

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

Análogos de nucleósidos en la búsqueda de agentes antivirales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gloria Fernández Cureses

Directores

María José Camarasa Rius
Sonia de Castro de la Osa

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I

Tesis Doctoral

**ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS EN LA BÚSQUEDA DE
AGENTES ANTIVIRALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gloria Fernández Cureses

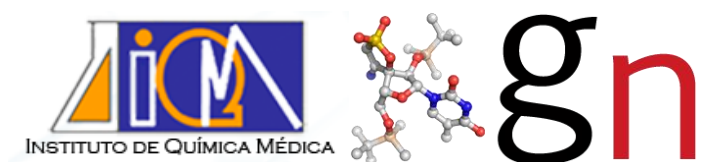
Directores

María José Camarasa Rius

Sonia de Castro de la Osa

Instituto de Química Médica (CSIC)

Madrid, 2017



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas del Instituto de Química Médica (CSIC), bajo la dirección de la Dra. María José Camarasa Rius y de la Dra. Sonia de Castro de la Osa, dentro del marco de los proyectos SAF2009-13914-C02 y SAF2012-39760-C02 financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación y por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), respectivamente, y del proyecto BIPEDD2 (S2010/BMD-2457), financiado por la Comunidad de Madrid.



La Dra. MARÍA JOSÉ CAMARASA RIUS, Profesor de Investigación y la Dra. SONIA DE CASTRO DE LA OSA, Doctor Contratado, ambas del Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN: Que el trabajo reflejado en la presente Memoria titulada ***“Análogos de nucleósidos en la búsqueda de agentes antivirales”*** ha sido realizado en el Departamento de Química Médica III del Instituto de Química Médica del CSIC por Dña. GLORIA FERNÁNDEZ CURESES y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, 15 de Febrero de 2017

Fdo: María José Camarasa Rius

Fdo: Sonia de Castro de la Osa

A mis padres
A Javi y Sergio

Nunca dejes que nadie te diga que no puedes hacer algo, ni siquiera yo ¿vale? Si tienes un sueño, tienes que protegerlo. Las personas que no son capaces de hacer algo te dirán que tú tampoco puedes. Si quieres algo, ve por ello y punto.

-Will Smith. En busca de la felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Y parecía que no iba a llegar nunca... pero ¡por fin llegó el final! No me gustaría despedirme sin dar las gracias a todas aquellas personas, que de una u otra forma, han hecho posible que esta Tesis Doctoral vea la luz. En primer lugar, me gustaría agradecer el apoyo y la ayuda recibida por mis directoras de Tesis, María José y Sonia. Sus conocimientos, orientaciones, su manera de trabajar y sobre todo su gran paciencia han sido fundamentales para mi formación como investigadora en este campo de la Química Médica que tanto me apasiona. Gracias María José por depositar tu confianza en mí justo en el momento en el que ya había perdido toda esperanza de realizar la Tesis. Sin duda, has sido un ejemplo de afán de superación y valentía durante toda tu carrera profesional y has logrado ganarte mi mayor admiración. A ti Sonia que te voy a decir... si casi podríamos decir que ésta es tu segunda tesis... Han sido muchos años trabajando juntas, gracias por estar siempre ahí para echarme un cable cuando lo he necesitado, por compartir conmigo toda tu experiencia, por ser mi gran apoyo cuando los azúcares dejaron de ser tan dulces y no salía el maldito "tirachinas". Aunque también ha habido hueco para compartir risas, momentos más o menos frikis, música, manualidades, y un millón de cosas. Espero haber estado a la altura y que guardes un buen recuerdo de tu primer doctorando. Como siempre te digo, estoy segura que todo esfuerzo tendrá su recompensa y de que conseguirás lo que te propongas en la vida.

No quiero olvidarme tampoco de Sonsoles que fue mi primer contacto con el grupo y que tanto sufrió conmigo la síntesis de los derivados de Metil- β -lactósido. Mi agradecimiento también a Ana, M. Jesús, Ernesto y Eva por toda la ayuda y consejos prestados a lo largo de estos años.

Me gustaría agradecer también a todos los grupos con los que hemos colaborado. A la Dra. María Luisa Jimeno por su inestimable ayuda con la asignación estructural y estudios conformacionales de los metiloxinucleósidos presentados en esta Tesis, al Dr. Federico Gago por su contribución en los estudios de modelado molecular y a la Dra. Nuria Verdaguer por la realización de los estudios cristalográficos. Y por supuesto, al Dr. Jan Balzarini que junto María José fue un poco el artífice de todo este trabajo y del que siempre esperábamos impacientes los resultados de los ensayos biológicos.

Me gustaría también dar las gracias al IQM en general y a todo el personal del Centro de Química "Lora-Tamayo" sin cuya ayuda no podría haber llevado a cabo esta Tesis Doctoral, al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, al Laboratorio de

Espectrometría de Masas y a todas las personas que trabajan por el buen funcionamiento del centro, haciendo que el día a día sea muy sencillo.

No me quiero olvidar tampoco de todos los compañeros de laboratorio con los que me he cruzado en este largo camino, habéis sido tantos que espero no dejarme ninguno: Pedro, Alberto, Silvia, Marta, Aida, Alex, Olga, Virginia, María, Leire, Elena, Alba, Lole, Susana, Paula, Alessandra, M^a Cruz, Andrés, Vanessa, Elisa, Eva, Sonia... Ha sido un placer tener tan buenos compañeros y compartir con vosotros esta experiencia.

La Tesis además puso en mi camino a mi niña Eva. Probablemente la persona más especial con la que me he cruzado, y que además de una gran compi de laboratorio ha llegado a ser una de mis mejores amigas. Contigo las tardes hasta las mil se hacían menos duras aunque me martirizaras con DJ Tiesto jeje. ¡Cuánto echo de menos nuestras confidencias y charlas arreglando el mundo! Sabes que a pesar de que estemos lejos, y que aunque cada una esté liada con sus cosas, puedes contar conmigo siempre que lo necesites.

No son menos importantes mis compañeros de tupper: Silvia, Alberto, Pedro, Paula, Leire, Marta, Aida, Lole, Andrés, Iria, Miriam, Irene, Ana, Dani...con los que he pasado grandes momentos de risas en las comidas haciendo que se me olvidaran un poco los problemas en el laboratorio.

Y por último, y no menos importante, quiero agradecer tanto a mi familia como a mis amigos de toda la vida su gran apoyo incondicional. Por estar ahí en los momentos más duros de la tesis y no dejarme caer, sobre todo a mi madre sin la que nada de esto sería posible, siempre luchando para que yo llegara lejos. Y a ti papá siempre cuidándome, guiándome y dándome fuerza allá donde estés.

Y dejo para el final a una de las personas más importantes en mi vida, a Javi. Mi gran compañero en la vida y porque no decirlo también partícipe de alguna manera en esta tesis. Sin duda, tú también deberías recibir un Doctorado pero en paciencia conmigo. Gracias por creer en mi y no dejar que abandonara nunca. Gracias por sacarme una sonrisa en los momentos más duros con el "tirachinas", no lo olvidaré nunca. Sergio y tu hacéis que cada momento de mi vida merezca la pena. ¡Espero que estéis orgullosos de mí!

¡Muchísimas gracias a todos!

Gloria

ÍNDICE

Nota sobre nomenclatura	i
Nota sobre puntuación	i
Abreviaturas empleadas.....	iii
Summary.....	vii
Resumen.....	xiii

I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES	1
I.1.1. Las infecciones virales	3
I.1.2. Infecciones virales emergentes y re-emergentes	6
I.1.3. Polimerasas virales	9
I.1.3.1. Estructura y función de las polimerasas virales	11
I.1.4. Etapas en la síntesis de los ácidos nucleicos catalizada por las polimerasas	13
I.1.5. Fármacos antivirales inhibidores de polimerasas	15
I.2. ESTRUCTURA DE LA TESIS Y OBJETIVOS GENERALES	21
I.3. BIBLIOGRAFÍA	23

CAPÍTULO 1.

METILOXINUCLEÓSIDOS:

UNA FAMILIA DE NUCLEÓSIDOS NO CONVENCIONALES.....

1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. Análogos de nucleósidos modificados.....	33
1.1.1. Nucleósidos modificados en la base	34
1.1.2. Nucleósidos modificados en el azúcar	36
1.1.3. Nucleósidos acíclicos (aciclonucleósidos).....	41
1.1.4. Fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs).....	42
2. ANTECEDENTES:	
Nueva generación de fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs)	47
3. OBJETIVOS.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. Síntesis de metiloxinucleósidos	53
4.1.1. Síntesis de metiloxinucleósidos de 2,5-anhidroalitol y de 2,5-anhidroaltritol.....	53

4.1.2.	Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos	64
4.1.2.1.	Síntesis de derivados de pirimidinas	65
4.1.2.2.	Síntesis de derivados de purinas	70
4.1.3.	Síntesis del trifosfato 1.60	73
4.1.4.	Síntesis de compuestos de estructura dimérica	75
4.2.	Estudio conformacional en disolución por RMN de los metiloxinucleósidos 1.16b y 1.25	81
4.2.1.	Determinación de la conformación del anillo de furanosa.....	82
4.2.2.	Determinación de la conformación alrededor de los enlaces exocíclicos C5'-C6' y C2'-C1'	85
4.2.3.	Determinación de la conformación alrededor del "enlace glicosídico" (C1'-O4-Base)	86
4.3.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biológica de los metiloxinucleósidos sintetizados	89
4.3.1.	Evaluación biológica frente a la replicación del VIH-1 y VIH-2	89
4.3.2.	Evaluación biológica frente a distintas líneas tumorales.....	92
4.3.3.	Evaluación biológica frente al virus del sarcoma murino (VSM)	95
4.3.4.	Evaluación biológica frente a la replicación de otros virus.....	97
4.3.5.	Evaluación biológica frente a la replicación del virus chicungunya ...	98
5.	CONCLUSIONES	103
6.	PARTE EXPERIMENTAL	107
6.1.	Métodos generales.....	107
6.2.	Productos comerciales	109
6.3.	Preparación de los productos de partida	111
6.3.1.	Preparación del producto de partida 1.2a,b	111
6.3.2.	Preparación del producto de partida 1.17	116
6.3.3.	Preparación de DABCO-purinas (1.52 y 1.53).....	117
6.4.	Síntesis de metiloxinucleósidos de 2,5-anhidroalitol y 2,5-anhidroaltritol...118	
6.4.1.	Síntesis de metiloxinucleósidos bencilados de 2,5-anhidroalitol y 2,5-anhidroaltritol (1.4a,b y 1.15a,b).....	118
6.4.2.	Síntesis de metiloxinucleósidos desprotegidos de 2,5-anhidroalitol y 2,5-anhidroaltritol (1.1b y 1.16b)	120
6.5.	Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos	121
6.5.1.	Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos bencilados de tetrahidrofurano (1.20 , 1.23 , 1.24 , 1.28 , 1.36 , 1.38 , 1.42 , 1.43 , 1.46 , 1.47 , 1.54 y 1.55)	121

6.5.2. Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos desprotegidos de tetrahidrofurano (1.21, 1.25, 1.26, 1.29, 1.56 y 1.57).....	129
6.6. Síntesis del trifosfato 1.60	132
6.7. Síntesis de compuestos de estructura dimérica (1.37, 1.39, 1.65, 1.66, 1.68-1.71)	133
6.8. Métodos biológicos.....	138
6.8.1. Evaluación biológica frente a la replicación del VIH-1 y del VIH-2..	138
6.8.2. Ensayos de actividad inhibitoria de la TI del VIH-1 en presencia de un molde/cebador artificial	139
6.8.3. Ensayos de citotoxicidad.....	140
6.8.4. Inhibición de la transformación de los fibroblastos murinos C3H/3T inducida por el virus del sarcoma murino de Moloney (MSV)	140
6.8.5. Evaluación biológica frente a la replicación de otros virus.....	140
6.8.6. Evaluación biológica frente a la replicación del virus chikungunya .	141
7. BIBLIOGRAFÍA	143

CAPÍTULO 2.

FOSFONATOS DE NUCLEÓSIDOS ACÍCLICOS

DE 2,4-DIAMINO-1,3,5-TRIAZINAS (PMEO-DAT).....

1. OBJETIVOS.....	157
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
2.1. Síntesis de fosfonatos de nucleósidos acíclicos de diaminotriazinas (PMEO-DAT)	159
2.2. Evaluación biológica de los fosfonatos de diaminotriazinas.....	164
2.3. Estudios de modelado molecular.....	166
3. CONCLUSIONES	171
4. PARTE EXPERIMENTAL	173
4.1. Métodos generales.....	173
4.2. Productos comerciales	175
4.3. Preparación de los productos de partida	175
4.3.1. Preparación del producto de partida 2.7	175
4.3.2. Preparación del producto de partida 2.13	176
4.3.3. Preparación del producto de partida 2.19	177
4.4. Síntesis de los PMEODAT (2.27 y 2.28).....	178
4.5. Métodos biológicos.....	182

4.5.1. Evaluación frente a la replicación del VIH-1 y VIH-2	182
4.5.2. Evaluación biológica frente a la replicación del VHB	182
4.5.3. Evaluación biológica frente a otros virus	183
4.5.4. Ensayos de actividad antiviral frente al VSM.....	184
4.5.5. Ensayos de citotoxicidad.....	184
4.5.6. Detección de citoquinas mediante el ensayo sistema Bio-Plex	184
4.6. Modelado molecular	185
5. BIBLIOGRAFÍA.....	187

CAPÍTULO 3.

NUCLEOPÉPTIDOS COMO MODELO DE VPgpU o VPgpFU	191
1. INTRODUCCIÓN.....	193
1.1. El virus de la fiebre aftosa	195
1.2. Replicación del genoma viral.....	197
1.3. ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) como diana terapéutica.....	198
2. ANTECEDENTES:	
Fluorouridina, un inhibidor del virus de la fiebre aftosa.....	200
3. OBJETIVOS.....	201
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	203
4.1. Síntesis del nucleopéptido VPgpFU	203
4.1.1. Síntesis del monómero de tirosina fluorouridilada (3.3).....	205
4.1.2. Síntesis en fase sólida del nucleopéptido modelo (I).....	210
4.1.3. Estudio de los complejos polimerasa viral-VPgpU y -VPgpFU mediante técnicas de R-X.....	215
5. CONCLUSIONES.....	219
6. PARTE EXPERIMENTAL	221
6.1. Métodos generales.....	221
6.2. Productos comerciales	223
6.3. Síntesis de los monómeros de tirosina uridilada y fluorouridilada	225
6.4. Síntesis en fase sólida de los nucleopéptidos VPgpU y VPgpFU	235
6.4.1. Protocolos generales de síntesis en fase sólida.....	235
6.4.1.1. Seguimiento de las reacciones en fase sólida	235
6.4.1.1.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina o de Kaiser ..	235
6.4.1.1.2. Ensayo cualitativo de cloranilo	236

6.4.1.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS).....	236
6.4.1.2. Elongación de la cadena peptídica	236
6.4.1.3. Desprotección de las cadenas laterales, desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos	237
6.4.1.4. Purificación de los péptidos	238
6.4.2. Síntesis de los nucleopéptidos modelo	238
6.5. Estudios mediante difracción de R-X de los nucleopéptidos modelo	239
7. BIBLIOGRAFÍA	241
CONCLUSIONES GENERALES	249

NOTAS SOBRE NOMENCLATURA

Con el fin de facilitar la formulación de los metiloxinucleósidos no convencionales recogidos en el Capítulo 1, la numeración del anillo de furanosa no coincide con la numeración de estos anillos en los nucleósidos clásicos. Por tanto, los números se verán incrementados en una unidad [C1'(2')-C2'(3')-C3'(4')-C4'(5')-C5'(6')], recogién dose entre paréntesis el número que corresponde a los carbonos del anillo furanósico de estos nucleósidos no convencionales.

Además, en el Capítulo 3 se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides", Pure & Appl. Chem. **1984**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>).

Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de código de una y de tres letras y pertenecen a la serie natural L. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

NOTAS SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren el uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre del 2005 (<http://buscon.rae.es/dpdl>).

ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en Guidelines for Authors (*J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas menos frecuentes se indican a continuación:

Generales

ABV	Abacavir
ACV	Aciclovir
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADV	Adefovir
ANPs	Fosfonatos de nucleósidos acíclicos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AZT	Zidovudina
BVDU	Brivudina
CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina
CDV	Cidofovir
CHIKV	Virus Chikungunya
CMVH	Citomegalovirus Humano
CPI	Cromatografía de pares iónicos
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
2',3'-ddN	2',3'-didesoxinucleósidos
DdDp	ADN polimerasa dependiente de ADN
DdRp	ARN polimerasa dependiente de ADN
DLV	Delavirdina
dsADN	Virus ADN de cadena doble
dsARN	Virus ARN de cadena doble
d4T	Estavudina
EBV	Virus de Epstein-Barr
EFV	Efavirenz
ETV	Etravirina
FCT	Emtricitabina
FDA	Food and Drug Administration
FHSV	Virus del herpes felino

FMD	Fiebre Aftosa
FMDV	Virus de la Fiebre Aftosa
FVP	Favipiravir
GCV	Ganciclovir
HAART	Terapia antiretroviral de alta eficacia
¹H-¹H COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPFC	Cromatografía de media presión
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence
IDU	Idoxuridina
MW	Microondas
NBS	Sitio de pares de bases nacientes
NNRTIs	Inhibidores no nucleosídicos de la Transcriptasa Inversa
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
NTP	Nucleósido 5'-trifosfato
NVP	Nevirapina
OIE	Organización mundial de la salud animal
PCV	Penciclovir
PFA	Foscarnet
PMEA	9-(2-fosfonometoxietil)adenina, Adefovir
PMEO-DAPym	2,4-diamino-6-[(2-fosfonometoxi)etoxi]-pirimidina
PMPA	9-(<i>R</i>)-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, Tenofovir
PPi	Pirofosfato
RdDp	ADN polimerasa dependiente de ARN
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RNAasa H	Ribonucleasa H
RPV	Rilpivirina
SARS-CoV	Síndrome respiratorio agudo causado por coronavirus
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
ssADN	Virus ADN de cadena sencilla
ssARN	Virus ARN de cadena sencilla
TI	Transcriptasa Inversa
3TC	Lamivudina
TNV	Tenofovir

VFIP	Virus corona felino
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHH	Virus Herpes humano
VHS	Virus Herpes Simplex
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus Papiloma Humano
VRS	Virus Respiratorio Sincitial
VSM	Virus del sarcoma murino de Moloney
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
VVZ	Virus Varicela Zóster

Grupos protectores, Reactivos y Disolventes

All, alil	Alilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTCl	Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio
TBDMSCl	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsilano
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo
TEA	Trietilamina
TEAB	Bicarbonato de trietilamonio
TES	Trietilsilano
<i>t</i>Bu	<i>tert</i> -butilo

TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsilano
Trt	Tritilo

SUMMARY

NUCLEOSIDE ANALOGS IN THE SEARCH OF NEW ANTIVIRAL AGENTS

INTRODUCTION

Viruses are the aetiological agents of several human diseases ranging from mild (i.e. common cold) to lethal (i.e. smallpox, AIDS, etc.). Moreover, they also play an important role in the development of some kinds of cancers.

There are more than 219 known species of viruses capable of infecting humans. Some examples of these viruses, responsible for the most important viral infections, include Human immunodeficiency virus (HIV-1) responsible for AIDS (37-40 million people infected around the world); Influenza viruses that cause among 250,000-500,000 deaths annually; Hepatitis B and Hepatitis C Viruses (HBV and HCV) with approximately 240 and 140 million people infected, respectively; Herpes simplex viruses (HSV) causing several serious diseases as pneumonia, encephalitis, meningitis, genital lesions etc.; Virus varicella zoster (VZV) and Human cytomegalovirus (HCMV), both belonging to the herpesvirus family, causing serious diseases in immunosuppressed patients.

(Re)emerging viral diseases are serious threats to humanity. In a globalized world a viral infection that appears in a remote site is rapidly spread to other parts of the world and as a consequence may originate virulent pandemics of dimensions difficult to predict. Most of the (re)emerging viral diseases are caused by RNA viruses (with a higher rate of mutation and thus of adaptation than DNA viruses).

Currently there are a limited number of antivirals to treat a limited number of diseases caused by viruses, therefore there is an urgent need for the discovery of new wide-spectrum antivirals that may act to a common target of different viruses.

The viruses use the cellular machinery for the replication, for the synthesis of their nucleic acids and for the transcription of the genomic information. Viral polymerases play a key role in the replication of the viral genome. In particular, catalyze the synthesis of nucleic acids.

The knowledge about the mechanisms of viral replication and about the structure and function of viral polymerases and of their exclusivity or differences with respect to cellular polymerases allowed the rational design of potent and selective antiviral agents. Moreover, since polymerases catalyze the synthesis of nucleic acids, most of the antivirals used in the clinic are nucleos(t)ides.

OBJECTIVES

The general aim of the present Doctoral Thesis is the discovery of new inhibitors of viral polymerases that may be of utility in the treatment emerging and/or reemerging viral diseases caused by either RNA or DNA viruses. The fact that many viral polymerases share sequences and similar functions among different viruses, may lead to compounds that may act against more than one family of viruses thus resulting in broad spectrum antivirals.

We direct our efforts into the design of new nucleosides as potential antivirals targeted to viral polymerases. In particular we have designed, synthesized and evaluated, against a wide panel of viruses, “unconventional” nucleosides of unknown structures. Due to the novelty of the structures of the designed “nucleosides” we were interested in exploring their biological potential and tested them in cell proliferating assays as antitumorals.

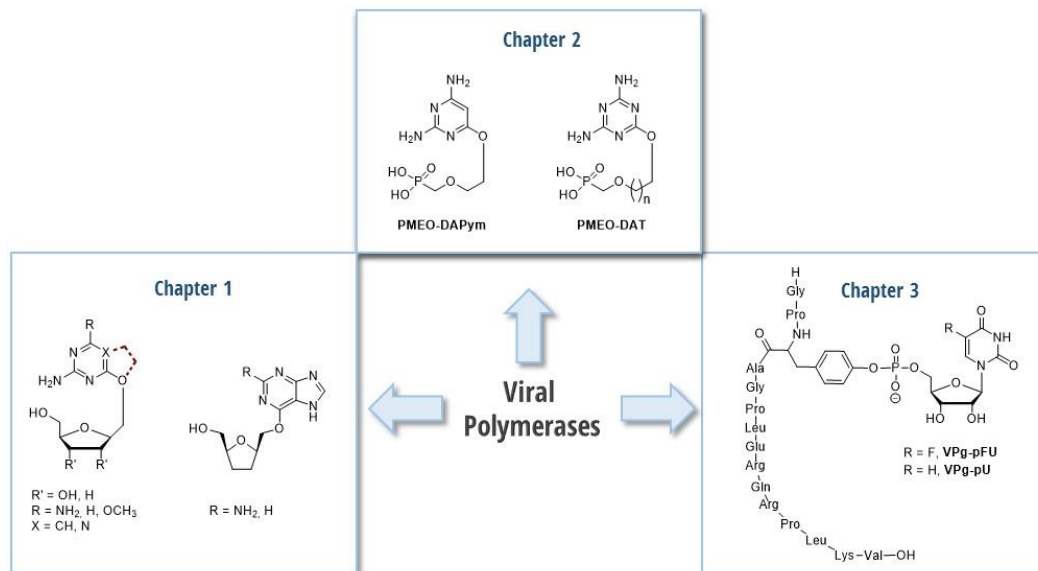
In Chapter 1 we describe the design, synthesis and biological evaluation of a series of methyloxynucleosides as “unconventional” nucleosides that combine in their structure non-natural nucleobases (diaminopyrimidines, diaminopurines or diamino-1,3,5-triazines) with non conventional sugars linked to the C-6 of the nucleobase through an ether bond. This kind of linkage may result in methabolically more stable compounds than the conventional nucleosides (linked through N-1 or N-9). The D-allitol or D-altritol were designed as ribonucleoside mimics while the tetrahydrofuran analogues were pursued as 2',3'-dideoxynucleoside mimetics. All compounds were tested against a wide panel of DNA and RNA viruses and also against different tumor cell lines.

Additionally, a comparative conformational study in solution with model unconventional nucleosides has been performed by NMR.

In Chapter 2 a family of acyclic phosphonates of 2,4-diamino-1,3,5-triazines (PMEO-DAT) are described. These compounds were designed as aza analogues of PMEO-DAPym upon pyrimidine to triazine scaffold hopping. Also, as in the nucleosides described in Chapter 1, the acyclic chain is linked to the nucleobase through the oxygen, by an ether bond. The synthesis, biological evaluation against DNA and RNA viruses and comparative molecular modeling studies with PMEO-DAPym and PMEO-DAT in relation with the active sites of viral DNA polymerases were also performed.

The main objective of Chapter 3 is the elucidation of a possible mechanism of inhibition of 5-fluorouridine (a potent inhibitor of the replication of foot-and-mouth disease virus; FMDV) over the uridylylation of VPg and therefore over the replication of FMDV. With this aim, we designed nucleopeptides as simplified models of uridylylated VPg

(VPgpU) and fluorouridylylated VPg (VPgFU) bearing a 15 amino acids chain. A structural study of these nucleopeptides in complex with viral polymerase, has been performed by X-Ray techniques.



RESULTS

The main results for Chapter 1 can be summarized as follows:

- The synthesis of the target unconventional nucleosides was carried out by alkylation of the corresponding Cl-substituted nucleobases with the alcoxides, *in situ* generated, of D-allitol and D-altritol or 2,5-bis(hydroxymethyl)tetrahydrofuran. The suitable D-allitol and D-altritol sugar intermediates have to be previously prepared through a careful 8-step synthesis, which required the set-up and optimization of each synthetic step. In the synthesis of these nucleosides some dimeric compounds (**1.37** and **1.39**) were obtained as side products. In order to explore their biological profile a synthetic procedure that gave exclusively dimeric compounds (**1.49**, **1.65**, **1.66**, **1.70** and **1.71**) was settled.
- A comparative conformational study in solution by NMR carried out with **1.16b** and **1.25**, as model compounds of ribomimetics and dideoxyanalogues, respectively, showed that the tetrahydrofuran ring in the polyhydroxylated nucleosides (as **1.16b**) adopts an equilibrium between 4E and 1E shifted to the south conformation, while in the corresponding dideoxyanalogues (as **1.25**) the equilibrium is in the usual ranges for dideoxynucleosides (between 3E and 2E).

- All the synthesized compounds resulted inactive against HIV-1 replication. This lack of activity could be due either to a lack of conversion of the nucleosides to the corresponding nucleoside 5'-triphosphates (NTPs) because they are not recognized by the kinases, and/or that the NTPs show a low or null affinity by the viral DNA polymerase [HIV-1 reverse transcriptase (RT)]. To clarify this issue the triphosphate **1.60** was synthesized, as model of this type of compounds. **1.60** was recognized by HIV-1 RT when poli(rU:dA) was used as template/primer. This result indicated that the compound is recognized by the polymerase and moreover, it is recognized as an adenine mimic. In view of the results with **1.60**, it can be assumed that inactivity shown by the unconventional nucleosides against HIV-1 replication may be due to a lack of an efficient metabolic conversion into their corresponding 5'-triphosphates and affinity for the target polymerase (HIV-1 RT).

- Due to the novelty of the structures we decided to explore the biological potential of the compounds synthesized. They were tested against the replication of a broad range of RNA and DNA viruses. From these assays several *hit* compounds, that deserve further development as antivirals, were obtained. Thus, **1.15a** and **1.15b** showed good activity against Chikungunya virus in the low μM range. **1.16b** resulted a good *hit* against the replication of feline herpes simplex virus (FHSV). The dimers **1.49** and **1.68** were active against the replication of virus varicella zoster (VZV) and Human cytomegalovirus (HCMV), respectively.

- Finally, compounds **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** and **1.55** showed cytostatic activity against proliferating human CD4+ T-Lymphocyte CEM cells and against several other tumor cell lines, including murine leukemia L1210 and human prostate PC3, kidney CAKI-1, and cervical carcinoma HeLa cells.

The main results for [Chapter 2](#) are the following:

- The synthesis of PMEO-DAT (**2.27** and **2.28**) compounds was carried out by a new synthetic procedure upon treatment of cyanuric chloride with the previously prepared appropriated phosphonates (**2.7** and **2.13**) in the presence of 2,4,6-triaminopyridine (collidine), followed by deprotection (bromotrimethylsilane) and hydrolysis. Importantly, to prevent compound degradation, the deprotection step has to be performed under cold conditions ($\approx -10\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the reaction mixture has to be carefully neutralized up to pH 5 before evaporating the solvent for purification.

- **2.27** and **2.28** were tested against a wide panel of viruses (HIV-1, HIV-2, MSV, HBV, HCV, HSV-1, HSV-2, HCMV, VZV, VV, VSV, Influenza A and B and Adenovirus 2). **2.28** was devoid of antiviral activity. In contrast, **2.27** showed a potent inhibitory potency against HIV-1, HIV-2, HBV, VZV and MSV (EC_{50} values in the low micromolar range). This result indicated that a methoxyethoxy acyclic chain (as in **2.27**) is the optimal length between the phosphonate moiety and the nucleobase (DAT) for activity. The biological profile of **2.27** is similar to that of PMEODAPym (**2.1**). However, PMEODAT is more selective because, unlike PMEODAPym, it does not stimulate secretion of β -chemokines in cultured PBMC.

- A comparative molecular modeling study of the active sites of viral DNA polymerases was carried out. With this study we proposed a rationale for the similar biological profile of **2.27** and **2.1** on the basis of structural differences in the active site of the viral DNA polymerase. Our hypothesis is that the greater the ability to discriminate between correct and mismatched bases in the active site, the lesser the sensitivity of the DNA polymerase to the compounds.

Finally, the results of Chapter 3 can be summarized as follows:

- For the synthesis of the target nucleopeptides **3.32** and **3.33**, first, it was necessary to prepare the monomers of uridylylated and fluorouridylylated tyrosine (**3.15** and **3.3**, respectively). These monomers were prepared in 38 and 50% global yield, respectively by a 7 steps procedure that required the optimization of the reaction conditions of each step. The model compounds of VPgpU (**3.32**) and VPgFU (**3.33**) were prepared by solid phase synthesis using a Fmoc/*t*Bu strategy and Wang resin.

- X-Ray studies of the model compounds in complex with FMDV polymerase showed for the complex with **3.33** a big conformational change in the $\beta 9$ - $\alpha 1$ loop of the viral polymerase that moves around 8Å from the active position of the polymerase. This movement prevents the right positioning of the acceptor base in the RNA template thus blocking the catalytic site and preventing the incorporation of a new nucleotide to the nascent RNA.

CONCLUSIONS

The main aim of this PhD thesis has been the design and study of new inhibitors of viral polymerases directly involved in the replication of RNA or DNA emerging and/or reemerging viruses. This aim has been accomplished following two different approaches: in the first, we have designed, synthesized and determined the biological profile of “unconventional” nucleosides to inhibit different viral polymerases, and, in the second, we have prepared and studied by X-Ray analysis, nucleopeptides in order to elucidate the mechanism of inhibition of 5-fluorouridine over the foot-and-mouth disease viral polymerase.

In **Chapter 1**, we obtained a family of methyloxynucleosides as “unconventional” nucleosides from which new “hits” of unknown structures have been discovered.

Thus, **1.15a** and **1.15b** were good inhibitors of chikungunya virus replication, with activity in the μM range. Moreover, **1.16b** was active, in the low μM range, against Feline herpes simplex virus (FHSV). **1.49** y **1.68** were good inhibitors of VZV and HCMV, respectively.

In addition, compounds **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** y **1.55** showed good activity in several tumor cell lines. Therefore, these series of unconventional nucleosides may represent a novel family of potential antiproliferative agents.

