethylpenam S,S-dioxide. *J. Chem. Soc., Perkin 1.* **1988**, 1551-1555.
154. Grecian, S.; Fokin, V. V. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of nitrile oxides and alkynes: Practical synthesis of isoxazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8285-8287.
155. Hu, F.; Szostak, M. Recent Developments in the Synthesis and Reactivity of Isoxazoles: Metal Catalysis and Beyond. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 2583-2614.
156. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*. **2013**, *340*, 457-460.

- 157.** 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.
- 158.** Haino, T.; Tanaka, M.; Ideta, K.; Kubo, K.; Mori, A; Fukazawa, Y. Solid-phase synthesis of liquid crystalline isoxazole library. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2277-2279.
- 159.** Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons, Inc., **2005**.
- 160.** Giralt, E., Rizo, J.; Pedroso, E. Application of gel-phase ¹³C-nmr to monitor solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron*.**1984**, *40*, 4141-4152.
- 161.** Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of laboratory chemicals*. Butterworth Heinemann, **1997**.
- 162.** Christensen, J. *Advanced ChemTech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry: a guide to principles, products & protocols*. **1998**.
- 163.** Ladeda, V; Adam, A.P.; Puricelli, L.; Bal de Kier Joffé, E. Apoptotic cell death in mammary adenocarcinoma cells is prevented by soluble factors present in the target organ of metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2001**, *69*, 39–51.
- 164.** Landegren, U.J. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J. Immunol. Methods*. **1984**; *67*, 379–388.