



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 800**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04791400 .7**

96 Fecha de presentación : **30.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1864995**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Ciclopéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos que contienen giros  $\gamma$ .**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **Universidad del País Vasco-Euskal  
Herriko Unibersitatea  
Barrio Sarriena  
48940 Leioa, Vizcaya ES**

72 Inventor/es: **Aizpurua Iparraguirre, Jesús María;  
Gamboa Landa, José Ignacio;  
Palomo Nicolao, Claudio;  
Loinaz Bordonabe, Iradia y  
Miranda Murua, José Ignacio**

74 Agente: **Isern Jara, Nuria**

ES 2 357 800 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## CICLOPÉPTIDOS RGD BETA-LACTÁMICOS QUE CONTIENEN GIROS GAMMA

5 **Sector técnico de la invención**

La presente invención hace referencia a nuevos compuestos ciclopéptidos RGD  $\beta$ -lactámicos y sus sales farmacéuticamente aceptables, a los procedimientos para su preparación y a las composiciones farmacéuticas derivadas de los mismos, así como a su utilización para la preparación de fármacos para terapia humana o veterinaria. También hace referencia a los materiales resultantes de su inmovilización sobre proteínas, polímeros, fases estacionarias de cromatografía o colorantes fluorescentes y la utilización de los materiales resultantes para la fabricación de sistemas de análisis o diagnóstico, sistemas de separación o fases estacionarias de cromatografía para la detección de integrinas.

15 **Estado de la técnica**

Las propiedades de interacción y adherencia celular entre los diferentes tipos celulares y con los componentes de la matriz extracelular son esenciales para la función celular. Las integrinas son receptores glicoproteicos diméricos  $\alpha\beta$  de la pared celular que juegan un papel importante en dichos procesos.

Por ejemplo, la integrina  $\alpha v\beta 3$  es un receptor dependiente de RGD de las células endoteliales que se expresa preferentemente en las venas angiogénicas. Se ha demostrado que juega un papel importante durante la neovascularización y sus antagonistas detienen la formación de nuevos vasos sanguíneos sin afectar a los vasos pre-existentes [Brooks PC y otros, Science 1994 264(5158): 569-571 "Requirement of vascular integrin  $\alpha v\beta 3$  for angiogenesis" ("Necesidad de la integrina  $\alpha v\beta 3$  vascular para la angiogénesis").

Diversas integrinas reconocen la secuencia de aminoácidos hidrofílica RGD Arg-Gly-Asp [Ruoslahti E, Pierschbacher M, Cell 1986 44:517-518 "Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal" ("Arg-Gly-Asp: Una señal de reconocimiento celular versátil)]. Esta secuencia se encuentra en proteínas adhesivas como la fibronectina, la vitronectina, el fibrinógeno, el factor de von Willebrand y el colágeno. La agregación plaquetaria, la migración de células tumorales, las metástasis, la angiogénesis y la adhesión de osteoclastos a la matriz ósea dependen de la interacción entre receptores tipo integrina y las proteínas de la matriz extracelular previamente mencionadas (Tissue Res. 305, 285-295 (2001).

Por lo tanto, los anticuerpos, péptidos o peptidomiméticos que bloquean selectivamente los mecanismos de adhesión celular controlados por una o varias integrinas, y más particularmente por la integrina  $\alpha v\beta 3$ , son agentes antiangiogénicos con aplicación en las terapias antitumorales, como se indica, por ejemplo, en Science, 264, 569-571 (1994), Cell, 79, 1157-1164 (1994), Science, 270, 1500-1502 (1995) o J. Med. Chem., 43, 22-26 (2000). También son útiles para el tratamiento de la restenosis posterior a la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), la artritis reumatoide o la osteoporosis.

Los péptidos sintéticos con secuencias RGD podrían competir favorablemente con otras proteínas en la unión a receptores (integrinas). Se ha demostrado que la conformación de la secuencia RGD es crucial para la unión específica al receptor. La presencia de conformaciones con giros  $\gamma$  y/o  $\beta$  bloqueadas en ciclopéptidos o pseudopéptidos equivalentes puede determinarse en solución mediante técnicas de RNM, tal como se describe, por ejemplo en Quart. Rev. Biophys. 31, 142-237 (1998), y se han utilizado métodos para el bloqueo conformacional de diferentes combinaciones de giros  $\gamma$  y/o  $\beta$  para incrementar la potencia y selectividad de pseudociclopéptidos RGD en el reconocimiento de integrinas de las familias  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha_{II}\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  y  $\alpha 5\beta 1$ , tal como se muestra, por ejemplo, en J. Biol. Chem. 269, 20233-20238 (1994).

Es sabido que ciertos miméticos de ciclopentapéptidos RGD que poseen un giro  $\gamma$  y un giro  $\beta$  entre los residuos Arg-Gly-Asp inhiben de forma moderada la integrina  $\alpha v\beta 3$ . Se han utilizado ciclopentapéptidos,  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -lactamas,  $\alpha$ -amino- $\delta$ -lactamas,  $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -lactamas, prolinas, prolinas espirolactámicas y lactamas bicíclicas para estabilizar simultáneamente un giro  $\gamma$  y un giro  $\beta$  entre los residuos Arg-Gly-Asp, tal como se describe, por ejemplo en J. Am. Chem. Soc. 118, 7881-7891 (1996), Org. Lett. 3, 1001-1004 (2001) o EP-683 173. La presencia de giros  $\gamma$  y  $\beta$  en dichos compuestos se caracteriza por la formación de enlaces de hidrógeno; el primero entre NH(Asp) y C=O(Arg), corresponde a un giro  $\gamma$  y el segundo entre NH(Arg) y C=O(Asp), corresponde a un giro  $\beta$ . También es conocida la estabilización simultánea del mismo tipo de giros  $\gamma$  y  $\beta$  entre los residuos Arg-Gly-Asp en ciclopentapéptidos RGD sin la incorporación de lactamas u otros agentes cíclicos. Se ha conseguido, por ejemplo, cambiando la configuración (D) y (L) de algunos aminoácidos del ciclo, ver EP-0 606 881.

Por otro lado, es sabido que el ciclopentapéptido RGD ciclo(Arg-Gly-Asp-(D)Fe-N(Me)Val), que contiene simultáneamente un D-aminoácido y un residuo N-alquilo, presenta solamente giros  $\gamma$  débiles en solución acuosa, tal como se demostró en J. Med. Chem. 42, 3033-3040 (1999). Este compuesto, que no posee giros  $\beta$  en solución acuosa, muestra una afinidad más elevada por la integrina  $\alpha v\beta 3$  que sus análogos que contienen giros  $\beta$  y  $\gamma$ . Por

tanto, la modificación de ciclopéptidos RGD u otros elementos estructurales para estabilizar un giro  $\gamma$ , preferentemente sin formar giros  $\beta$ , parece ser un requisito deseable para incrementar la actividad inhibidora de dichos compuestos frente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

A la vista del estado de la técnica, se mantiene todavía la necesidad de inhibidores selectivos y altamente activos.

- 5 Son particularmente adecuados compuestos RGD cíclicos que incorporen giros  $\gamma$  estables y que muestren buenas propiedades farmacológicas.

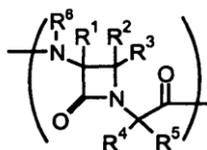
### Resumen de la invención

- 10 Se ha observado que los pseudopéptidos cíclicos que contienen la secuencia RGD y un residuo alfa-amino beta lactama presentan una conformación con giros  $\gamma$  y poseen buenas propiedades de inhibición de las integrinas. Los compuestos de la invención se caracterizan porque están restringidos conformacionalmente, independientemente de sus sustituyentes, y porque contienen al menos un giro  $\gamma$  estable en solución acuosa.

- 15 Un aspecto de la presente invención incluye los compuestos de fórmula (I):



- 20 que contienen al menos un giro  $\gamma$ , siendo (beta-Lactam) un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidín-2-ona de fórmula (II):



(II)

- 25 donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan de forma independiente del grupo formado por hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, -COR<sup>7</sup>, -C(O)OR<sup>7</sup>, -C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, -C=NR<sup>7</sup>, -CN, -OR<sup>7</sup>, -OC(O)R<sup>7</sup>, -S(OH-R<sup>7</sup>), -NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, -NR<sup>7</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -NO<sub>2</sub>, -N=CR<sup>7</sup>R<sup>8</sup> o halógeno;

donde dos de estos grupos pueden unirse entre sí formando un sustituyente cíclico;

- 30 t es 1, 2 o 3

R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, alcóxico sustituido o no sustituido, ariloxilo sustituido o no sustituido, halógeno;

- 35 sus enantiómeros, diastereómeros o sales farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto, tal como se ha definido previamente, sus enantiómeros, diastereómeros o mezclas de los mismos.

- 40 La invención también incluye un procedimiento para obtener los compuestos tal como se han definido previamente, que comprende:

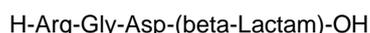
- a) La ciclación de los siguientes pseudopéptidos protegidos en los residuos Arg y Asp:

- 45 H-Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)-OH  
H-Gly-Asp-(beta-Lactam)-Arg-OH  
H-Asp-(beta-Lactam)-Arg-Gly-OH  
H-(beta-Lactam)-Arg-Gly-Asp-OH

- 50 Donde (beta-Lactam) es un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidín-2-ona de fórmula (II) tal como se ha definido previamente;

- b) Opcionalmente, la eliminación de los grupos protectores.

- 55 La presente invención también incluye los compuestos intermediarios necesarios para el procedimiento que contienen los elementos estructurales definidos previamente, más concretamente, los pentapéptidos de fórmulas:



H-Gly-Asp-(beta-Lactam)-Arg-OH  
 H-Asp-(beta-Lactam)-Arg-Gly-OH  
 H-(beta-Lactam)-Arg-Gly-Asp-OH

5 donde (beta-Lactam)- es un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidín-2-ona de la fórmula (II) definida previamente, con los residuos Asp y Arg opcionalmente protegidos con grupos protectores.

10 Otro aspecto de la presente invención hace referencia a la utilización de los compuestos definidos previamente para la fabricación de fármacos. Preferentemente, para el tratamiento de enfermedades mediadas por la sobre-expresión de integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$  en humanos o animales, incluyendo el cáncer, las metástasis de tumores sólidos cancerosos, la trombosis, la estenosis tras una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), la artritis reumatoide o la osteoporosis.

15 Un aspecto adicional de la presente invención hace referencia a sistemas para la purificación de integrinas y sistemas de diagnóstico o análisis que comprenden un pseudopéptido, tal como se ha definido previamente.

20 Finalmente, los compuestos de la presente invención pueden ser inmovilizados sobre materiales de soporte para formar materiales, que también se incluyen en la presente invención. Como soportes se incluyen, entre otros, polímeros, proteínas, colorantes fluorescentes y fases estacionarias de cromatografía.

#### Breve descripción del contenido de las figuras:

25 La figura 1 muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz) (WATERGATE) del compuesto A (10 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K.

La figura 2 muestra el espectro TOCSY (500 MHz) (WATERGATE) del compuesto A (10 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K.

30 La figura 3 muestra el espectro ROESY del compuesto A (10 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K con un tiempo de mezcla de 200 ms.

35 La figura 4 muestra (arriba) la deriva térmica de los protones amida del compuesto A (10 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 entre 300K y 325K a intervalos de 5K y (abajo) los coeficientes térmicos (ppb/K) de los protones amida del compuesto A.

La figura 5 muestra la estructura tridimensional del compuesto A en solución en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K determinada por Molecular Dynamics, incluyendo las restricciones en la distancia inter-protónica obtenidas en el experimento de RMN (ROESY).

40 La figura 6 muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz) (WATERGATE) del compuesto B (5 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K.

45 La figura 7 muestra el espectro TOCSY (500 MHz) (WATERGATE) del compuesto B (5 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K.

La figura 8 muestra el espectro ROESY del compuesto B (5 mM) determinado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K con un tiempo de mezcla de 400 ms.

50 La figura 9 muestra (arriba) la deriva térmica de los protones amida del compuesto B (5 mM) registrado en solvente  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 entre 300K y 325K a intervalos de 5K y (abajo) los coeficientes térmicos (ppb/K) de los protones amida del compuesto B.

55 La figura 10 muestra la estructura tridimensional del compuesto B en solución en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  90/10 a 300K determinada por Molecular Dynamics, incluyendo las restricciones en la distancia inter-protónica obtenidas en el experimento de RMN (ROESY).

60 La figura 11 muestra las curvas de inhibición de la adhesión a una superficie de vitronectina de células de vena umbilical humana (HUVEC) con sobreexpresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  mediante la adición de los compuestos A y B. Cada curva representa el valor promedio de tres determinaciones y las barras de error indican la desviación estándar de la determinación de cada valor.