In **Chapter 2**, **2.27** and **2.28** are designed and synthesized as aza analogues of PMEO-DAPym. They have been prepared by replacing the 2,4-diaminopyrimidine ring by a 2,4-diamino-1,3,5-triazine (PMEO-DAT).

2.27 (PMEO-DAT) is a potent inhibitor of HIV-1, HIV-2, HBV, MSV and VZV, showing a similar biological profile than that of PMEO-DAPym although it is more selective.

In **Chapter 3**, nucleopeptides as simplified models of VPgpU (**3.32**) and VPgpFU (**3.33**) have been prepared and studied by X-Ray in complex with the FMD viral polymerase. The results of the X-Ray studies show that the incorporation of 5-FUMP at the Tyr of position 3 of the primer results in a great conformational change in the $\beta 9$ - $\alpha 1$ loop of the viral polymerase which moves 8 Å away from its active position, thus preventing a correct positioning of the acceptor base of the RNA template and as a consequence avoids the incorporation of a new nucleotide to the nascent RNA.

This mode of inhibition may be useful for the design of antiviral drugs against other picornaviruses since they all use different VPgs as primers for the synthesis of viral RNA.

RESUMEN

ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS EN LA BÚSQUEDA DE AGENTES ANTIVIRALES

INTRODUCCIÓN

Los virus son los agentes etiológicos responsables de muchas enfermedades en humanos que van desde leves (p. ej. resfriado común) a letales (p. ej. la viruela, el SIDA, etc). Asimismo, los virus juegan un papel importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

Actualmente, se conocen más de 219 especies de virus capaces de infectar seres humanos. Algunos de estos virus son responsables de importantes infecciones virales: como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) responsable del SIDA (37-40 millones de personas infectadas en el mundo); el virus influenza que causa cerca de 250.000-500.000 muertes anuales; el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C (VHB y VHC) con 240 y 140 millones de personas infectadas, respectivamente; el virus herpes simplex (VHS) causante de neumonía, encefalitis, meningitis, lesiones genitales, etc; el virus varicela zóster (VVZ) y el citomegalovirus humano (CMVH), ambos pertenecientes a la familia de los virus herpes, responsables de graves enfermedades en pacientes inmunodeprimidos.

Las enfermedades virales (re)emergentes suponen una amenaza para la humanidad. En un mundo globalizado como en el que vivimos, una infección viral que aparece en un lugar distinto y remoto a su entorno natural, puede ser fácilmente diseminada a otras partes del mundo y como consecuencia se pueden originar brotes virulentos de dimensiones difíciles de predecir.

La mayoría de las enfermedades virales (re)emergentes están causadas por virus ARN que en general muestran una alta capacidad de mutación comparada con la de los virus ADN.

Actualmente, se dispone de un escaso arsenal de fármacos para el tratamiento de un número muy limitado de virus, por lo que se hace imprescindible y urgente la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antivirales de amplio espectro cuya diana sea común a múltiples virus.

Los virus utilizan la maquinaria celular para la replicación y síntesis de sus ácidos nucleicos así como para la transcripción de la información genética. Las polimerasas virales juegan un papel esencial en la replicación y transcripción del genoma viral. En particular, catalizan la síntesis de los ácidos nucleicos.

El conocimiento acerca de los mecanismos de replicación viral y, sobre todo, de la estructura y función de las polimerasas virales así como su exclusividad o diferencia con respecto a las polimerasas celulares ha permitido el diseño racional y desarrollo de fármacos antivirales potentes y selectivos de la replicación viral. Dado que las polimerasas son las enzimas que catalizan la síntesis de los ácidos nucleicos, no es de extrañar que muchos de los fármacos antivirales empleados en clínica tengan estructura de nucleós(t)idos.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el descubrimiento de nuevos inhibidores de polimerasas virales que puedan resultar útiles en el tratamiento de enfermedades virales emergentes y/o re-emergentes causadas tanto por virus ARN como por virus ADN. El hecho de que muchas polimerasas compartan secuencias y funciones similares entre distintos tipos de virus, puede dar lugar a compuestos que actúen frente a más de una familia de virus, dando lugar a antivirales de amplio espectro.

Por ello, dirigimos nuestros esfuerzos en el diseño de nuevos nucleósidos como potenciales agentes antivirales cuyas dianas terapéuticas sean las polimerasas virales. En concreto, se han diseñado, sintetizado y evaluado frente a un amplio panel de virus, nucleósidos “no convencionales” de estructura desconocida en la literatura hasta el momento de iniciar la tesis. Debido a la novedad estructural de estos compuestos decidimos explorar su potencial biológico en ensayos de proliferación celular como antitumorales.

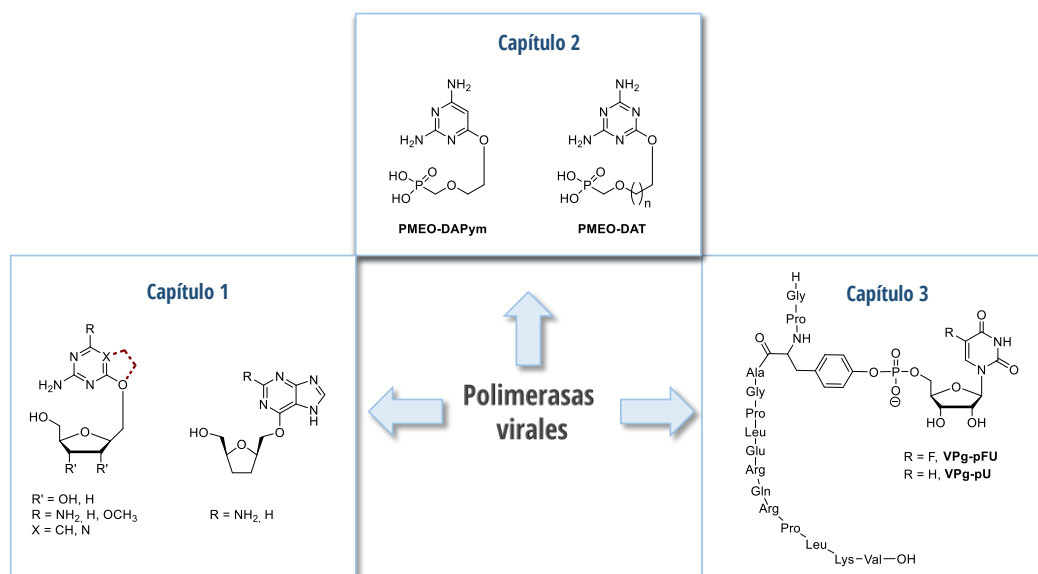
En el **Capítulo 1** se describe el diseño, síntesis y evaluación biológica, como potenciales inhibidores de polimerasas virales y, por tanto, de la replicación de distintos virus, de una nueva clase de nucleósidos “no convencionales” (metiloxinucleósidos de estructura desconocida) que combinan en su estructura bases no naturales (diaminopirimidinas, diaminopurinas o diamino-1,3,5-triazinas) con azúcares “no convencionales” (un anillo intacto de tetrahidrofurano distinto de ribosa y de desoxirribosa) unidos al C-6 de la nucleobase mediante un enlace tipo éter. Este tipo de unión podría dotar a los compuestos de una mayor estabilidad metabólica respecto a los nucleósidos clásicos o convencionales (unidos a través del N-1 o N-9 de las pirimidinas o purinas, respectivamente). Los derivados de D-alitol y D-altritol se diseñaron como miméticos de ribonucleósidos mientras que los análogos de tetrahidrofurano pueden considerarse como sus didesoxianálogos y miméticos de los

2',3'-didesoxinucleósidos. Todos los compuestos se ensayaron frente a un amplio panel de virus ADN y ARN y frente a diferentes líneas tumorales.

Adicionalmente, se ha llevado a cabo un estudio conformacional en disolución mediante RMN de ambos tipos de metiloxinucleósidos (ribomiméticos y didesoxianálogos).

En el **Capítulo 2** se describe el diseño y síntesis de una familia de fosfonatos de nucleósidos acíclicos de 2,4-diamino-1,3,5-triazinas (PMEO-DAT) diseñados como aza-análogos de PMEODAPym en los que se ha sustituido el anillo de 2,4-diaminopirimidina por el de triazina. Tal como ocurre en el Capítulo 1, la cadena acíclica se halla unida a la base a través del oxígeno mediante un enlace tipo éter. Todos los compuestos se ensayaron frente a un amplio panel de virus ADN y ARN. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de modelado molecular comparativos de PMEODAT y PMEODAPym en relación con los sitios activos de las ADN polimerasas virales.

Finalmente, en el **Capítulo 3** se pretende esclarecer el posible mecanismo de inhibición de la 5-Fluorouridina (un potente inhibidor de la replicación del virus de la fiebre aftosa) sobre el proceso de uridilación de la VPg y, por tanto, en la replicación del virus. En este capítulo se diseñan y sintetizan nucleopéptidos como modelos simplificados de VPg tanto uridilados (VPgpU) como fluorouridilados (VPgpFU) portadores de una cadena de 15 aminoácidos. Asimismo, se lleva a cabo un estudio de sus estructuras en complejo con la polimerasa viral, mediante técnicas cristalográficas de difracción de R-X.



RESULTADOS

A continuación, se recogen los principales resultados del Capítulo 1:

- La preparación de los nucleósidos no convencionales objetivo se lleva a cabo por alquilación de las nucleobases Cl-sustituidas con los correspondientes alcóxidos, generados *in situ*, de D-alitol, D-altritol o 2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano. La síntesis de los derivados intermedios de D-alitol y D-altritol se realizó en 8 pasos y fue necesaria una cuidadosa puesta a punto y optimización de cada una de las etapas de reacción. En la ruta sintética para la preparación de los metiloxinucleósidos no convencionales se obtuvieron como productos secundarios algunos derivados de estructura dimérica (**1.37** y **1.39**). Con el fin de explorar su posible potencial biológico, se ha llevado a cabo la puesta a punto de un procedimiento sintético que ha permitido la obtención exclusiva de dichos compuestos diméricos así como de otros análogos (**1.49**, **1.65**, **1.66**, **1.70** y **1.71**).

- Se ha llevado a cabo un estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN de ambos tipos de metiloxinucleósidos (ribomiméticos y didesoxianálogos) empleando **1.16b** y **1.25** como compuestos modelo. En los nucleósidos polihidroxilados (**1.16b**) el anillo de tetrahidrofurano adopta un equilibrio conformacional (N/S), próximo aunque en distinta zona donde aparecen los nucleósidos “clásicos”, entre 4E y 1E desplazado hacia el confórmero tipo sur (4E). Para los correspondientes didesoxianálogos (**1.25**), el equilibrio conformacional se encuentra en el rango N/S habitual de los didesoxinucleósidos entre 3E y 2E .

- Los metiloxinucleósidos sintetizados resultaron inactivos frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), debido posiblemente, a que no son reconocidos por las quinasas que los metabolizarían a los correspondientes nucleósido 5'-trifosfatos (NTPs), y/o bien a que dichos NTPs presentaran una nula o muy baja afinidad por la ADN polimerasa viral [Transcriptasa inversa (TI) del VIH]. Con el fin de explicar dicha falta de actividad, se sintetizó el trifosfato **1.60**, como compuesto modelo de este tipo de nucleósidos. El trifosfato **1.60** fue reconocido por la transcriptasa inversa del VIH cuando se emplea poli(rU:dA) como molde/cebador y además se comporta como un mimético de adenina. Por tanto, se puede asumir que la falta de actividad de estos nucleósidos “no convencionales” frente a la replicación del VIH-1 puede ser debida a la falta de conversión metabólica a los correspondientes 5'-trifosfatos y de afinidad por la TI del VIH.

- Con el fin de explorar el potencial biológico de estos nuevos nucleósidos no convencionales, los compuestos se ensayaron como inhibidores de la replicación frente a un amplio panel de virus ADN y ARN. De dicha evaluación han surgido posibles “hits” frente a la replicación de diversos virus que merecen un posterior estudio y desarrollo como antivirales. Así, **1.15a** y **1.15b** mostraron buena actividad frente al virus chikungunya en el orden micromolar bajo. El derivado **1.16b** resultó activo frente al virus del herpes felino (FHSV). Los dímeros **1.49** y **1.68** resultaron activos frente a la replicación del virus varicela zóster (VVZ) y del citomegalovirus humano (CMVH), respectivamente.

- Finalmente, los compuestos **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** y **1.55** mostraron citotoxicidad en células CEM CD4⁺ T-linfocíticas tumorales y frente a distintas líneas tumorales como leucemia murina (L1210), carcinoma de próstata humano (PC3), carcinoma de riñón (CAKI-1) y carcinoma cervical (HeLa).

Los principales resultados del Capítulo 2 fueron los siguientes:

- La síntesis de los PMEODAT se ha llevado a cabo a través de una novedosa estrategia sintética mediante el tratamiento de cloruro cianúrico con los correspondientes fosfonatos (**2.7** y **2.13**) en presencia de 2,4,6-triaminopiridina (2,4,6-colidina), seguido de desprotección (con bromuro de trimetilsilano) e hidrólisis. Cabe destacar que para evitar la degradación de estos productos en el paso de desprotección, éste es necesario realizarlo en condiciones suaves (0 a -10 °C) y llevar cuidadosamente la mezcla de reacción hasta pH≈5 antes de evaporar el disolvente para su posterior purificación.

- Los fosfonatos de diaminotriazinas **2.27** y **2.28** se evaluaron en cultivos celulares frente a un amplio panel de virus (VIH-1, VIH-2, VSM, VHB, VHC, VHS-1, VHS-2, CMVH, VVZ, VV, VSV, Influenza A y B, adenovirus 2). El derivado **2.28** resultó inactivo. Por el contrario, el derivado **2.27** es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1, VIH-2, VHB, MSV y VVZ presentando valores de CE₅₀ en el orden micromolar bajo. Este hecho indica que la cadena tipo metoxietoxi como en **2.27** es la longitud óptima entre el fosfonato y la nucleobase (DAT) para la actividad. El perfil biológico de **2.27** (PMEODAT) es muy similar al de PMEODAPym (**2.1**). Sin embargo, PMEODAT es más selectivo que PMEODAPym ya que no induce la aparición de las β-quimio/citoquinas cuando se añade a cultivos de PBMC.

- Mediante estudios de modelado molecular de los sitios activos de las ADN polimerasas virales se ha podido proporcionar una explicación estructural plausible al hecho de que **2.27** y **2.1** presenten perfiles biológicos similares. Nuestra hipótesis es que cuanto mayor es la capacidad de discriminación entre bases correcta e incorrectamente apareadas en el sitio activo, menor será la sensibilidad de la ADN polimerasa a este tipo de compuestos.

Finalmente, los resultados del Capítulo 3 pueden resumirse tal como sigue a continuación:

- Para la preparación de los nucleopéptidos objetivo (**3.32** y **3.33**) ha sido necesaria la síntesis de los monómeros de tirosina uridilada (**3.15**) y fluorouridilada (**3.3**), respectivamente. La síntesis de dichos monómeros se llevó a cabo en 7 pasos, y requirió la puesta a punto de cada una de las etapas de reacción, obteniéndose los monómeros buscados con un rendimiento global del 38 y 50%, respectivamente. Los modelos de VPgpU (**3.32**) y VPgpFU (**3.33**) simplificados (portadores de 15aa) se prepararon mediante síntesis en fase sólida siguiendo una estrategia Fmoc/*t*Bu empleando una resina Wang.

- En los estudios cristalográficos del complejo polimerasa-VPgpFU (**3.33**) mediante técnicas de difracción de rayos X se observa un cambio conformacional en el bucle bucle $\beta 9-\alpha 1$ de la polimerasa viral que se desplaza alrededor de 8 Å de la posición activa. Dicho desplazamiento impide el correcto posicionamiento de la base aceptora del molde de ARN, bloqueando el centro catalítico e impidiendo así la incorporación de un nuevo nucleótido a la hebra de ARN en crecimiento.

CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el diseño y estudio de nuevos inhibidores de polimerasas virales, directamente implicadas en la replicación de virus emergentes y/o re-emergentes tanto ARN como ADN, que puedan ser de utilidad en el tratamiento de las enfermedades causadas por los mencionados virus. Este propósito se ha abordado desde dos aproximaciones diferentes: en la primera se lleva a cabo el diseño, síntesis y evaluación biológica de nucleósidos “no convencionales” capaces de inhibir diferentes polimerasas virales y, en la segunda se lleva a cabo la preparación y el estudio cristalográfico, mediante técnicas de difracción

de R-X, de nucleopéptidos que permitan elucidar el mecanismo de inhibición de la 5-fluorouridina sobre la polimerasa del virus de la fiebre aftosa.

En el **Capítulo 1**, se obtuvo una familia de metiloxinucleósidos como nucleósidos “no convencionales”, a partir de los cuales se han descubierto nuevos “hits” de estructura desconocida.

Así, **1.15a** y **1.15b** resultaron ser buenos inhibidores frente a la replicación del virus chicungunya con una actividad en el rango micromolar. **1.16b** fue activo en el orden micromolar bajo frente al virus del herpes felino (FHSV). **1.49** y **1.68** fueron buenos inhibidores del VVZ y CMVH, respectivamente.

Además, los compuestos **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** y **1.55** muestran buena actividad frente a diferentes líneas tumorales. Por lo tanto, esta serie de nucleósidos “no convencionales” representan una nueva familia de agentes con potencial antiproliferativo.

En el **Capítulo 2**, se han sintetizado y evaluado frente a un amplio panel de virus, aza-análogos de PMEO-DAPym (**2.27** y **2.28**) en los que se ha sustituido el anillo de 2,4-diaminopirimidina por un anillo de 2,4-diamino-1,3,5-triazina (PMEO-DAT). El derivado **2.27** es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1, VIH-2, VHB, VSM y VVZ mostrando un perfil biológico similar a PMEO-DAPym aunque es más selectivo.

En el **Capítulo 3**, se han preparado nucleopéptidos como modelos simplificados de VPg tanto uridilados (**3.32**) como fluorouridilados (**3.33**) del virus y se ha llevado a cabo el estudio de los mismos en complejo con la polimerasa viral mediante técnicas de difracción de R-X. Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de 5-FUMP sobre la tirosina en posición 3 del cebador (VPg) da lugar a un gran cambio conformacional en el bucle $\beta 9-\alpha 1$ de la polimerasa viral que se desplaza unos 8 Å de la posición activa de la polimerasa, impidiendo así el correcto posicionamiento de la base aceptora del molde de ARN. De este modo, se bloquea el centro catalítico impidiendo la incorporación de un nuevo nucleótido a la cadena de ARN en crecimiento.

Este modo de inhibición podría ser de utilidad para el diseño de fármacos antivirales frente a picornavirus aprovechando el hecho de que todos ellos utilizan distintas VPg como cebadores para la síntesis del ARN viral.

Introducción

I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES

I.1.1. Las infecciones virales

Los virus son los agentes etiológicos responsables de muchas enfermedades en humanos que van desde leves (p. ej. resfriado común) a letales (p. ej. la viruela, el SIDA, etc). Asimismo, los virus juegan un papel importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.^{1,2}

A lo largo de la historia de las distintas civilizaciones, las infecciones virales han sido y siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo.^{1,2} A pesar de los grandes esfuerzos de la comunidad científica para prevenir (mediante vacunas) y combatir dichas infecciones mediante el desarrollo de antivirales y, sobre todo, teniendo en cuenta el gran número de virus existentes, de virus emergentes y re-emergentes, se puede asegurar que el “arsenal” de fármacos antivirales disponibles es insuficiente, escaso y limitado a un número reducido de virus.

Actualmente, se conocen más de 219 especies de virus,³ capaces de infectar seres humanos, que se han clasificado en 21 familias.^{3,4} Así, por ejemplo, la familia de los virus herpes está integrada por 8 tipos de virus diferentes (VHS-1, VHS-2, CMVH, VVZ, EBV, VHH-6, VHH-7 y VHH-8).⁴ Es casi inevitable que emerjan nuevos virus humanos, procedentes fundamentalmente de otros mamíferos y de las aves.³

Existen virus ADN, que se replican en el núcleo celular, como por ejemplo el virus herpes, adenovirus, virus papiloma, etc., y virus ARN que se replican en el citoplasma, como por ejemplo retrovirus, togavirus, virus corona, etc.

En los últimos 50 años se han aprobado 90 fármacos antivirales aunque solo para el tratamiento de 9 infecciones causadas por virus en humanos⁵ (Figura 1). Dichos fármacos actúan frente a virus ADN tales como VHB (virus de la hepatitis B), CMVH (citomegalovirus humano), VHS (virus herpes), VPH (virus papiloma humano), y VVZ (virus varicela zóster); frente a virus ARN tales como VHC (virus de la hepatitis C), VRS (virus respiratorio sincitial), virus influenza y frente a retrovirus como el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). Once de los fármacos aprobados actúan frente a más de una infección viral, lo que sugiere que algunos agentes antivirales pueden ser utilizados para el tratamiento de múltiples infecciones virales.⁵

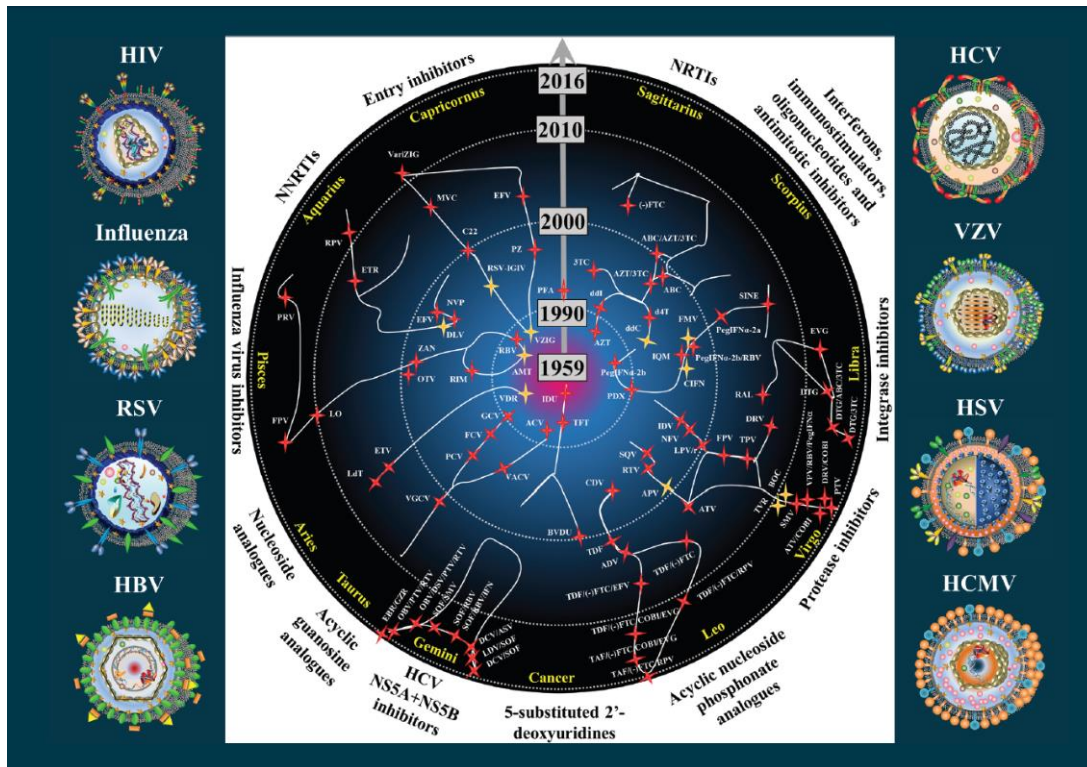


Figura 1. Fármacos antivirales aprobados en los últimos 50 años (Enero de 1959-Abril de 2016) visualizados en el zodiaco. La flecha gris indica las fechas de aprobación de los fármacos. Los 12 signos se posicionan en el círculo. Cada signo corresponde a un grupo de fármacos cuyo nombre está anotado fuera del círculo. Cada estrella roja representa un fármaco aprobado (hasta 90). Las flechas amarillas indican los fármacos para los que se ha abandonado su uso clínico. Figura tomada de la referencia 5 (De Clercq & Li, 2016).

Así, por ejemplo, la ribavirina (Figura 2) es eficaz frente a infecciones producidas por tres virus ARN diferentes: el virus de la hepatitis C, el virus respiratorio sincitial y el virus influenza.⁵

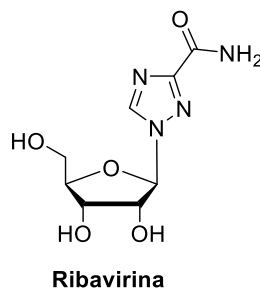


Figura 2. Estructuras del antiviral de amplio espectro ribavirina.

A continuación se enumeran algunos de los virus responsables de las infecciones virales más importantes que han afectado a la humanidad en estos últimos 50 años para las que se han aprobado fármacos antivirales:

- (1) El **virus de inmunodeficiencia humana (VIH)**, agente etiológico del SIDA.⁶ Desde que se describieron los primeros casos en 1983,⁷ se estima que ha causado 78 millones de infectados de los cuales 35 millones han muerto a causa de la enfermedad. La infección por VIH está lejos de ser solventada. Así, se ha estimado que a finales del 2015 existen unos 37-40 millones de infectados por el virus en todo el mundo.⁵ Solo en el 2015 se registraron aproximadamente unos 2 millones de nuevas infecciones.⁸
- (2) Los **virus influenza**, de los que existen 3 tipos distintos: A (infectan a una gran variedad de aves y mamíferos), B y C (infectan casi exclusivamente a humanos).^{9,10} El de tipo A fue el responsable de la denominada gripe española (1918-1919), una de las pandemias más mortíferas de todos los tiempos, que se extendió por todo el mundo (el 60% de la población mundial enfermó) y en solo un año murieron 40-50 millones de personas. Nunca antes murieron tantos en tan poco tiempo. El H1N1 fue el responsable del brote de gripe A en México (2009) que supuso una alerta mundial. Según la OMS, los virus influenza causan entre 250.000 y 500.000 muertes cada año y entre 3-5 millones de casos graves a consecuencia de la enfermedad.¹¹
- (3) El **virus de la hepatitis B (VHB)**.¹² La infección por este virus causa unas 780.000 muertes cada año. Aproximadamente unos 240 millones de personas resultaron infectadas por el virus en el 2014. El virus provoca hepatitis, cirrosis y cáncer de hígado en los casos más graves.^{11,13}
- (4) El **virus de la hepatitis C (VHC)**.¹⁴ Responsable de hepatitis, cirrosis, fallo hepático o carcinoma hepatocelular.^{13,15,16} Existen unos 130-150 millones de personas infectadas por el virus.⁵
- (5) Los **virus herpes simplex (VHS)** de los que existen dos tipos (VHS-1 y VHS-2).¹⁷ El de tipo 1 (VHS-1) causa lesiones orofaciales y en los casos más graves neumonía y encefalitis, mientras que el de tipo 2 (VHS-2) es el responsable de ciertas meningitis y lesiones genitales.^{18,19} Según la OMS, solo en el 2012 existían en el mundo 140 y 417 millones de personas infectadas por VHS-1 y VHS-2, respectivamente.⁵

- (6) El **virus varicela zóster (VVZ)**.²⁰ Pertenece a la familia de los virus herpes²¹ y causa el doloroso herpes zóster de especial gravedad en pacientes inmunodeprimidos.²² Se estima que el 30% de la población mundial ha sido infectada a lo largo de su vida por este virus.²³ VVZ es el responsable de 1 millón de nuevas infecciones cada año.^{23,24}
- (7) El **citomegalovirus humano (CMVH)**.²⁵ También pertenece a la familia de los virus herpes.²⁶ Las consecuencias más graves de la infección por este virus son encefalitis, retinitis, etc. Las infecciones por CMVH se asocian a la alta morbilidad y mortalidad en pacientes trasplantados.^{27,28}

I.1.2. Infecciones virales emergentes y re-emergentes

Las enfermedades virales emergentes han supuesto una amenaza para la humanidad a lo largo de la historia. Actualmente, una de las amenazas sanitarias y epidemiológicas en el mundo globalizado en el que vivimos, es la aparición de enfermedades virales en lugares distintos y remotos a su entorno natural, favorecidas por el intercambio constante de mercancías y personas desde puntos muy distantes del planeta que pueden originar brotes virulentos de dimensiones difíciles de predecir.^{29,30}

En lo que a enfermedades infecciosas se refiere “no existe ningún lugar en el mundo del que estemos lo suficientemente lejos ni desconectados”.³¹ Los virus viajan en avión a través de los continentes. Hoy en día la duración de los vuelos entre continentes llega a ser más corta que el tiempo de incubación de la mayoría de los virus, lo que imposibilita la detección de pasajeros infectados y su aislamiento durante el trayecto, lo que impediría así el salto de las infecciones virales de un continente a otro.³² Un ejemplo fue el brote de síndrome respiratorio agudo causado por coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS-CoV, en inglés) en el 2002 en el sudeste de China. El brote resultó ser un problema de salud mundial, extendiéndose a 40 países, desde el sudeste asiático hasta Estados Unidos, causando más de 8000 infecciones y unas 800 muertes. El reservorio del virus fueron los murciélagos que infectaron a otros animales (ciervos, gatos) y finalmente al hombre.³⁰ Los vuelos internacionales lo extendieron por todo el mundo originando un nuevo brote en Canadá que causó 43 muertes y cientos de personas en aislamiento.³³

Veamos qué es lo que se entiende por enfermedades emergentes y re-emergentes:^{30,34}

- Una **enfermedad emergente** es aquella que se identifica por primera vez en humanos.
- Una **enfermedad re-emergente** es aquella que históricamente ha afectado a humanos pero que reaparece en: (a) nuevas localizaciones, (b) en forma fármaco-resistente, (c) reaparece después de su aparente control y erradicación y lo hace generalmente acompañada de cambios significativos en su patogenicidad. El SIDA causado por el VIH, el síndrome respiratorio agudo (SARS), la pandemia del 2009 de influenza H1N1 y el reciente brote de Ébola en África Occidental (2013-2016)³⁵ son solo algunos de los muchos ejemplos de infecciones virales re-emergentes de alto impacto sanitario, social y económico en todo el mundo.

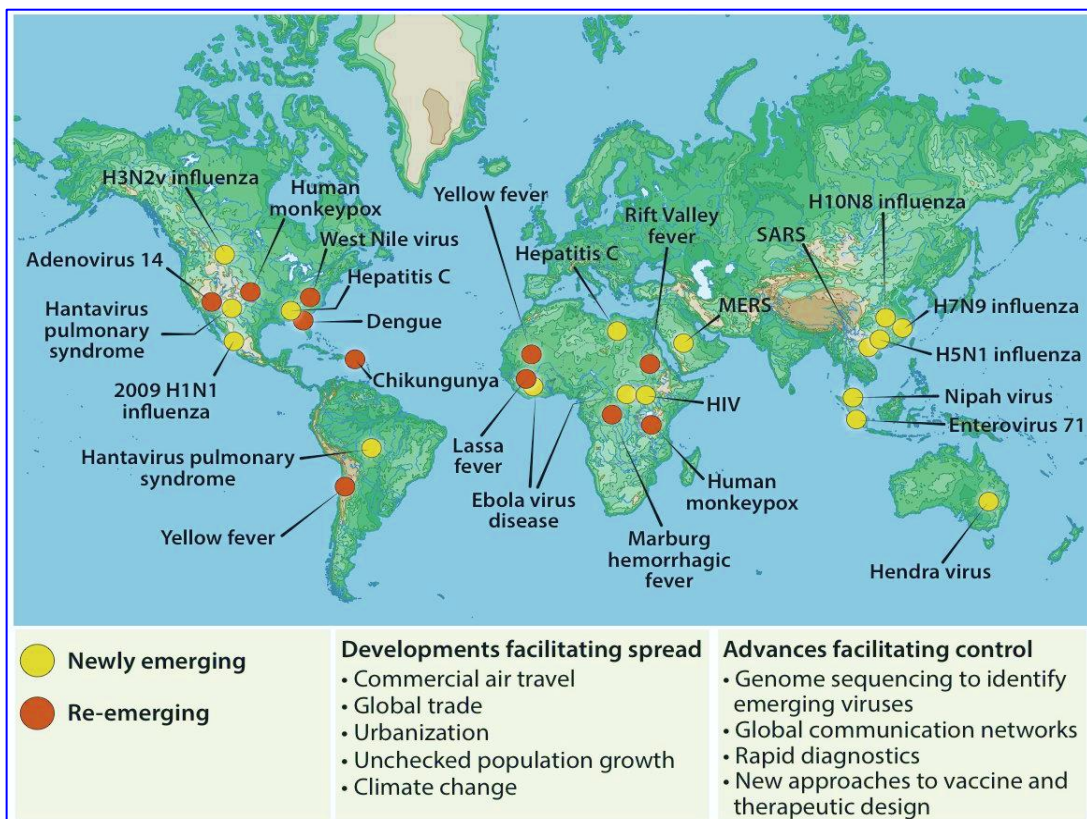


Figura 3. Mapa que muestra algunos ejemplos de los lugares del mundo donde se han registrado brotes de infecciones virales emergentes (puntos amarillos) y re-emergentes (puntos naranjas). Figura tomada de la referencia 29 (Marston et al. 2014).

