



Universidad de Oviedo
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

***SÍNTESIS DE NUEVAS β -LACTAMAS
ESPIRÁNICAS. MECANISMO DE REACCIÓN,
APLICACIONES SINTÉTICAS Y ACTIVIDAD
BIOLÓGICA. SÍNTESIS DE SULTAMICILINA.***

EDUARDO ALONSO FERNÁNDEZ

Tesis Doctoral

Francisco Javier González Fernández, Profesor Titular de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que la presente Memoria, titulada "**SÍNTESIS DE NUEVAS b-LACTAMAS ESPIRÁNICAS. MECANISMO DE REACCIÓN, APLICACIONES SINTÉTICAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA. SÍNTESIS DE SULTAMICILINA.**", ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección, por el licenciado en Química Eduardo Alonso Fernández y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Oviedo, Abril de 2002

Fdo.: Prof. Dr. Fco. Javier González Fernández

A mis padres

A Noelia

*En teoría, no existe diferencia entre teoría
y práctica; en la práctica sí la hay.*

Jan L.A. van de Snepscheu

RESUMEN

En esta memoria se describe la síntesis, estudio del mecanismo de reacción, aplicaciones sintéticas y actividad biológica de nuevas β -lactamas espiránicas, dedicando especial atención a la preparación de compuestos potencialmente activos.

En el primer capítulo se presentan los resultados relativos a la preparación de β -lactamas espiránicas derivadas de tetrahydrofurano, empleando como método sintético la reacción de Staudinger entre cetenos cíclicos e iminas. Asimismo, se analizan algunos de los factores que influyen en la estereoquímica de esta reacción y se describen nuevos derivados β -lactámicos potencialmente activos.

En el segundo capítulo se lleva a cabo el diseño, síntesis y análisis estructural de nuevos peptidomiméticos conformacionalmente restringidos. El diseño es realizado basándose en el esqueleto de β -lactama espiránica. El análisis conformacional en disolución, pone de manifiesto que estos compuestos son capaces de mimetizar la estructura secundaria de los giros β tipo II de las proteínas.

En el tercer capítulo presentan los resultados relativos al estudio teórico, empleando cálculos teóricos ab initio, de la reacción de Staudinger ceteno-imina con cetenos cíclicos. Así, se logran explicar algunos de los resultados estereoquímicos encontrados en los capítulos 1 y 2 de esta memoria durante la síntesis de las β -lactamas espiránicas.

En el cuarto capítulo se describe la síntesis de β -aminoésteres α,α -ciclodisubstituidos y de dipéptidos que los contienen. Para ello se emplean como substratos de partida las β -lactamas espiránicas preparadas previamente en los capítulos 1 y 2 de la presente memoria. La modelización de la estructura de β -péptidos compuestos por residuos

de β -aminoácidos como los aquí descritos, muestra la capacidad de estas moléculas de formar polímeros con estructuras de tipo helicoidal.

En el quinto capítulo se describe la síntesis y actividad biológica de *N*-tiometil β -lactamas espiránicas. Estos compuestos presentan una notable actividad antibacteriana en las cuatro cepas bacterianas ensayadas, una de las cuales no es sensible a la Penicilina G. Asimismo, se presentan algunas evidencias que parecen ligar claramente la actividad antibacteriana de estos compuestos con la presencia de un enlace azufre-nitrógeno de amida.

En el sexto y último capítulo de esta memoria se detalla una síntesis alternativa (no sujeta a la protección de patentes) del antibiótico comercial sultamicilina. Este nuevo método de síntesis está basado en la preparación de los iminoderivados de sultamicilina, intermedios sorprendentemente estables desde los que se puede acceder a las dos formas galénicas de la sultamicilina, con rendimientos elevados y en un proceso técnicamente propicio para su aplicación a escala industrial.

SUMMARY

In this memory there is described the synthesis, study of the mechanism of reaction, synthetic applications and biological activity of new spiranic β -lactams, dedicating special attention to the preparation of new potentially active compounds.

In the first chapter appear the results relative to the synthesis of new tetrahydrofuran derived spiranic β -lactams, using as synthetic method Staudinger reaction between cyclic ketenes and imines. Likewise, there are analysed some of the factors that influence the stereochemistry of this reaction, and the synthesis of potentially active derivatives is described.