#### Descripción detallada de la invención

65 En la presente descripción, los términos indicados se definen del modo siguiente:

- 5 “Alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada, lineal o ramificada, formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin contener insaturación, que tiene de uno a doce átomos de carbono, y está unido a la molécula principal por un enlace simple; por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales alquilo pueden contener opcionalmente uno o más sustituyentes tales como arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, carboxi, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto, alquiltio, etc. Por la sustitución con un grupo arilo, se obtiene un radical “aralquilo”, tal como bencilo o fenetilo.
- 10 “Arilo” se refiere a radicales de anillo único y anillos múltiples, incluyendo anillos múltiples que contienen anillos separados y/o condensados. Los grupos arilo típicos están formados por entre 1 y 3 anillos, ya sean separados o condensados, que contienen aproximadamente entre 6 y 18 átomos de carbono de anillo; por ejemplo fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antranilo. Los radicales arilo pueden contener opcionalmente uno o más sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halógeno, alquilo, fenoxi, alcoxi, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo, alcoxicarbonilo, etc.
- 15 “Alquenilo” se refiere a un radical alquilo que posee al menos dos átomos de carbono y uno o más enlaces no saturados.
- 20 “Cicloalquilo” se refiere a radicales monocíclicos o bicíclicos estables con anillos de 3 a 10 miembros, saturados o parcialmente saturados, y formados solamente por átomos de carbono e hidrógeno, tales como ciclohexilo o adamantilo. A menos que se especifique lo contrario en la descripción detallada, el término “cicloalquilo” incluye también radicales cicloalquilo sustituidos opcionalmente con uno o más grupos tales como alquilo, halógeno, hidroxilo, amino, ciano, nitro, alcoxi, carboxi, alcoxicarbonilo, etc.
- 25 “Heterociclo” se refiere a radicales estables con anillos de entre 3 y 15 miembros, formados por átomos de carbono y hasta cinco heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, preferentemente un anillo de entre 4 y 8 miembros con uno o más heteroátomos y, más preferentemente, un anillo de 5 o 6 miembros con uno o más heteroátomos. Puede ser aromático o no. Para el objeto de la presente invención, el heterociclo puede contener un sistema de anillos, ya sea monocíclico, bicíclico o tricíclico, puede incluir opcionalmente sistemas de anillo condensados; y puede contener opcionalmente átomos de nitrógeno, carbono o azufre oxidados; el átomo de nitrógeno puede ser opcionalmente cuaternario; y el heterociclo puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático. Como ejemplos de dichos heterociclos se incluyen, sin carácter limitante, azepinas, bencimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, imidazol, indol, piperidina, piperazina, purina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano, cumarina, morfolina, pirrol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazol, imidazol, etc.
- 30
- 35 “Alcoxilo” hace referencia a un grupo de fórmula –ORa, en la que Ra es un radical alquilo tal como se ha definido previamente; por ejemplo metoxi, etoxi, propoxi, etc.
- 40 “Amino” hace referencia a un grupo de fórmula –NH<sub>2</sub>, NHRa o NRaRb, opcionalmente cuaternizado, en la que Ra y Rb son radicales alquilo, tal como se ha definido previamente, y seleccionados de forma independiente; por ejemplo metilamino, etilamino, metilpropilamino, etc.
- “Halógeno” o “halo” hace referencia a bromo, cloro, yodo o flúor.
- 45 Las referencias a grupos sustituidos en los compuestos de la presente invención hacen referencia al residuo especificado, que puede estar sustituido en una o más posiciones disponibles por uno o más grupos adecuados; por ejemplo, halógeno tal como flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; hidroxilo; nitro; azido; alcanilo tal como un grupo C1-6 tal como acilo y similares; carboxamido; grupos alquilo incluyendo aproximadamente entre 1 y 12 átomos de carbono o, más preferentemente, entre 1 y 3 átomos de carbono; grupos alquenilo y alquinilo incluyendo uno o más enlaces no saturados y aproximadamente entre 2 y 12 átomos de carbono, más preferentemente entre 2 y 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo con aproximadamente entre 1 y 12 átomos de carbono y, más preferentemente entre 1 y 6 átomos de carbono; ariloxilo tal como fenoxi; grupos alquiltio incluyendo residuos con uno o más enlaces tioéter y aproximadamente entre 1 y 12 átomos de carbono o, más preferentemente, entre 1 y 6 átomos de carbono, grupos alquilsulfinilo incluyendo residuos con uno o más enlaces sulfinilo y aproximadamente entre 1 y 12 átomos de carbono o, más preferentemente entre 1 y 6 átomos de carbono; aminoalquilo con uno o más átomos de nitrógeno y aproximadamente entre 1 y 12 átomos de carbono o, más preferentemente, entre 1 y 6 átomos de carbono; arilo carbocíclico con 6 o más átomos de carbono, particularmente, fenilo o naftilo y aralquilo, tal como bencilo. A no ser que se especifique lo contrario, un grupo sustituido puede contener opcionalmente sustituyentes adicionales, independientes entre sí, en cada posición susceptible de ser sustituida.
- 50
- 55
- 60 Es bien conocido que la introducción de  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactamas  $\alpha$ -alquiladas, según la fórmula (II), en péptidos abiertos del tipo A<sub>1</sub>-(beta-Lactam)-A<sub>2</sub>, en los que A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> representan dos aminoácidos, promueve la estabilización de un giro- $\beta$  del tipo II o II' entre el NH dador del residuo A<sub>2</sub> y el C=O aceptor del residuo A<sub>1</sub>, tal como se describe en Angew. Chem. Int. Ed. 38, 3056-3058 (1999), J. Org. Chem. 66, 6333-6338 (2001) o J. Am. Chem. Soc. 125, 16243-16260 (2003).

- Sorprendentemente, hemos hallado que la introducción de  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactamas en pentapéptidos cíclicos RGD forma un giro- $\gamma$  en una posición que depende de la configuración (R) o (S) del estero-centro  $C_{\alpha}$  del anillo azetidín-2-ona contenido en el fragmento (beta-Lactam), pero que es independiente de los sustituyentes  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$ . De acuerdo con ello, hemos establecido que una configuración (S) en el estero-centro  $C_{\alpha}$  del anillo  $\beta$ -lactama cuando  $R^6$  es H induce un giro- $\gamma$  inverso entre el N-H dador del fragmento (beta-Lactam) definido en la fórmula (II) y el C=O aceptor (Gly); por el contrario, una configuración (R) de  $C_{\alpha}$  cuando  $R^6$  es H induce un giro- $\gamma$  con un enlace de hidrógeno entre N-H(Asp) y C=O(Arg). Cuando  $R^6$  es diferente de H, se forma un giro- $\gamma$  con un enlace de hidrógeno entre N-H(Asp) y C=O(Arg), independientemente de que la configuración sea (R) o (S) en el  $C_{\alpha}$  de la  $\beta$ -lactama. Se ha determinado la presencia de al menos un giro- $\gamma$  en solución mediante técnicas de RMN/Molecular Dynamics (ejemplos 9-10). Por tanto, en cualquier caso, los compuestos de la presente invención siempre contienen giros- $\gamma$  y no presentan tendencia a la formación de giros- $\beta$ . Y, más importante, los compuestos de la presente invención, tal como se ha definido previamente, inhiben selectiva y eficientemente las integrinas del tipo  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$ , independientemente del tipo de giro- $\gamma$  (ejemplo 11 y figura 11).
- En una variante de la presente invención,  $R^1$  no es H. En este caso, las  $\alpha$ -alquil- $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactamas de la fórmula (II) en pseudopentapéptidos RGD de la fórmula (I) no forman giros  $\beta$  dentro del ciclo, como podría esperarse, según la técnica previa. En esta variante,  $R^1$  es preferentemente un grupo alquilo, lineal, ramificado o cíclico, que contiene entre 1 y 16 átomos de carbono, preferentemente entre 1 y 6 átomos de carbono, o un grupo alquildenearomático definido por la fórmula  $-(CH_2)_nAr$  en la que n es 1, 2, 3, o 4 y Ar es un grupo aromático o heteroaromático. El grupo aromático o heteroaromático es preferentemente fenilo, 1- o 2-naftilo, 1-, 2- o 9-antranilo, 2-, 3- o 4-difenilo, 2-, 3-, o 4-piridilo, 2- o 3-furilo, 2- o 3-tienilo, 1-, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-imidazolilo, 1-, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo. Estos grupos pueden contener sustituyentes (mono-, di-, tri-, tetra- o penta- sustituidos) seleccionados de forma independiente del grupo formado por metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, tert-butilo,  $CF_3$ , F, OMe,  $NMe_2$  o  $NH_2$ . En una variante preferente,  $R^1$  es  $-CH_2Ph$ .
- En otra variante,  $R^1$  es un grupo alquilpolifluorado definido por la fórmula  $-(CH_2)_mR_f$  en la que m es 0, 1, 2, 3 ó 4 y  $R_f$  es  $CF_3$ ,  $C_2F_5$ ,  $n-C_3F_7$ ,  $n-C_4F_9$ ,  $n-C_5F_{11}$ ,  $n-C_6F_{13}$  o  $C_6F_5$ ; alternativamente,  $R^1$  es un grupo alquilo funcionalizado definido por la fórmula  $-(CH_2)_pX$  en la que p es 1, 2, 3 o 4 y X es OH,  $NH_2$ , SH o  $CO_2H$ .
- En otra variante de la presente invención  $R^2$  es H o un grupo alquilo, lineal o ramificado, que contiene entre 1 y 15 átomos de carbono; preferentemente H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$  o un grupo alquilo C1-C4 funcionalizado. En otra variante  $R^2$  es un grupo alquilenaromático definido por la fórmula  $-(CH_2)_nAr$ , en la que n es 1, 2, 3 o 4 y Ar es un grupo aromático o heteroaromático.
- En otra variante de la presente invención  $R^3$  se selecciona del grupo formado por H, metilo, etilo, alilo, bencilo o fenilo.
- En otra variante de la presente invención  $R^4$  se selecciona preferentemente del grupo formado por H, metilo, etilo, alilo, iso-propilo, iso-butilo, bencilo, alilo, 4-hidroxibencilo, hidroximetilo, 1-hidroxietilo, carboximetilo, carboxietilo, aminocarbonilmetilo, aminocarboniletilo, 4-aminobutilo, 3-guanidilpropilo, tiometilo, 2-(metiltio)etilo o 3-indolilometilo. Alternativamente, es un grupo alquilo lineal o ramificado, que contiene entre 5 y 15 átomos de carbono o un grupo alquilo C1-C4 funcionalizado.
- En otra variante de la presente invención  $R^5$  se selecciona preferentemente del grupo formado por H, metilo, etilo, alilo, bencilo o fenilo.
- En algunos compuestos es preferente el enlace entre  $R^4$  y  $R^5$  formando un grupo  $-(CH_2)_n$ , en el que n es 2, 3 o 4. En otra variante preferente  $R^6$  es H.
- Alternativamente, también pueden enlazarse  $R^1$  y  $R^6$  para formar un grupo cíclico  $-(CH_2)_n$  en el que n es 3, 4 o 5. En los ejemplos vienen recogidos algunos compuestos típicos de la presente invención, véase, por ejemplo, los ejemplos 7 y 8.
- La presente invención incluye ciclopéptidos definidos según la fórmula (I), que contienen todas las formas enantioméricas y diastereoméricas de los fragmentos de (beta-Lactam)- definidos según la fórmula (II).
- En la fórmula (I) Arg representa el aminoácido Arginina o un derivado del mismo, Gly representa el aminoácido glicina o un derivado del mismo, y Asp representa el aminoácido ácido aspártico o un derivado del mismo. La configuración de los aminoácidos R y D en la secuencia RGD es (L). Estos aminoácidos pueden contener grupos protectores.
- Como compuestos derivatizados se incluyen los profármacos transformables *in vivo* en los compuestos de la presente invención. Dichos compuestos derivatizados son evidentes para los expertos en la técnica e incluye,

dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin carácter limitante, ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres fosfato, ésteres sulfonato de sales de metales, carbamatos y amidas.

5 Son particularmente preferentes los derivados o profármacos que incrementan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando dichos compuestos se administran a pacientes (por ejemplo, permitiendo la administración oral consiguiendo una absorción sanguínea más fácil) o mejoran la administración del compuesto original para un comportamiento biológico respecto al compuesto original (por ejemplo, en el cerebro o el sistema linfático).