En la Figura 3 se recogen los lugares del mundo donde se han identificado brotes de virus re-emergentes. Con puntos amarillos se identifican las enfermedades virales emergentes como por ejemplo el brote de virus Hendra en Australia,³⁶ que afortunadamente es muy raro en humanos, o el brote de MERS en el 2014 en Oriente medio que supuso una seria amenaza en Arabia Saudí,³⁷ etc. Los puntos naranjas se refieren a las enfermedades virales re-emergentes como por ejemplo el brote de Dengue en Florida,³⁸ el brote de Chicungunya en América Latina, o los brotes de gripe aviar (H5N1 y H7N9) en Asia, etc.²⁹ Aunque algunos de los virus mostrados en el mapa son muy raros, otros tienen una alta capacidad de expansión (VIH, influenza, SARS) y todos ellos son objeto de vigilancia por las autoridades sanitarias en todo el mundo.

La mayoría de las enfermedades virales re-emergentes están causadas por virus ARN que en general presentan una alta y mayor capacidad de mutación comparada con la de los virus ADN. Esto se debe en parte a que las ARN polimerasas virales carecen de la capacidad “proofreading” (corrección de errores) de las ADN polimerasas. Por tanto, los virus ARN están especialmente capacitados para adaptarse a los cambios ambientales. La alta mutabilidad de los virus ARN es una de las razones que permite explicar la falta de eficacia de las vacunas frente a estos patógenos.²⁹

A la vista de las infecciones devastadoras que causan los virus y que afectan a millones de seres humanos en todo el mundo, del número limitado de antivirales disponible, de los graves efectos secundarios que provocan algunos de ellos y del desarrollo de resistencias a los mismos, se hace imprescindible y urgente la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antivirales. Por otra parte, el rápido aumento del número de patógenos virales emergentes apunta también hacia la necesidad de desarrollar antivirales de amplio espectro cuya diana sea común a múltiples virus. Así, entre otros ejemplos, el favipiravir (FVP, T-705, Figura 4) es un inhibidor de ARN polimerasas que actualmente está en ensayos clínicos frente al virus influenza y que inhibe la replicación de muchos otros virus ARN donde se incluyen alfavirus, arenavirus, hantavirus, flavivirus, enterovirus y el virus respiratorio sincitial.³⁹

El favipiravir se ha aprobado en Japón para el tratamiento de las infecciones producidas por el virus influenza A, B y C. Para ejercer su acción antiviral favipiravir es convertido intracelularmente en su ribofuranosil monofosfato por acción de la enzima fosforiltransferasa; seguidamente, dos fosforilaciones consecutivas lo convierten en el ribofuranosil trifosfato (FVP-TP) que es el metabolito activo (Figura 4). El FVP-TP es un inhibidor de amplio espectro frente a ARN polimerasas del virus influenza A (incluyendo los virus H5N1, altamente patogénicos).⁵ Asimismo, es activo frente a otros virus ARN (+) y ARN (-). Favipiravir se utilizó de forma experimental en pacientes infectados por el reciente brote de ébola.⁵

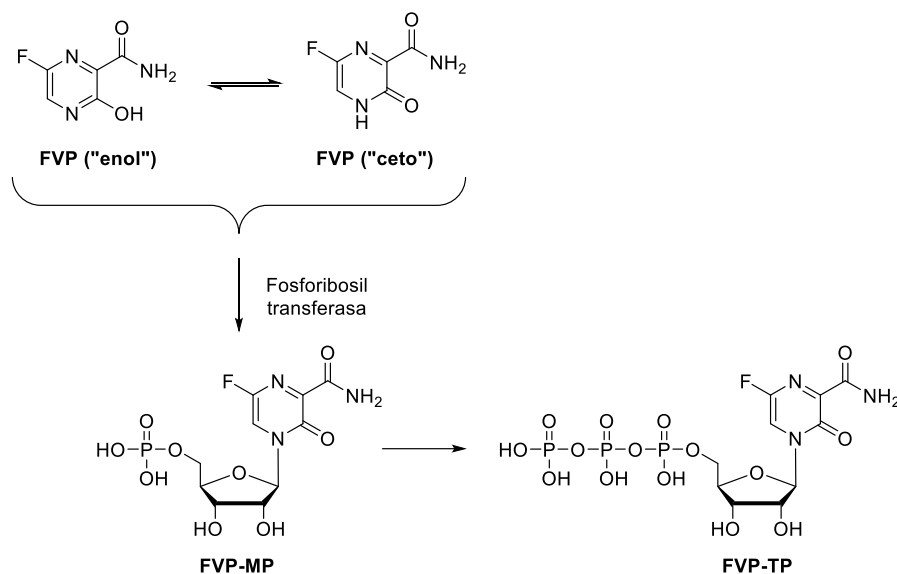


Figura 4. Estructura de favipiravir y de su metabolito activo favipiravir-ribofuranosil-5'-trifosfato. Figura tomada de la referencia 40 (De Clercq, 2015).

1.1.3. Polimerasas virales

Los virus utilizan la maquinaria celular para la replicación y síntesis de sus ácidos nucleicos y la transcripción de la información genética. Las polimerasas virales juegan un papel esencial en la replicación y transcripción del genoma viral.

Debido a las limitaciones en el tamaño del genoma que tiene que ser empaquetado en una partícula viral, las polimerasas virales son generalmente proteínas únicas que desempeñan múltiples funciones en la síntesis del mencionado genoma viral. En función del tipo de genoma y de la familia de virus, estas polimerasas utilizan diversos mecanismos que aseguran la copia completa y exacta del genoma.⁴¹⁻⁴³

Varios de los pasos en el ciclo replicativo de los virus requieren la actividad de una polimerasa.⁴¹ Así, en un primer paso, los virus necesitan convertir sus genomas en un ARNm (ARN mensajero) que posteriormente es traducido para dar lugar a las proteínas virales. Seguidamente, los virus sintetizan copias idénticas de su genoma que tras encapsidación darán lugar finalmente a nuevas partículas virales.

La necesidad de codificar una polimerasa viral que lleve a cabo los procesos de transcripción y/o replicación depende tanto de la localización celular como de la naturaleza del genoma viral que ha de replicarse, por ejemplo si es ADN o ARN, de doble o de simple hebra, o si es de sentido positivo (+) o negativo (-). Los virus que se replican en el citoplasma (todos los virus ARN y la mayoría de los virus ADN) no tienen acceso a las polimerasas celulares y por tanto necesitan codificar sus propias

polimerasas para los procesos de transcripción y replicación. En cambio, los virus que se replican en el núcleo (algunos virus ADN pequeños como por ejemplo el virus papiloma, parvovirus, etc) no necesitan codificar sus polimerasas ya que emplean las ADN polimerasas celulares para la replicación de sus genomas y la síntesis del ARNm. Los retrovirus (por ejemplo el VIH)⁴⁴ codifican una “inusual” ADN polimerasa denominada *transcriptasa inversa* (TI), que es una ADN polimerasa dependiente de ARN (RdDp) que polimeriza el ADN a partir de un molde (*template*) de ARN.⁴¹⁻⁴⁴ La familia de las transcriptasas inversas contienen además de la actividad ADN polimerasa la actividad RNasa H (que degrada la hebra de ARN molde utilizado en la síntesis de ADN viral).

Los virus se clasifican en 7 clases diferentes (clasificación Baltimore 1971)⁴⁵ en función de la naturaleza química de su genoma, de la necesidad de la síntesis de un ARNm y de la estrategia particular empleada en la replicación de dicho genoma. En la Figura 5 se resumen las 7 clases de virus:

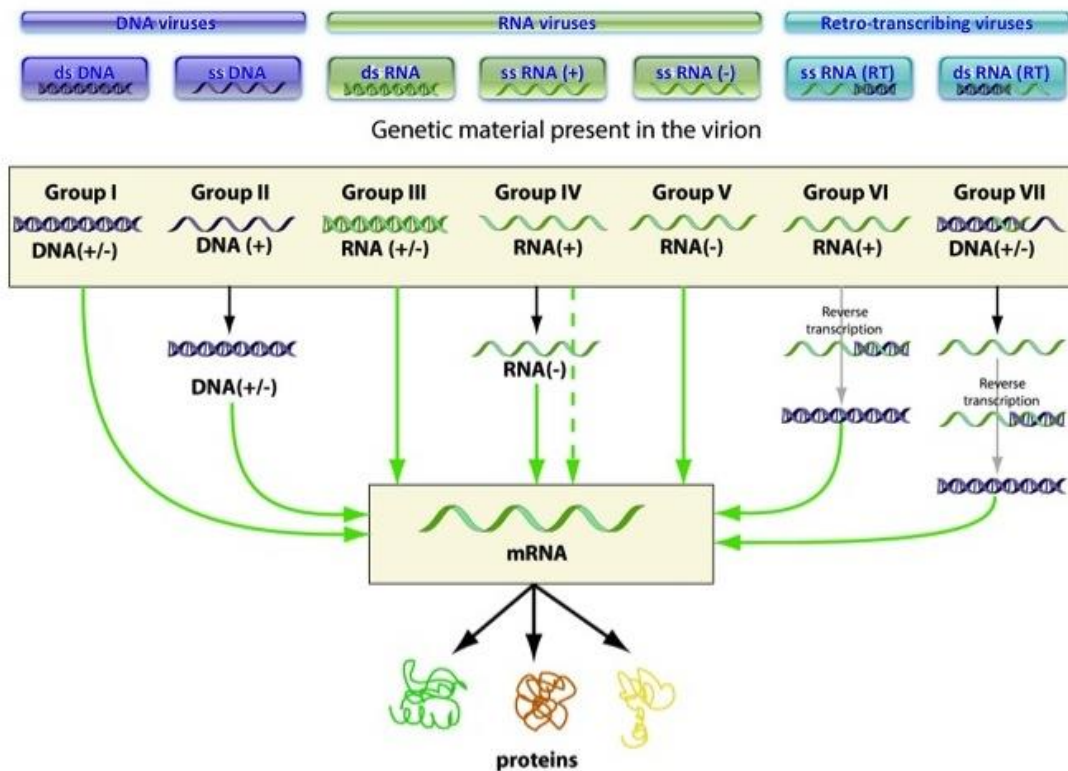


Figura 5. Clasificación de Baltimore de los virus en función del tipo de genoma y método de síntesis del ARNm. Las siete clases de virus son: virus ADN (ssADN y dsADN), virus ARN (sentido positivo (+)ssARN, sentido negativo (-)ssARN y dsARN) y virus de transcripción inversa (ssARN-rt y dsADN-rt). Figura adaptada de las referencias 41 (Choi 2012) y 45 (Baltimore 1971).

Los virus ADN contienen ADN como material genético y son generalmente de cadena doble (dsADN) aunque también pueden ser de cadena sencilla (ssADN). Estos virus replican su genoma empleando *ADN polimerasas ADN-dependientes* (también denominadas ADN polimerasas) y transcriben un ARNm mediante *ARN polimerasas ADN-dependientes* (también denominadas ARN polimerasas).⁴⁶ Por otra parte, los virus ARN contienen genomas ARN, que pueden ser a su vez de doble cadena (dsARN) o de cadena sencilla (ssARN). A su vez, los genomas de cadena sencilla pueden ser de sentido positivo (+) o negativo (-). Los virus ARN se replican y transcriben sus genomas empleando *ARN polimerasas ARN-dependientes*. Los retrovirus se replican mediante *transcripción inversa*, es decir sintetizan su ADN a partir de un molde de ARN.^{41,47-51}

Los retrovirus son virus ARN de cadena sencilla (ssARN) que se replican mediante un intermedio de ADN y emplean una *ADN polimerasa ARN-dependiente* (transcriptasa inversa) codificada por el virus. El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus ADN de cadena doble (dsADN) que se replica mediante un intermedio de ARN empleando una *transcriptasa inversa* codificada por el virus. Por tanto, los cuatro tipos posibles de polimerasas: (i) ARN polimerasas ARN-dependientes; (ii) ADN polimerasas ARN-dependientes; (iii) ARN polimerasas ADN-dependientes y (iv) ADN polimerasas ADN-dependientes, se encuentran en los virus. Cabe destacar que las ARN polimerasas ARN-dependientes y las transcriptasas inversas son exclusivas de los virus ya que las células huésped no requieren replicación de ARN ni transcripción inversa.^{41,48-52}

I.1.3.1. Estructura y función de las polimerasas virales

Como ya se ha mencionado, las polimerasas catalizan la síntesis de los ácidos nucleicos. Su función principal consiste en copiar una hebra de un ácido nucleico molde (*template*) y producir una hebra “hermana” (complementaria). En concreto, las polimerasas sintetizan moléculas de ADN o ARN a partir de desoxi- o ribonucleósido trifosfatos (dNTP o NTP), respectivamente (que son los componentes esenciales de los ácidos nucleicos).

La estructura de las polimerasas se asemeja a una mano derecha (Figura 6) con dominios de pulgar, palma y dedos, basándose en una analogía empleada para describir la estructura del fragmento Klenow de la ADN polimerasa.⁵³

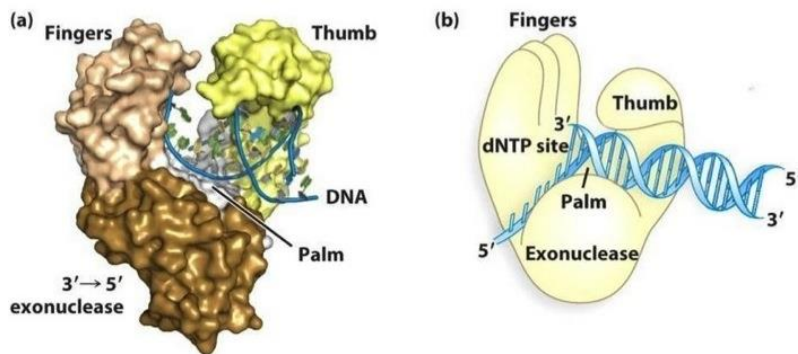


Figura 6. Estructura de una ADN polimerasa que asemeja a una mano derecha con dominios palma (que contiene el centro catalítico), pulgar y dedos.

El dominio de la palma es el dominio más conservado entre los distintos tipos de polimerasas. Este dominio es el que contiene el sitio catalítico e incluye los residuos de Asp que coordinan los dos iones metálicos divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) esenciales en la catálisis y, por tanto, en la actividad de la polimerasa. Uno de ellos se une al OH-3' del *primer* (ARN o ADN)^{41,54,55} mientras que el otro se une a los fosfatos del nucleótido trifosfato (NTP) donde se va a incorporar a la cadena de ácido nucleico en formación.^{41,54,55} El sitio catalítico contiene además el sitio de unión para el *template* (molde), para el extremo del *primer* (iniciador) y para el NTP que se va a incorporar al *primer* (Figura 7). Los dominios pulgar y dedos, que varían tanto en su tamaño como en su estructura secundaria entre las distintas polimerasas, reflejan los requisitos para la replicación de ARN/ADN genomas de cadena sencilla o doble. La superficie interna de estos dominios forma un canal, hacia el sitio catalítico en la palma, donde se une el *template* (molde).^{41,54–56}

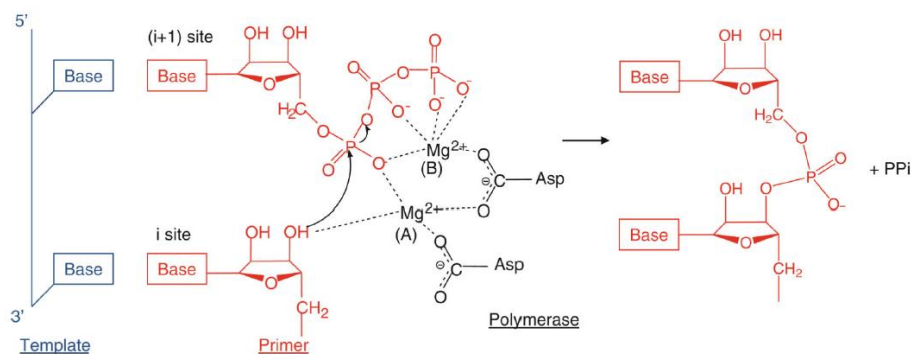


Figura 7. Mecanismo de dos metales usado por las polimerasas para catalizar la reacción de transferencia de nucleótidos. El “template”, el “primer” y los residuos de la polimerasa se indican en azul, rojo y negro, respectivamente. El sitio catalítico de la polimerasa contiene los sitios de unión para el *template* (molde), para el extremo ARN o ADN (sitio de iniciación, “i”, o *priming site*), y para el NTP que se va a incorporar (el sitio “i + 1”). Dos iones metálicos A y B se coordinan con los Asp del centro activo (muy conservados en todas las polimerasas). El Mg^{2+} A se coordina al OH-3' del extremo del *primer* y disminuye la afinidad del 3'-OH por su hidrógeno, facilitando el ataque nucleófilo del 3'-O⁻ sobre el α -fosfato del NTP que se va a incorporar. El Mg^{2+} B estabiliza el NTP y el grupo saliente pirofosfato (PPi). Figura tomada de la ref 41 (Choi 2012).

Además de los dominios dedos, palma y pulgar, algunas polimerasas virales contienen otros dominios que realizan funciones de transcripción y replicación del genoma. Por ejemplo, las transcriptasas inversas de retrovirus contienen un dominio adicional de ribonucleasa H (RNAasa H) que cataliza la degradación de la hebra de ARN en el híbrido ARN-ADN durante la replicación del genoma.⁵⁷ Algunas *ADN polimerasas virales ADN-dependientes* contienen un dominio con actividad “proofreading” (de corrección de errores) para corregir los nucleótidos incorporados incorrectamente durante la síntesis del genoma; por el contrario, las *ARN polimerasas virales ARN-dependientes* carecen de esta actividad “proofreading” y como consecuencia la replicación del genoma contiene una alta proporción de nucleótidos erróneamente incorporados, lo que se traduce en una alta capacidad de mutación (una mutación por cada 10^3 - 10^7 nucleótidos incorporados), lo que supone aproximadamente un error por genoma replicado⁴¹ en los virus que dependen de este tipo de polimerasas.

I.1.4. Etapas en la síntesis de los ácidos nucleicos catalizada por las polimerasas

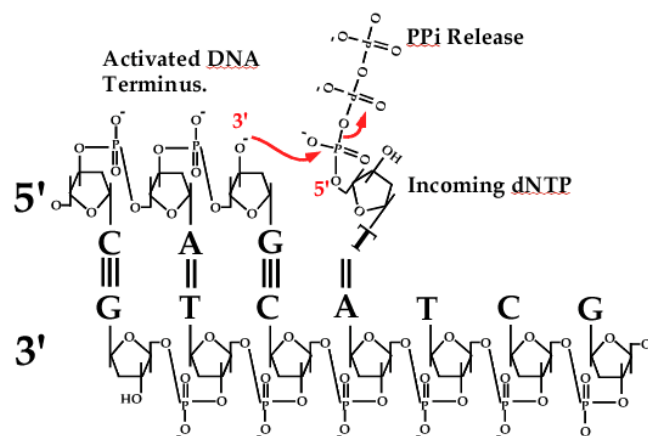


Figura 8. Síntesis de ácidos nucleicos catalizada por polimerasas. Se representa la síntesis de ADN catalizada por una ADN polimerasa. La ADN polimerasa sintetiza el ADN mediante el ataque nucleófilo del OH-3' de la hebra en crecimiento (*primer*) sobre el fosfato en α del dNTP que se va a incorporar.

La síntesis de los ácidos nucleicos, catalizada por las polimerasas (Figura 8), consta de las siguientes etapas: (1) iniciación, (2) elongación y, (3) terminación. A diferencia de las ADN o ARN polimerasas celulares, las polimerasas virales pueden iniciar la replicación del genoma mediante diversos mecanismos, dependiendo de la célula huésped a la que infectan y a la que se adaptan.^{41,58}

(1) Iniciación. Todas las polimerasas sintetizan los ácidos nucleicos en la dirección $5' \rightarrow 3'$ y, por tanto, inician la transferencia del nucleótido en el extremo 3' de la hebra molde (*template*). Los mecanismos de iniciación pueden ser dependientes de un *primer* (iniciador) o *de novo* (independientes de un *primer*). En la Figura 9 se muestran los diversos mecanismos de iniciación empleados por las polimerasas:

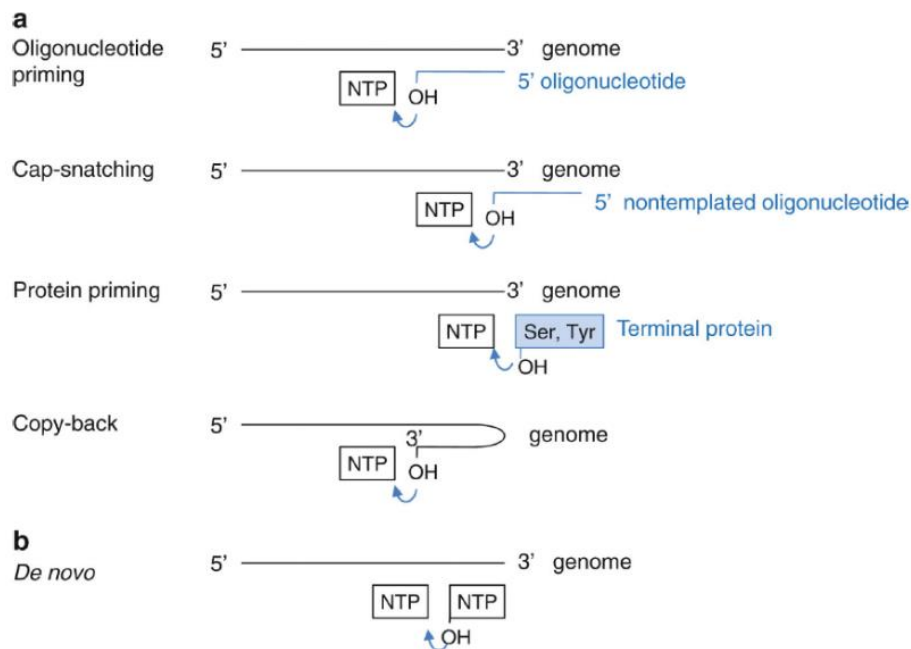


Figura 9. Diagrama esquemático del mecanismo de iniciación de las polimerasas virales. (a) Iniciación dependiente de *primer*. El *primer* puede ser un oligonucleótido, un “snatched cap” de un ARNm de la célula huésped, una proteína terminal, o el extremo-3' de la cadena del molde (*template*) que se dobla sobre sí misma. (b) Iniciación *de novo*. El OH-3' del NTP de iniciación ataca al α-fosfato del NTP que se va a incorporar.

La iniciación *primer*-dependiente requiere un *primer* que puede ser un oligonucleótido o una proteína corta, que aportan el OH-3' inicial donde se va a unir el primer nucleótido que se va a incorporar a la cadena de ácido nucleico naciente.⁴¹ El *primer* puede ser un oligonucleótido (por ej. una cadena corta de ARN de 2-5 oligonucleótidos), un fragmento de “capped” ARNm celular, una proteína corta que contenga un grupo OH (p ej. picornavirus y VHB, codifican una proteína terminal que contiene un residuo de Tyr o Ser que proporciona el grupo hidroxilo similar al 3'-OH de un *primer* de oligonucleótido).^{59,60} Un caso especial de ARN-iniciación *primer*-dependiente es la 3'-elongación mediante un mecanismo de “copy-back”, en el que el extremo 3' del *template* se dobla sobre sí mismo actuando como su propio *primer*. Como resultado se obtiene una cadena de nucleótidos con una longitud dos veces la del *template*.⁶¹

En cuanto a la iniciación *de novo*, no requiere *primer*, pero requiere dos nucleósido trifosfatos (NTPs) uno en el sitio “i” y el NTP que se va a incorporar en el sitio “i + 1” (Figura 7). El NTP de iniciación proporciona el 3'-OH donde se va a unir el siguiente nucleótido que se va a incorporar, por tanto ese 3'-OH funciona de forma similar al 3'-OH del extremo del *primer* en los mecanismos *primer*-dependientes.

(2) Elongación. Una vez formado el complejo polimerasa-ácido nucleico, y sin disociación del *template*, la polimerasa va incorporando, consecutivamente, diversos nucleótidos. Las polimerasas pueden incorporar miles de nucleótidos durante el proceso de elongación. Así, por ejemplo la polimerasa de poliovirus puede sintetizar el genoma completo de 7.5 Kb en un solo proceso sin disociación.⁶² Esta alta procesividad requiere una asociación suficientemente estable del *template* (molde) y del *primer* (iniciador) en la polimerasas que evite la disociación pero suficientemente débil para facilitar el movimiento en cada uno de los pasos de incorporación de un nuevo nucleótido.

(3) Terminación. No se conoce muy bien como las polimerasas terminan la síntesis de los ácidos nucleicos en el extremo 5' del genoma. La terminación en este extremo es un reto, especialmente para virus lineales como los ARN y ADN de cadena sencilla. Si el final del genoma no se copia durante los ciclos sucesivos de replicación, el genoma resultante puede ser progresivamente más corto o más largo.

I.1.5. Fármacos antivirales inhibidores de polimerasas

El conocimiento acerca de los mecanismos de replicación viral y, sobre todo, de la estructura y función de las polimerasas virales así como su exclusividad o diferencia con respecto a las polimerasas celulares ha permitido el diseño racional y desarrollo de fármacos antivirales potentes y selectivos de la replicación viral. Asimismo, los cribados de alto rendimiento se están convirtiendo en una herramienta de alto valor para el descubrimiento de nuevos compuestos antivirales.

Dado que las polimerasas son las enzimas que catalizan la síntesis de los ácidos nucleicos, no es de extrañar que muchos de los fármacos antivirales empleados en clínica tengan estructura de nucleós(t)idos (que son los componentes de los ácidos nucleicos).⁶³ A continuación, se ilustran algunos ejemplos, de los antivirales que se utilizan en clínica y que tienen como diana las polimerasas.

Tabla 1. Tipos de inhibidores de polimerasas virales aprobados para uso clínico.

Tipo de inhibidor	Fármaco	Virus
Análogos de nucleósidos (sustrato)	Aciclovir (ACV)	VHS, VVZ
	Penciclovir (PCV)	VHS
	Ganciclovir (GCV)	CMVH
	Brivudina (BVDU)	VVZ
	Sofosbubir	VHC
	Zidovudina (AZT)	VIH
	Didanosina (ddl)	VIH
	Zalcitabina (ddC)	VIH
	Lamivudina (3TC)	VIH
	Estavudina (d4T)	VIH
	Abacavir (ABV)	VIH
	Emtricitabina (FCT)	VIH
Análogos de nucleótido (sustrato)	Cidofovir (CDV)	CMVH
	Tenofovir (TNV)	VIH
	Adefovir (ADV)	VHB, VIH
Análogos de pirofosfato (producto)	Foscarnet (PFA)	CMVH, VHS
Inhibidores alostéricos	Efavirenz (EFV)	VIH
	Etravirina (ETV)	VIH
	Nevirapina (NVP)	VIH
	Rilpivirina (RPV)	VIH
	Delavirdina (DLV)	VIH

Los fármacos antivirales aprobados para uso clínico y que son inhibidores de las polimerasas, están dirigidos a cuatro grupos principales de virus: el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los virus herpes (VHS), los virus de la hepatitis humana (VH) y los virus influenza.⁶⁴ Dentro de estos 4 grupos nos vamos a centrar solo en los fármacos que actúan como inhibidores de polimerasas.

Los inhibidores de las polimerasas pueden ser de tres tipos: (a) análogos de sustrato (análogos de nucleósidos y nucleótidos), (b) análogos del producto (análogos de pirofosfato) y (c) inhibidores alostéricos (inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa).⁶⁵ En la Tabla 1 se recogen los inhibidores de polimerasa utilizados en clínica.

(a) Análogos de sustrato (análogos de nucleósidos y nucleótidos). En cuanto a los análogos de nucleósidos (N), éstos para inhibir una polimerasa viral necesitan ser fosforilados, en tres etapas sucesivas, por acción de las quinasas a los correspondientes trifosfatos (NTP). El primer paso de fosforilación (para la obtención del monofosfato) es muy selectivo y puede ser realizado por quinasas virales o celulares, mientras que las dos etapas siguientes de fosforilación a los correspondientes di- y trifosfatos son mucho menos selectivas y las realizan quinasas celulares. El NTP puede actuar como un inhibidor competitivo con respecto al sustrato natural (nucleósido trifosfatos) y/o como un sustrato alternativo incorporándose a la cadena de ácido nucleico viral en elongación actuando como terminador de cadena.⁶⁵

Ejemplos de este tipo de compuestos (Figura 10) son: el Aciclovir (ACV), un análogo de guanosina, que se emplea en el tratamiento de las infecciones causadas por virus herpes simplex tipos 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2) y el virus varicela zóster (VVZ).⁶³⁻⁶⁶ El ACV es fosforilado por acción de la timidina quinasa viral (TK) al ACV-MP y por acción de las quinasas celulares al correspondiente ACV-TP. El ACV-TP actúa como un sustrato competitivo de la ADN polimerasa viral y su incorporación a la cadena de ADN en elongación resulta en la terminación de la replicación viral.⁶³⁻⁶⁸ El ganciclovir (GCV), también análogo de guanosina, es activo frente al citomegalovirus humano (CMVH) que actúa de igual modo. La brivudina (BVDU), un análogo de timina, es muy activo frente al VHS-1 y VVZ. El BVDU una vez fosforilado al correspondiente BVDU-TP actúa como inhibidor competitivo de la ADN polimerasa viral y como consecuencia como terminador de la síntesis del ADN viral.^{63-65,68}

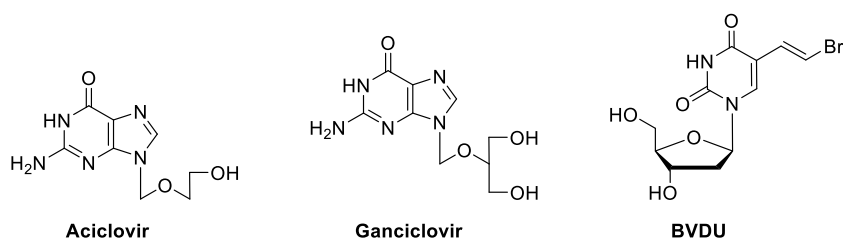


Figura 10. Estructuras del Aciclovir, ganciclovir y brivudina.