Second chapter presents the results from the design, synthesis and structural analysis of new conformationally restricted peptidomimetics. The structure of these compounds is based on a spiranic β -lactam. The conformational analysis, show that they mimetic the secondary structure of the type II β -turns found in proteins.

Third chapter present the results relative to the theoretical study, using ab initio theoretical calculations, of Staudinger ketene-imine reaction with cyclic ketenes. With these calculations we can explain some of the stereochemical results found in the chapters 1 and 2 of this thesis.

In the fourth chapter the synthesis of α,α -disubstituted β -amino esters and peptide derivatives is described. The geminally disubstituted β -amino esters are obtained from the *N*-BOC spiro β -lactams synthesised in the chapters 1 and 2 of this thesis. Molecular modelling of β -peptides composed of β -aminoacids described here, show the ability of these systems to adopt a helical conformation.

In the fifth chapter the synthesis of *N*-Thiomethyl β -lactams are described. These compounds present antibacterial activity against several bacterial strains, one of them is not sensitive to Penicillin G. Likewise, some experimental evidences indicates the that biological activity of these compound is joined to the presence of a sulfur-amide nitrogen bond in the structure.

In the sixth and last chapter of this memory, there is detailed an alternative synthesis (not hold to the protection of patents) of the commercial antibiotic sultamicilin. This new method of synthesis is based on the preparation of the iminoderivades of sultamicillin, surprisingly stable intermediates that allow the access to both galenic forms of the sultamicilina with very high yields and in a technically propitious process for its application to industrial scale.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

- **0.1.** Compuestos β -lactámicos activos.
 - 0.1.1.** Antibióticos.
 - 0.1.1.1.** Historia de los antibióticos β -lactámicos.
 - 0.1.2.** Inhibidores de β -lactamasas.
 - 0.1.3.** Otros compuestos β -lactámicos biológicamente activos.
- **0.2.** Las β -lactamas como precursores de compuestos de interés biológico.
- **0.3.** Métodos de síntesis de β -lactamas.
 - 0.3.1.** Reacciones de ciclación.
 - 0.3.1.1.** Formación del enlace (N1-C2)
 - 0.3.1.2.** Formación del enlace (N1-C4)
 - 0.3.1.3.** Formación del enlace (C2-C3) y (C3-C4)
 - 0.3.2.** Adiciones de enolatos a iminas.
 - 0.3.3.** Heterocicloadiciones [2+2]
 - 0.3.3.1.** Reacción entre isocianatos y alquenos.
 - 0.3.3.2.** Reacción entre cationes ceteniminio e iminas.
 - 0.3.3.3.** Reacción entre carbenos de Fischer e iminas.
 - 0.3.3.4.** Reacción entre cetenos e iminas. Reacción de Staudinger.
- **0.4.** Mecanismo de la reacción de Staudinger.
 - 0.4.1.** Propuestas de mecanismo.
 - 0.4.1.1.** Mecanismo concertado.
 - 0.4.1.2.** Mecanismo por pasos.
- **0.5.** Mecanismo ceteno-imina.
 - 0.5.1.** Estereoquímica de la reacción ceteno imina.
- **0.6.** Mecanismo cloruro de ácido imina.
- **0.7.** Control estereoquímico en la reacción de Staudinger. Efecto torquoelectrónico.

CAPÍTULO 1. “Síntesis de Nuevas β -Lactamas Espiránicas Derivadas de Tetrahydrofurano”

- **1.1.** Introducción.
- **1.2.** Métodos de síntesis de β -lactamas espiránicas.
- **1.3.** Discusión de resultados.
 - 1.3.1.** Síntesis de 5-oxa-2-azaespiro[3,4]octan1-onas y 6-oxa-2-azaespiro[3,4]octan1-onas.