10 La presente invención también incluye compuestos protegidos en el grupo amino por grupos protectores, definidos como fragmentos químicos capaces de prevenir (bloquear) la modificación del grupo amino en la mayoría de reacciones químicas, pero que son fácilmente eliminables bajo condiciones determinadas tras una transformación en una posición diferente de la molécula. Son grupos protectores preferentes BOC, ALLOC, FMOC, CBZ, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, bencilo, PBF, acetilo o benzoilo.

15 Los acrónimos de los grupos protectores previamente mencionados son los siguientes:

20 ALLOC -tert-Aliloxicarbonilo.  
Bn -Bencilo.  
BOC -tert-Butoxicarbonilo.  
CBZ -Benciloxicarbonilo.  
FMOC -9-Fluorenilmetoxicarbonilo.  
PBF -2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo.

25 Además, es posible utilizar los grupos funcionales de las cadenas laterales de algunos restos de aminoácidos o restos aminoácidos derivatizados para inmovilizar los péptidos cíclicos de la presente invención sobre diferentes materiales, tales como polímeros o proteínas, fases estacionarias de cromatografía o colorantes fluorescentes. También pueden inmovilizarse introduciendo grupos funcionales en los sustituyentes R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup>. Ello permite la utilización de los compuestos de la presente invención en sistemas de análisis o diagnóstico, debido a su capacidad para unirse a las integrinas. Ello también es aplicable a sistemas para la detección y separación de integrinas.

30 A no ser que se especifique lo contrario, la presente invención también incluye compuestos que contienen uno o varios átomos enriquecidos isotópicamente, y su utilización como marcadores para diagnóstico. Los compuestos, tal como se han definido previamente, excepto aquellos en los que se sustituye el hidrógeno por deuterio o tritio, se hallan dentro del alcance de la presente invención; por ejemplo, los compuestos con átomos de carbono enriquecidos con <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C o con átomos de nitrógeno enriquecidos con <sup>15</sup>N.

40 Los compuestos de fórmula (I) tal como se ha definido previamente pueden obtenerse mediante procedimientos de síntesis disponibles. Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula (I) (o sus derivados protegidos, conteniendo, por ejemplo, residuos Arg y Asp protegidos) mediante ciclación de los siguientes segmentos de péptidos protegidos en los residuos Arg y Asp:

45 H-Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)-OH  
H-Gly-Asp-(beta-Lactam)-Arg-OH  
H-Asp-(beta-Lactam)Arg-Gly-OH  
H-(beta-Lactam)Arg-Gly-Asp-OH

50 Dichas ciclaciones puede llevarse a cabo utilizando reactivos de síntesis de péptidos conocidos recogidos, por ejemplo, en Houben Weyl Methods of Organic Chemistry (Métodos de química orgánica de Houben Weil), Vol. E 22 b, pp.461-542 (2003), y pudiendo escindirlos los grupos protectores en una última etapa de la síntesis aplicando métodos conocidos en el estado de la técnica.

55 La preparación de fragmentos (beta-Lactam), definidos según la fórmula (II) es conocida (ver, por ejemplo, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 3056-3058 (1999), J. Org. Chem. 66, 6333-6338 (2001), o J. Am. Chem. Soc. 125, 16243-16260 (2003)), y su incorporación en los segmentos anteriores puede conseguirse utilizando los compuestos de fórmula:

X-(beta-Lactam)-Y

60 En la que X e Y representan, en cada caso y de forma independiente:

X: H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-SO<sub>2</sub>-, 4-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>2</sub>-, 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>2</sub>-, 2,4-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-, PBF-, ALLOC-, CBZ-, Bn-, BOC-, FMOC-, CHO-, Me<sub>3</sub>Si-, <sup>t</sup>BuMe<sub>2</sub>Si-

65 Y: OH, OLi, ONa, OK, OMe, O<sup>t</sup>Bu, OBn, OC<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, SC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, F, Cl

Los productos de reacción pueden ser purificados, en caso necesario, mediante métodos convencionales tales como la cristalización, la cromatografía o la trituración. Cuando con los procedimientos descritos previamente para obtener los compuestos de la presente invención se consiguen mezclas de esteroisómeros, éstas pueden utilizarse como tales o bien pueden separarse mediante métodos convencionales como la cromatografía preparativa. En caso de que existan estero-centros, los compuestos pueden prepararse en forma racémica; alternativamente, pueden prepararse los enantiómeros individuales mediante síntesis enantioselectiva o mediante resolución.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se preparan a partir de los compuestos originales que contienen restos básicos o ácidos mediante métodos químicos convencionales. Por ejemplo, dichos compuestos pueden prepararse a partir de formas básicas o ácidas libres con cantidades estequiométricas de la base o ácido adecuado en agua, en un solvente orgánico o en mezclas de los mismos.

En general, son preferentes los medios no acuosos, particularmente dietiléter, etil acetato, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Como ejemplos de sales formadas por adición de ácido se incluyen sales de ácidos minerales tales como el clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de ácidos orgánicos, por ejemplo acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metansulfonato y p-toluensulfonato. Como ejemplos de sales formadas por la adición de bases se incluyen sales de bases inorgánicas tales como sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio, litio y bases orgánicas, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquiletanolamina, trietanolamina y las sales de los aminoácidos básicos.

Los compuestos de la presente invención pueden presentarse en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos, incluyéndose ambas formas dentro del alcance de la invención. Las técnicas de solvatación son bien conocidas en el estado de la técnica. Son solvatos adecuados aquellos que son farmacéuticamente aceptables. En una variación particular, el solvato es hidrato.

Una forma farmacéuticamente aceptable preferente es la cristalina, incorporada como tal en una composición farmacéutica. En el caso de sales y solvatos, los solventes residuales y los compuestos iónicos adicionales deben ser no tóxicos. Los compuestos de la presente invención pueden presentar formas polimórficas diferentes, todas ellas incluidas en la invención.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención o su sal, derivado, profármaco o esteroisómero farmacéuticamente aceptable, combinados con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a pacientes.

Como ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables se incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para tratar o prevenir enfermedades mediadas por la sobreexpresión de integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$  en humanos y animales. Las propiedades antiangiogénicas y de inhibición de las integrinas descritas previamente son útiles para el tratamiento del cáncer, más particularmente de las metástasis de tumores sólidos cancerosos. También son útiles para el tratamiento de la trombosis, la restenosis tras una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), la artritis reumatoide o la osteoporosis.

Los ejemplos siguientes se presentan con mero carácter ilustrativo y no limitan el alcance de la invención.

## EJEMPLOS

Los ejemplos 1 a 8 muestran la metodología para la preparación de los nuevos compuestos, según la presente invención. También se describe la preparación de sales fisiológicamente compatibles. En los ejemplos 9 y 10 se describe la conformación en solución acuosa de los compuestos preparados en los ejemplos 7 y 8. El ejemplo 11 muestra cómo evaluar la actividad biológica de los compuestos de la invención.

Los acrónimos de los reactivos o técnicas utilizadas se definen como sigue:

DAPI 4,6-Diamidina-2-fenilindol  
 DIPA Diisopropilamina  
 DIPEA Diisopropiletilamina  
 DMEM Medio Eagle modificado de Dulbecco  
 DMF N,N-Dimetilformamida  
 EDCI Clorhidrato de 1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida  
 HATU Hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio  
 HOAT 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol  
 HOBT Hidrato de 1-Hidroxibenzotriazol

LDA Diisopropilamida de litio  
 LHMDS Bis(trimetilsilil)amida de litio  
 MS (ESI) Espectrometría de masas (ionización por electrospray)  
 THF Tetrahidrofurano  
 TMEDA N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

**Ejemplo 1:****Preparación de 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>6</sub>-(beta-Lactam)-OH.**

(beta-Lactam): R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=R<sup>4</sup>=R<sup>5</sup>=R<sup>6</sup>=H; configuración (3S), según la fórmula (II)

Se hizo refluir una suspensión de éster metil de (S)-α-bencilserina (4,0 g, 19 mmol), cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo (8,5 g; 38 mmol) y KHCO<sub>3</sub> (9,5 g, 95 mmol) en acetonitrilo (150 mL) durante 16 horas. A la (S)-2-bencil-2-metoxycarbonil-1-(2-nitrobencenosulfonil)aziridina formada "in situ" y con KHCO<sub>3</sub> en exceso enfriado a 20 °C, se añadió alilamina (2,13 mL, 28,5 mmol) y se agitó la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se añadió a la suspensión resultante una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) y se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub> anhidro) y evaporaron. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: Hexano/EtOAc 3/1) dio lugar a propanoato de metil (S)-3-alilamino-2-bencil-2-(2-nitrobencenosulfonilamino) (6,09 g 74%). A una solución de este compuesto en THF anhidra (30 mL) enfriado a 0 °C, se añadió gota a gota durante 5 minutos LHMDS (1M en THF) (35 mL, 35 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. A continuación, se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) y se extrajo la mezcla con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y evaporó dando lugar a (S)-3-bencil-3-(2-nitrobencenosulfonilamino)-1-alilazetidina-2-ona (5,13 g, 94%), que se disolvió en acetonitrilo (30 mL). Se añadieron a la solución periodato sódico (10,65 g, 50 mmol) y una cantidad catalítica de tricloruro de rutenio hidratado (50 mg) a 0° y se agitó la mezcla durante 3 horas a la misma temperatura. Se añadió una solución acuosa de HCl (0,1 M) (50 mL) y se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y evaporaron dando lugar al producto del título. Rendimiento global: 4,05 g (51 %). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -2,5 (c = 0,075, MeOH); <sup>1</sup>H-RMN (500MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7,77-8,12 (m, 4H, arom.), 7,31-7,21 (m, 5H, arom), 3,67 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>, β-Lactam, J= 6,0 Hz), 3,59 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3,56 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>, β-Lactam, J= 6,1 Hz), 3,28 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>Ph).

**Ejemplo 2****Preparación de 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>2</sub>-(beta-Lactam)-OH**

(beta-Lactam): R<sup>1</sup>= CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= R<sup>6</sup>= H; configuración (3R), según la fórmula (II).

Se hizo refluir una suspensión de éster metílico de (R)-α-bencilserina (2,1 g, 10 mmol), cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo (2,2 g, 38 mmol) y KHCO<sub>3</sub> (5,0 g, 50 mmol) en acetonitrilo (80 mL) durante 16 horas. A la (R)-bencil-2-metoxycarbonil-1-(2-nitrobencenosulfonil)aziridina formada "in situ" y con KHCO<sub>3</sub> en exceso enfriado a 20 °C, se añadió 2-(O- tert-butildimetilsililoxi)-etilamina (1,75 g, 10 mmol) y se agitó la mezcla durante 20 horas a temperatura ambiente. Se añadió a la suspensión resultante una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) y se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y evaporaron bajo presión reducida dando lugar al producto intermedio. Se purificó el producto crudo mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hx 1:4) dando lugar a metil propanoato de (R)-3-(2-tert-butildimetilsililoxietil)-2-bencil-2-(2-nitrobencenosulfonilo amino) (3,75 g 68%). A una solución de este compuesto en THF anhidra (30 mL) enfriado a 0°C, se añadió gota a gota LHMDS (1 M en THF) (25 mL, 25 mmol) durante 5 minutos y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Tras ello, se añadió una solución de NaHCO<sub>3</sub> (sat.) (20 mL) y se extrajo la mezcla con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 15 mL). La fase orgánica se decantó y secó (MgSO<sub>4</sub>). Se procedió a la evaporación bajo presión reducida dando lugar a (S)-3-bencil-3-(2-nitrobencenosulfonilamino)-1-(2-tert-butildimetilsililoxietil)-azetidina-2-ona pura (3,43 g, 97%). El producto crudo se disolvió en acetona (50 mL). Sobre esta solución, enfriada a 0°C, se añadió gota a gota, una solución en agua (9 mL) de trióxido de cromo (3,3 g, 33 mmol), ácido sulfúrico (2,86 mL) y ácido hidrofúrico (48%) (0,8 mL, 8 mmol). Se agitó la solución resultante, a temperatura ambiente, durante 1 hora. A continuación se añadieron sucesivamente isopropanol (5 mL) y agua (100 mL). Se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3 x 20 mL), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente hexanos/EtOAc 1:5). Rendimiento global: 2,43 (58%) [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +2,8 (c = 0,10, MeOH).

**Ejemplo 3:****Preparación de 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>2</sub>-(beta-Lactam)-OH.**

(beta-Lactam): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>5</sup>= R<sup>6</sup>= H; R<sup>4</sup> = Ph; configuración (3S), (1'R), según la fórmula (II).