Un compuesto que se encuentra en ensayos clínicos en fase II y que se destaca aquí por su elevada potencia y selectividad es el FV100 (Figura 11), el 5'-éster de valina de CF1743, con mejores propiedades farmacocinéticas que CF1743.^{69,70} Este compuesto es el agente anti-VVZ más potente y selectivo de todos los descritos hasta este momento. Su mecanismo de acción no está completamente elucidado pero se conoce que la activación de CF1743 depende de la fosforilación específica por la timidina quinasa codificada por VVZ.⁷¹

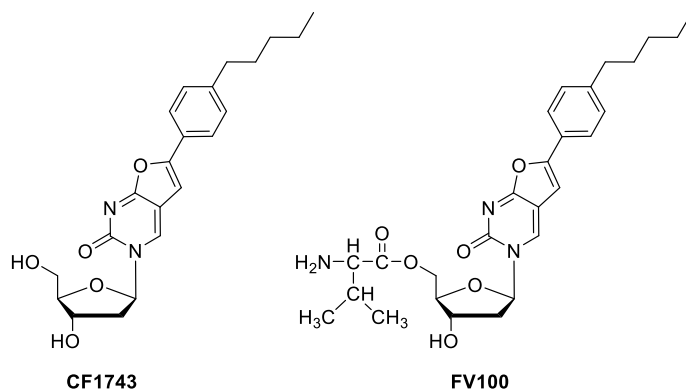


Figura 11. Estructuras del CF1743 y FV100.

Finalmente, los 2',3'-didesoxinucleósidos (ddN) tales como zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), abacavir (ABV) y emtricitabina (FTC) (Figura 12) se emplean en el tratamiento de la infección por el VIH. Estos nucleósidos, tras ser fosforilados por acción de las quinasas celulares, funcionan como sustratos alternativos incorporándose a la cadena de ADN actuando como terminadores de cadena al carecer del 3'-OH necesario para la elongación. La diana de los ddN es la transcriptasa inversa (TI) del VIH.⁶⁴

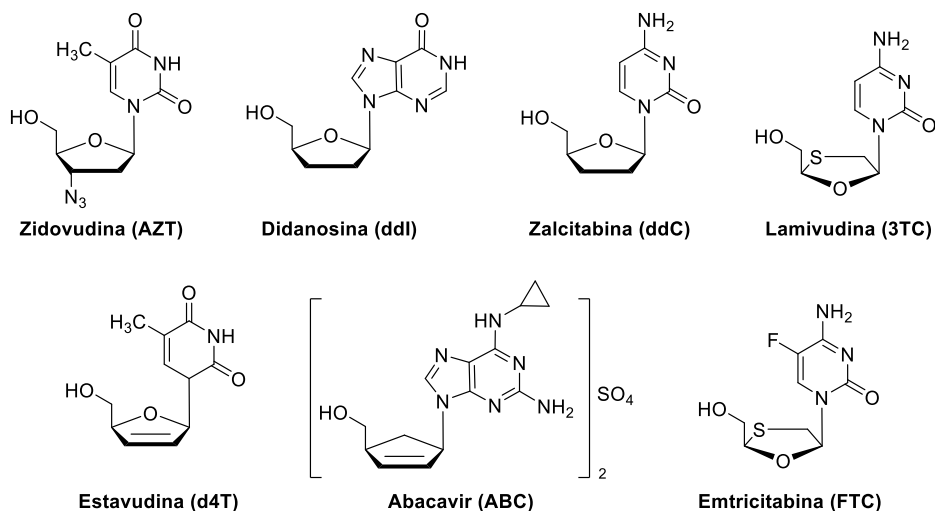


Figura 12. Estructuras de 2',3'-didesoxinucleósidos.

En cuanto a los análogos de nucleótidos, este tipo de compuestos se diseñaron para sobrepasar o evitar el primer paso de fosforilación por las quinasas (paso limitante en muchos compuestos en su activación a los trifosfatos). Los fosfonatos acíclicos como el cidofovir [(S)-HPMPC], el tenofovir [(R)-PMPA] y el adefovir (PMEA) son algunos ejemplos de este tipo de compuestos (Figura 13). Estos fármacos se han aprobado para el tratamiento de patologías relacionadas con la replicación del CMV, el VIH, o VHB y

VHS, respectivamente. Además se utilizan ocasionalmente en el tratamiento de otras infecciones virales producidas por otros virus como los herpes o por virus ADN ya que en general poseen propiedades antivirales de amplio espectro.^{63,64} Los fosfonatos acíclicos son fosforilados a los correspondientes difosfatos por acción de las quinasas celulares, y como tales inhiben la acción de las polimerasas.

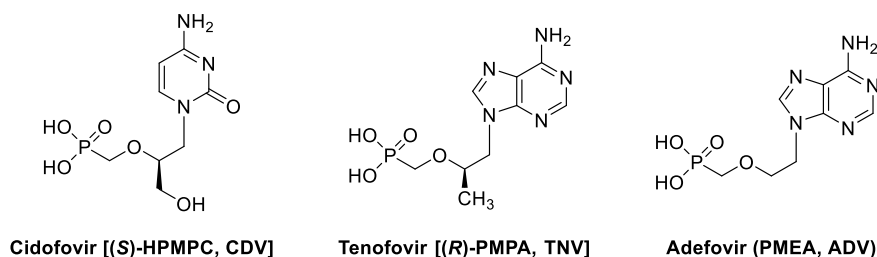


Figura 13. Estructuras de fosfonatos acíclicos: cidofovir, tenofovir y adefovir.

(b) Análogos de producto (análogos de pirofosfato). El pirofosfato (PPI) es un producto secundario de la reacción catalizada por las polimerasas (Figura 7). Por ello, se diseñaron y ensayaron análogos de pirofosfato como inhibidores de polimerasas virales.⁷² Uno de estos compuestos es el foscarnet (fosfonoformato trisódico, PFA, Figura 14). Este compuesto no necesita ser activado metabólicamente, y como tal actúa como inhibidor no competitivo de las ADN polimerasas del virus herpes simplex (VHS), del citomegalovirus (CMVH) y del virus de la hepatitis B (VHB). Asimismo, es un inhibidor de la ARN polimerasa del virus influenza y de la transcriptasa inversa (TI) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

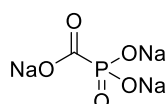


Figura 14. Estructura del Foscarnet (PFA).

(c) Inhibidores alostéricos (inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa). Este tipo de inhibidores de la actividad polimerasa de la TI del VIH se les denomina inhibidores no nucleosídicos de la TI del VIH (NNRTIs, siglas en inglés). Los NNRTIs cuyos representantes aprobados para uso clínico son el efavirenz (EFV), etravirina (ETR), nevirapina (NVP), delavirdina (DLV) y rilpivirina (RPV) (Figura 15).^{63,65,73,74} A diferencia de los inhibidores nucleosídicos, no necesitan ser activados por medio de la fosforilación. Todos ellos se unen a un bolsillo alostérico en la TI que se encuentra próximo pero que es distinto al centro catalítico, distorsionando dicho centro catalítico e impidiendo así la síntesis del ADN y por tanto la replicación viral.

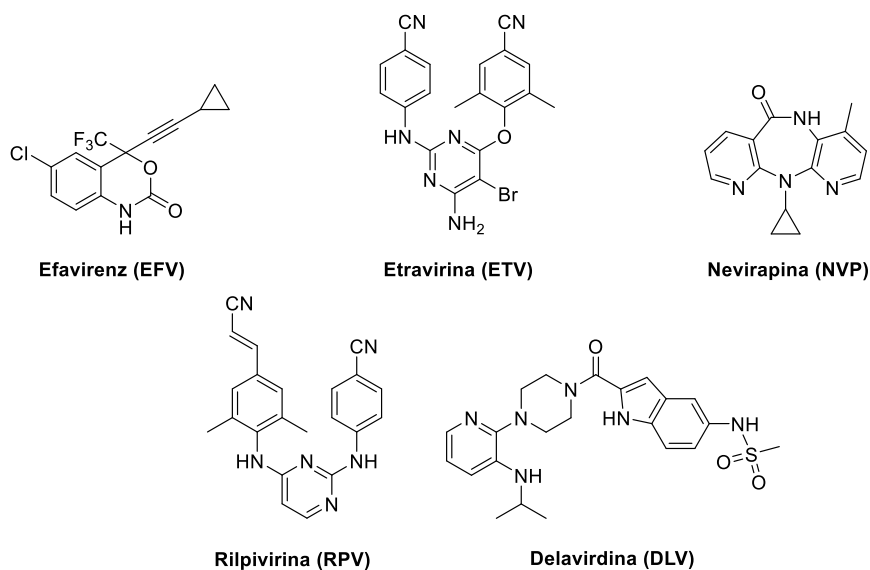


Figura 15. Estructuras de inhibidores alostéricos.

Dentro del grupo de los NNRTIs hay que destacar dos familias de nucleósidos, que aunque no se encuentran en fases clínicas, presentan una característica excepcional como es que a pesar de su naturaleza nucleosídica actúan como inhibidores no nucleosídicos de la TI del VIH uniéndose al bolsillo alostérico donde se unen el resto de NNRTIs y que no necesitan ser fosforilados para ejercer su acción antiviral. Estos compuestos son el HEPT^{73,75} y los derivados TSAO, descubiertos en nuestro grupo de trabajo, cuyo prototipo es el derivado de timina denominado TSAO-T^{76,77} (Figura 16). Ambos son inhibidores potentes y selectivos de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana. Además, los derivados TSAO son inhibidores del proceso de dimerización de la enzima.⁷⁸⁻⁸⁰

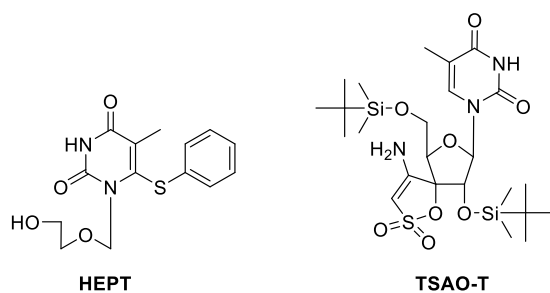


Figura 16. Estructuras de inhibidores alostéricos HEPT y TSAO-T.

I.2. ESTRUCTURA DE LA TESIS Y OBJETIVOS GENERALES

El trabajo que se describe en la presente Memoria supone el inicio de una nueva línea de investigación en nuestro grupo de trabajo, encaminada a la búsqueda de nuevos inhibidores de polimerasas virales que puedan resultar útiles en el tratamiento de enfermedades virales emergentes y/o re-emergentes causadas tanto por virus ARN como virus ADN.

En base a los mecanismos de replicación viral y sobre todo al conocimiento de la estructura, función y exclusividad y/o diferencia de las polimerasas virales con respecto a las polimerasas celulares se pueden diseñar inhibidores potentes y selectivos de la replicación viral. Además, el dirigir los esfuerzos hacia las polimerasas virales (muchas de ellas con secuencias y funciones similares entre distintos tipos de virus) puede dar lugar a compuestos que actúen frente a más de una familia de virus, dando lugar a antivirales de amplio espectro.

Como ya se ha mencionado en la introducción, las polimerasas catalizan la síntesis de los ácidos nucleicos, por ello, en la presente Tesis Doctoral dirigimos nuestros esfuerzos al diseño de nuevos nucleósidos como potenciales agentes antivirales cuyas dianas terapéuticas sean las polimerasas virales, haciendo especial hincapié en el diseño de nucleósidos no convencionales de estructura desconocida en la literatura hasta el momento de iniciar la tesis. Finalmente, cabe mencionar que los derivados de nucleósidos constituyen una de las bases de la quimioterapia antiviral y anticancerosa, por tanto, es en estas áreas terapéuticas donde podríamos enmarcar a la presente Tesis Doctoral.

El trabajo realizado, cuyo hilo conductor han sido las polimerasas virales, se ha recopilado en tres capítulos que hemos estructurado de modo que cada capítulo tenga su propia introducción, objetivos, discusión de resultados y sus conclusiones junto a la bibliografía empleada, así como la correspondiente parte experimental. Tras los tres capítulos se describen unas conclusiones generales.

En el **Capítulo 1** se describe el diseño, síntesis y evaluación biológica, como potenciales inhibidores de polimerasas virales y, por tanto, de la replicación de distintos virus, de una nueva clase de nucleósidos “no convencionales” (metiloxinucleósidos de estructura desconocida) que combinan en su estructura bases no naturales (diaminopirimidinas, diaminopurinas o diamino-1,3,5-triazinas) con azúcares “no convencionales” (un anillo intacto de tetrahidrofurano distinto de ribosa y de desoxirribosa) unidos al C-6 de la nucleobase mediante un enlace tipo éter. Este tipo de unión podría dotar a los compuestos de una mayor estabilidad metabólica respecto a los nucleósidos clásicos o convencionales. Los derivados de D-alitol y D-altritol se

diseñaron como miméticos de ribonucleósidos mientras que los análogos de tetrahidrofurano pueden considerarse como sus didesoxianálogos y miméticos de los 2',3'-didesoxinucleósidos. Todos los compuestos se ensayaron frente a un amplio panel de virus ADN y ARN. De dicha evaluación han surgido posibles “hits” frente a la replicación de diversos virus. Asimismo, se han llevado a cabo estudios frente a distintas líneas de células tumorales de los que han surgido algunos compuestos con buena actividad antitumoral.

En el **Capítulo 2** se describe el diseño y síntesis de una familia de fosfonatos de nucleósidos acíclicos de 2,4-diamino-1,3,5-triazinas (PMEO-DAT) diseñados como aza-análogos de PMEODAPym en los que se ha sustituido el anillo de 2,4-diaminopirimidina por el de triazina, y en los que la cadena acíclica se halla unida a la base a través del oxígeno (en lugar del nitrógeno como en un nucleósido convencional). Su evaluación frente a distintos virus ha dado como resultado la obtención de compuestos activos frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana, del virus de la hepatitis B y del virus herpes y además son más selectivos que PMEODAPym. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de modelado molecular comparativos de PMEODAT y PMEODAPym en relación con los sitios activos de las ADN polimerasas virales.

La evaluación biológica de los compuestos sintetizados en estos dos capítulos frente a la replicación de virus ARN, virus ADN y frente a distintas líneas celulares tumorales ha sido realizada por el equipo del Prof. Jan Balzarini en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). Los ensayos frente a la replicación del virus de la hepatitis B han sido realizados por el equipo del Dr. Brent Korba en el Georgetown University Medical Center de la Universidad de Georgetown en Washington (USA).

Los estudios de modelado molecular fueron realizados por el equipo del Prof. Federico Gago en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Alcalá.

Finalmente, en el **Capítulo 3** se pretende esclarecer el posible mecanismo de inhibición de la 5-Fluorouridina (un potente inhibidor de la replicación del virus de la fiebre aftosa) sobre el proceso de uridilación de la VPg y, por tanto, en la replicación del virus. En este capítulo se diseñan y sintetizan nucleopéptidos como modelos simplificados de VPg tanto uridilados (VPgpU) como fluorouridilados (VPgpFU) portadores de una cadena de 15 aminoácidos. Asimismo, se lleva a cabo un estudio de sus estructuras en complejo con la polimerasa viral, mediante técnicas cristalográficas de difracción de R-X.

Los estudios de difracción de R-X han sido realizados por el equipo de la Prof. Nuria Verdaguer del Instituto de Biología Molecular del CSIC (IBMB-CSIC) en Barcelona.

I.3. BIBLIOGRAFÍA

1. Horsfall, F. L. J. General principles and historical aspects. In *Viral and rickettsial infections of man*; Horsfall, F. L. J., Tamm, I., Eds.; Philadelphia, PA, **1965**.
2. Mahy, B. W. J. Human viral infections: an expanding frontier. *Antiviral Res.* **1997**, *36*, 75–80.
3. Woolhouse, M.; Scott, F.; Hudson, Z.; Howey, R.; Chase-Topping, M. Human viruses: discovery and emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 2864–2871.
4. Estructura y clasificación de los virus. <http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/estructurayclasificacion.htm>.
5. De Clercq, E.; Li, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 695–747.
6. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.; Rey, F.; Nugeyre, M.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **1983**, *220*, 868–871.
7. Gallo, R. C.; Montagnier, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2283–2285.
8. UNAIDS (2016) Fact sheet. <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>.
9. Taubenberger, J. K.; Morens, D. M. Pandemic influenza-including a risk assessment of H5N1. *Rev Sci Tech.* **2009**, *28*, 187–202.
10. Potter, C. W. A history of influenza. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 572–579.
11. Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/>.
12. Blumberg, B. S. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 7121–7125.
13. White, M. K.; Pagano, J. S.; Khalili, K. Viruses and human cancers: A long road of discovery of molecular paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 463–481.
14. Shepard, C. W.; Finelli, L.; Alter, M. J.; Palitzsch, K.; Hottentrager, B.; Schlottmann, K.; Al., E.; Zou, S.; Tepper, M.; Saadany, S. El; et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet. Infect. Dis.* **2005**, *5*, 558–567.
15. Manns, M. P.; Wedemeyer, H.; Cornberg, M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* **2006**, *55*, 1350–1359.
16. Pfaender, S.; Brown, R. J.; Pietschmann, T.; Steinmann, E. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, e21.
17. Whitley, R. J.; Kimberlin, D. W.; Roizman, B. Herpes simplex viruses. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 541–555.

18. Kimberlin, D. W. Neonatal herpes simplex infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 1–13.
19. Kimberlin, D. W.; Rouse, D. J. Clinical practice. Genital Herpes. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1970–1977.
20. Arvin, A. Varicella-Zoster Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 361–381.
21. Ku, C. C.; Besser, J.; Abendroth, A.; Grose, C.; Arvin, A. M. Varicella-zoster virus pathogenesis and immunobiology: new concepts emerging from investigations with the SCIDhu mouse model. *J Virol.* **2005**, *79*, 2651–2658.
22. Zerboni, L.; Sen, N.; Oliver, S. L.; Arvin, A. M. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Micro.* **2014**, *12*, 197–210.
23. Kimberlin, D. W.; Whitley, R. J. Varicella-zoster vaccine for the prevention of herpes zoster. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 1338–1343.
24. Tseng, H. F.; Smith, N.; Harpaz, R.; Bialek, S. R.; Sy, L. S.; Jacobsen, S. J. Herpes zoster vaccine in older adults and the risk of subsequent herpes zoster disease. *J. Am. Med. Assoc.* **2011**, *305*, 160–166.
25. Ho, M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* **2008**, *197*, 65–73.
26. Landolfo, S.; Gariglio, M.; Gribaudo, G.; Lembo, D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *98*, 269–297.
27. Stoelben, S.; Arns, W.; Renders, L.; Hummel, J.; Mühlfeld, A.; Stangl, M.; Fischereder, M.; Gwinner, W.; Suwelack, B.; Witzke, O.; et al. Preemptive treatment of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: Results of a phase 2a study. *Transpl. Int.* **2014**, *27*, 77–86.
28. Razonable, R. R.; Hayden, R. T. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 703–727.
29. Marston, H. D.; Folkers, G. K.; Morens, D. M.; Fauci, A. S. Emerging viral diseases: confronting threats with new technologies. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 253, 1–7.
30. Morens, D. M.; Fauci, A. S. Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, 7–9.
31. *Committee on microbial threats to health, institute of medicine, emerging infections: microbial threats to health in the United States*; National Academies Press: Washington, D.C., **1992**.
32. Busquets-Martí, N. Globalización y enfermedades virales emergentes. *Cresapienss.* **2011**, *1*, 5–9.

33. Rutledge, T.; Penciner, R.; Popovich, K. SARS assessment clinic: A rapid response to an infectious outbreak. *Can. J. Emerg. Med.* **2005**, *7*, 162–167.
34. Fauci, A. S.; Morens, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 454–461.
35. Dixon, M. G.; Schafer, I. J. Ebola viral disease outbreak-west africa (2014). <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6325a4.htm>.
36. Hendra Virus (HeV) Infection. <http://www.who.int/csr/disease/hendra/en/>.
37. Boheemen, S. Van; Graaf, M. De; Lauber, C.; Bestebroer, T. M.; Raj, V. S.; Zaki, M.; Zaki, A. M.; Osterhaus, A.; Haagmans, B. L.; Gorbalenya, A.; et al. Genomic characterization of newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio.* **2012**, *3*, e00473-12.
38. Dengue fever. <http://www.floridahealth.gov/%5C/diseases-and-conditions/dengue/index.html>.
39. Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 446–454.
40. De Clercq, E. Curious (old and new) antiviral nucleoside analogues with intriguing therapeutic potential. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3866–3880.
41. Choi, K. H. Viral polymerases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *726*, 267–304.
42. Goodman, M. F.; Tippin, B. The expanding polymerase universe. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 101–109.
43. Carter, J.; Saunders, V. *Virology: principles and applications*; John Wiley & Sons Limited, **2007**.
44. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M.; Losick, R. *Molecular biology of the gene (6th ed.)*; Pearson/Benjamin Cummings: San Francisco, **2008**.
45. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241.
46. Filée, J.; Forterre, P.; Sen-Lin, T.; Laurent, J. Evolution of DNA polymerase families: Evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J. Mol. Evol.* **2002**, *54*, 763–773.
47. Lujan, S. A.; Williams, J. S.; Kunkel, T. A. DNA polymerases divide the labor of genome replication. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 640–654.
48. Kornberg, A.; Baker, T. A. *DNA Replication*; W. H. Freeman: New York, **1992**.
49. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953, 737–738.
50. Higgs, P. G.; Lehman, N. The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *16*, 7–17.

51. te Velthuis, A. J. W. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cell. Mol. life Sci.* **2014**, *71*, 4403–4420.
52. Hübscher, U.; Spadari, S.; Villani, G.; Maga, G. *DNA polymerases: discovery, characterization and functions in cellular DNA transactions*; World Scientific Publishing Company, Ed.; **2010**.
53. Ollis, D. L.; Brick, P.; Hamlin, R.; Xuong, N. G.; Steitz, T. A. Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature.* **1985**, *313*, 762–766.
54. Hansen, J. L.; Long, A. M.; Schultz, S. C. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure.* **1997**, *5*, 1109–1122.
55. Gohara, D. W.; Crotty, S.; Arnold, J. J.; Yoder, J. D.; Andino, R.; Cameron, C. E. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)): Structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25523–25532.
56. Steitz, T. A. A mechanism for all polymerases. *Nature.* **1998**, *391*, 231–232.
57. Furfine, E. S.; Reardon, J. E. Reverse transcriptase. RNase H from the human immunodeficiency virus: Relationship of the DNA polymerase and RNA hydrolysis activities. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 406–412.
58. van Dijk, A. A.; Makeyev, E. V.; Bamford, D. H. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 1077–1093.
59. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Perez-Luque, R.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Verdaguer, N. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47212–47221.
60. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Agudo, R.; Pérez-Luque, R.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Verdaguer, N. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* **2006**, *25*, 880–888.
61. Ackermann, M.; Padmanabhan, R. De Novo synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30242–30250.
62. Rodriguez-Wells, V.; Plotch, S. J.; DeStefano, J. J. Primer-dependent synthesis by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2715–2724.
63. De Clercq, E. Milestones in the discovery of antiviral agents: nucleosides and nucleotides. *Acta Pharm. Sin. B.* **2012**, *2*, 535–548.
64. Razonable, R. R. Antiviral drugs for viruses other than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, 1009–1026.

65. Öberg, B. Rational design of polymerase inhibitors as antiviral drugs. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 90–95.
66. Clercq, E. De. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *32*, 121–132.
67. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5716–5720.
68. De Clercq, E. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2301–2315.
69. McGuigan, C.; Yarnold, C. J.; Jones, G.; Vela, S.; Barucki, H.; Brancale, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Clercq, E. De; Balzarini, J. Potent and selective inhibition of Varicella-Zoster Virus (VZV) by nucleoside analogues with an unusual bicyclic base. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479–4484.
70. McGuigan, C.; Barucki, H.; Blewett, S.; Carangio, A.; Erichsen, J. T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Highly potent and selective inhibition of varicella-zoster virus by bicyclic furopyrimidine nucleosides bearing an aryl side chain. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4993–4997.
71. McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Migliore, M.; Adak, R.; Luoni, G.; Jones, A. T.; Díez-Torrubia, A.; Camarasa, M.-J.; Velázquez, S.; Henson, G.; et al. Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1316–1330.
72. Öberg, B. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, Foscarnet sodium). *Pharmac. Ther.* **1989**, *40*, 213–285.
73. Miyasaka, T.; Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6 (phenylthio)thymine. *J. Med. Chem.* **1989**, *4*, 2507–2509.
74. Romero, D. L.; Busso, M.; Tan, C. K.; Reusser, F.; Palmer, J. R.; Poppe, S. M.; Aristoff, P. A.; Downey, K. M.; So, A. G.; Resnick, L. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 8806–8810.
75. Baba, M.; Tanaka, H.; Clercq, E. De; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Schols, D.; Nakashima, H.; Perno, C. F.; Walker, R. T.; Miyasaka, T. Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 1375–1381.

76. Camarasa, M. J.; Pérez Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. 3'-Spiro nucleosides, a new class of specific human immunodeficiency virus type 1 inhibitors: Synthesis and antiviral activity of [2',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-β-D-xylo-and-ribofuranose]-3'-spiro-5''-[4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-Dioxide] (TSAO). *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2721–2727.
77. Camarasa, M. J.; San-Felix, A.; Velázquez, S.; Pérez Pérez, M. J.; Gago, F.; Balzarini, J. TSAO compounds: The comprehensive story of a unique family of HIV-1 specific inhibitors of reverse transcriptase. In *Current Topics in Medicinal Chemistry*; **2004**; Vol. 4, 945–963.
78. Sluis-Cremer, N.; Dmitrienko, G. I.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Parniak, M. A. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimer destabilization by 1-[Spiro[4''-amino-2'',2'' -dioxo-1'',2'' -oxathiole-5'',3'-[2', 5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]]]-3-ethylthymine. *Biochemistry*. **2000**, *39*, 1427–1433.
79. Sluis-cremer, N.; Hamamouch, N.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Structure-activity relationships of [2',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]- 3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834–4841.
80. Camarasa, M. J.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Bonache, M. C.; De Castro, S. TSAO derivatives, inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization: recent progress. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 1895–1907.

Capítulo 1.

Metiloxinucleósidos: una familia de nucleósidos no convencionales

En este primer capítulo nos centramos en el diseño, síntesis y evaluación biológica de nucleósidos “no convencionales” como potenciales inhibidores de polimerasas virales y por tanto de la replicación viral. Dada la novedad de las estructuras propuestas, estos compuestos podrían resultar más activos, más estables, menos tóxicos y/o con mejores propiedades farmacológicas que los nucleósidos convencionales.

1. INTRODUCCIÓN

Los nucleósidos son compuestos endógenos que constituyen los “eslabones” de los ácidos nucleicos y juegan un papel esencial en muchos procesos biológicos tales como la síntesis del ADN y del ARN, los procesos de señalización celular, de expresión génica, del metabolismo y en la inmunomodulación, entre otros.

Los nucleósidos naturales están constituidos por una nucleobase de naturaleza púrica (adenina, guanina) o pirimidínica (timina o uracilo) y una furanosa (β -D-ribofuranosa o β -D-2-desoxirribofuranosa) (Figura 1.1) unidas covalentemente entre la posición anomérica del azúcar y el N-1 en las pirimidinas o el N-9 de las purinas. A este enlace se le denomina enlace glicosídico.¹⁻⁴

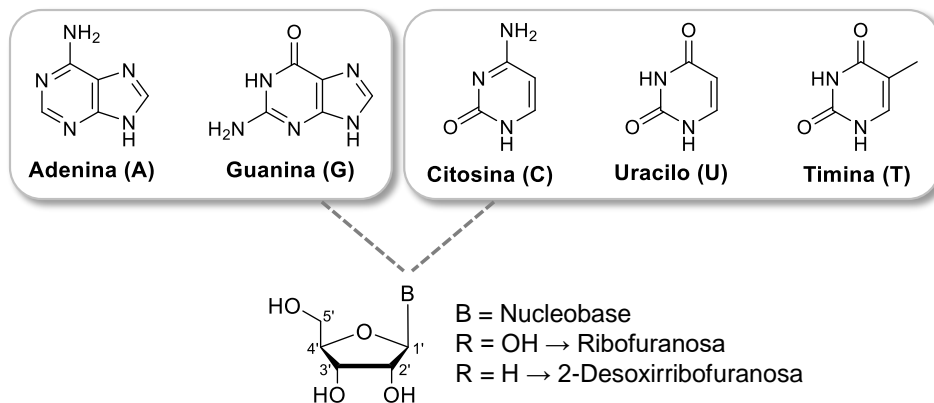


Figura 1.1. Estructura de un nucleósido.

Los análogos de nucleósidos y nucleótidos son compuestos sintéticos químicamente modificados diseñados para mimetizar a los análogos naturales. Estos compuestos son importantes agentes terapéuticos con actividades antiviral, antitumoral, antibacteriana o antifúngica, etc.⁵⁻¹² Por ello, no resulta sorprendente que los nucleósidos sean unos compuestos clave en el desarrollo de fármacos ampliamente utilizados en clínica durante más de 40 años para el tratamiento de pacientes con cáncer

o enfermedades relacionadas con infecciones virales.^{1,2,11-14} Como ya se ha mencionado en la introducción general, la mayoría de los fármacos antivirales aprobados son nucleós(t)idos modificados, sin embargo, éstos presentan diversos efectos indeseados como son el desarrollo de resistencias, toxicidad variable, espectro de acción antiviral reducido, o una baja disponibilidad oral.⁷⁻¹⁴ Por ello, es necesario buscar nuevos nucleós(t)idos más seguros, selectivos y/o con mayor espectro de acción antiviral o antitumoral.

La forma activa del fármaco es, a veces, el propio nucleósido pero en la mayoría de los casos es el nucleósido-5'-trifosfato (NTP). En cualquier caso, el nucleósido sin fosforilar es el único que puede cruzar la membrana celular, penetrando así al interior de la célula, que es donde los agentes antivirales ejercen normalmente su actividad. Una vez en el interior de la célula el nucleósido puede fosforilarse, por acción de las quinasas, hasta el nucleósido trifosfato (NTP) y en este estado ya no puede salir fácilmente de la célula. Los NTPs pueden interactuar con las polimerasas virales, ejerciendo así su acción antiviral y/o con las polimerasas celulares lo que les conferirá citotoxicidad o actividad antitumoral (Figura 1.2).

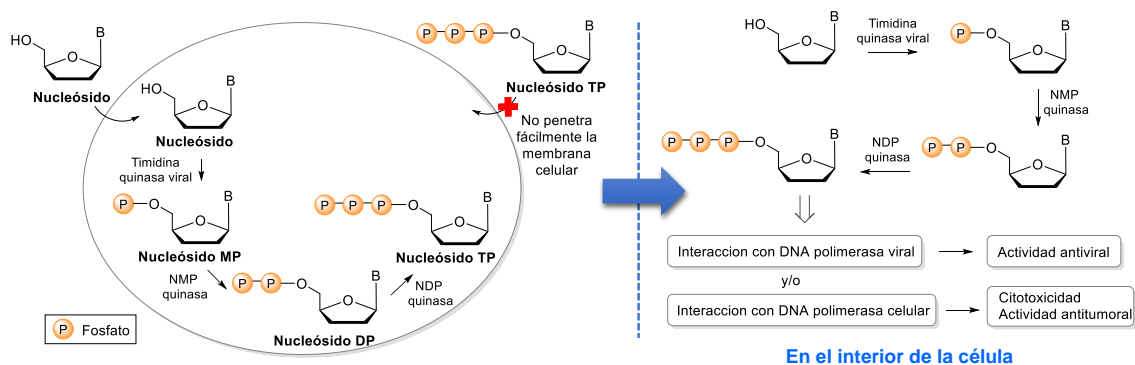


Figura 1.2. Activación de los nucleósidos en el interior de la célula y su interacción con las polimerasas para ejercer su actividad biológica.