- 1.3.2. Determinación de la estereoquímica relativa en las β -lactamas espiránicas **12** y **13**.
- 1.3.3. Diastereoselectividad de la reacción de Staudinger con los cloruros de 2 y 3-tetrahidrofuroilo.
 - 1.3.3.1. Diastereoselectividad con distintos cetenos. Efecto torquoelectrónico.
 - 1.3.3.2. Diastereoselectividad con distintas iminas.
- 1.3.4. Reacción del cloruro de 2-tetrahidrofuroilo con la *N*-bencilbenzaldimina.
- 1.3.5. Síntesis de β -lactamas espiránicas *N*-no substituidas.
- 1.3.6. Síntesis de *N*-sulfonato β -lactamas espiránicas.
- 1.4 Conclusiones.

CAPÍTULO 2. “ β -Lactamas Espiránicas Como Peptidomiméticos. Diseño, Síntesis y Análisis Estructural.”

- 2.1. Introducción.
- 2.2. Peptidomiméticos.
 - 2.2.1. Estrategias en el diseño de peptidomiméticos.
 - 2.2.1.1. Modificación de la cadena lateral de α -aminoácidos.
 - 2.2.1.2. Modificación del esqueleto peptídico.
 - 2.2.1.3. Unión covalente entre residuos de α -aminoácido de la cadena peptídica.
 - 2.2.1.3.a. Unión covalente entre residuos adyacentes.
 - 2.2.1.3.b. Unión covalente entre residuos no adyacentes.
- 2.3. Estructuras secundarias en péptidos y proteínas. Giros β .
 - 2.3.1. Aplicaciones de péptidos y peptidomiméticos con estructura secundaria de giro β (I). Elucidación de la conformación bioactiva de un péptido.
 - 2.3.2. Aplicaciones de péptidos y peptidomiméticos con estructura secundaria de giro β (II). Aproximación a la función catalítica del centro activo de un enzima.
- 2.4. Discusión de Resultados.
 - 2.4.1. Diseño de peptidomiméticos con estructura secundaria de giro β tipo II basados en β -lactamas espiránicas.
 - 2.4.2. Modelización molecular de las β -lactamas espiránicas.
 - 2.4.3. Síntesis de β -lactamas espiránicas.
 - 2.4.4. Análisis conformacional de la β -lactama espiránica **24** en disolución.
 - 2.4.4.1. Comparación de los espectros de ^1H RMN de **24** y **22e** en CDCl_3 . Comparación de los espectros de ^1H RMN de **24** en CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$.
 - 2.4.4.2. Desplazamiento químico (δ) del NH de **24** en CDCl_3 .
 - 2.4.4.3. Desplazamiento químico (δ) de los NH de **24** en CDCl_3 en función de la concentración
 - 2.4.4.4. Análisis del espectro de infrarrojo de la β -lactama espiránica **24**.
 - 2.4.4.5. Análisis del espectro de 2D-NOESY de **24** en CDCl_3 .

- 2.4.5. Síntesis de peptidomiméticos basados en el esqueleto espiránico pirrolidina- β -lactama.
 - 2.4.5.1. Análisis estructural de la β -lactama espiránica **30** en disolución.
 - 2.4.5.2. Variación del desplazamiento químico de los NH de la β -lactama espiránica **30** en función de la temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) y del disolvente.
 - 2.4.5.3. Análisis del espectro 2D NOESY de la β -lactama espiránica **30** en CDCl_3 .
- 2.4.6. Síntesis de β -lactamas espiránicas enantioméricamente puras.
- 2.4.7. Análisis teórico de sistemas estabilizados por enlace de hidrógeno.
 - 2.4.7.1. Análisis estructural del sistema *N*-metilacetamida (**35**) + *N*-metoxicarbonil-dimetilamina (**36**).
 - 2.4.7.2. Análisis estructural del dipéptido $\text{CH}_3\text{OCO-}N$ -metil-Gly-*N*-metil-Gly- NCH_3 (**37**).
 - 2.4.7.3. Análisis estructural del dipéptido $\text{CH}_3\text{OCO-L-Pro-Gly-NHCH}_3$ (**38**).
 - 2.4.7.4. Análisis estructural del peptidomimético (**39**).
 - 2.4.7.5. Búsqueda de la estructura óptima en las β -lactamas espiránicas mediante métodos teóricos DFT.
- 2.5. Conclusiones.