Se siguió el procedimiento del ejemplo 2, partiendo de (S)- $\alpha$ -bencilserina (2,1 g, 10 mmol), y (R)-2-(O-tertbutildimetilsililoxi)-2-fenil-etilamina (2,51 g, 10 mmol), Rendimiento global: 2,18 g (44%), punto de fusión = 195-7 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -42,8$  (c = 0,75, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $\delta$ ): 7,21-7,89 (m, 14H, arom.), 5,45 (s, 1H, PhCHCO<sub>2</sub>H), 3,79 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>,  $\beta$ -Lactam, J= 6,0 Hz), 3,42 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>,  $\beta$ -Lactam, J= 5,6 Hz), 3,32 (ancho s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph).

#### Ejemplo 4:

##### Preparación de 2-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-SO<sub>2</sub>-(beta-Lactam)-OH.

(beta-Lactam): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>5</sup> = R<sup>6</sup> = H; R<sup>4</sup> = Ph; configuración (3S), (1'S), según la fórmula (II).

Se siguió el procedimiento del ejemplo 2, partiendo de (S)- $\alpha$ -bencilserina (2,1 g, 10 mmol), y (S)-2-(O-tertbutildimetilsililoxi)-2-fenil-etilamina (2,51 g, 10 mmol). Rendimiento global: 2,58 g (52%).  $[\alpha]_D^{20} = +2,4$  (c = 0,05, MeOH); <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ): 7,77-8,30 (m, 4H, arom.), 6,74-7,2 (m, 5H, arom), 5,07 (s, 1H, PhCHCO<sub>2</sub>H), 3,70 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>,  $\beta$ -Lactam, J= 6,3 Hz), 3,13 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3,11 (d, 1H, NCH<sub>2</sub>,  $\beta$ -Lactam, J= 6,6 Hz).

#### Ejemplo 5:

##### Preparación de H-(beta-Lactam)-OMe.

(beta-Lactam): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>(2-Naftilo); R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = R<sup>5</sup> = R<sup>6</sup> = H; configuración (3R, 4R), según la fórmula (II)

**a) (3R,4R)-1-[Bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona:** Se añadió a una solución de DIPA seco (0,92 mL, 6,5 mmol) en THF (30 mL) enfriado a -78°C en un baño de CO<sub>2</sub>/acetona, una solución de n-BuLi (2,5 M en hexano) (2,6 mL, 6,5 mmol) y la solución LDA resultante se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente. Se añadió sobre el LDA previamente formado una solución de (3S,4R)-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-azetidín-2-ona (2,61 g, 5 mmol) [preparado según la descripción en Chem, Eur, J., 3, 1432-1441 (1997)] en THF (40 mL) y la mezcla resultante se agitó a -78°C durante 10 min. A continuación, se añadió una solución de 2-bromometilnaftaleno (3,28 g, 15 mmol) en THF anhidra (30 mL) y se agitó la mezcla durante 16 horas mientras la temperatura ascendía lentamente hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) y se lavó sucesivamente con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado (50 mL), HCl (1 M) (50 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (sat.) (50 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y evaporó bajo presión reducida dando lugar a un producto crudo, que se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hex 1:6). Rendimiento 2,58 g (78%), punto de fusión: 187-188 (EtOH);  $[\alpha]_D^{20} = -0,012$  (c = 0,5, EtOH), IR(cm<sup>-1</sup>, KBr): 1760,7, 1741,7 (C=O), 845,3 (C-Si). <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 8,00 (s, 1H, H-1 Naft), 7,83 (d, 1H, J= 7,5 Hz, H-8 Naft), 7,78 (d, 1H, J= 8,3 Hz, H-5, Naft), 7,71 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-3 Naft), 7,62 (d, 1H, J= 7,8 Hz, H-4 Naft), 7,45 (m, 2H, H-6, H-7 Naft), 7,01-6,99 (m, 10H, Ph), 5,60 (d, 1H, J= 7,2 Hz, OCHPh), 5,02 (d, 1H, J= 7,2 Hz, NCHPh), 3,95 (t, 1H, NCH/Bu), 3,29 (d, 1H, J= 15,8 Hz, CH<sub>2</sub>Naft), 3,09 (d, 1H, J= 15,8 Hz, CH<sub>2</sub>Naft), 2,02 (s, 1H, CHSiMe<sub>3</sub>), 1,63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>), 1,26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>), 0,86 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>), 0,28 (s, 9H, SiMe<sub>3</sub>), 0,04 (s, 9H, SiMe<sub>3</sub>)

**b) (3R,4R)-3-[(4S,5R)-4,5-Difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-1-[(metoxicarbonil)metil]-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona:** Se añadió a una solución de (3R,4R)-1-[bis(trimetilsilil) metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona (2,58 g, 3,9 mmol) en acetonitrilo (10 mL), enfriada a 0°C, Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (11,5 g, 21 mmol) en H<sub>2</sub>O (20 mL). Se agitó la mezcla a 0°C durante 10 min. y a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se añadió agua (100 mL) y EtOAc (3 x 30 mL) y se lavó la fase orgánica con NaHCO<sub>3</sub> (sat.) (50 mL), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó bajo presión reducida dando lugar a (3R,4R)-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-1-formil-4-isobutil-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona cruda (100%). A este material disuelto de MeOH (50 mL) se añadió Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,70 g, 0,6 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> acuoso (sat.) (20 mL) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 90 min. Se filtró y separó el residuo sólido y se lavó con MeOH (20 mL). Se vertió H<sub>2</sub>O (400 mL)/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) sobre las fases metánolicas combinadas y se realizó una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y evaporó y el producto crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hex 1:3). Rendimiento 1,41 g (63%). A una suspensión de NaH (0,11 g, 3,8 mmol) en THF anhidra (25 mL) enfriada a 0°C se añadió, sucesivamente, (3R,4R)-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-3-[(2-naftil) metil]azetidín-2-ona (1,34 g, 3 mmol), bromoacetato de metilo (0,39 mL, 4,2 mmol) y éter 15-corona-5 (0,13 g, 0,3 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2h. Se añadió HCl acuoso (2 M) hasta conseguir un pH ácido fuerte y se extrajo la mezcla con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 mL). Las fases orgánicas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y evaporaron dando lugar al producto crudo que se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hx 1:1). Rendimiento global: 1,12 g (72%).

**c) (3R,4R)-3-Amino-4-isobutil-1-(metoxicarbonil)metil]-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona:** Se agitó una suspensión de (3R,4R)-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-isobutil-1-[(metoxicarbonil)metil]-3-[(2-naftil)metil]azetidín-2-ona (1,04 g, 2 mmol) y Pd(OH)<sub>2</sub> (10% en carbono, 0,16 g) en metanol (20 mL) bajo una atmósfera de

hidrógeno (1 atm.) durante 48 horas. Tras este período de tiempo se filtraron los sólidos sobre celita y se evaporó el solvente dando lugar a una mezcla de 1,2-difeniletano y el producto deseado, que se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/hexanos 1:10, tras MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:5). Rendimiento: 0,58 g (95%).

5

### Ejemplo 6:

#### Preparación de Boc-(beta-Lactam)-OH

10 (beta-Lactam): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = R<sup>5</sup> = R<sup>6</sup> = H; R<sup>2</sup> = Me; configuración (3R, 4R), según la fórmula (II).

15 **a) (3R,4R)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-tert-butoxicarbonilamino-4-metil-azetidín-2-ona:** Se siguió el procedimiento del ejemplo 5-a), partiendo de (3S,4R)-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-metil-azetidín-2-ona (2,61 g, 5 mmol) y bromuro de bencilo (5,55 mL, 15 mmol), obteniéndose (3,4R)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-4-metil-azetidín-2-ona. Rendimiento: 1,91 g (67%). Se agitó una suspensión de este producto, di-tert-butil dicarbonato (6,06 g, 26,4 mmol) y Pd(OH)<sub>2</sub> (10% en carbono, 0,24 g, catal.) en etanol anhidro (80 mL) bajo atmósfera de hidrógeno (160 psi.) a 60°C durante 24 horas. Se filtraron los sólidos sobre celita, se evaporó el filtrado y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/hexanos 1:30). Rendimiento global: 1,34 g (60%). Punto de fusión: 66-69 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -10,5 (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,29-7,18 (m, 5H, Ar), 4,98 (s, 1H, NH), 3,83-3,79 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CHN) 3,30 (d, 1H, J = 13,8 Hz, PhCHHC), 2,89 (d, 1H, J = 13,7 Hz, PhCHHC), 2,11 (s, 1H, CH(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,52 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0,20 (s, 9H, SiMe<sub>3</sub>), 0,13 (s, 9H, SiMe<sub>3</sub>).

25 **b) (3R,4R)-3-Bencil-3-tert-butoxicarbonilamino-1-(carboximetil)-4-metilazetidín-2-ona:** Se calentó hasta 70°C una solución de (3R,4R)-3-bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-tert-butoxicarbonilamino-4-metil-azetidín-2-ona (1,34 g, 3 mmol) en acetonitrilo seco (20 mL) y se añadió CsF (1,32 g, 9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a la misma temperatura durante 2 horas, se evaporó el solvente y el crudo resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL). La capa orgánica se lavó con agua (20 mL), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó obteniéndose (3R,4R)-3-bencil-1-(trimetilsililmetil)-3-tert-butoxicarbonilamino-4-metil-azetidín-2-ona en crudo, que se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hx 1:2). Rendimiento: 1,03 g (91%). A una solución de la anterior β-lactama (1,03 g, 2,73mmol) en THF (12 mL), enfriada a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron gota a gota TMEDA (1,02 mL, 6,8 mmol) y tBuLi (1,5 M en pentano) (4,5 mL, 6,8 mmol). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 1 hora y a continuación se borboteó CO<sub>2</sub> seco por la solución durante 2 minutos. La mezcla se enfrió con NH<sub>4</sub>Cl (2 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). Se hizo básica la capa orgánica con NaOH (1 M), se separó la solución acuosa, se aciduló con HCl 6 M y se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL) obteniéndose el compuesto ácido: Rendimiento: 0,47 g (45%). IR KBr cm<sup>-1</sup>: 3500-2800 (OH, ancho), 1768; 1753; 1714 (C=O); <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,38-7,27 (m, 5H, Ar), 5,03 (s, 1H, NH(Boc)), 4,22 (d, 1H, J=15,1Hz, NCHHCO<sub>2</sub>H), 4,18 (m, 1H, (CO)NCH), 3,95 (d, 1H, J=15,2Hz, NCHHCO<sub>2</sub>H), 3,18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 1,43 (s, 9H, CO<sub>2</sub>CMe<sub>3</sub>), 1,39 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J=5,4Hz).

### 40 Ejemplo 7:

#### Preparación de la sal trifluoroacética de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)]

45 (beta-Lactam): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = R<sup>5</sup> = R<sup>8</sup> = H; configuración (3S), según la fórmula (II).

50 **a) 3-CBZ-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)-OH:** A una solución de (S)-3-amino-3-bencil-1-(metoxicarbonilmetil)azetidín-2-ona [H-(beta-Lactam)-OMe] (1,30 g, 3,02 mmol), y N-metilmorfolina destilada (0,83 mL, 7,55 mmol) en diclorometano seco (20 mL) fue enfriado a 0°C, se añadió gota a gota una solución de fluoruro de ácido CBZ-Asp-(O<sup>t</sup>Bu)-F (1,62 g, 4,99 mmol) en diclorometano seco (20 mL). Se agitó la reacción durante 16 horas mientras se calentaba lentamente hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con una solución acuosa de HCl (0,1 M) (2 x 20 mL) y una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y evaporó, y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente EtOAc/Hx 1:1). Rendimiento (1,08 g, 65%). El compuesto resultante 3-CBZ-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)-OMe (0,627 g, 1,13 mmol), se disolvió en THF (12 mL), se añadió una solución de LiOH.H<sub>2</sub>O (71 mg, 1,7 mmol) en H<sub>2</sub>O (6 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se aciduló con una solución de ácido cítrico al 5%, se evaporó la THF bajo presión reducida y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó el solvente bajo presión reducida dando lugar al producto puro (0,61 g, 100%). MS (ESI), m/z: 554,1. <sup>1</sup>HRMN (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 7,37-7,26 (m, 10H, Ph), 6,96 (s, NH β-Lactam), 5,84 (d, 1H, J = 8,3 Hz, CbzNH), 5,12 (d, 1H, J = 12,2 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,08 (d, 1H, J = 12,2 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,49 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu), 4,12 (d, 1H, J = 17,6 Hz, CHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3,78 (d, 1H, J = 17,6 Hz, CHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3,67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, β-Lactam), 3,62 (d, 1H, J = 4,9 Hz, CH<sub>2</sub>, β-Lactam), 3,26 (d, 1H, 14,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 3,20 (d, 1H, 12,7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 2,86 (dd, 1H, J = 17,1, 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu), 2,58 (m, 1H, J = 17,1, 16,6, 6,3, 5,9 Hz, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu), 1,41 (s, 9H, tBu).