Los requisitos estructurales para interactuar con las quinasas y las polimerasas tienen importantes implicaciones en el diseño de nuevos nucleósidos antivirales o antitumorales.¹⁵ Así por ejemplo, algunos virus, como los virus herpes, codifican sus propias enzimas para fosforilar nucleósidos (quinasas de nucleósidos). De esta forma, estas enzimas se convierten en una diana terapéutica muy interesante. Los nucleósidos antiherpéticos son fosforilados más eficazmente por las quinasas virales que por las homólogas celulares, activándose mejor en las células infectadas y, por tanto, presentan una alta selectividad frente a estos virus¹⁵ como ocurre con el antiviral aciclovir (ACV). Sin embargo, otros virus, como el VIH y el VHB, no codifican sus propias

quinasas por lo que deben ser activados por las quinasas celulares y la selectividad de los nucleós(t)idos que inhiben la replicación de estos virus dependerá de la diferente especificidad de sustrato que presenten las polimerasas virales por los NTPs respecto a las celulares.¹⁵

1.1. Análogos de nucleósidos modificados

Dadas las diversas aplicaciones terapéuticas de los análogos de nucleósidos, no es de extrañar que los fragmentos estructurales de los que se componen los nucleósidos naturales hayan sido objeto de numerosas modificaciones sintéticas¹⁶ en la búsqueda de compuestos farmacológicamente activos pero que difieran notablemente de los que constituyen el ADN y/o ARN celular con el fin de evitar la degradación enzimática, reducir los problemas de resistencias cruzadas, y disponer de compuestos más selectivos y menos tóxicos.¹⁷ Desde el punto de vista estructural la mayoría de las modificaciones afectan tanto a la nucleobase como al resto de azúcar. En la mayoría de los casos, se persigue que el análogo de nucleósido mimetice el comportamiento del nucleósido natural al interaccionar con las enzimas implicadas en el metabolismo de nucleósidos (quinasas, polimerasas, fosforilasas, desaminasas, etc). Así, una vez el análogo de nucleósido se une al centro activo se puede comportar de distintas maneras:

- (1) Como un sustrato alternativo de la enzima en cuestión, experimentando una transformación similar a la del nucleósido natural, por ejemplo la fosforilación de la posición 5' y su posterior incorporación a la hebra de ADN o ARN en crecimiento.
- (2) Como inhibidor competitivo con respecto al sustrato natural, de modo que se une al centro activo sin ser transformado por la enzima, pero dificultando por competición la unión del sustrato natural.
- (3) Como un inhibidor alostérico, en el que el análogo de nucleósido se une a un sitio distinto y muchas veces distante del centro activo, distorsionando este último e impidiendo que la enzima transforme el sustrato natural.¹⁸

Cuando el nucleós(t)ido actúa sobre la cadena de ADN/ARN en crecimiento las modificaciones sobre la nucleobase determinan la eficacia de la interacción entre las bases, mientras que las modificaciones en el azúcar determinan la capacidad de propagación de la cadena de ácido nucleico mediante la formación de enlaces fosfodiéster. En general, estas modificaciones mantienen la disposición espacial relativa entre la nucleobase y el grupo hidroxilo de la posición 5' susceptible de ser fosforilado al correspondiente nucleósido trifosfato (forma biológicamente activa). Además muchas de las modificaciones están dirigidas a aumentar la resistencia de los nucleósidos frente a la degradación enzimática.

La eficacia de los análogos de nucleósidos depende de su conversión a la forma trifosfato activa mediante la acción de las quinasas virales o celulares. El nucleósido trifosfato (NTP) tiene que ser aceptado por las polimerasas para después incorporarse a la cadena de nucleótidos en crecimiento de dos formas diferentes:

- (1) Si el análogo está modificado en el azúcar, por ejemplo, careciendo del grupo 2'-hidroxilo, del 3'-hidroxilo o de ambos, se impide la formación del enlace fosfodiéster en la cadena de ADN en crecimiento y por lo tanto este tipo de nucleós(t)idos actúan como terminadores de cadena.
- (2) Si la estructura del análogo de nucleós(t)ido permite completar la biosíntesis del ácido nucleico, éste dará lugar a la formación de proteínas defectuosas o enzimas no funcionales con la consecuente inhibición de la replicación viral.¹⁹

1.1.1. Nucleósidos modificados en la base

Las modificaciones más fructíferas de la base suponen la sustitución de una base natural (uracilo, citosina, adenina, etc) por otra base estructuralmente relacionada. Algunos ejemplos de este tipo de modificaciones son los carbamoilazoles tales como la ribavirina (**1**)²⁰⁻²³ que contiene un anillo de 1,2,4-triazolcarboxamida como mimético de adenina o guanina. La ribavirina es un antiviral de amplio espectro frente a virus influenza A y B, el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis B, etc; los deazaderivados de purinas tales como 3-dezaadenosina (**2**) (un inhibidor de la replicación viral de virus tales como influenza, virus sindbis, virus de la estomatitis vesicular) o el antibiótico tubercidina (**3**) (7-dezaadenosina)²⁴ y los derivados de pirimidinas 5'-sustituidas tales como la 5-yodo-2'-desoxiuridina (idoxuridina, IDU, **4**) o la 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina (TFT, **5**) que se emplean en el tratamiento de la queratitis herpética en uso tópico y el BVDU (brivudina, **6**)²⁵⁻²⁷ que es un análogo de nucleósido que incorpora 5-bromoviniluracilo como nucleobase e inhibe la replicación del virus herpes simplex tipo 1 y el virus varicela zóster inhibiendo la ADN polimerasa viral (Figura 1.3).

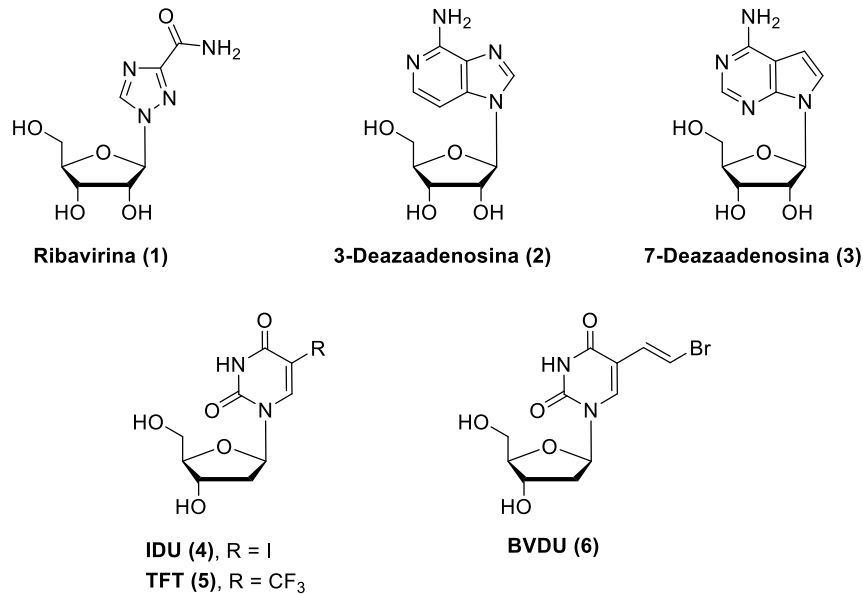


Figura 1.3. Ejemplos de análogos de nucleósidos modificados en la base.

Otra modificación que ha conducido a buenos resultados ha sido la unión de la nucleobase al azúcar mediante un enlace C-C en lugar del enlace C-N presente en los nucleósidos naturales, los compuestos que incorporan este tipo de modificación en su estructura se denominan **C-nucleósidos**. Esta modificación provoca cambios significativos en la geometría de la molécula, especialmente en la disposición espacial entre el grupo 5'-OH y la base lo que puede influir en las propiedades biológicas de las moléculas.²⁸ Además, el enlace C-C es más resistente a la degradación química o enzimática que el enlace C-N lo que hace que los C-nucleósidos sean metabólicamente más estables que sus análogos naturales.^{28,29} En la Figura 1.4 se muestran algunos ejemplos de este tipo de compuestos. Algunos de estos análogos como la pseudouridina (7) y la showdomicina (8) son de origen natural, o bien poseen importantes propiedades biológicas: antibióticas como las formicinas A y B (9 y 10), antitumorales como la oxazofurina (11), tiazofurina (12), selenazofurina (13) imidazofurina (14), y pirazofurina (15) que además es un antiviral de amplio espectro, 9-deazaadenosina (16) y o inhibidores enzimáticos como las inmucilinas A y H (17 y 18) que inhiben la purina nucleósido fosforilasa y que además son portadoras de un azúcar modificado (Figura 1.4).

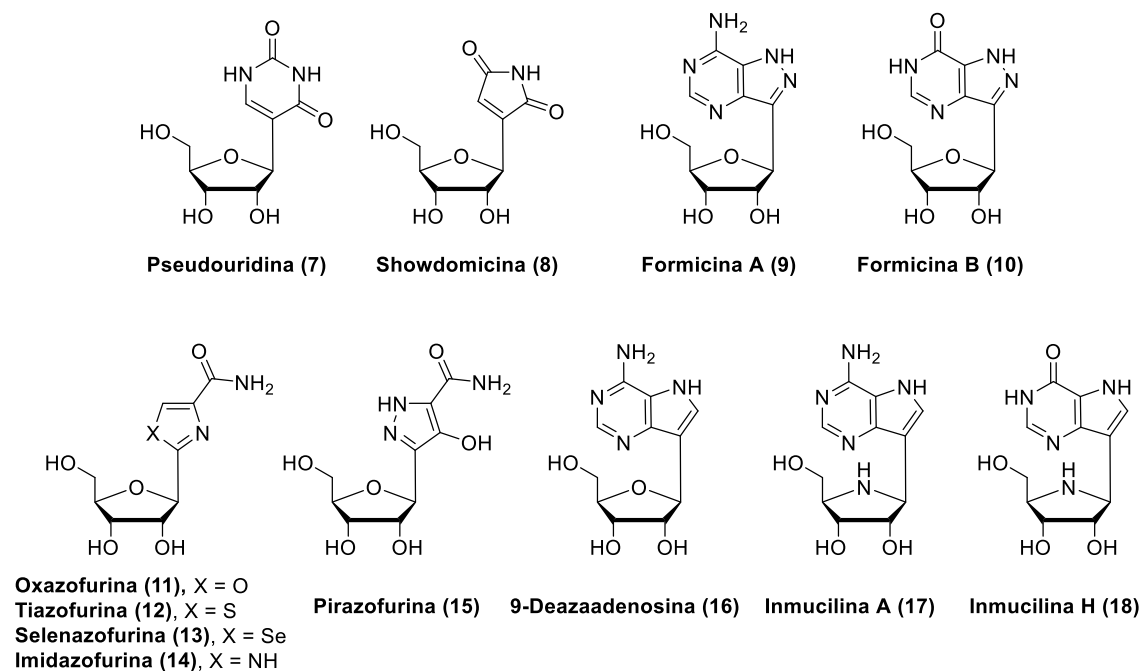


Figura 1.4. Ejemplos de C-nucleósidos biológicamente relevantes.

1.1.2. Nucleósidos modificados en el azúcar

Una de las modificaciones en el azúcar más utilizadas implica la sustitución de los azúcares naturales, ribosa o desoxirribosa, por restos de arabinosa dando lugar a los que se conocen como **arabinonucleósidos** como por ejemplo, la arabinofuranosil adenina (Ara-A, **19**) o citosina (Ara-C, **20**), dos nucleósidos con una potente actividad antitumoral (Figura 1.5). Otra modificación consiste en la introducción de sustituyentes sobre la furanosa²⁸ (Figura 1.5) como por ejemplo, en el antitumoral gemcitabina (**21**) en el que la presencia de átomos de F le confiere propiedades farmacológicas favorables, el L-nucleósido L-FMAU (**22**) un potente inhibidor de la replicación del virus de la hepatitis B, la zidovudina (AZT, **23**) uno de los fármacos aprobados para uso clínico en el tratamiento del SIDA, etc.

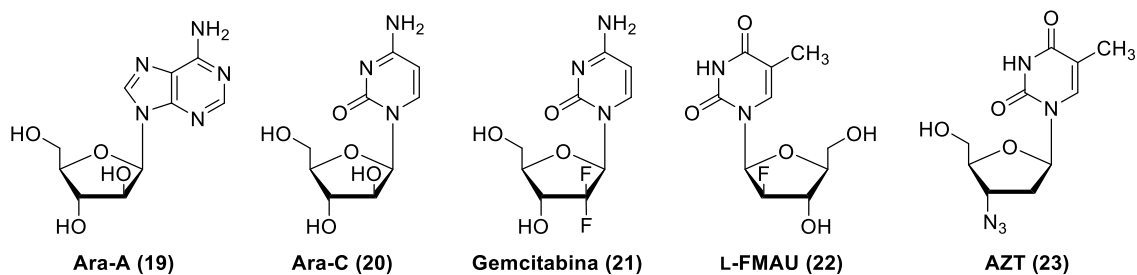


Figura 1.5. Ejemplos de nucleósidos modificados en el azúcar.

Otra modificación importante es la sustitución del átomo de oxígeno de la furanosa por diferentes heteroátomos (S, N, etc). Así, la sustitución isostérica del O de la furanosa por un S ha dado lugar a la importante familia de los **4'-tionucleósidos** muchos de los cuales muestran una potente actividad antiherpética como por ejemplo la 2'-desoxi-4-etil-tiouridina (**24**) activa frente a herpes simplex tipos 1 y 2 y frente a virus varicela zóster.³⁰ Por otro lado, la 4-tiotimidina y la 4-tiocitidina (**25** y **26**) (Figura 1.6) son compuestos citotóxicos potentes. La presencia del átomo de S en este tipo de nucleósidos estabiliza el enlace N-glicosídico con respecto a la fosforolisis por acción de las fosforilasas,³¹ es decir, estos nucleósidos son más estables que los 4'-oxinucleósidos. También se han descrito nucleósidos que combinan en su estructura más de una modificación que presentan diversas actividades biológicas, como por ejemplo las inmucilinas A y H (**17** y **18**) (Figura 1.6), C-nucleósidos con el azúcar modificado mencionadas anteriormente o los 4'-tioarabinonucleósidos como los derivados de guanina (**27**) o de 2,6-diaminopurina (**28**) con actividad frente a distintos virus herpes, en especial frente al citomegalovirus humano,³² o los derivados de pirimidinas 5-sustituidos como 5-metil (**29**), -etil (**30**), -yodo (**31**) y -Br (**32**) derivados que muestran buena actividad frente a la replicación del virus herpes simplex tipo 1 (Figura 1.6), o el antibiótico 4'-tioangustmicina C (**33**).^{33,34}

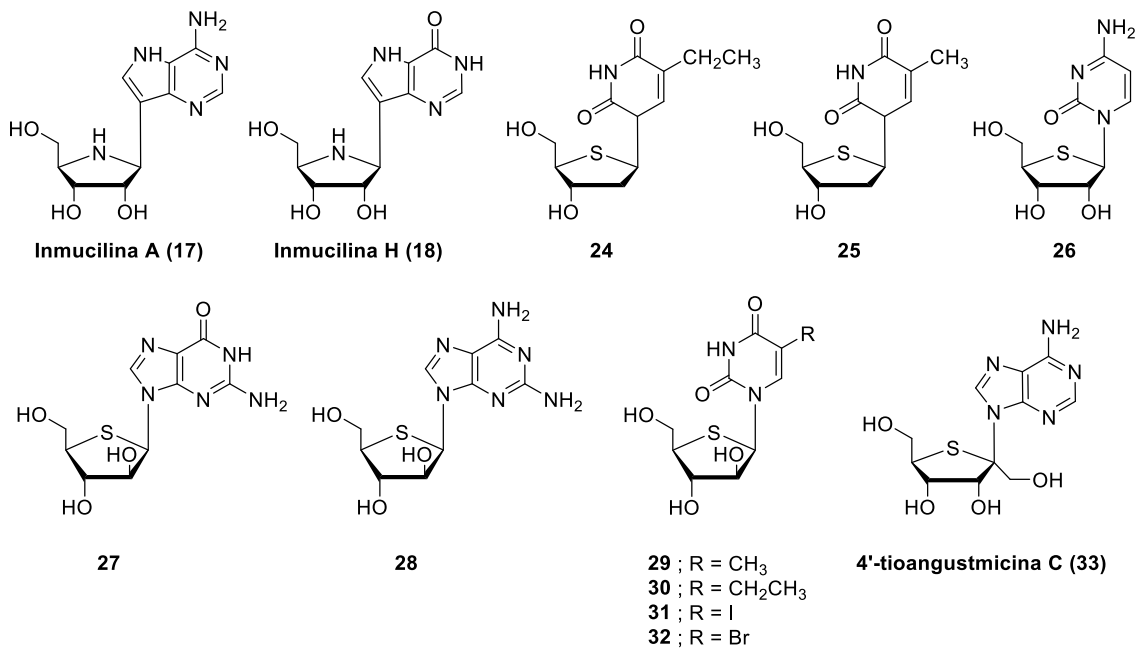


Figura 1.6. Ejemplos de tionucleósidos y nucleósidos doblemente modificados.

La sustitución del átomo de oxígeno de la furanosa por un metileno ha dado lugar a otro grupo importante de nucleósidos, los denominados **nucleósidos carbocíclicos**. Este tipo de sustitución proporciona a estos análogos una alta estabilidad química y metabólica, impidiendo su degradación enzimática por acción de las fosforilasas e hidrolasas que rompen el enlace glicosídico en los nucleósidos naturales. En la Figura 1.7 se ilustran algunos ejemplos de este tipo de nucleósidos. Así, la aristeromicina (**34**) es un carbonucleósido con propiedades antibióticas.^{33,34} La neplanocina A (**35**) es un antibiótico antitumoral,³⁵ el BVDU carbocíclico (**36**), el BMS-200475 (**37**) un potente agente frente a la replicación del virus de la hepatitis B³⁶ o el carbovir (**38**) y abacavir (**39**) aprobados para el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana^{37,38} o la 2'-carbaganosina (**40**) que es compuesto muy potente y selectivo frente a la replicación del virus de la hepatitis B.³⁹

Dada su similitud estructural con los nucleósidos naturales, estos análogos son sustratos de las enzimas que los fosforilan hasta los correspondientes TPs y como tales se integran en las cadenas de ADN y ARN en crecimiento, ejerciendo así su acción antiviral o antitumoral.

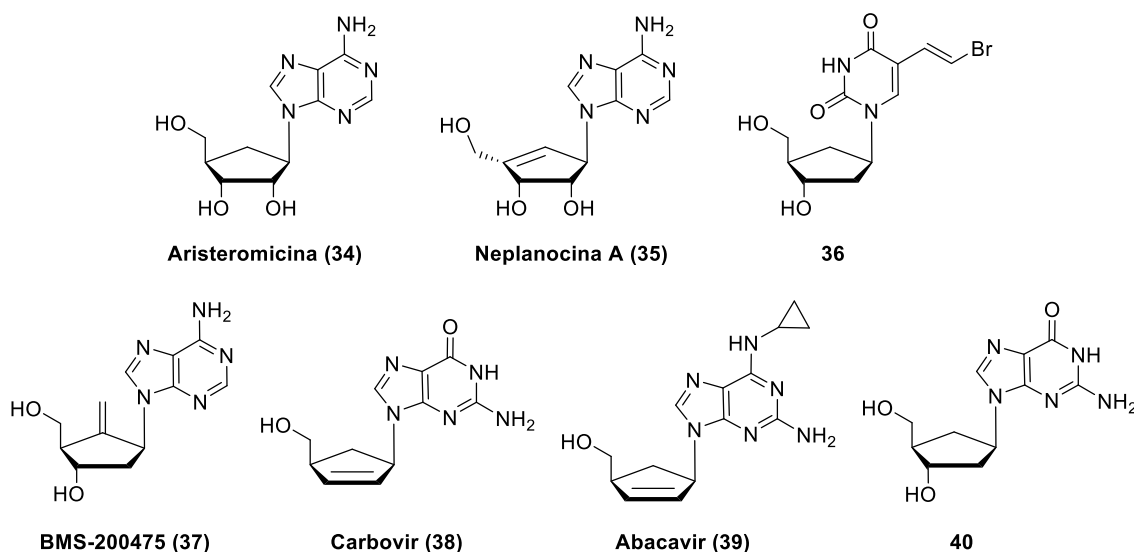


Figura 1.7. Ejemplos de nucleósidos carbocíclicos.

Otro tipo de análogos de nucleósidos son aquellos en los que el anillo de furanosa se reemplaza por un anillo de cicloalcano que aporta la rigidez necesaria con el fin de orientar los sustituyentes (la nucleobase y el 5'-OH) para el reconocimiento molecular. Debido a la ausencia del centro anomérico se consigue una mejora en la estabilidad química y metabólica frente a las fosforilasas e hidrolasas. En la Figura 1.8 se muestran algunos ejemplos de este tipo de nucleósidos donde se ha sustituido el

anillo de furanosa por un grupo metilenciclopropano como en el caso del sinadenol (**41**) y singuanol (**42**),^{40,41} potentes antivirales frente al citomegalovirus humano (CMVH), o bien por un grupo oxetano como en el antibiótico oxetanocina-A (**43**) o un ciclobutilo en ciclobut-A (**44**) dando lugar a compuestos muy activos frente VHS, CMVH y VIH.^{42,43}

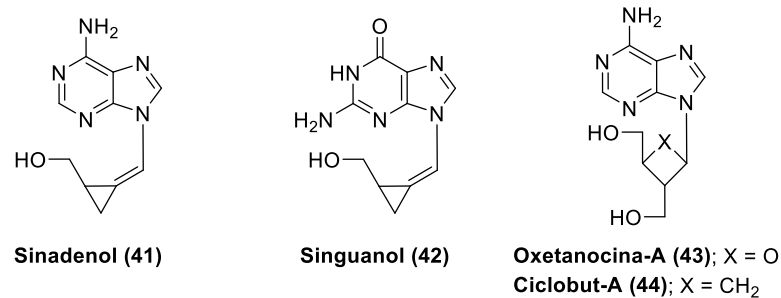


Figura 1.8. Ejemplos de nucleósidos en los que el azúcar se ha reemplazado por un cicloalcano.

Un grupo muy importante de análogos de nucleósidos modificados en el azúcar son los **2',3'-didesoxinucleósidos** (2',3'-ddN) que constituyen uno de los grupos de inhibidores más potentes y selectivos frente a la replicación del VIH. Como se ha mencionado en la introducción general, a este grupo pertenecen siete de los fármacos aprobados para uso clínico en el tratamiento del SIDA (sus estructuras se ilustran aquí de nuevo con el fin de facilitar la lectura): zidovudina (AZT, **23**) empleada desde 1987,⁴⁴ zalcitabina (ddC, **45**), didanosina (ddl, **46**), estavudina (d4T, **47**), lamivudina (3TC, **48**), abacavir (ABC, **39**) y emtricitabina (FTC, **49**)⁴⁵ (Figura 1.9). Estos compuestos y en particular, la lamivudina y la emtricitabina se emplean comúnmente junto a otros fármacos en la denominada terapia antirretroviral de alta eficacia (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART, en inglés) o terapia antirretroviral combinada enfocada en las múltiples etapas del ciclo replicativo del VIH. Se ha demostrado que este tipo de tratamientos reduce significativamente la mortalidad y la aparición de enfermedades oportunistas en los pacientes infectados por el VIH. Mediante el empleo de estos fármacos se ha conseguido ralentizar el curso de la enfermedad, alargando y mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, los 2',3'-ddN poseen una elevada toxicidad con graves efectos secundarios,^{46,47} debido en parte a su interacción con las ADN polimerasas celulares, y a que además inducen la aparición de cepas de virus resistentes en tratamientos prolongados.^{48,49}

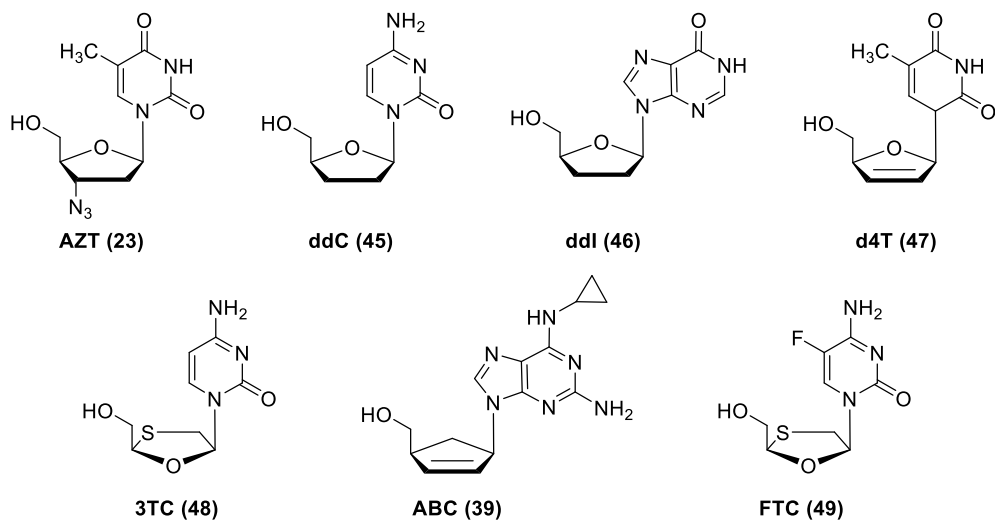


Figura 1.9. 2',3'-Didesoxinucleósidos aprobados para el tratamiento de la infección por VIH.

El mecanismo de acción aceptado para este tipo de compuestos (2',3'-ddN), implica la fosforilación por las quinasas celulares al estado de 5'-trifosfatos. Dichos trifosfatos pueden actuar como inhibidores competitivos del sustrato natural de la enzima (2'-desoxinucleósidos-5'-trifosfatos) o como sustratos alternativos. De este modo, al incorporarse al ADN, en lugar de los sustratos naturales, actúan como terminadores de cadena ya que carecen del grupo 3'-OH necesario para la elongación del ADN mediante la formación del enlace 5'→3' fosfodiéster (Figura 1.10).⁵⁰

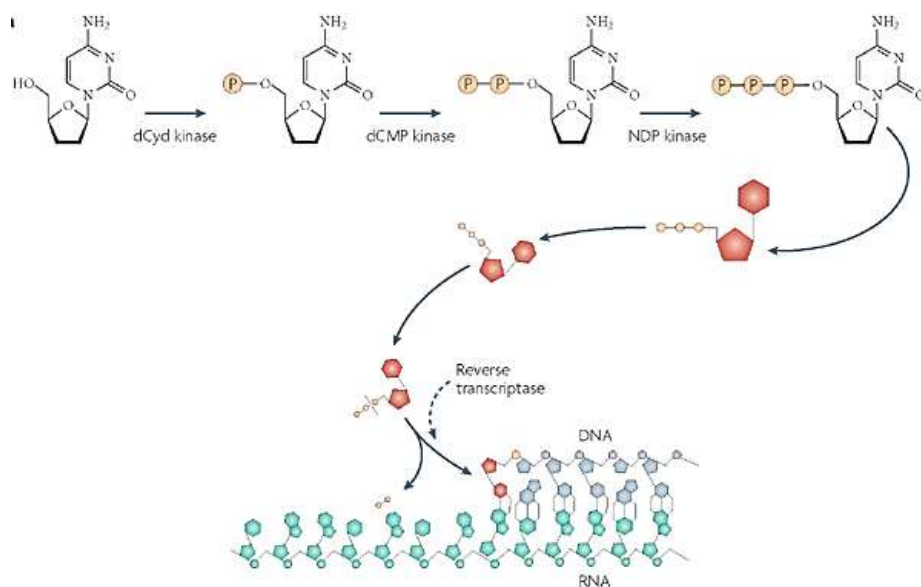


Figura 1.10. Mecanismo de acción de los 2',3'-didesoxinucleósidos como terminadores de cadena.

La mayor afinidad de los trifosfatos de algunos de los 2',3'-ddN por la TI del VIH que por las ADN polimerasas celulares (α , β , γ) explicaría, en parte, su selectividad de acción antiviral.⁴⁶ Uno de los pasos clave, y que se ha relacionado directamente con la actividad, es la eficacia con que dichos nucleósidos son transformados intracelularmente en sus correspondientes trifosfatos.⁵¹ En muchos de ellos, el paso limitante para su activación es la fosforilación inicial al estado de 5'-monofosfato. Este hecho podría explicar las diferencias en la actividad encontrada entre los miembros de una misma familia de ddN.⁹

1.1.3. Nucleósidos acíclicos (aciclonucleósidos)

Otra de las aproximaciones que ha conducido a buenos resultados consiste en la sustitución del anillo de furanosa por una cadena acíclica alifática, dando lugar a los **aciclonucleósidos** de los que existen numerosos ejemplos en la bibliografía. Este tipo de sustitución les confiere a los nucleósidos una mayor flexibilidad conformacional en comparación con otros análogos de nucleósidos. En la Figura 1.11 se muestran algunos de los análogos acíclicos de guanosina, aprobados para uso clínico en infecciones producidas por virus, como son el aciclovir (ACV, **50**) que es un agente terapéutico ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones producidas por el VHS, VVZ y CMVH⁵², el ganciclovir (GCV, **51**) que es el fármaco de elección en las infecciones producidas por CMVH y el penciclovir (**52**) con una actividad muy potente frente a VVZ y VHS.⁵³ Sin embargo, estos tres compuestos presentan una biodisponibilidad oral muy baja⁵⁴⁻⁵⁷ lo que limita su uso y favorece la aparición de cepas de virus resistentes. Para paliar dichos efectos adversos se han comercializado sus profármacos: el valil éster del aciclovir (valaciclovir, **53**) y del ganciclovir (valganciclovir, **54**) y el diacetil éster del penciclovir (famciclovir, **55**), con los que se mejora la biodisponibilidad oral de 3 a 5 veces con respecto a los compuestos patrón (**50-52**) manteniendo la eficacia antiviral y la seguridad.^{53,58,59} Estos compuestos una vez fosforilados específicamente por las quinasas celulares (ganciclovir)⁶⁰ o por timidinas quinasas virales (aciclovir y penciclovir)^{61,62} actúan como inhibidores competitivos con el sustrato natural (dGTP) de las ADN polimerasas virales inhibiendo la síntesis del ADN viral.

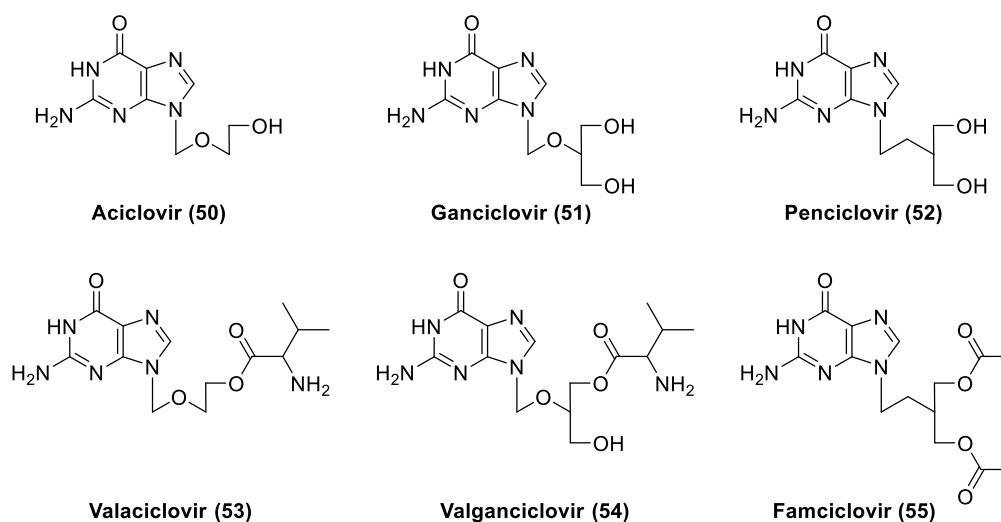


Figura 1.11. Ejemplos de nucleósidos acíclicos y sus profármacos.