CAPÍTULO 3. “Estudio Teórico de la Reacción de Staudinger con Cetenos Cíclicos”

- 3.1. Introducción
- 3.2. Discusión de Resultados.
 - 3.2.1. Estudio teórico de la reacción de Staudinger con cetenos cíclicos derivados de tetrahidrofurano.
 - 3.2.1.1. Estudio teórico de la reacción de Staudinger del 2-carboniltetrahidrofurano (**3**) con la formaldimina (**7**).
 - 3.2.1.2. Estudio teórico de la reacción de Staudinger del 3-carboniltetrahidrofurano (**4**) con la formaldimina (**7**).
 - 3.2.1.3. Estudio teórico de la reacción de Staudinger del 2-carboniltetrahidrofurano (**3**) con la *N*-metilbenzaldimina (**8**).
 - 3.2.1.4. Estudio teórico de la reacción de Staudinger de la *N*-formil-2-carbonilpirrolidina (**10**) con la *N*-metilacetaldimina (**11**).
- 3.3. Conclusiones.

CAPÍTULO 4. “Síntesis de β -Aminoésteres α,α -Ciclodisustituidos y Derivados”

- 4.1. Introducción.
- 4.2. Aplicaciones de los β -aminoácidos.
 - 4.2.1. Modificación de las propiedades biológicas de moléculas activas. El caso del Taxol.
 - 4.2.2. Polímeros constituidos por β -aminoácidos: los β -péptidos.
- 4.3. Propiedades estructurales de los β -péptidos. Formación de estructuras secundarias estables.

- 4.3.1. β -aminoácidos α,α disustituidos
- 4.4. Discusión de resultados.
 - 4.4.1 Síntesis de β -aminoácidos cíclicamente α,α -disustituidos a partir de β -lactamas espiránicas.
 - 4.4.1.1. Síntesis de (α -amino)- α -alquil prolinas.
 - 4.4.2 Síntesis de dipéptidos conteniendo β -aminoácidos α,α -cíclicamente disustituidos.
 - 4.4.2.1. Unión por el extremo *N*-terminal del β -aminoácido.
 - 4.4.2.2. Unión por el extremo C-terminal del β -aminoácido.
 - 4.4.3. Determinación de la configuración absoluta de los dipéptidos **24b** y **24c**.
 - 4.4.4. Modelización de la estructura de β -aminoácidos y β -péptidos α,α -cíclicamente disustituidos.
- 4.5. Conclusiones

CAPÍTULO 5. “Estudio de la Actividad Antimicrobiana de las β -Lactamas Espiránicas”

- 5.1. Introducción.
- 5.2. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.
- 5.3. Nuevos agentes antibacterianos. Las *N*-tioalquil β -Lactamas.
- 5.4. Discusión de Resultados.
 - 5.4.1. Síntesis de *N*-tiometil β -lactamas espiránicas.
 - 5.4.2. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión en medio sólido.
 - 5.4.2.1. Actividad antibacteriana de las *N*-tiometil β -lactamas espiránicas **4**.
 - 5.4.3. Concentración inhibitoria mínima de la β -lactama **4a**.
 - 5.4.4. Actividad antibacteriana de las *N*-tiometil amidas.
- 5.5. Conclusiones.

CAPÍTULO 6. “Síntesis de Nuevos Intermedios en la Preparación de Sultamicilina”

- 6.1. Introducción.
- 6.2. Farmacología de las penicilinas.
 - 6.2.1. Absorción oral.
 - 6.2.2. Resistencia a las β -lactamasas.
- 6.3. La Sultamicilina.
 - 6.3.1. Métodos de síntesis de sultamicilina.
- 6.4. Discusión de Resultados.
 - 6.4.1. Síntesis alternativa de Sultamicilina.
 - 6.4.2. Análisis estructural de las iminas de sultamicilina **19**.

6.4.3. Estudio de la reacción de formación de la imina de ampicilina **19a** por Resonancia Magnética Nuclear.

6.4.4. Transformación de las iminas de sultamicilina **19** en la sultamicilina base o sultamicilina tosilato.

6.4.4.1. Obtención de Sultamicilina Tosilato (**21**).

6.4.4.2. Obtención de Sultamicilina Base (**20**).

• **6.5.** Conclusiones

• **PARTE EXPERIMENTAL**

• **ANEXO MÉTODOS TEÓRICOS**