65 **b) CBZ-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)-Arg(PBF)-Gly-OBn:** Se preparó en un matraz seco y bajo atmósfera de nitrógeno una solución de 3-CBZ-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)-OH (0,291 g, 0,54 mmol) y H-Arg(PBF)-Gly-OBn (0,293

g, 0,52 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Se añadió consecutivamente a esta mezcla trietilamina (0,145 mL, 1,04 mmol), EDCI (0,16 g, 0,835 mmol) y HOBT (0,99 g, 0,73 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 20 horas y a continuación se lavó sucesivamente con una solución acuosa de HCl (0,1 M) (2 x 10 mL) y una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y evaporó bajo presión reducida obteniéndose un producto crudo, que se purificó mediante cromatografía en columna (silicagel-60, eluyente MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:25). Rendimiento: 0,569 g (82%), MS (ESI), m/z: 1095,3; IR KBr, cm<sup>-1</sup>: 3456, 3343, 1757, 1663, 1550, 1461. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, DMSO<sub>d6</sub>, δ): 8,38 (t, 1H, J= 5,6 Hz, NH-Gly), 8,23 (s, 1H, NH-β-Lactam), 8,50 (d, 1H, J= 8,3 Hz, NH-Asp), 8,12 (d, 1H, J= 7,8 Hz, NH-Arg), 7,35-7,22 (m, 15H, arom.), 5,12 (s, 2H, O CH<sub>2</sub>Ph), 5,06 (d, 1H, J= 12,0 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,98 (d, 1H, J= 12,0 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,41 (m, 1H, Hα-Asp), 4,25 (m, 1H, Hα-Arg), 3,92 (dd, 1H, J= 5,9, 17,6 Hz, Hα-Gly), 3,85 (dd, 1H, J= 5,9, 17,6 Hz, Hα-Gly), 3,77 (d, 1H, J= 17,3Hz, Hα (β-Lactam), 3,70 (d, 1H, J= 17,3 Hz, Hα β-Lactam), 3,50 (d, 1H, J= 5,4 Hz, Hββ-Lactam), 3,36 (d, 1H, J= 5,4 Hz, Hββ-Lactam), 3,20 (d, 1H, J= 14,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ph β-Lactam), 3,09 (d, 1H, J= 14,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ph β-Lactam), 3,00 (m, 2H, Hδ-Arg), 2,92 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Pbf), 2,53 (dd, 1H, J= 4,9, 16,1Hz, Hβ-Asp), 2,48 (s, 3H, Me-Pbf), 2,42 (s, 3H, Me-Pbf), 2,39 (dd, 1H, J= 9,3, 16,1Hz, Hβ-Asp), 2,48 (s, 3H, Me-Pbf), 2,42 (s, 3H, Me-Pbf), 2,39 (dd, 1H, J= 9,3, 16,1Hz, Hβ-Asp), 1,99 (s, 3H, Me-Pbf), 1,66 (m, 2H, Hβ-Arg), 1,49 (m, 2H, Hγ-Arg), 1,40 (s, 6H, 2xMe-Pbf), 1,34 (s, 9H, tBu).

**c) ciclo[Arg(PBF)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)]:** Se agitó una suspensión de CBZ-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)-Arg (PBF)-Gly-OBn (86 mg, 0,08 mmol) y Pd/C al 10% (9 mg) en etanol (5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno (1 atm.) durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de celita y se evaporó el solvente bajo presión reducida. Se disolvió el crudo (70 mg, 0,073 mmol, rendimiento 92 %) en DMF seco (20 mL), se enfrió la solución resultante a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno y se añadieron consecutivamente, y HATU (44 mg, 0,073 mmol), HOAT (14 mg, 0,102 mmol) y DIPEA (0,076 mL, 0,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. a 0°C comprobando el pH cada hora con tiras de papel de pH manteniéndolo ajustado a un pH entre 7 y 8. Tras 6 horas más, se añadió DIPEA (0,013 mL, 0,073 mmol) para aumentar el pH a un valor entre 8 y 9. Se agitó la mezcla durante 20 horas a temperatura ambiente, el solvente se evaporó bajo presión reducida a una temperatura inferior a los 50°C, y el crudo se disolvió en EtOAc (5 mL) y se lavó con una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (5%). El producto crudo obtenido tras evaporación del solvente bajo presión reducida se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (eluyente Me-OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:10). Rendimiento: 17 mg, (28%). MS (MALDI-TOF), m/z: 853,02; IR KBr, cm<sup>-1</sup>: 3446, 3386, 1752, 1730, 1663, 1550, 1259, 1160, 1130. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, DMSO<sub>d6</sub>, δ): 8,62 (t, 1H, J= 5,4 Hz, NH-Gly), 8,35 (s, 1H, NH-(β-Lactam), 8,26 (d, 1H, J= 7,8 Hz, NH-Asp), 8,11 (d, 1H, J= 8,8 Hz, NH-Arg), 7,28-7,11 (m, 5H, arom.), 4,50 (m, 1H, Hα-Asp), 4,17 (m, 1H, Hα-Arg), 3,93 (dd, 1H, J= 6,3,13,7 Hz, Hα-Gly), 3,75 (1H, d, J= 14,2 Hz, Hα β-Lactam), 3,50 (s, 1H, Hβ β-Lactam), 3,50-3,11 (m, 5H, Hα-Gly, Hα β-Lactam, Hβ β-Lactam, CH<sub>2</sub>Ph), 3,00 (m, 2H, Hδ-Arg), 2,85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Pbf), 2,70 (dd, 1H, J= 9,3, 16,1Hz, Hβ-Asp), 2,45 (m, 3H, Me-Pbf), 2,43 (m, 1H, Hβ-Asp), 2,40 (s, 3H, Me-Pbf), 1,54 (m, 1H, Hβ-Arg), 1,46 (m, 3H, Hβ,Hγ-Arg), 1,40 (s, 6H, 2xMe-Pbf), 1,38 (s, 9H, tBu).

**d) Sal trifluoroacética de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)]:** Se agitó una solución de ciclo[Arg(PBF)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(beta-Lactam)] (18 mg, 0,02 mmol) en ácido trifluoroacético (0,3 mL) a 35°C durante 1 hora. A continuación se vertió sobre la solución isopropil éter (10 mL) y se centrifugó el precipitado resultante. El sólido se lavó con isopropil éter (2 x 5 mL) y se secó a presión reducida. Rendimiento: 14 mg (100%). MS (MALDI-TOF), m/z: 658,58. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 90/10, δ): 8,83 (s, 1H, NH-Arg), 8,62 (t, 1H, NH-Gly), 7,85 (d, 1H, J= 5,4 Hz, NH-Asp), 7,73 (s, 1H, NH-β-Lactam), 7,34-7,02 (m, 5H, arom.), 7,15 (s, 1H, NHω-Arg), 6,61 (s, 1H, NHω-Arg), 4,55 (m, 1H, Hα-Asp), 4,23 (dd, 1H, J= 7,23, 17,3 Hz, Hα-Gly), 3,94 (m, 1H, Hα-Arg), 3,92 (d, 1H, J=14,0 Hz, Hα β-Lactam), 3,83 (s, 1H, Hβ β-Lactam), 3,76 (d, 1H, J= 14,0 Hz, Hα β-Lactam), 3,63 (s, 1H, Hβ β-Lactam), 3,50 (dd, 1H, J= 7,2, 17,3 Hz, Hα-Gly), 3,47 (d, 1H, J=14,1 Hz Hδ, β-Lactam), 3,12 (m, 2H, Hδ-Arg), 3,10 (d, 1H, J= 14,1 Hz, Hδ, β-Lactam), 2,85 (dd, 1H, J= 5,1, 17,5Hz, Hβ-Asp), 2,67 (dd, 1H, J= 8,0, 17,5 Hz, Hβ-Asp), 1,72 (m, 2H, Hγ-Arg), 1,62 (m, 1H, Hβ-Arg), 1,54 (m, 1H, Hβ-Arg).

#### Ejemplo 8:

##### Preparación de sal trifluoroacética de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)]

(beta-Lactam): R<sup>1</sup>= CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>2</sup>= R<sup>3</sup>= R<sup>4</sup>= R<sup>5</sup>= R<sup>6</sup>= H; configuración (3R), según la fórmula (II).

Se siguió el procedimiento del ejemplo 7, partiendo de (R)-3-amino-3-bencil-1-metoxicarbonilmetilazetidín-2-ona (4,30g, 10 mmol). Rendimiento global; 1,12 g (17%). Punto de fusión = 180-220°C (dec.); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 0,3 (c = 0,28, 1 M HCl). <sup>1</sup>H RMN (500MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 90/10, δ) 9,22 (d, 1H, J= 5,3 Hz, NH-Arg), 8,93 (s, 1H, NH-p-Lactam), 8,59 (t, 1H, J= 6,3 Hz, NH-Gly), 8,11 (d, 1H, J= 7,6 Hz, NH-Asp), 7,03-7,40 (m, 5H, arom.), 7,13 (m, 2H, NH-Arg), 6,58 (m, 1H, NH-Arg), 4,80 (m, 1H, Asp), 3,98 (dd, 1H, J= 6,8Hz, CH<sub>2</sub>, Hα-Gly), 3,86 (d, 1H, J= 15,7Hz, CH<sub>2</sub>), 3,80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3,20 (d, 1H, J=14,7Hz, CH), 3,19 (d, 1H, J= 13,9Hz, CH<sub>2</sub>), 3,14 (dd, 2H, J= 7,0Hz, J= 13,5Hz, CH<sub>2</sub>), 3,01 (d, 1H, J= 13,8Hz, CH<sub>2</sub>), 2,77 (dq, 2H, J= 6,9Hz, J= 16,6Hz, CH<sub>2</sub>, Hα-Asp), 1,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Hβ-Arg), 1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Hγ-Arg).

#### Ejemplo 9:

**Conformación de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)] en solución acuosa, conteniendo (beta-Lactam) de configuración (S), según la fórmula (II) en la que  $R^1 = CH_2Ph$ ;  $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$  (Compuesto A)**

5 Se disolvió el compuesto A, preparado según el ejemplo 7, a una concentración de 10 mM en agua destilada con un 10% de  $D_2O$ . Los experimentos siguientes se realizaron a 300K en un espectrómetro Bruker Avance-500 equipado con una sonda BBI con los siguientes gradientes en el eje z: a) un espectro  $^1H$  monodimensional utilizando un pulso "water suppression by excitation sculpting" ("supresión acuosa mediante modelado de la excitación") [J. Mag. Res., serie A, 112, 275-279 (1995)] (Figura 1), b) un espectro bidimensional TOCSY-WATERGATE "total correlation spectroscopy" (espectroscopía de correlación total) [J. Mag. Res., 130, 162-168 (1998)] (figura 2), c) un espectro bidimensional ROESY-WATERGATE "rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy" (espectroscopía de intensificación del marco rotatorio Overhauser) [J. Mag. Res., 63, 207-213 (1985)] con un tiempo de mezclado de 200 ms. (Figura 3). La asignación de protones en el espectro  $^1H$  se basó en las correlaciones del experimento TOCSY utilizando un procedimiento de asignación secuencial. Además, se determinaron las distancias inter-protónicas mediante la integración de las señales de cruce del espectro ROESY. La variación del desplazamiento químico de los protones amida con la temperatura se determinó en el mismo solvente entre 300K y 325K a intervalos de 5K (figura 4).

20 Considerando como enlaces de hidrógeno estables aquellos que muestran coeficientes térmicos inferiores a -5 ppb/K, solamente puede considerarse que participan en puentes de hidrógeno intramoleculares el NH(beta-Lactam) con -0,97 ppb/K y NH(Asp) con -2,8 ppb/K. El alto valor observado en el caso de NH(Arg) (-5,59 ppb/K) confirmó la ausencia de giros  $\beta$  entre NH(Arg) y C=O(Asp). La estructura tridimensional del compuesto A (figura 5) se determinó en una caja de agua a 300K a partir del análisis de grupos conformacionales mediante Molecular Dynamics incorporando distancias inter-protónicas restringidas, según el método descrito en J. Am. Chem. Soc. 123, 2393-2404 (2001), y utilizando el programa X-Plor (v2.9.2) [J. Mag. Res., 160, 66-74 (2003)]. El compuesto A muestra un giro  $\gamma$  inverso formando un puente de hidrógeno entre NH(beta-Lactam) y C=O (Gly) y un giro  $\gamma$  entre NH(Asp) y C=O(Arg).