1.1.4. Fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs)

Los fosfonatos de nucleósidos acíclicos (Acyclic Nucleoside Phosphonates, ANPs, en inglés),^{63,64} son análogos de nucleótidos caracterizados por la presencia de un grupo fosfonato unido a una purina o una pirimidina mediante un espaciador alifático (*linker*).⁶⁵ Este tipo de análogos que inhiben la actividad de las ADN polimerasas virales surgen de la hibridación de (S)-DHPA [(S)-9-(2,3-dihidroxiopropil)adenina] con ácido fosfonoacético dando lugar al (S)-HPMPA (**56**), un antiviral de amplio espectro y que puede considerarse como el prototipo de este tipo de compuestos (ANPs) (Figura 1.12).⁶⁵ Desde el punto de vista estructural los ANPs se pueden clasificar en distintas subclases (Figura 1.12): (i) Fosfonilmetoxietil (PME) derivados [ej. PMEA (adefovir, **57**)]; (ii) fosfonilmetoxipropil (PMP) derivados [ej. PMPA (tenofovir, **58**)]; y (iii) hidroxifosfonilmetoxipropil (HPMP) derivados [ej. (S)-HPMPA (**56**) y (S)-HPMPC (cidofovir, **59**)].⁶⁵⁻⁶⁹ Como se ha mencionado en el párrafo anterior, a este grupo pertenecen el adefovir (PMEA, **57**), el tenofovir (PMPA, **58**), el cidofovir [(S)-HPMPC, **59**], y sus respectivos profármacos (preparados a fin de mejorar la baja biodisponibilidad oral de los primeros) aprobados para su uso en clínica frente a las infecciones producidas por virus. Así, el cidofovir se aprobó para el tratamiento de la retinitis causada por CMVH en pacientes con SIDA mientras que adefovir y tenofovir se comercializan en forma de profármacos para su uso oral; adefovir dipivoxil [Bis(POM)PMEA, **60**], aprobado para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), y el tenofovir disoproxil fumarato [Bis(POC)PMPA, **61**], aprobado en 2001 para el tratamiento clínico en la infección por VIH y en 2008 para el tratamiento de

la infección crónica por VHB (Figura 1.12).^{53,67,68,70-73} También se han preparado y comercializado profármacos del cidofovir, de entre ellos destaca el brincidofovir (**62**) que es un conjugado de cidofovir con un lípido. Este compuesto libera mayores concentraciones de cidofovir en el plasma aumentando la actividad del cidofovir frente a virus ADN (citomegalovirus, VHS, adenovirus entre otros) así como su biodisponibilidad oral. En 2014, la FDA autorizó su uso como medida excepcional en el tratamiento de los casos de ébola en USA.^{74,75}

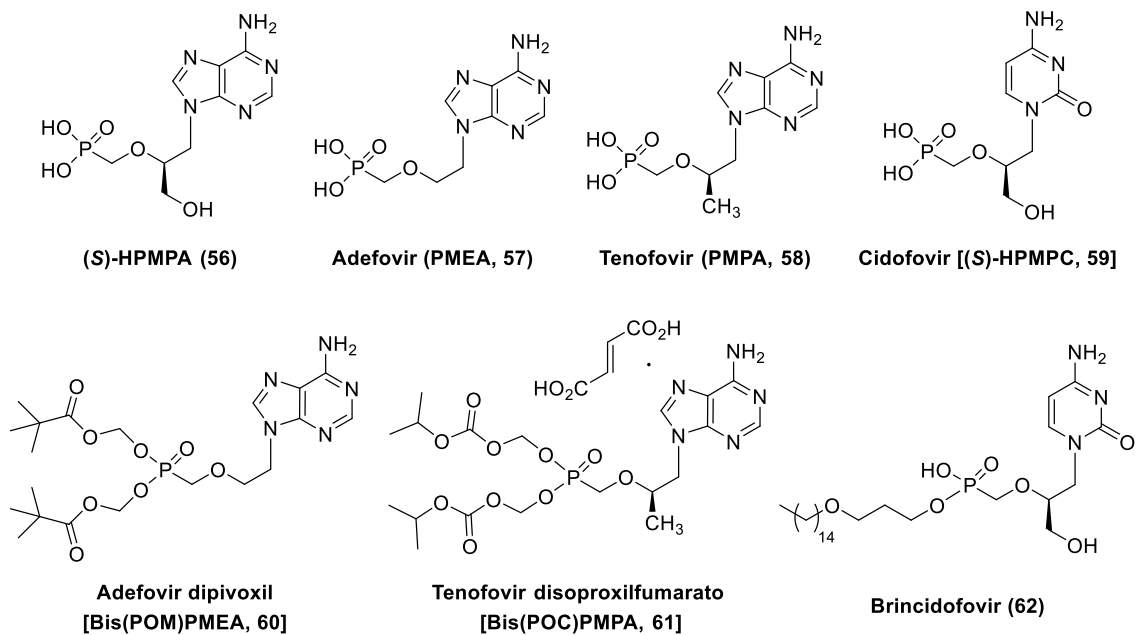


Figura 1.12. Ejemplos de fosfonatos acíclicos (ANPs) y sus profármacos.

En este tipo de compuestos no solo el azúcar del nucleósido se ha sustituido por una cadena acíclica sino que además están funcionalizados con un grupo fosfonato (unido a la cadena alifática mediante un enlace PCO) en lugar de un fosfato (enlace POC) como en los nucleótidos naturales para su interacción con las polimerasas.⁷⁶ Dicho grupo fosfonato es equivalente al fosfato ya que ambos mantienen permanentemente su carga negativa a pH fisiológico.⁷⁷ Pero a diferencia de los fosfatos, los fosfonatos no son degradados por las esterasas que normalmente degradan los monofosfatos de nucleósidos a sus correspondientes nucleósidos (Figura 1.13). Por otra parte, al ser resistentes a la degradación metabólica la vida media de estos compuestos es superior a la de otros derivados nucleosídicos utilizados en clínica. De modo que, por ejemplo, en el caso de adefovir y tenofovir, se administran diariamente en una única dosis, lo que supone una gran ventaja con respecto a las pautas de administración seguidas con otros fármacos antivirales.

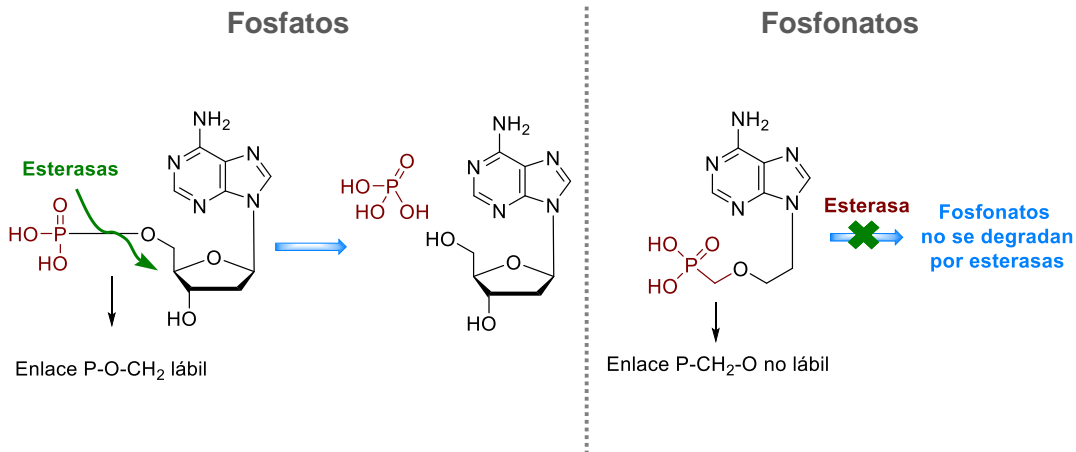


Figura 1.13. Acción de las esteratas sobre fosfatos y fosfonatos.

La presencia de dicho grupo fosfonato hace que estos ANPs actúen como terminadores de cadena irreversibles,^{70,71,78} ya que tras su incorporación a la cadena de ADN en crecimiento, éstos no pueden ser eliminados de dicha cadena de ADN por las enzimas correspondientes.⁶³ Los ANPs mimetizan a los nucleósidos 5'-monofosfato, evitando así la primera etapa de fosforilación requerida para la activación de los nucleósidos que suele ser la etapa limitante en la secuencia de activación a los correspondientes trifosfatos (Figura 1.14). Así, los ANPs son fosforilados, por acción de las quinasas celulares, a los difosfatos y éstos actúan como inhibidores competitivos con respecto al sustrato natural (p.ej. dATP para PMEA) de las ADN polimerasas virales.

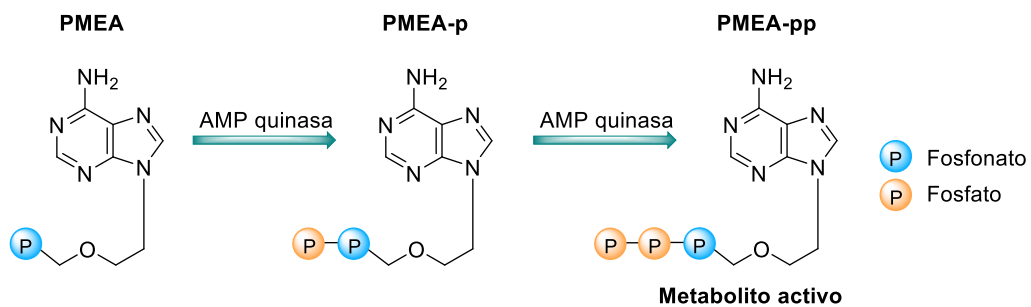


Figura 1.14. Mecanismo de activación de los nucleósidos de fosfonatos acíclicos (ANPs).

En la figura 1.15 se muestran, a modo de ejemplo, el mecanismo de acción mediante el cual adefovir (PMEA, Figura 1.15 izquierda) y cidofovir (HPMPC, Figura 1.15 derecha) inhiben la replicación viral actuando como terminadores de cadena. Tal como se ha indicado anteriormente, cidofovir, adefovir y tenofovir únicamente precisan de dos fosforilaciones para convertirse en los metabolitos activos.

Sin embargo, sus mecanismos para actuar como terminadores de cadena son diferentes. Así, para terminar con la elongación de la cadena de ADN viral es necesaria la incorporación de una única molécula de adefovir- o tenofovir-DP en el extremo 3'-final de la cadena de ADN en crecimiento, mientras que en el caso del cidofovir-DP se requiere la incorporación de dos unidades consecutivas para terminar la elongación de la cadena de ADN de forma eficiente.⁷⁹

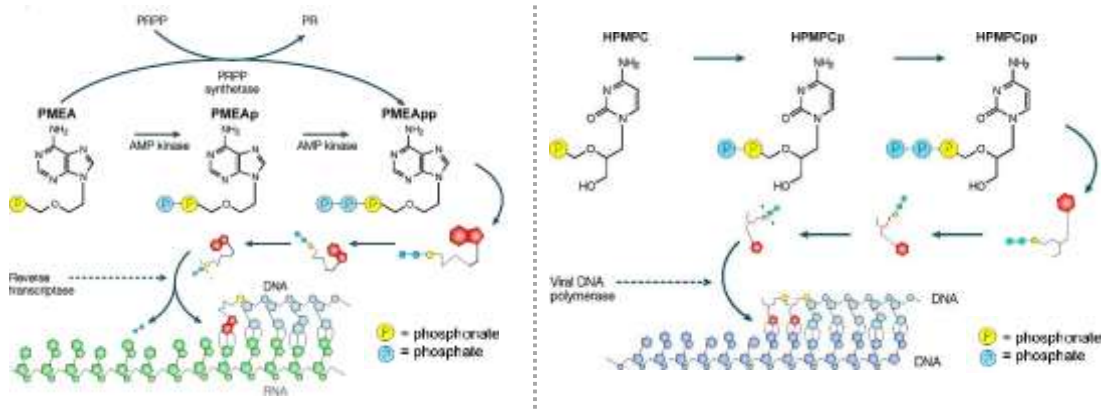


Figura 1.15. Mecanismo mediante el cual PMEA (izquierda) o HPMPc (derecha) ejercen su acción antiviral como terminadores de cadena.

2. ANTECEDENTES

Nueva generación de fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs)

Dentro del grupo de los fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs) cabe destacar una nueva subclase de análogos descrita por J. Balzarini y A. Holy en el 2002, los ANPs de diaminopirimidinas (DAPym) tales como PMEODAPym (**63**), (S)-PMPODAPym (**64**), y (S)-HPMPODAPym (**65**) que son 6-[2-(fosfonometoxi)alcoxi]-2,4-diaminopirimidinas (Figura 1.16).^{64,67,80-82} Este tipo de fosfonatos de nucleósidos acíclicos se diferencia del resto de ANPs descritos hasta este punto en que la nucleobase (2,4-diaminopirimidina, DAPym) está unida a la cadena alifática de alquiloxi fosfonato mediante un enlace tipo éter al C-6 de la base, en lugar de unirse al N-1 de la base pirimidínica o al N-9 de la base púrica como ocurre en el resto de ANPs.

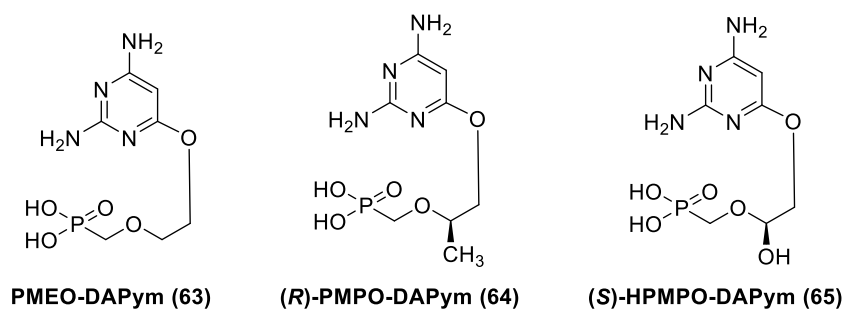


Figura 1.16. Estructuras de PMEODAPym-, (R)-PMPODAPym-, (S)-HPMPODAPym-diaminopirimidinas (DAPym).

Cabe destacar, que contrariamente a lo que ocurre con los ANPs de PME- y PMP de pirimidinas, unidos a través del N-1, que carecen de actividad antiviral (únicamente los ANPs de purinas son activos), los análogos ANPs de pirimidinas PMEODAPym (**63**) y PMPODAPym (**64**) muestran una potente actividad antiviral frente a retrovirus y frente al virus de la hepatitis B,⁸⁰ y lo que es aún más intrigante, la actividad de este tipo de compuestos (de diaminopirimidinas, DAPym) es similar a la que presentan los derivados de diaminopurinas (DAP) PME-DAP (**66**) y PMP-DAP (**67**), por lo que se ha especulado que deben existir semejanzas estructurales entre PME-2,6-diaminopurina (PME-DAP) y los derivados de PMEODAPym.⁸² Estudios de modelado molecular demostraron que la 2,4-diaminopirimidina puede considerarse como un análogo abierto e incompleto de 2,4-diaminopurina (Figura 1.17).⁶⁴ Este tipo de fosfonatos son reconocidos como nucleótidos de purina por las enzimas fosforilasas (principalmente quinasas). Por lo tanto, los derivados de PMEODAPym pueden

considerarse como los análogos abiertos de PME-DAP (**66**, fosfonato acíclico de 2,6-diaminopurina) (Figura 1.17).

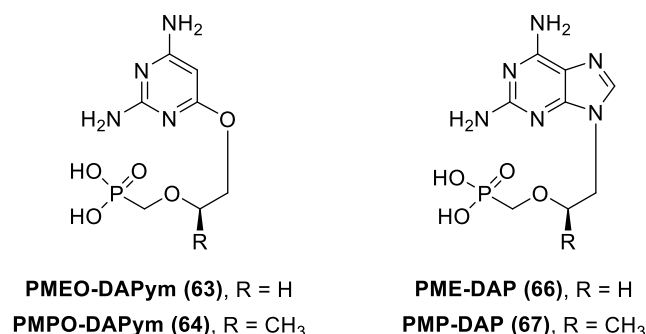


Figura 1.17. Similitud estructural entre los derivados de diaminopurinas PME-DAP y PMP-DAP y los derivados de diaminopirimidinas PME-O-DAPym y PMPO-DAPym.

Por otro lado, la transcriptasa inversa del VIH-1 reconoce a PME-O-DAPym-pp como una purina en lugar de como un derivado de pirimidina y lo incorpora a la cadena de ADN en crecimiento como un nucleótido de purina⁸³ [es decir, frente a una timina (en ADN) o uracilo (en ARN)].⁸⁰ Por tanto, este tipo de compuestos “engañan” a la ADN polimerasa viral comportándose como un mimético de nucleótido de purina (Figura 1.18). Además, PME-O-DAPym-pp una vez incorporado a la cadena de ADN en formación actúa como terminador de cadena, al carecer del -OH necesario para la elongación.

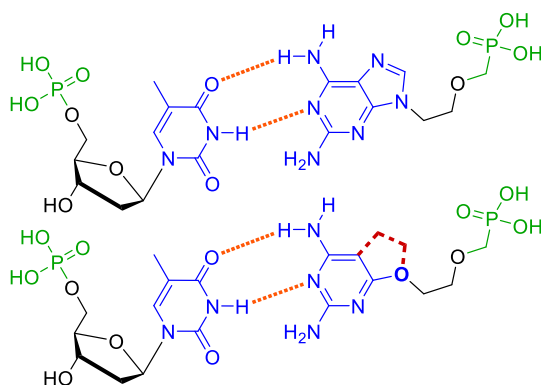


Figura 1.18. Apareamiento clásico de Watson-Crick para el PME-O-DAPym-pp

Asimismo, estudios de modelado molecular y de “docking” han demostrado que debido a la presencia de los grupos amino en el anillo de pirimidina, PME-O-DAPym-pp [que mantiene la parte farmacofórica de la purina para el reconocimiento de apareamiento de bases (base-pairing)] interacciona en el sitio activo de la TI del VIH sin

distorsionar los aminoácidos catalíticos claves (YMDD) y el hecho de que mimetice una purina abierta incompleta permite que el apareamiento de bases de Watson-Crick se mantenga (Figura 1.18). Por otra lado, al contrario de lo que ocurre con PMEAs (57), se ha observado que PMEODAPym-pp no es buen sustrato de las enzimas reparadoras del ADN (que eliminan los nucleótidos “fraudulentamente” incorporados) por lo que podría ejercer un efecto antiviral más prolongado y ser mejor antirretroviral que PMEAs.^{64,83}

En resumen, PMEODAPym puede considerarse como el prototipo de una nueva clase de fosfonatos de nucleósidos acíclicos de pirimidina que son reconocidos como nucleótidos de purina que pueden servir de base para el diseño y desarrollo racional de nuevos nucleós(t)idos miméticos de purina como potenciales antivirales o como antimetabolitos.

3. OBJETIVOS

Inspirados en la estructura “peculiar y única” de los PMEODAPyms y con el objetivo de descubrir nuevas familias de análogos de nucleósidos de estructura desconocida hasta el momento, en este capítulo se propone el diseño y síntesis de una nueva clase de nucleósidos “no convencionales”, de fórmula general I (Figura 1.19).

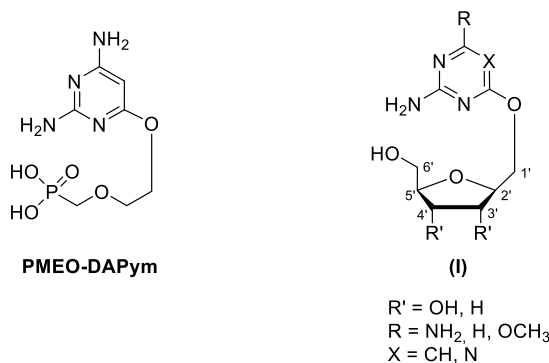


Figura 1.19. Estructura general de los nucleósidos “no convencionales” objetivo (I).

Estos compuestos combinan en su estructura bases “no convencionales” como las diaminopirimidinas (como en el PMEODAPym) con azúcares “no convencionales” como es un anillo intacto de tetrahydrofurano (pero distinto de ribosa y desoxirribosa). Los nucleósidos portadores de tetrahydrofuranos sustituidos en 3' y 4' con grupos -OH se contemplan como miméticos de los ribofuranosil nucleósidos convencionales, mientras que los derivados no sustituidos (R = H) se diseñan como miméticos de los 2',3'-didesoxinucleósidos convencionales. Además, se han diseñado y sintetizado nucleósidos “no convencionales” portadores de amino-1,3,5-triazinas, o aminopurinas sustituidas. Con la preparación de este tipo de nucleósidos se pretende estudiar si serían reconocidos por las quinasas celulares y transformados a los correspondientes 5'-trifosfatos, y si éstos actuarían como sustratos de las ADN polimerasas virales incorporándose al ADN naciente como un nucleótido de purina (como ocurre en el caso del PMEODAPym). Además, dada la novedad estructural de este tipo de nucleósidos no convencionales pretendemos estudiar su potencial biológico, no solo como antivirales. Para ello se ha llevado a cabo, en paralelo a la síntesis química, la evaluación biológica de los compuestos como antivirales y como antitumorales en colaboración con grupos especializados del Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

A continuación se recogen de manera detallada los resultados obtenidos en la síntesis, el análisis conformacional mediante técnicas de RMN, y la evaluación biológica de este tipo de compuestos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE METILOXINUCLEÓSIDOS

4.1.1. Síntesis de metiloxinucleósidos de 2,5-anhidroalitol y de 2,5-anhidroaltritol

La síntesis estereoselectiva de tetrahidrofuranos funcionalizados es de gran interés ya que existen muchos compuestos biológicamente activos que contienen estos sistemas cíclicos en su estructura. Así, los anillos de tetrahidrofurano están presentes en la estructura de productos naturales tales como antibióticos, macrólidos, etc. con actividad antitumoral, antimicrobiana, antimalárica o inmunodepresiva.^{84,85}

Con el fin de descubrir nuevos análogos de nucleósidos como potenciales agentes antivirales o antitumorales nos centramos en la preparación de nucleósidos no convencionales sustituidos con tetrahidrofuranos (distintos de ribofuranosa) portadores de grupos -OH en las posiciones 3' y 4' como miméticos de nucleósidos de ribofuranosilo. Primeramente, nos planteamos la síntesis de metiloxinucleósidos de 2,6-diaminopirimidinas (**1.1**) (Figura 1.20).

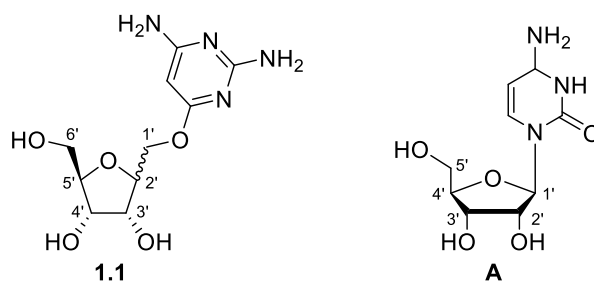
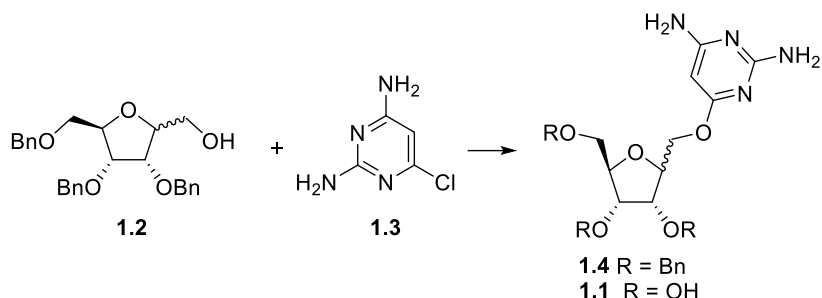


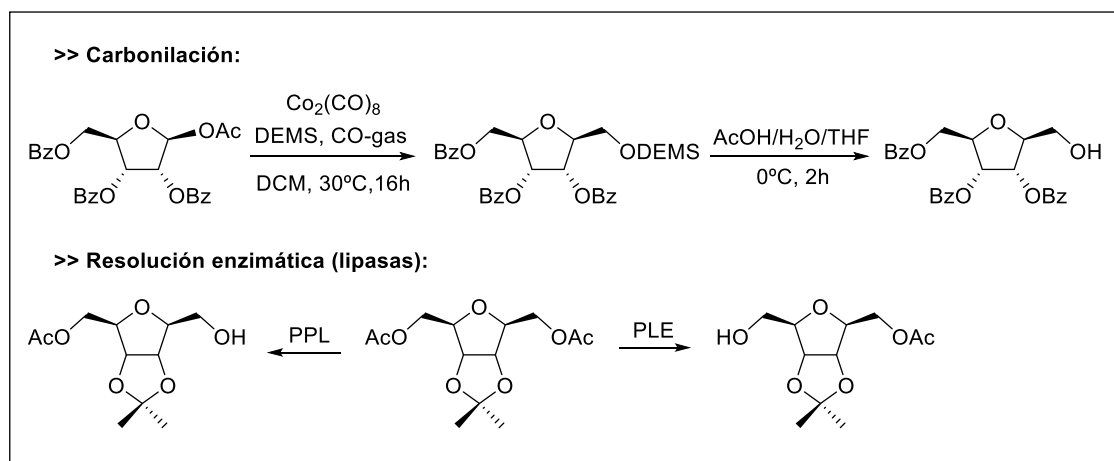
Figura 1.20. Estructuras comparativas de un nucleósido “no convencional” (**1.1**) y un nucleósido natural (citidina, **A**).

Para la síntesis de dichos nucleósidos nos planteamos el procedimiento sintético recogido en el Esquema 1.1 que consistiría en el acoplamiento del intermedio bencilado (**1.2**) con 2,4-diamino-6-cloropirimidina (**1.3**), y la posterior desbencilación del “nucleósido” obtenido (**1.4**), que conduciría al metiloxinucleósido desprotegido buscado (**1.1**).



Esquema 1.1. Síntesis del “nucleósido” objetivo (1.1).

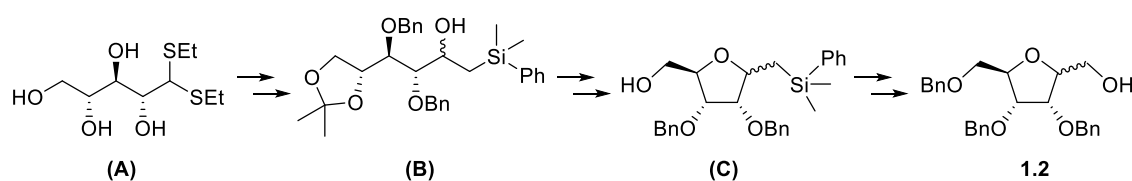
Primeramente fue necesaria la preparación del intermedio clave (1.2). Existen diversos procedimientos sintéticos descritos en la bibliografía para la preparación de anillos de 2,5-anhidroalitol (Esquema 1.2), como por ejemplo, la inserción de un carbonilo en el carbono anómero en α de una furanosa convenientemente sustituida empleando monóxido de carbono y $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ como catalizador,⁸⁶ o bien mediante resolución enzimática empleando lipasas de 2,5-tetrahidrofuranil diésteres.⁸⁷ Estos procedimientos fueron descartados ya que se necesitaba el empleo de monóxido de carbono o lipasas, no disponibles en nuestros laboratorios. Un método que nos pareció sintéticamente accesible y que además permitía obtener el alitol con la estereoquímica y sustitución adecuadas para la preparación de nuestro compuesto objetivo 1.1 fue el descrito por el Dr. Van Delf y col.⁸⁸ y que se recoge en el Esquema 1.3.



Esquema 1.2. Procedimientos sintéticos descritos en bibliografía para la preparación de 1.2.

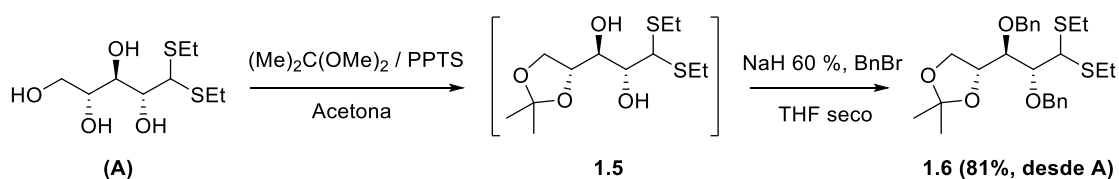
Así para la síntesis del intermedio clave 1.2 nos planteamos la ruta sintética propuesta en el Esquema 1.3. Partiendo del dietilditioacetal de D-ribosa comercial (A) se podría llegar a los correspondientes alditoles (B) en dos pasos, mediante la desprotección del aldehído y posterior adición del reactivo de Grignard adecuado. La

deshidratación de los alditoles en medio ácido conduciría a los derivados de tetrahidrofurano ciclados (**C**), los cuales, tras bencilación del grupo hidroxilo libre seguida de la desprotección oxidativa del sililo daría lugar al compuesto buscado **1.2**.



Esquema 1.3. Estrategia sintética propuesta para la obtención del intermedio clave **1.2**.

Así, y como se indica en el Esquema 1.4, el primer paso de la reacción consistió en la protección selectiva, en forma de acetal, de los grupos hidroxilo en posiciones 4 y 5 de la D-ribosa dietilditioacetal (**A**) por tratamiento con 2,2-dimetoxipropano y *p*-toluensulfonato de piridinio en acetona, seguido de la bencilación de los grupos hidroxilo (2 y 3) del intermedio **1.5** con BnBr/NaH,⁸⁹ para obtener **1.6** con buen rendimiento (81% desde **A**).



Esquema 1.4. Síntesis del ditioacetal protegido **1.6**.

A continuación se abordó la hidrólisis del ditioacetal **1.6** que conduciría a la formación del aldehído **1.7**^{88,89} (Tabla 1.1). En este caso fue necesaria la puesta a punto de las condiciones de reacción ya que cuando se emplearon las condiciones descritas en la bibliografía $[\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O} / \text{HgO} (1:1)]$ ^{88,89} (Entrada 1) se obtuvo únicamente un compuesto que correspondía al derivado **1.8**⁹⁰ (resultante de la desprotección tanto del ditioacetal como del grupo isopropilideno). El empleo de tiempos de reacción más cortos (Entrada 2) o temperaturas más bajas (Entradas 3 y 4), a fin de minimizar en lo posible la hidrólisis del grupo isopropilideno, condujo al producto deseado **1.7** aunque con bajos rendimientos. Por otro lado, el empleo de un mayor número de equivalentes de HgO (Entrada 5) condujo a una mezcla 1:1 de los compuestos **1.7** y **1.8**. Seguidamente se intentó la hidrólisis en condiciones no ácidas, para evitar la desprotección del grupo isopropilideno y por tanto la formación de **1.8**. Se ha descrito en la bibliografía la desprotección de ditioacetales utilizando MeI y medios básicos como 2,4,6-colidina^{91,92}

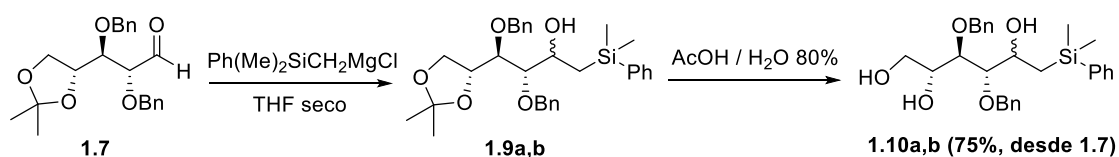
o CaCO_3 ^{93,94}. Así, se hizo reaccionar el compuesto **1.6** con Mel en presencia de 2,4,6-colidina (Entradas 6-8) o de CaCO_3 (Entradas 9 y 10) a distintas temperaturas y tiempos de reacción. Asimismo, se varió el número de equivalentes de Mel. A la vista de los resultados mostrados en la Tabla 1.1, se podría concluir que las condiciones óptimas en las que se obtienen mejores rendimientos del producto de desprotección del ditioacetal (**1.7**) son aquellas en las que se utilizan CaCO_3 (7 eq) como base y Mel (14 eq) a 70 °C durante 5 horas (Entrada 10), aunque en estas condiciones se obtiene también el producto totalmente desprotegido **1.8** en un 29% de rendimiento.