**Ejemplo 10:**

30 **Conformación de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)] en solución acuosa, conteniendo (beta-Lactam) de configuración (R), según la fórmula (II) en la que  $R^1 = CH_2Ph$ ;  $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$  (Compuestos B).**

35 Se disolvió el compuesto B, preparado según el ejemplo 8, a una concentración de 5mM en agua destilada con un 10% de  $D_2C$ . Utilizando las mismas técnicas descritas para el compuesto A, se registraron los experimentos siguientes: a) un espectro  $^1H$  utilizando un pulso "water suppression by excitation sculpting" ("supresión acuosa mediante modelado de la excitación") (Figura 6), b) un espectro bidimensional TOCSY-WATERGATE (figura 7), c) un espectro bidimensional ROESY-WATERGATE con un tiempo de mezclado de 400 ms. (Figura 8). La asignación de protones, la determinación de las distancias inter-protónicas y la determinación de la variación del desplazamiento químico de los protones amida con la temperatura (figura 9) se realizaron bajo condiciones idénticas a las descritas para el compuesto A.

40 En el compuesto B, solamente la amida NH(Asp), con -4,4 ppb/K, forma puentes de hidrógeno intramoleculares. El alto valor observado para NH(Arg) (-8,4 ppb/K) confirma la ausencia de puentes de hidrógeno con giros  $\beta$  entre NH(Arg) y C=O(Asp). La estructura tridimensional del compuesto B (figura 10) se determinó de forma idéntica a la del compuesto A, mostrando un giro  $\gamma$  con puente de hidrógeno entre NH(Asp) y C=O (Arg).

**Ejemplo 11:**

50 **Ensayo de adhesión a células endoteliales de ciclo[Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)] conteniendo (beta-Lactam) según la fórmula (II) de los compuestos A y B.**

55 Se cultivaron células endoteliales umbilicales humanas, HUVEC (BD Biosciences) hasta una confluencia del 80% y a continuación se recolectaron rápidamente utilizando 0,025% tripsina/EDTA (Sigma). Se preincubaron las células con diferentes concentraciones de los compuestos A, B, E, F y G durante 20 minutos en medio CSC (Sigma) preparados según se describe en los ejemplos 7 y 8.

60 Los experimentos se realizaron por triplicado para cada concentración y se repitieron tres veces en experimentos diferentes para un rango de concentraciones entre  $10^{-4}M$  y  $10^{-9}M$  a intervalos de medio orden de magnitud. Las células tratadas con los péptidos ( $4 \times 10^4$  células/100  $\mu L$ /pocillo) se cultivaron en microplacas de 96 pocillos recubiertas previamente con vitronectina (10 mg/mL en PBS) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, 5%  $CO_2$ /95% de aire para permitir la adhesión de las células. Las células se lavaron suavemente tres veces con PBS para eliminar las células no adheridas. El número de células adheridas se determinó mediante el método del colorante fluorescente DAPI utilizando citometría de flujo celular (Beckton Dickinson Co).

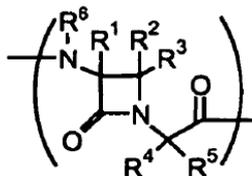
5 El porcentaje de células se muestra en comparación con el experimento control para cada concentración con las barras de error representando el error estándar de la media (SEM) (figura 11). La figura muestra claramente que los compuestos A, B inducen una inhibición de la adhesión mediada por la integrina  $\alpha_v\beta_3$  a concentraciones sub-micromolares, mostrando que la inhibición es independiente de la configuración (R) o (S) en la posición a de la  $\beta$ -lactama, de las sustituciones a nivel de la posición  $\alpha'$  y del tipo y posición del giro  $\gamma$ .

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



que contiene al menos un giro- $\gamma$ , en el que (beta-Lactam)- es un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidín-2-ona de fórmula (II):



(II)

en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido,  $-\text{COR}^7$ ,  $-\text{C(O)OR}^7$ ,  $-\text{C(O)NR}^7\text{R}^8$ ,  $-\text{C}=\text{NR}^7$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{OR}^7$ ,  $-\text{OC(O)R}^7$ ,  $-\text{S(O)}_t\text{R}^7$ ,  $-\text{NR}^7\text{R}^8$ ,  $-\text{NR}^7\text{C(O)R}^8$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{N}=\text{CR}^7\text{R}^8$  o halógeno;

en la que dos de ellos pueden unirse para formar un sustituyente cíclico;

$t$  es 1, 2 ó 3,

$R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, ariloxilo sustituido o no sustituido, o halógeno;

sus enantiómeros, diastereómeros o sales farmacéuticamente aceptables.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, caracterizado por un grupo  $R^1$  seleccionado entre un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo alquildenaromático definido por la fórmula  $-(\text{CH}_2)_n\text{Ar}$  en la que  $n$  es 1, 2, 3 ó 4 y  $\text{Ar}$  es un grupo arilo o aromático heterocíclico.

3. Compuesto, según la reivindicación 2, en el que  $R^1$  es  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ .

4. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por un grupo  $R^4$  seleccionado preferentemente entre H, metilo, etilo, alilo, iso-propilo, iso-butilo, bencilo, alilo, 4-hidroxibencilo, hidroximetilo, 1-hidroxietilo, carboximetilo, carboxietilo, aminocarbonilmetilo, aminocarboniletilo, 4-aminobutilo, 3-guanidilpropilo, tiometilo, 2-(metiltio)etilo, 3-indolilometilo, preferentemente H.

5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por un grupo  $R^5$  seleccionado entre H, metilo, etilo, alilo, bencilo o fenilo, preferentemente H.

6. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por un enlace entre los grupos  $R^4$  y  $R^5$  que forma un anillo  $-(\text{CH}_2)_n-$ , en el que  $n$  es 2, 3 o 4.

7. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque tanto  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  como  $R^6$  son H.

8. Composición farmacéutica que comprende un compuesto definido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, sus enantiómeros, diastereómeros o mezclas de los mismos.

9. Procedimiento para la obtención de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que incluye:

a) la ciclación de los siguientes pseudopéptidos protegidos en los residuos Arg y Asp:

H-Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)-OH  
 H-Gly-Asp-(beta-Lactam)-Arg-OH  
 H-Asp-(beta-Lactam)-Arg-Gly-OH  
 H-(beta-Lactam)-Arg-Gly-Asp-OH

en los que (beta-Lactam)- es un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidinona de la fórmula (II), tal como se define en la reivindicación 1;

b) opcionalmente, la eliminación de los grupos protectores.

5 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la ciclación se realiza a partir de un pseudopentapéptido de fórmula H-Asp(OtBu)-(beta-Lactam)-Arg(PBF)-Gly-OH, sus sales o ésteres activados.

10 11. Pseudopéptido de fórmulas:

H-Arg-Gly-Asp-(beta-Lactam)-OH

H-Gly-Asp-(beta-Lactam)-Arg-OH

H-Asp-(beta-Lactam)-Arg-Gly-OH

H-(beta-Lactam)-Arg-Gly-Asp-OH

15 en las que (beta-Lactam)- es un fragmento de la 3-amino-1-(2-carbonilmetil)-azetidinona de la fórmula (II), tal como se define en la reivindicación 1, y en las que Asp y Arg están opcionalmente protegidos con grupos protectores.

20 12. Pseudopéptido, según la reivindicación 11, de fórmula H-Asp(OtBu)-(beta-Lactam)-Arg(PBF)-Gly-OH, sus sales o ésteres activos.

13. Utilización de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de fármacos.

25 14. Utilización de un compuesto, según la reivindicación 13, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por integrinas del tipo  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$  en humanos o animales, seleccionándose dicha enfermedad entre cáncer, metástasis de tumores sólidos cancerosos, trombosis, restenosis tras una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), artritis reumatoide u osteoporosis.

30 15. Sistema para la purificación de integrinas que incluye un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

16. Sistemas de análisis o diagnóstico que incluyen un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

35 17. Material que incluye un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, inmovilizado sobre un soporte.

18. Material, según la reivindicación 17, en el que el soporte es un polímero, una proteína, un colorante fluorescente o una fase estacionaria de cromatografía.



Figura 2

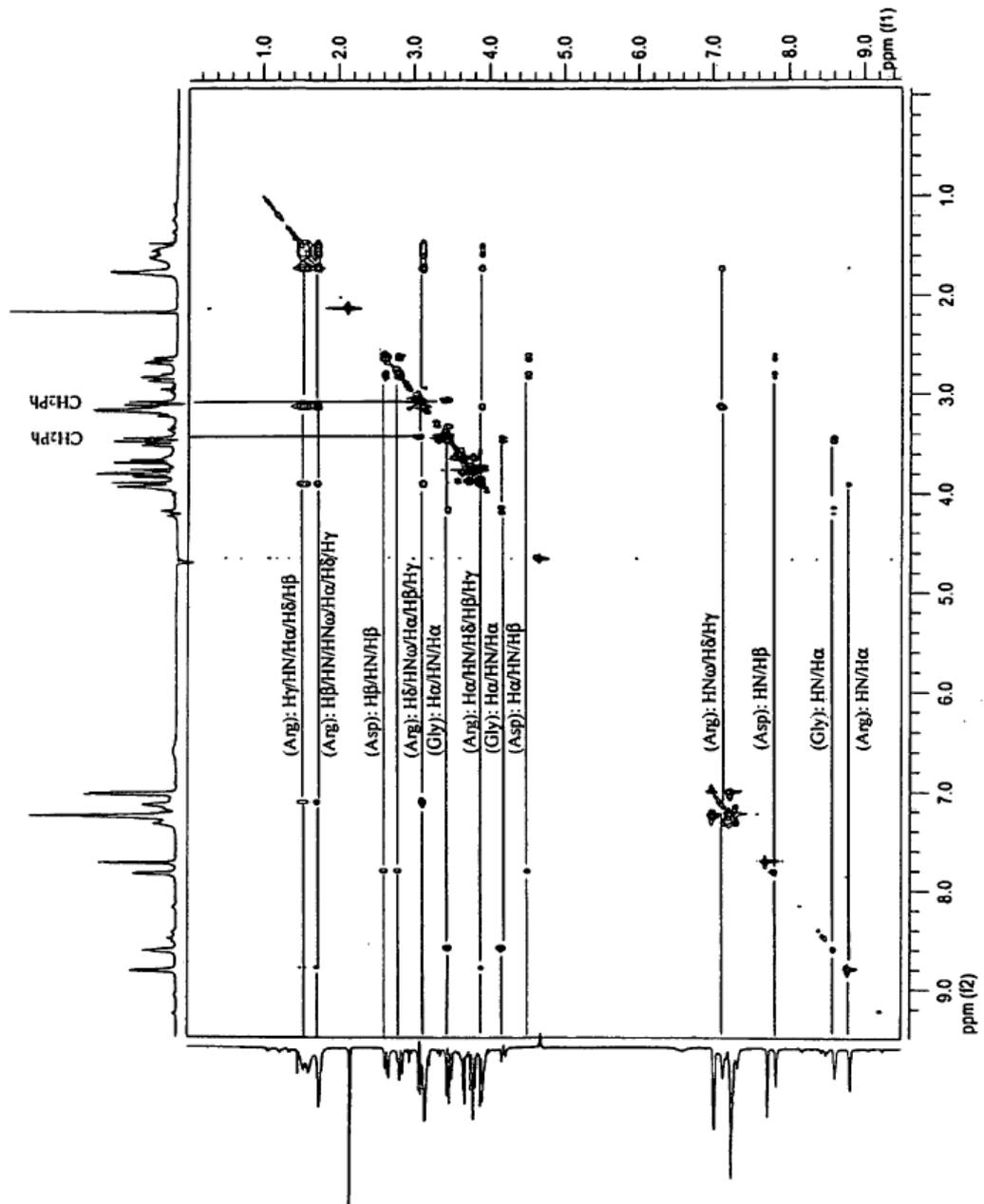


Figura 3

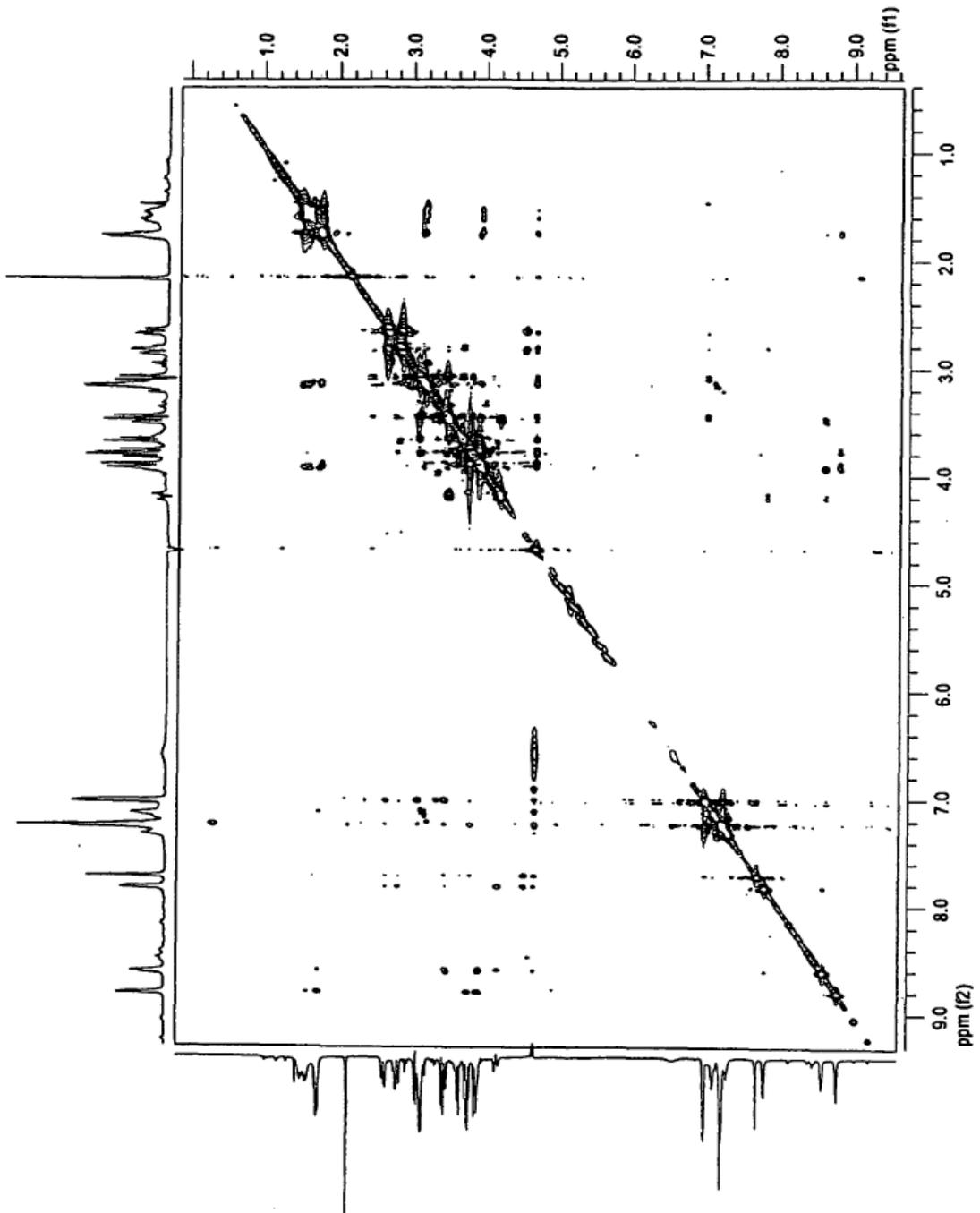


Figura 4

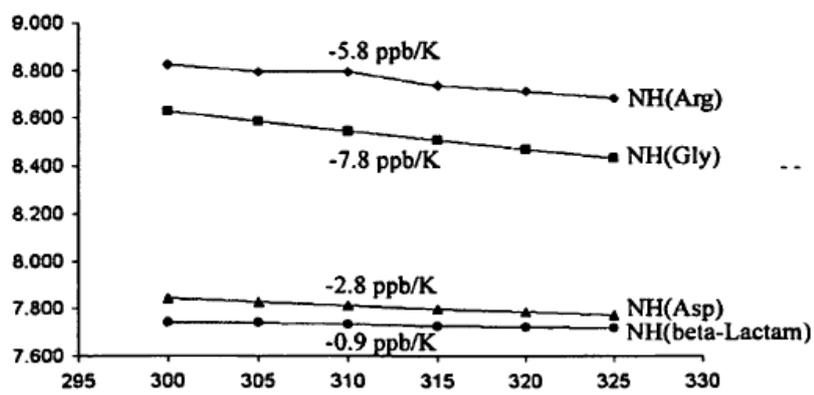
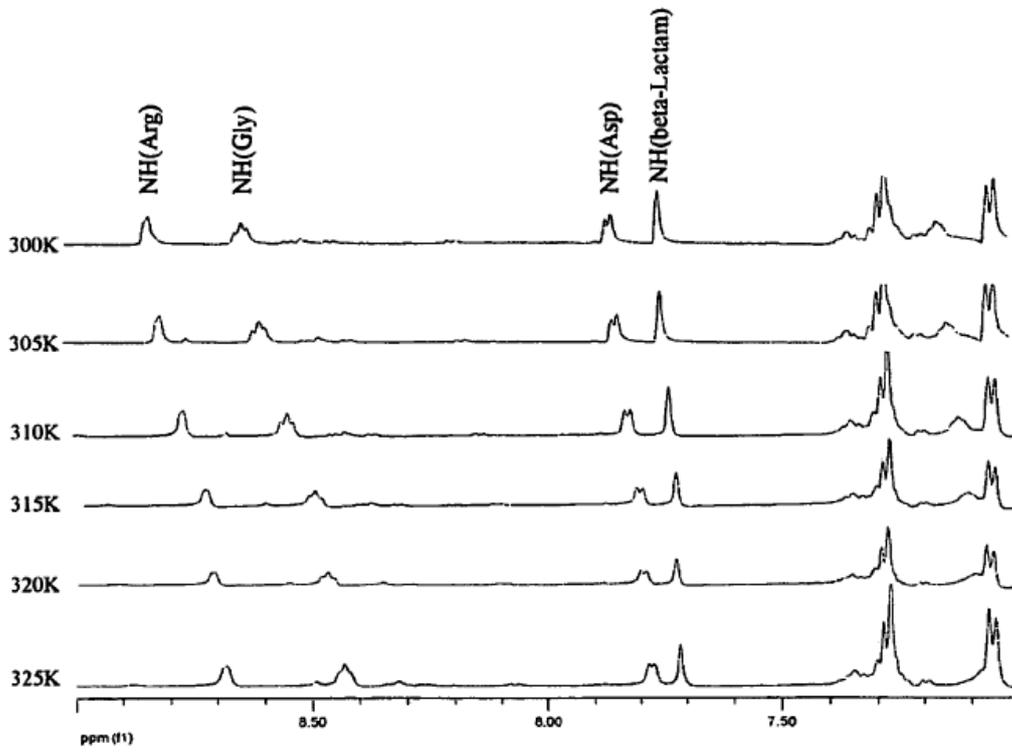