Tabla 1.1. Estudios de optimización de la hidrólisis del ditioacetal **1.6**.

Entrada	Condiciones	Temp / Tpo	Productos (%) [*]		
			1.6	1.7	1.8
1	BF ₃ .Et ₂ O, HgO (1:1)	t.a., 1h	-	-	71
2		t.a., 10 min	-	29	9
3		-15 °C, 10 min	-	35	12
4		-30 °C, 10 min	-	39	15
5	BF ₃ .Et ₂ O, HgO (1:1.7)	t.a., 10 min	-	45	45
6	2,4,6-Colidina (7 eq), Mel (7 eq)	40 °C, 5h	30	15	-
7		70 °C, 5h	-	25	5
8	2,4,6-Colidina (7 eq), Mel (14 eq)	70 °C, 5h	-	47	10
9	CaCO ₃ (7 eq), Mel (14 eq)	70 °C, 3h	-	49	21
10		70 °C, 5h	-	60	29

* Rendimiento del producto aislado.

La hidroximetilación del aldehído **1.7** (Esquema 1.5) con cloruro de (fenildimetil)sililmethylmagnesi⁸⁸ conduce a la mezcla **1.9a,b** que tras hidrólisis ácida (AcOH/H₂O 80%) dio lugar a **1.10a,b** con muy buenos rendimientos (75%, desde **1.7**).



Esquema 1.5. Síntesis de los hexitoles **1.10a** y **1.10b**.

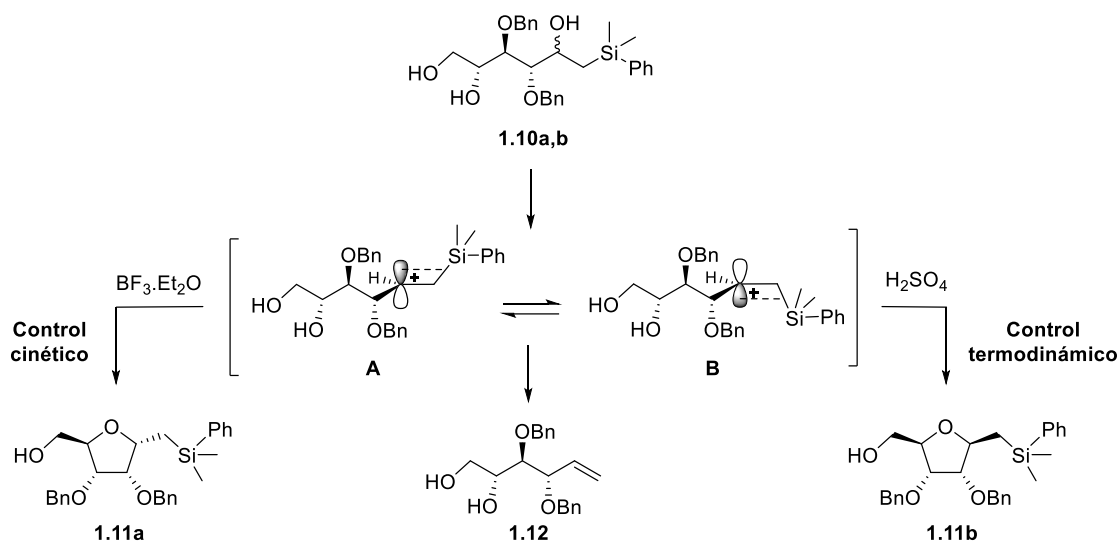
El siguiente paso de reacción consistiría en la ciclación del hexitol **1.10a,b**, mediante deshidratación, en medio ácido. La deshidratación de la mezcla de hexitoles **1.10a,b** para dar lugar a los correspondientes derivados cíclicos mediante catálisis ácida, ha sido descrita por el grupo del Dr. van Delft⁸⁸ en presencia de un ácido de Lewis (BF₃.Et₂O) o de H₂SO₄ (Tabla 1.2). Según van Delft⁸⁸, el empleo de BF₃.Et₂O como catalizador conduce de forma exclusiva al ciclo de configuración 2,3-*cis* (**1.11a**). En cambio, cuando la reacción se realiza en presencia de H₂SO₄ se obtiene, de forma mayoritaria, el ciclo de configuración contraria 2,3-*trans* (**1.11b**). En ambos casos se obtiene como producto secundario la olefina (**1.12**) resultante de la reacción de olefinación de Peterson.⁹⁵

Tabla 1.2. Condiciones de ciclación empleadas por Dr. van Delft.

Ácido (%)	Temp / Tpo	Productos (%) [*]		
		1.11a,b	1.12	2,3- <i>cis</i> / 2,3- <i>trans</i>
BF ₃ .Et ₂ O (5%)	0 °C, 1h	22	58	1:0
H ₂ SO ₄ (1%)	50 °C, 24h	73	15	1:20

* Rendimiento del producto aislado.

La formación del ciclo de configuración 2,3-*cis* (**1.11a**) transcurre mediante control cinético (Esquema 1.6).⁸⁸ El mecanismo de la ciclación implica la formación de un carbocatión intermedio (**A**) estabilizado en β por el átomo de silicio, lo que determina que el ataque nucleófilo del hidroxilo en posición 5 ocurra en *anti* respecto al enlace C-Si (C-2) con retención de la configuración del C-2.⁹⁶ Por otro lado, la formación del ciclo 2,3-*trans* (**1.11b**) transcurre mediante control termodinámico. En este caso la ciclación se produce a través del carbocatión intermedio (**B**), de tal modo, que el ataque nucleófilo del hidroxilo en posición 5 al C-2 ocurre con inversión de la configuración.⁹⁷ Además, se observa una clara preferencia hacia la formación del ciclo de 5 eslabones frente al de 6. En ambos casos se obtiene el producto de eliminación **1.12**^{95,98,99} como producto secundario.



Esquema 1.6. Mecanismo de la reacción de ciclación intramolecular.

Para obtener el derivado de configuración *2,3-trans* (**1.11b**) intentamos las condiciones descritas por van Delft⁸⁸ que, como se ha comentado, conducirían preferentemente al isómero buscado. Sin embargo, el empleo de H₂SO₄ (1% en THF) a 50 °C durante 1 hora (Tabla 1.3, Entrada 1) condujo a una mezcla de productos de configuración *cis* y *trans* (**1.11a,b**) con bajos rendimientos junto con el producto de eliminación **1.12**. Con el fin de optimizar las condiciones de esta reacción de ciclación, realizamos un estudio variando la temperatura, el tiempo de reacción y la cantidad de ácido empleada (Tabla 1.3).

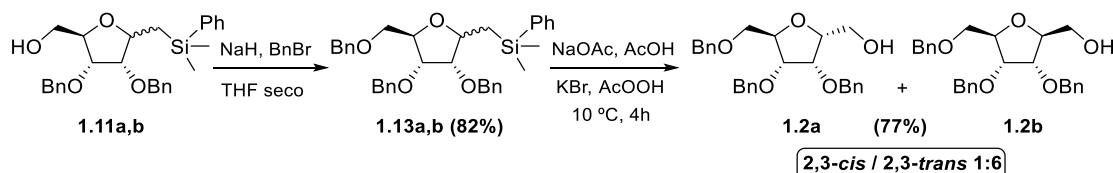
Tabla 1.3. Estudios de optimización de la ciclación intramolecular de **1.10a,b**.

Entrada	H ₂ SO ₄ (%)	Temp / Tpo	Productos (%) [*]		
			1.10a,b	1.11a,b	1.12
1	1	50 °C, 1h	57	21	2
2	10	50 °C, 2h	-	11	28
3	1		2	40	13
4	0.5		43	30	3
5	1	60 °C, 1h	-	-	-
6	0.5	50 °C, 48h	-	58	40

* Rendimiento del producto aislado.

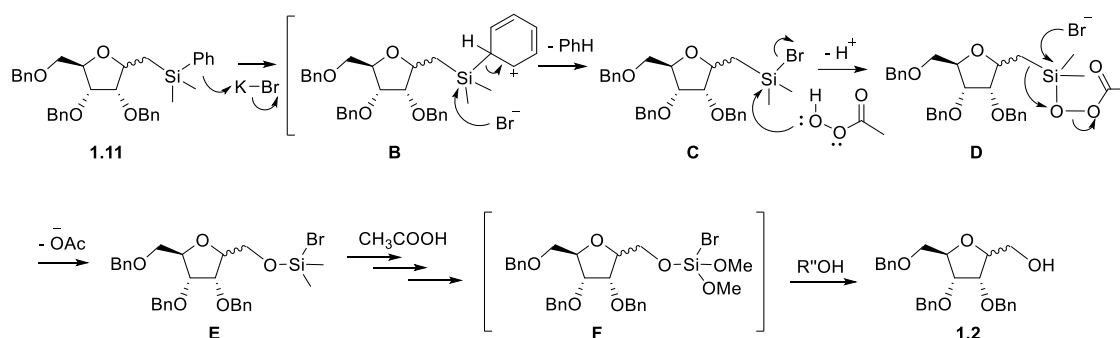
En estos experimentos se observa que la cantidad de ácido empleada parece ser crítica para la obtención de los productos de ciclación (**1.11a,b**) frente al de eliminación (**1.12**) (Tabla 1.3, Entradas 2-4). Por otro lado, el aumento de la temperatura (Entrada 5) conduce a una mezcla compleja de productos de descomposición, mientras que son necesarios largos tiempos de reacción (Entrada 6) para agotar el producto de partida. A la vista de los resultados las mejores condiciones de ciclación para **1.10a,b** serían el empleo de H₂SO₄ (0.5% en THF) a 50 °C durante 48 horas (Entrada 6). Aplicando estas condiciones se obtuvo la mezcla **1.11a,b** con un 58% de rendimiento y una proporción 2,3-*cis*/2,3-*trans* (1:2) determinada mediante RMN. Cabe destacar, la importancia tanto del control de la temperatura como de la concentración de ácido empleados, ya que pequeñas variaciones favorecen la formación del producto de β-eliminación o la descomposición de la mezcla de reacción.

A continuación, se llevó a cabo la bencilación del grupo hidroxilo libre de **1.11a,b** para dar **1.13a,b** (Esquema 1.7) que por posterior desenmascaramiento del alcohol en posición 1, aplicando las condiciones de Fleming-Tamao¹⁰⁰ (NaOAc, AcOH, KBr, AcOOH), condujo a la obtención de la mezcla **1.2a,b** con un 77% de rendimiento, y en una proporción 2,3-*cis*/2,3-*trans* (1:6) determinada por RMN.



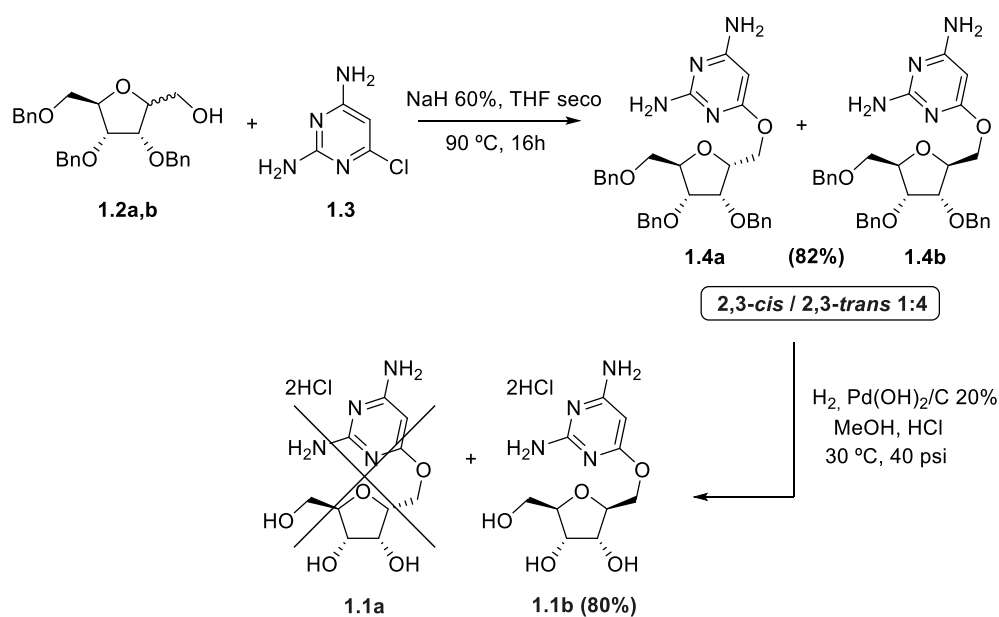
Esquema 1.7. Bencilación y desprotección oxidativa de Fleming-Tamao de **1.11a,b**.

La oxidación de Fleming-Tamao es un método ampliamente utilizado para la transformación de un grupo sililo a hidroxilo con retención de la configuración¹⁰⁰ (Esquema 1.8). En un primer paso, el grupo fenilo de **1.11** es eliminado mediante la acción del KBr, así el grupo fenilsilano que presenta una gran estabilidad es convertido en bromosilano (**C**), mucho más reactivo. El desplazamiento del bromuro en **C** por ácido peracético conduce a un intermedio (**D**) que se reordena para dar un silanol (**E**) que, mediante tratamiento prótico, da lugar al alcohol deseado (**1.2**).



Esquema 1.8. Mecanismo de desprotección oxidativa de Fleming-Tamao.¹⁰⁰

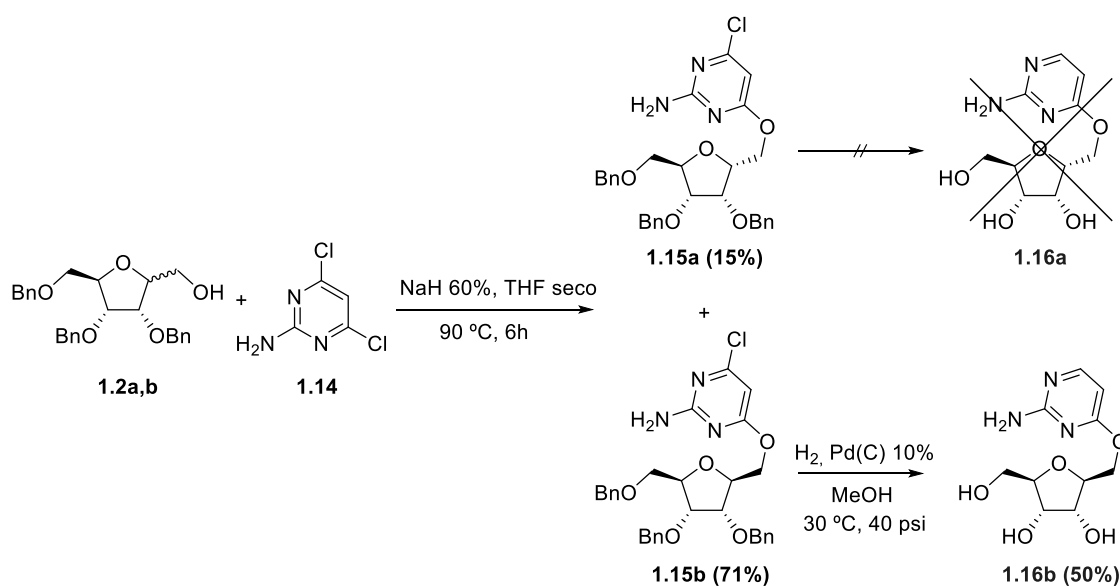
Finalmente, la sustitución nucleófila aromática de los tetrahidrofuranos (**1.2a,b**) con la base pirimidínica correspondiente y la posterior desprotección de los grupos hidroxilo, conduciría al metiloxinucleósido buscado. Así, la alquilación de 2,4-diamino-6-cloropirimidina (**1.3**) con el alcóxido de **1.2a,b** (Esquema 1.9) generado *in situ* por tratamiento de **1.2a,b** con NaH al 60% en THF a 90 °C durante 16 horas condujo a **1.4a,b** (82% rendimiento) como una mezcla (1:4) de isómeros 2',3'-*cis* y 2',3'-*trans* que fue imposible de separar mediante diferentes técnicas cromatográficas [Cromatografía circular centrífuga (CCTLC) en el cromatotrón, Cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage, etc], así como de asignarlas de forma inequívoca.



Esquema 1.9. Obtención del metiloxinucleósido **1.1b**.

Seguidamente, se procedió a la hidrogenolisis de los grupos bencilo. El tratamiento de **1.4a,b** con H₂, 10% Pd/C a 30 °C y 40 psi condujo, exclusivamente, al producto de partida inalterado. Sin embargo, cuando la desprotección de los grupos bencilo se realiza con H₂, 20% Pd(OH)₂/C a 30 °C y 40 psi, en presencia de cantidades estequiométricas de HCl, para evitar el envenenamiento del catalizador por parte de los grupos amino de la base pirimidínica, se obtuvo exclusivamente el análogo desprotegido **1.1b** con buenos rendimientos (80%). En la mezcla de reacción no se detectó la presencia del isómero 2,3-*cis* (**1.1a**) (Esquema 1.9).

Dada la novedad de este tipo de nucleósidos, desconocidos hasta el momento en la literatura, nos propusimos la síntesis de otros metiloxinucleósidos portadores de otras bases pirimidínicas. Así, el tratamiento de **1.2a,b** con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (Esquema 1.10) en presencia de NaH al 60% a 90 °C durante 6 horas condujo a la mezcla de isómeros 2',3'-*cis* (**1.15a**) y 2',3'-*trans* (**1.15b**). Dicha mezcla pudo ser separada mediante CCTLC en el cromatotrón, obteniéndose **1.15a** y **1.15b** en una proporción (1:5) con rendimientos del 15% y del 71% respectivamente. Los compuestos aislados se caracterizaron mediante técnicas de resonancia magnética nuclear mono- y bidimensionales. La posterior hidrogenolisis de **1.15b** con H₂, 10% Pd/C a 30 °C y 40 psi, dio lugar al análogo **1.16b** en un 50% de rendimiento en el que se observa la reducción del átomo de cloro. Sin embargo, todos los intentos de hidrogenolisis llevados a cabo sobre **1.15a** en distintas condiciones (H₂, 10% Pd/C, 5% Pd/C o 20% Pd(OH)₂/C) fueron infructuosos, recuperándose en todos los casos una mezcla compleja de productos intermedios de desprotección que no pudieron ser aislados e identificados.



Esquema 1.10. Obtención del metiloxinucleósido **1.16b**.

La asignación estructural de los compuestos descritos hasta este punto se llevó a cabo mediante resonancia magnética nuclear. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales (1D-RMN) presentaban complejidad se recurrió a experimentos bidimensionales de RMN (2D-RMN). La asignación de las diferentes señales de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY y NOESY, y las señales de ^{13}C -RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C de tipo HSQC y HMBC. Dichos experimentos fueron todos realizados bajo las mismas condiciones experimentales.

La asignación de la configuración $2',3'$ -*cis* o $2',3'$ -*trans* del C-2' de los nucleósidos (**1.15a** y **1.15b**) se realizó mediante experimentos NOESY. En las Figuras 1.21 y 1.22 se muestran dichas asignaciones. Tal y como se muestra en la Figura 1.21, para el análogo bencilado **1.15b** se observa una fuerte correlación espacial entre H-2' y H-5', lo que confirma una configuración $2',3'$ -*trans* de **1.15b**, mientras que en la Figura 1.22 no se observa dicha correlación, por lo tanto, **1.15a** corresponde al isómero de configuración $2',3'$ -*cis*.

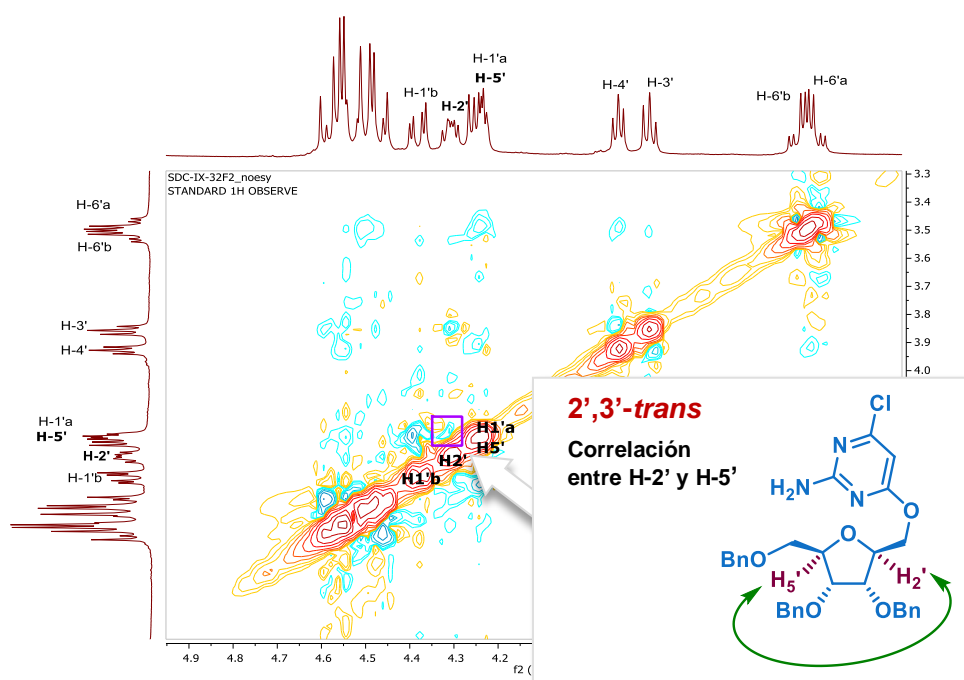


Figura 1.21. Espectro NOESY del análogo de “nucleósido” bencilado **1.15b**.

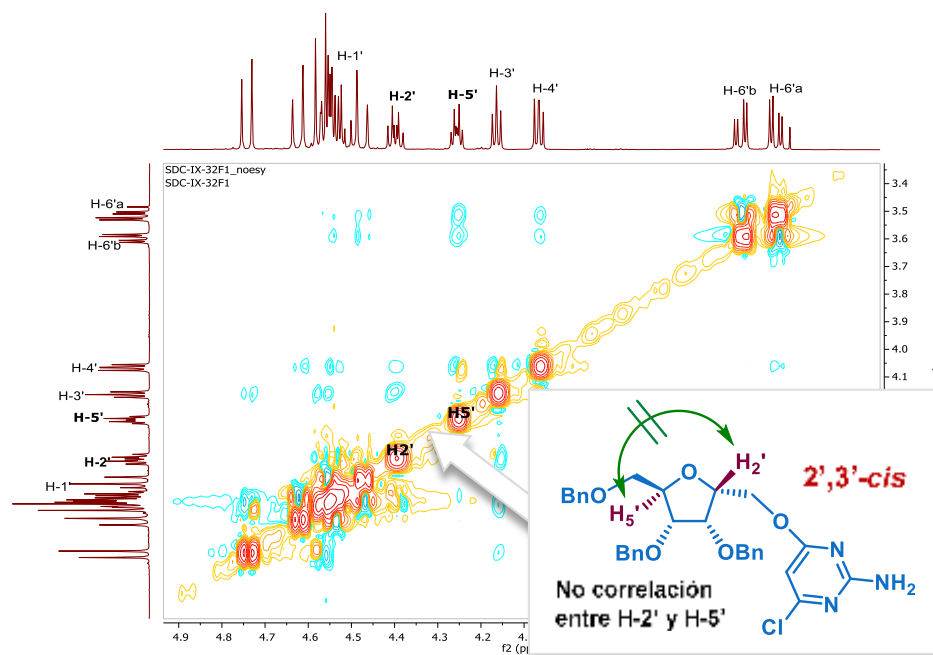


Figura 1.22. Espectro NOESY del análogo de “nucleósido” bencilado 1.15a.

Del mismo modo, se determinó la configuración del análogo desprotegido 1.16b. En el espectro NOESY se observa claramente correlación espacial entre los hidrógenos H-2' y H-5' y entre H-1'a,b y H-3', únicamente compatibles con una configuración 2',3'-*trans* (Figura 1.23).

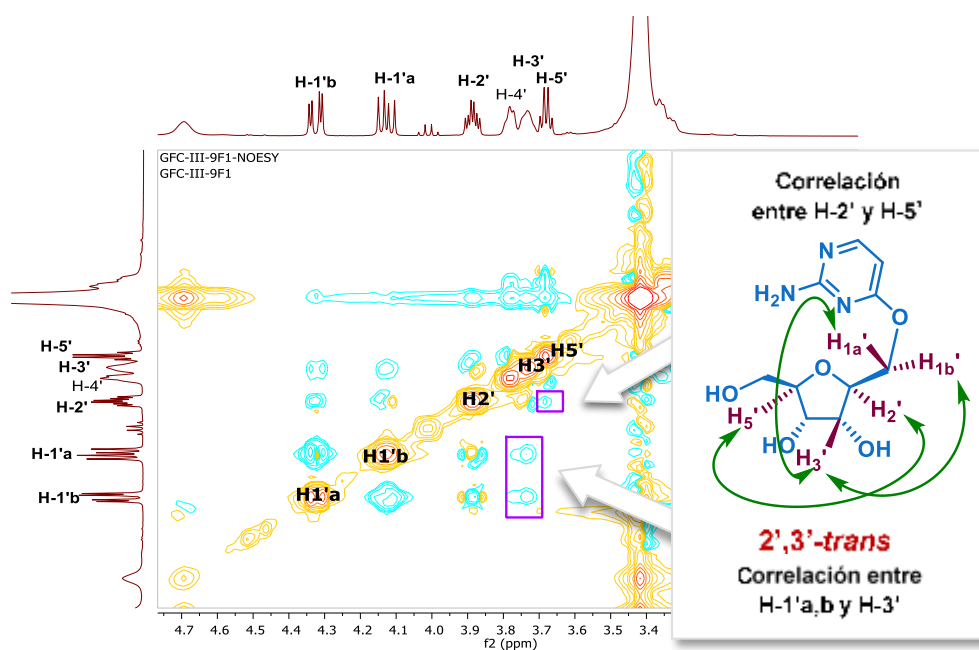


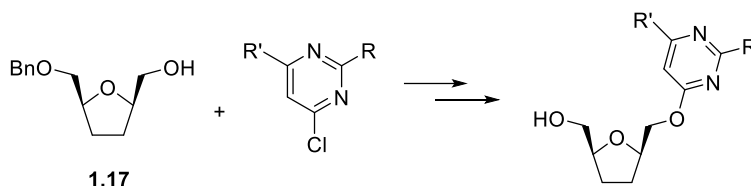
Figura 1.23. Espectros NOESY del análogo de “nucleósido” desprotegido 1.16b.

Una vez asignada de forma inequívoca **1.15a**, **1.15b**, y **1.16b** se pudieron asignar por comparación la mezcla **1.4a,b** y la configuración 2,3-*trans* del derivado de diaminopirimidina (**1.1b**).

Los compuestos descritos hasta este punto se evaluaron frente a la replicación de una gran variedad de virus (ARN y ADN) en cultivo celular, resultando inactivos o poco activos (como se verá en el correspondiente apartado de actividad biológica). La falta de actividad podría deberse a que estos compuestos no cumplen los criterios para actuar como terminadores de cadena. Su eventual incorporación a la cadena de ADN en formación permitiría la elongación de la misma al disponer de grupos -OH en las posiciones 3' y 4'. Este hecho, nos llevó a plantear la preparación de los correspondientes 3',4'-didesoxi nucleósido análogos.

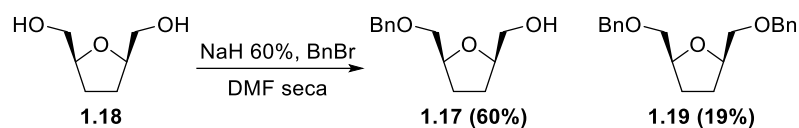
4.1.2. Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos

La síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos se abordó siguiendo un procedimiento sintético similar al descrito para la síntesis de los nucleósidos **1.1b** y **1.16b** según se recoge en el Esquema general 1.11 que consistiría en la alquilación de **1.17** con la nucleobase correspondiente, seguida de la desprotección del grupo hidroxilo de la posición 6' para dar los nucleósidos buscados.



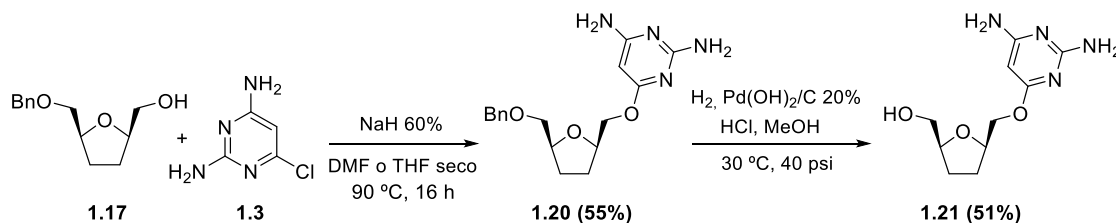
Esquema 1.11. Esquema general para la síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos.

Para ello, fue necesario la preparación del producto de partida **1.17** que se llevó a cabo por tratamiento de (2*R*,5*S*)-2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano (**1.18**) con 1.3 equivalentes de BnBr/NaH⁸⁹ (Esquema 1.12). De esta manera se favorece la formación del producto monobencilado **1.17** frente al dibencilado **1.19**. Debido a la baja solubilidad de **1.18**, fue necesario el uso de DMF seca como disolvente en lugar de THF, mejorando así el rendimiento de la reacción de un 35% hasta un 60% de **1.17** que se obtuvo en forma de mezcla racémica (2*RS*,5*SR*).



Esquema 1.12. Síntesis del producto de partida 1.17.

Primeramente, abordamos la síntesis de 3',4'-didesoxi análogos de pirimidinas. Así, el tratamiento de **1.17** con 1.5 equivalentes de 2,4-diamino-6-cloropirimidina (**1.3**) (Esquema 1.13) en presencia de NaH al 60% a 90 °C en tubo cerrado durante la noche, condujo al metiloxinucleósido bencilado **1.20** con un 55% de rendimiento. La posterior hidrogenolisis de **1.20** con [H₂, Pd(OH)₂/C 20%] en presencia de cantidades estequiométricas de HCl a 30 °C y 40 psi dio lugar al (2'*RS*,5'*SR*)-análogo desprotegido **1.21** con un 51% de rendimiento. Los compuestos se obtuvieron como una mezcla racémica (2'*RS*,5'*SR*) y no pudieron separarse. Se llevaron a cabo diversos intentos para separar la mezcla por vía enzimática en colaboración con el Prof. Chris Meier de la Universidad de Hamburgo (Alemania). Desafortunadamente, estos intentos resultaron infructuosos.