Figura 5

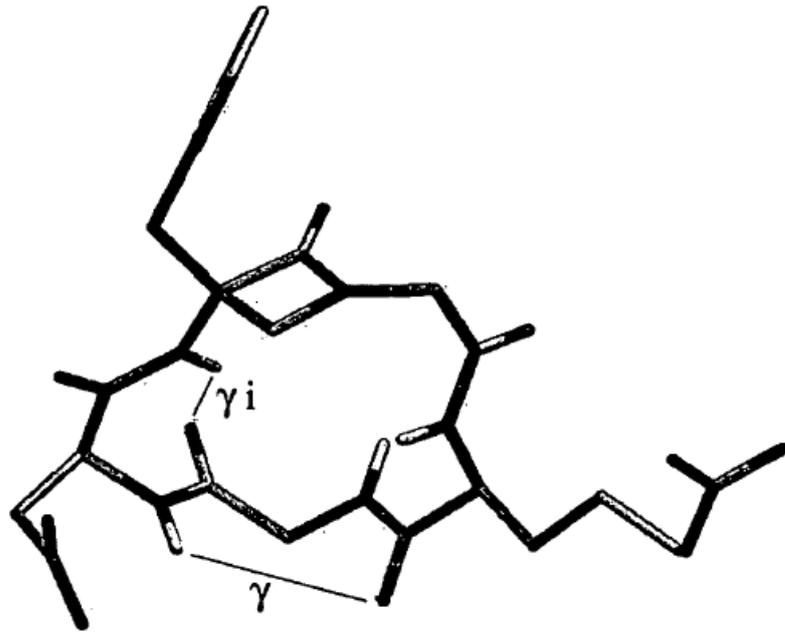


Figura 6

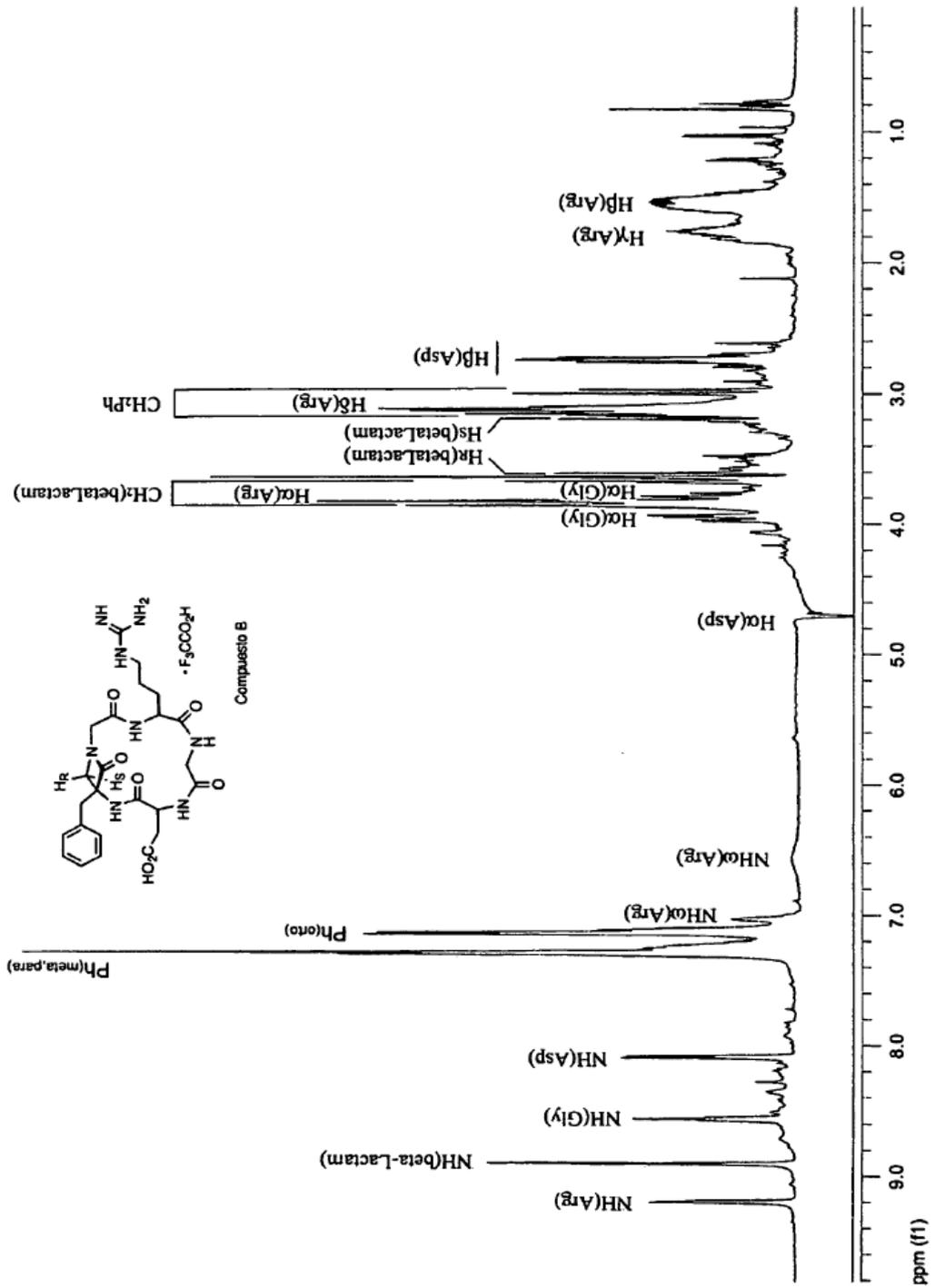


Figura 7

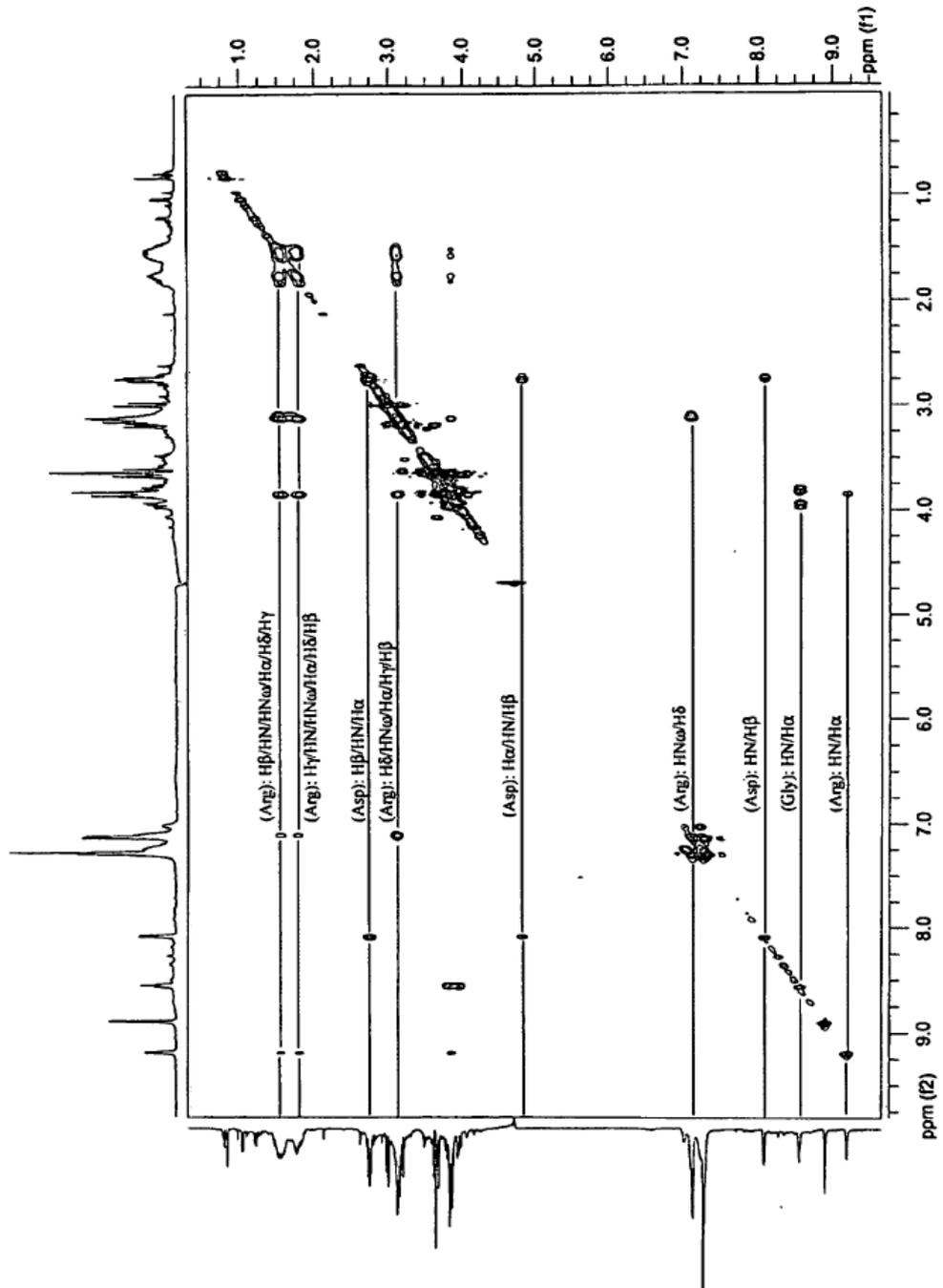


Figura 8

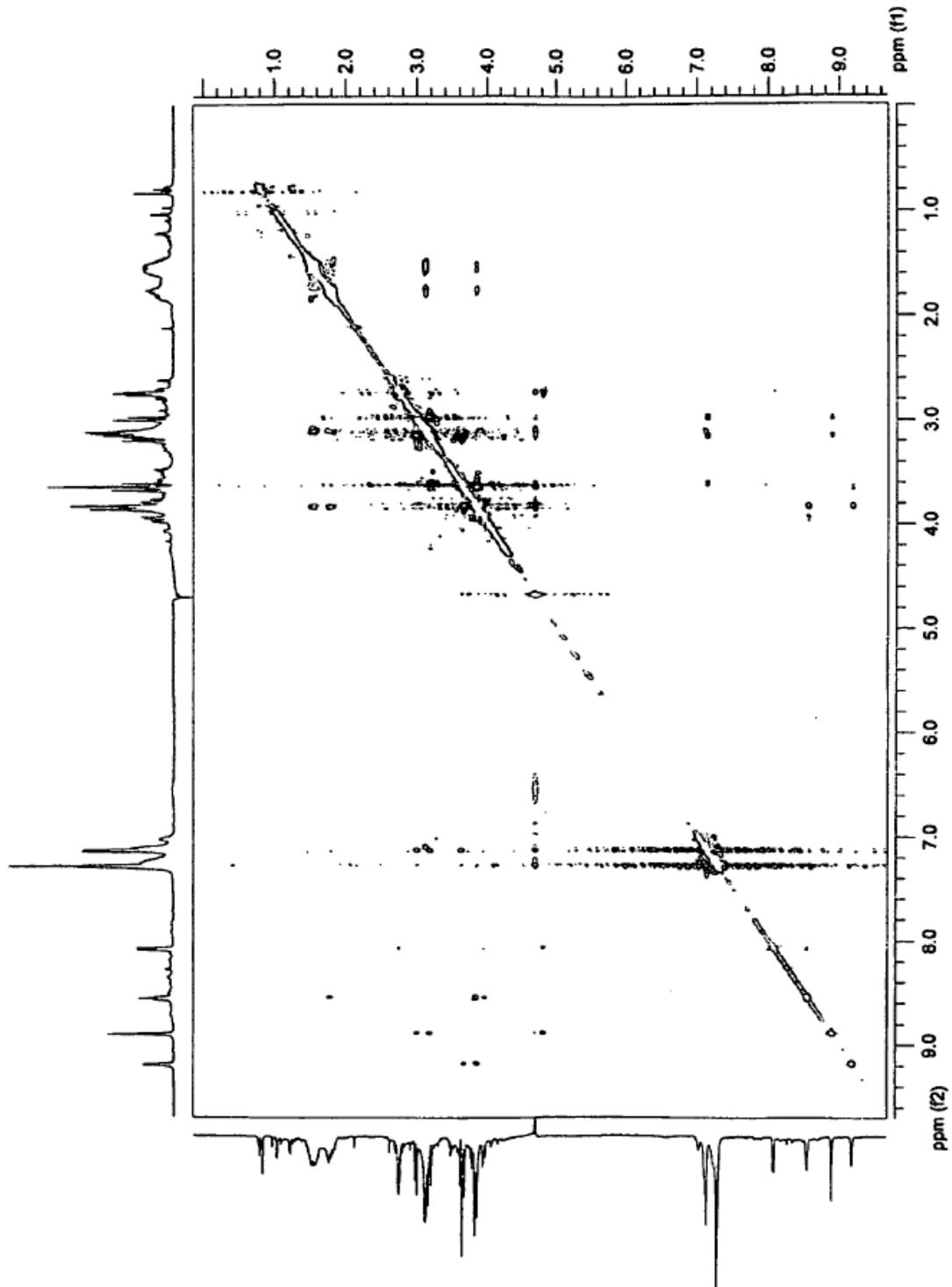


Figura 9

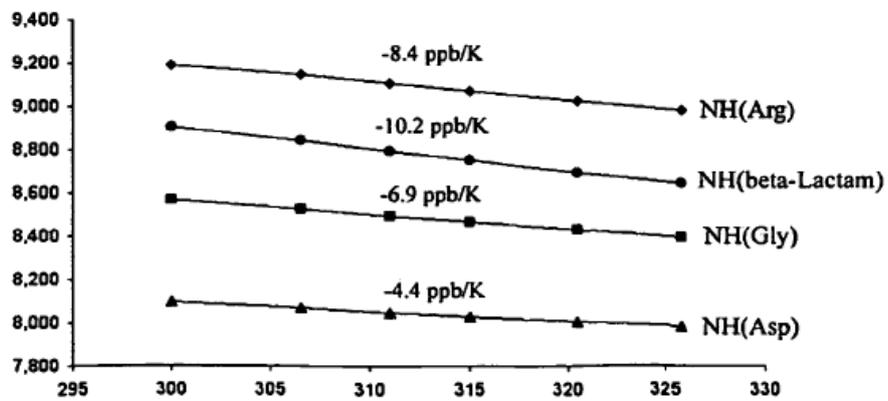
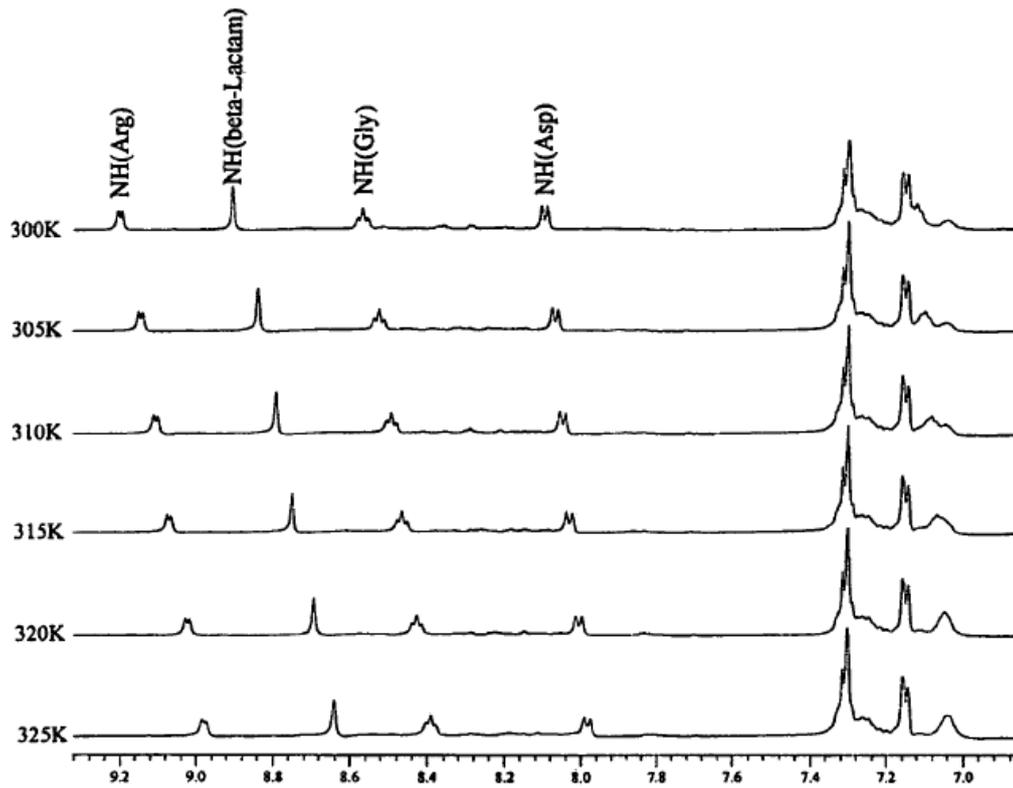


Figura 10

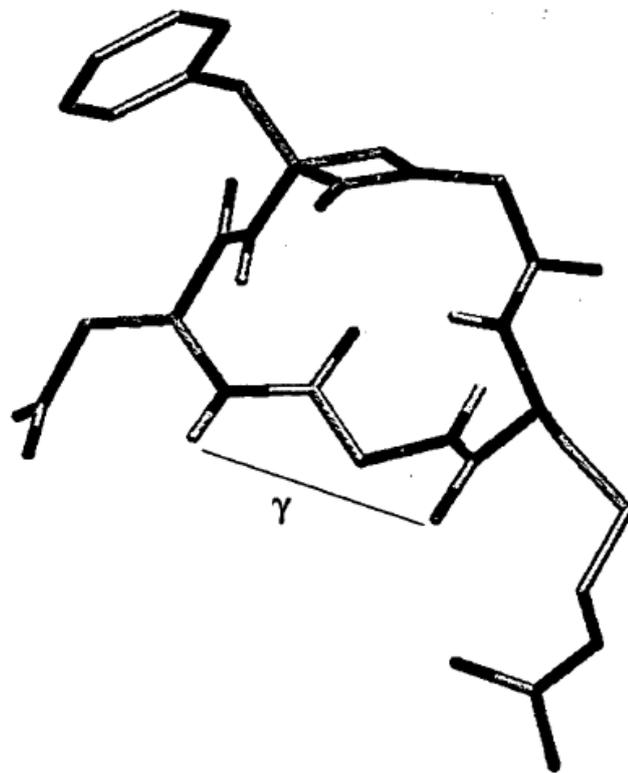


Figura 11