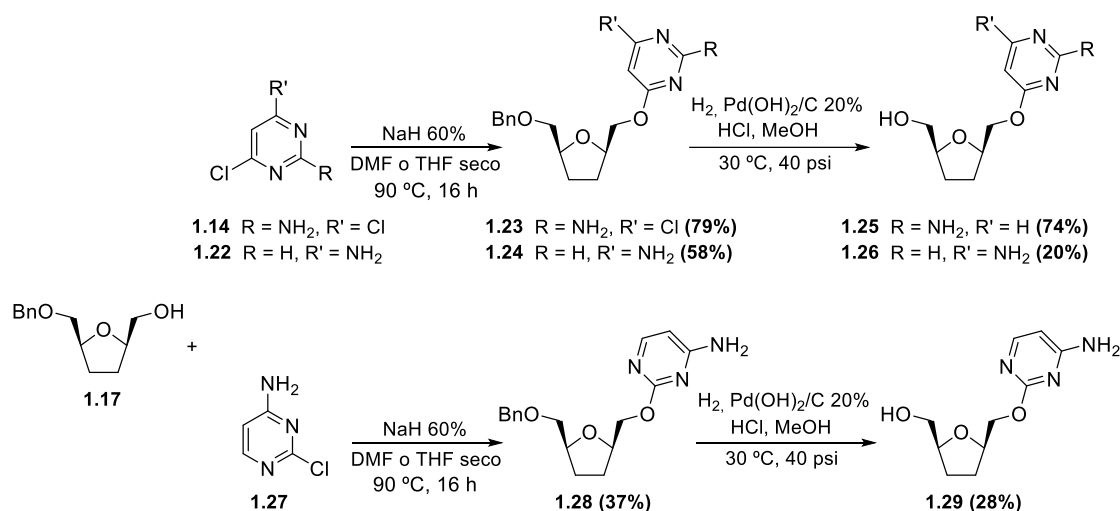
Esquema 1.13. Síntesis del metiloxinucleósido 1.21.

Dada la novedad estructural de este tipo de nucleósidos no convencionales, decidimos extender su síntesis a otros análogos de pirimidinas y purinas diferentemente sustituidas.

4.1.2.1. Síntesis de derivados de pirimidinas

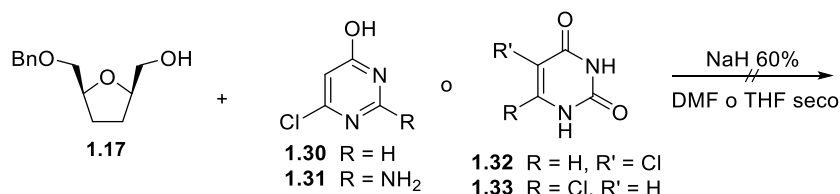
La reacción de (2'*RS*,5'*SR*)-**1.17** con 1.2 equivalentes de 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**), 4-amino-6-cloropirimidina (**1.22**) o 4-amino-2-cloropirimidina (**1.27**) en presencia de NaH al 60% a 90 °C durante la noche en tubo cerrado (Esquema 1.14) dio lugar a los correspondientes (2'*RS*,5'*SR*)-análogos bencilados **1.23** (79%), **1.24** (58%), y **1.28** (37%) con rendimientos desde moderados a buenos. La hidrogenolisis de **1.23**, **1.24** y **1.28** [H₂, Pd(OH)₂/C 20%; HCl en cantidades

estequiométricas a 30 °C y 40 psi] dio lugar a los correspondientes (2'*RS*,5'*SR*)-análogos 3',4'-didesoxigenados **1.25** (74%), **1.26** (20%), y **1.29** (28%) respectivamente. Al igual que para **1.21** todos los nucleósidos se obtuvieron en forma de mezclas racémicas (2'*RS*,5'*SR*) que no pudieron ser separados.



Esquema 1.14. Síntesis de metiloxinucleósidos **1.25**, **1.26** y **1.29**.

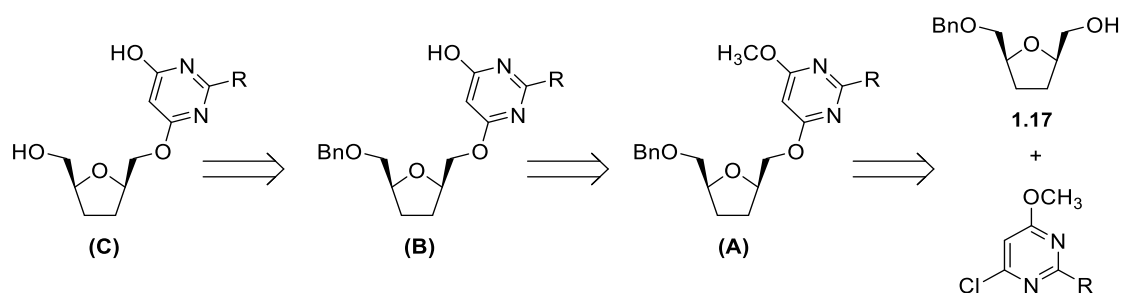
Seguidamente, llevamos a cabo la reacción con otras pirimidinas sustituidas (Esquema 1.15). La reacción de **1.17** con la pirimidina **1.30** en las condiciones empleadas para la síntesis de **1.23**, **1.24** y **1.28** (1.2 equivalentes de la pirimidina, NaH al 60%, en DMF o THF seco, a 90 °C en tubo cerrado durante la noche) condujo al producto de partida inalterado. El empleo de grandes excesos de la pirimidina sustituida o el calentamiento en microondas a 100 °C a distintos tiempos de reacción, resultó asimismo infructuoso. Igual resultado se obtuvo con otras pirimidinas sustituidas como **1.31-1.33**, recuperándose en todos los casos el producto de partida inalterado.



Esquema 1.15. Síntesis de metiloxinucleósidos derivados de otras pirimidinas.

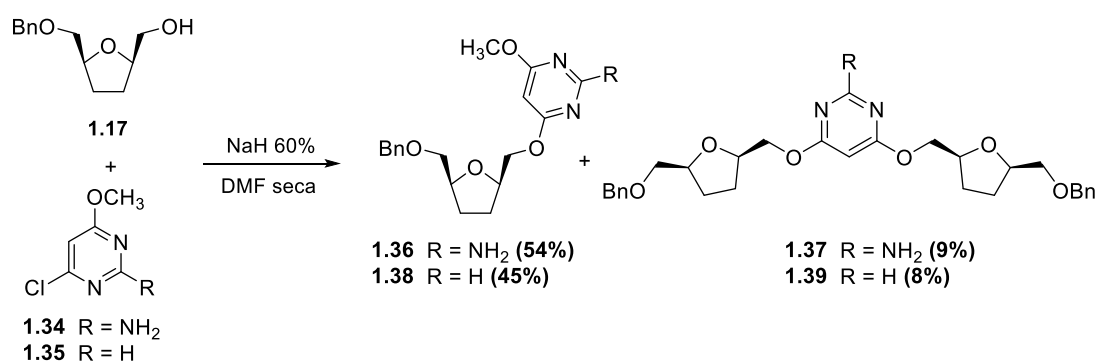
A la vista de los resultados, nos planteamos una ruta alternativa de síntesis a partir de pirimidinas *O*-metiladas (Esquema 1.16). En el esquema retrosintético se propone la alquilación de **1.17** a partir de las pirimidinas *O*-metiladas que daría lugar a los análogos de nucleósidos *O*-metilados (**A**). La desprotección de **A** con BBr₃ conduciría a los

análogos bencilados que contienen en el anillo de pirimidina un grupo hidroxilo (**B**). La hidrogenolisis final de **B** conduciría a los productos deseados (**C**).



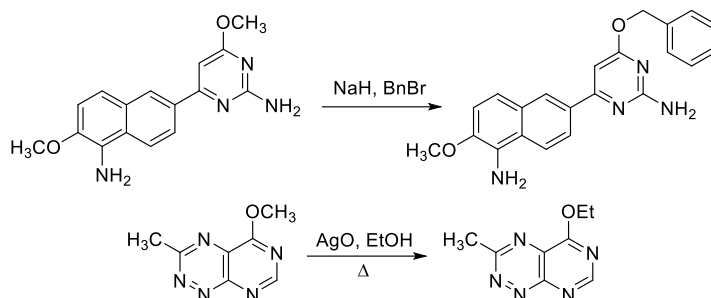
Esquema 1.16. Esquema retrosintético para la síntesis de los metiloxi-nucleósidos **C**.

La alquilación de **1.17** con 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.34**) o con 4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.35**) (NaH al 60% en DMF seca a 90 °C en tubo cerrado durante la noche) condujo a los (2'*RS*,5'*SR*)-análogos **1.36** y **1.38** con un 54% y un 45% de rendimiento respectivamente. En ambas reacciones se obtuvieron **1.37** y **1.39** (9% y 8% de rendimiento respectivamente) como subproductos de la reacción (Esquema 1.17).



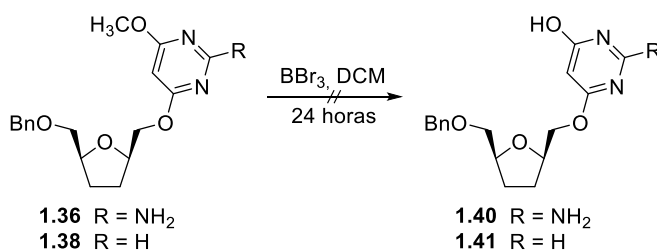
Esquema 1.17. Síntesis de metiloxi-nucleósidos derivados de pirimidinas O-metiladas.

Estos dímeros disustituidos inesperados podrían ser el resultado de una reacción de transesterificación del anión alcóxico de **1.17**. Este tipo de transesterificaciones han sido descritas en la bibliografía^{101–103} en reacciones a altas temperaturas. Por ejemplo, Delacotte y col.¹⁰¹ describieron una transesterificación similar donde un anillo de metoxipirimidina es sustituido por un anión bencilato dando lugar a un éter bencilico cuando calientan la reacción a 95 °C. Brown y col.¹⁰⁴ también describen este tipo de transesterificaciones en presencia de óxido de plata como catalizador (Esquema 1.18).



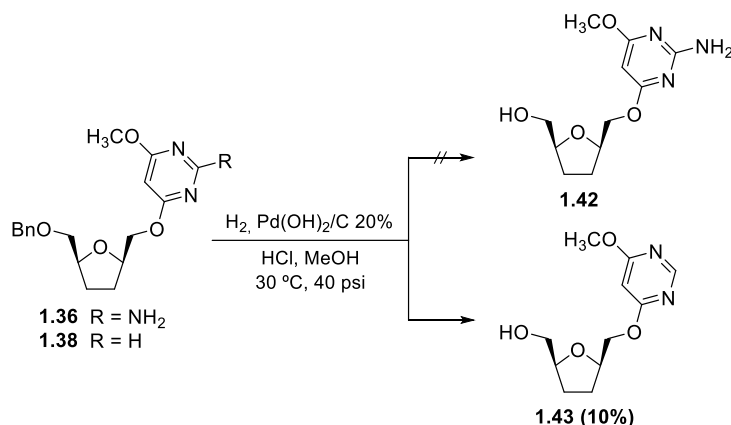
Esquema 1.18. Transesterificaciones de Delacotte y col.¹⁰¹ y Brown y col.¹⁰⁴

Todos los intentos de desprotección del grupo metoxilo en **1.36** y **1.38** con BBr_3 resultaron infructuosos (Esquema 1.19), dando lugar a mezclas complejas de reacción donde solamente pudieron detectarse derivados polibromados que no pudieron identificarse mediante técnicas de HPLC-MS.



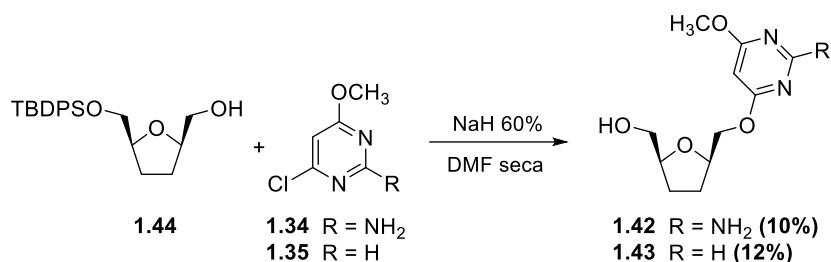
Esquema 1.19. Desprotección con BBr_3 de metiloxinucleósidos O-metilados.

La hidrogenolisis del derivado **1.36**, en presencia de H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% y cantidades estequiométricas de HCl a 30°C y 40 psi, dio lugar a una mezcla compleja de reacción que no pudo identificarse (Esquema 1.20). Cabe destacar que el producto **1.42** no fue detectado. Sin embargo, aplicando un tratamiento similar al derivado bencilado **1.38** se obtuvo el producto desprotegido **1.43** (10%) aunque con muy bajos rendimientos.



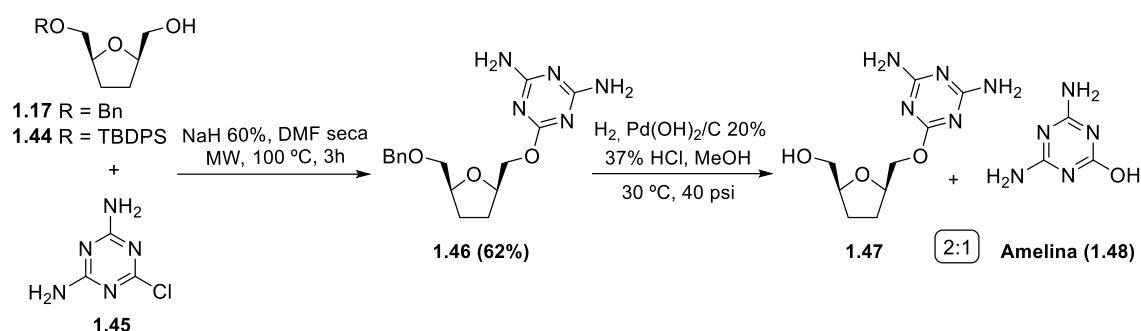
Esquema 1.20. Hidrogenolisis de **1.36** y **1.38**.

Para evitar el paso de hidrogenolisis se reemplazó el grupo bencilo por el grupo protector *tert*-butildifenilsililo (TBDPS) en el producto de partida (Esquema 1.21) que se desprotegería en condiciones ácidas. De esta forma, se utilizó como material de partida el producto **1.44**.¹⁰⁵ En este caso, el tratamiento de **1.44** con las pirimidinas **1.34** o **1.35** en las condiciones de alquilación descritas anteriormente, condujo a los (2'*RS*,5'*SR*)-nucleósidos desprotegidos **1.42** y **1.43** con un 10% y un 12% de rendimiento, respectivamente.



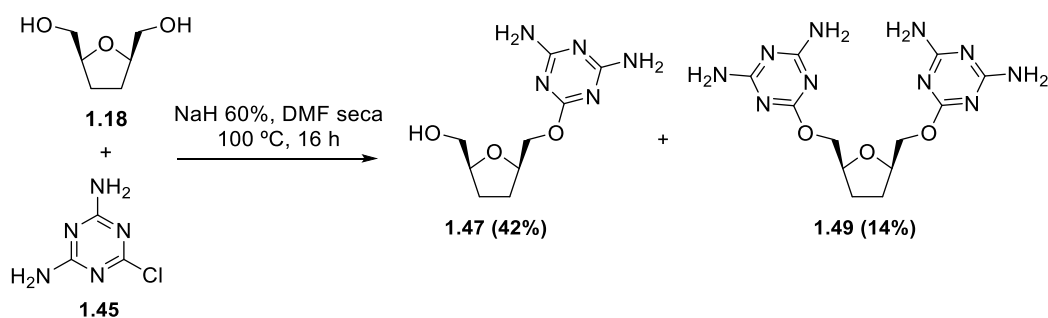
Esquema 1.21. Síntesis de **1.42** y **1.43**.

A continuación, nos planteamos la preparación del aza-nucleósido análogo de **1.21** (Esquema 1.22). El tratamiento de **1.17** con la triazina disustituida 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) en las condiciones descritas para la obtención de **1.21**, no condujo a los resultados esperados recuperándose mayoritariamente el producto de partida inalterado. En la reacción se obtuvo el nucleósido deseado **1.46** con muy bajos rendimientos (< 10%), probablemente debido a la conocida baja reactividad y solubilidad de las 1,3,5-triazinas disustituidas.¹⁰⁶ Por ello, fueron necesarias condiciones más enérgicas para llevar a cabo la alquilación. Así, la alquilación de 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) con **1.17** se llevó a cabo por tratamiento con NaH al 60% con irradiación en microondas a 100 °C durante 3 horas, para dar el (2'*RS*,5'*SR*)-derivado **1.46** con un 62% de rendimiento (Esquema 1.22). La hidrogenolisis de **1.46** [H₂, Pd(OH)₂/C 20% y HCl en cantidades estequiométricas, a 30 °C y 40 psi] dio lugar a una mezcla del producto desprotegido **1.47** y amelina (**1.48**) que fue imposible de separar mediante diferentes técnicas cromatográficas (CCTLC, HPFC, etc). Mediante trituraciones con éter etílico frío del crudo de reacción se logró enriquecer la mezcla hasta una proporción (2:1) de (2'*RS*,5'*SR*)-**1.47** y amelina (**1.48**) respectivamente, determinada por RMN.



Esquema 1.22. Síntesis de 1.47.

Al igual que en el caso de la síntesis de **1.42** y **1.43**, y con el fin de evitar la etapa de hidrogenolisis, y así la formación de amelina (**1.48**), se hicieron reaccionar el producto protegido con TBDPS (**1.44**) y **1.45** (Esquema 1.22) en las mismas condiciones de reacción, obteniéndose en este caso una mezcla compleja de reacción que no pudo ser identificada. Finalmente, nos planteamos la reacción directa del producto de partida desprotegido (**1.18**) con la triazina (**1.45**) (Esquema 1.23) obteniendo el derivado desprotegido (2'*RS*,5'*SR*)-**1.47** con un 42% de rendimiento junto con el derivado disustituido **1.49** (14%) como componente minoritario. La purificación del compuesto **1.47** se realizó mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando diclorometano/metanol/ácido acético (9:1:0.1) como eluyente.

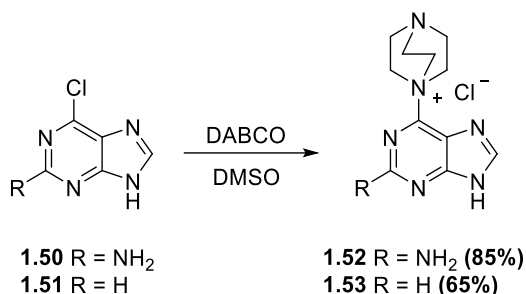


Esquema 1.23. Síntesis de 1.47.

4.1.2.2. Síntesis de derivados de purinas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los metiloxinucleósidos derivados de aminopirimidinas y triazinas, decidimos explorar la síntesis de los metiloxinucleósidos derivados de purinas y así ampliar la colección de nucleósidos no convencionales cuyo potencial biológico pretendíamos estudiar.

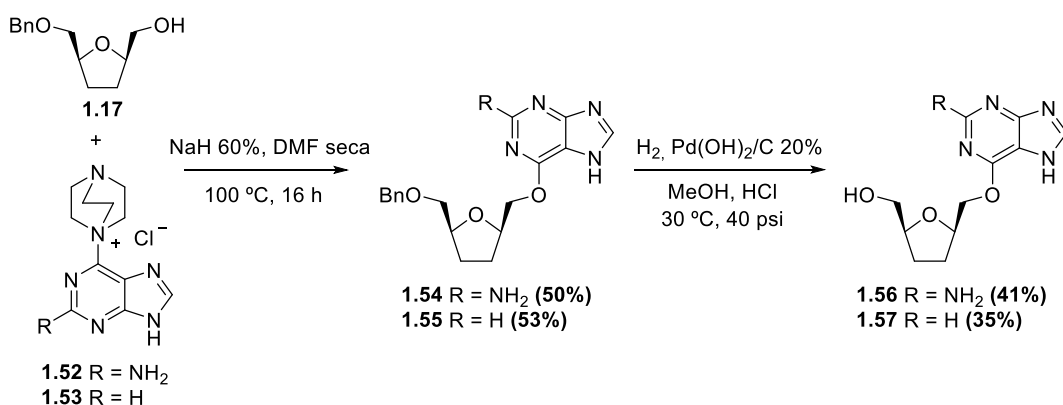
En las reacciones de alquilación¹⁰⁷ las bases púricas son menos reactivas que las bases pirimidínicas. Un método muy eficiente para la síntesis de purinas 6-oxi-sustituidas consiste en el empleo de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) como grupo saliente en la posición C-6 de las purinas lo que facilita la sustitución nucleófila en esta posición. Además, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) en purinas se comporta como mejor grupo saliente que 1-azabicyclo[2.2.2]octano (quinuclidina) o cloro.¹⁰⁷ Por tanto, se procedió a la síntesis de las 6-DABCO purinas mediante reacción de 2-amino-6-cloropurina (**1.50**) y 6-cloropurina (**1.51**) con DABCO en DMSO dando lugar a **1.52** y **1.53** con un 85% y un 65% de rendimiento, respectivamente (Esquema 1.24).



Esquema 1.24. Síntesis de 6-DABCO-purinas.

Según datos experimentales encontrados en bibliografía,¹⁰⁸ los rendimientos de la reacción de sustitución nucleófila en 6-DABCO purinas aumentan si se incrementa la cantidad de base (NaH) empleada en estas reacciones. Está comprobado que es necesario un equivalente de NaH para contrarrestar la acidez del NH en posición 7 de las 6-DABCO purinas, por esta razón, se requieren más equivalentes de NaH para generar el alcóxido en el medio de reacción y que se produzca el ataque nucleófilo a estas purinas. Por tanto, el tratamiento del alcóxido de **1.17** generado *in situ* con NaH al 60% con las 6-DABCO-purinas **1.52** y **1.53** a 100 °C durante toda la noche da lugar a los derivados **1.54** y **1.55** que se obtuvieron con un 50% y un 53% de rendimiento, respectivamente (Esquema 1.25).

La hidrogenolisis posterior de **1.54** y **1.55** con H₂, Pd(OH)₂/C 20% en presencia de cantidades estequiométricas de HCl, a 30 °C y 40 psi (Esquema 1.25), dio lugar a los productos desprotegidos **1.56** y **1.57** con un 41% y un 35% de rendimiento, respectivamente. Al igual que en todos los casos anteriores, todos los compuestos se obtuvieron en forma de mezclas racémicas (2'*RS*,5'*SR*) inseparables.



Esquema 1.25. Síntesis de metiloxinucleósidos de purinas.

Al igual que en los casos anteriores, la asignación estructural de los metiloxinucleósidos se llevó a cabo mediante técnicas de resonancia magnética nuclear. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales (1D-RMN) presentaban complejidad se recurrió a experimentos bidimensionales de RMN (2D-RMN). La asignación de las diferentes señales de ¹H-RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY y NOESY, y las señales de ¹³C-RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ¹H-¹³C de tipo HSQC y HMBC. Dichos experimentos fueron todos realizados bajo las mismas condiciones experimentales.

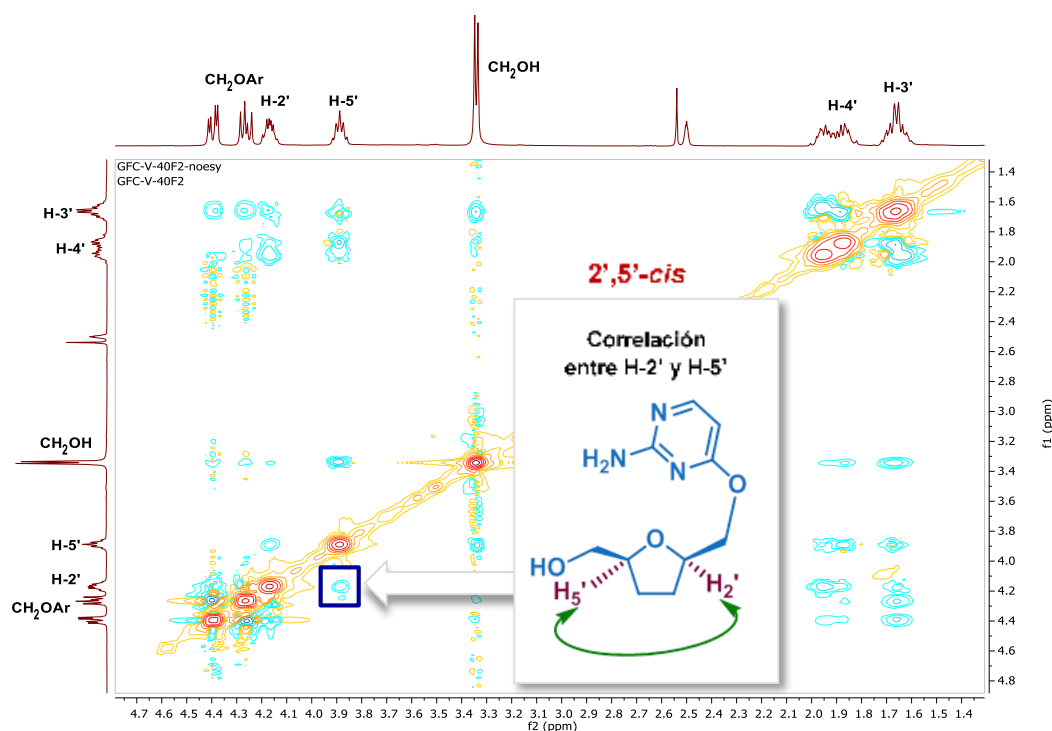


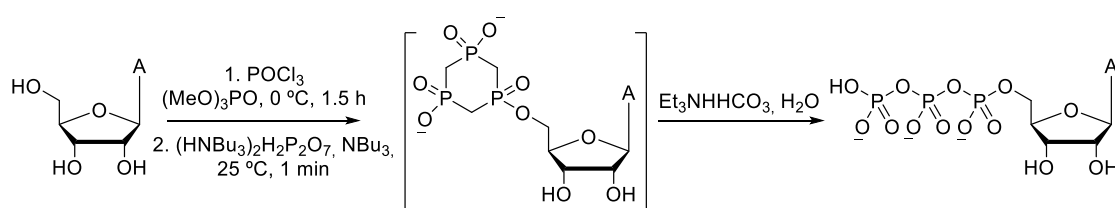
Figura 1.24. Espectro NOESY del análogo de "nucleósido" desprotegido 1.25.

La disposición de los sustituyentes en posiciones 2' y 5' de todos los 3',4'-didesoxinucleósidos se asignó como *cis* en base a experimentos NOESY. En la Figura 1.24 se ilustra un ejemplo de dicha asignación. En el espectro NOESY se observa una fuerte correlación espacial entre los hidrógenos H-2' y H-5', únicamente compatible con una disposición 2',5'-*cis* de dichos hidrógenos.

Todos los metiloxinucleósidos sintetizados hasta este punto fueron ensayados frente a la replicación del virus VIH-1 en cultivo celular resultando inactivos. La falta de actividad podría deberse a que estos compuestos no cumplen los criterios para actuar como terminadores de cadena (en el caso de **1.1b** y **1.16b**), o bien a que no son reconocidos como sustrato de las quinasas que los fosforilarían a los correspondientes trifosfatos para su interacción con la transcriptasa inversa del VIH. Por ello, consideramos interesante estudiar la capacidad de interaccionar con ADN polimerasas (p.ej. con la actividad ADN polimerasa de la TI de VIH) de este nuevo tipo de metiloxinucleósidos. Así, nos planteamos la síntesis del correspondiente nucleósido trifosfato de un ejemplo representativo de todos ellos y ver si éste era capaz de interferir la actividad ADN-polimerasa de la transcriptasa inversa del VIH.

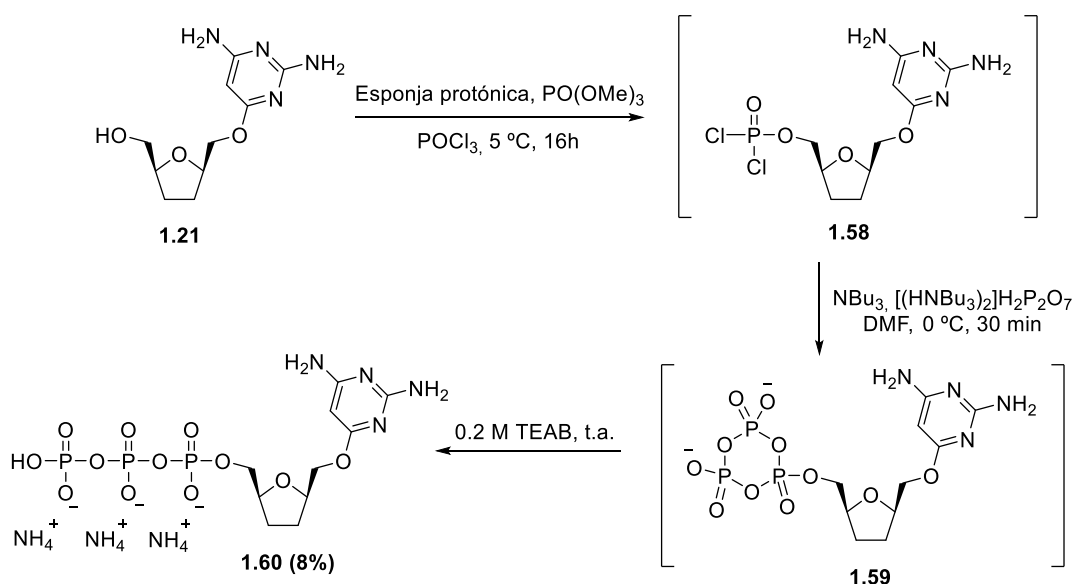
4.1.3. Síntesis del trifosfato 1.60

Uno de los métodos más extendidos para la síntesis de trifosfatos de nucleósidos es el desarrollado por Ludwig¹⁰⁹ a partir de la metodología de Yoshikawa.¹¹⁰ En este método el empleo de trimetilfosfato durante la etapa de fosforilación de los nucleósidos permite aumentar la velocidad de reacción; mientras que la formación de un intermedio ciclado evita la aparición de derivados secundarios tetrafosforilados. Finalmente, la hidrólisis del intermedio con bicarbonato de trietilamonio da lugar a los trifosfatos deseados (Esquema 1.26).



Esquema 1.26. Metodología Ludwig-Yoshikawa^{109,110} para la síntesis de trifosfatos.

Así, para la síntesis del trifosfato deseado (**1.60**) empleamos la metodología Ludwig-Yoshikawa.^{109,110} En primer lugar, fue necesario generar el intermedio de diclorofosfato **1.58** mediante el tratamiento del nucleósido desprotegido **1.21** con oxicloruro de fósforo (POCl_3), en presencia de 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno (esponja protónica) como base y empleando trimetilfosfato como disolvente (Esquema 1.27). Seguidamente, se adicionó pirofosfato de bis(tri-n-butilamonio) en DMF seca y tributilamina para obtener el intermedio cíclico **1.59** que se hidrolizó con una disolución 0.2 M de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) dando lugar al trifosfato deseado **1.60** con un 8% de rendimiento.



Esquema 1.27. Síntesis del trifosfato **1.60**.

Los nucleótidos son compuestos iónicos, por lo tanto, son demasiado polares para retenerse en una columna cromatográfica de fase reversa. Debido a esto, el seguimiento y cuantificación de las reacciones de fosforilación se realiza mediante cromatografía de pares iónicos (CPI)¹¹¹ o cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de pares iónicos permite la utilización de columnas de fase reversa C-18 para el análisis de nucleótidos. La CPI es muy efectiva para trifosfatos de adenosina, uridina, timidina y guanosina. Sin embargo, no funciona bien para el caso de la citidina.¹¹² En nuestro caso, los intentos de seguimiento de reacción de formación del nucleótido **1.60** mediante CPI no permitieron un seguimiento eficaz de la misma ya que **1.60** no forma bien pares iónicos y fue necesario recurrir al uso de la cromatografía de intercambio iónico.

La purificación del nucleótido **1.60** se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico. En este caso, se utiliza una resina de intercambio de aniones DEAE-Sephadex A-25 y como eluyente NH_4HCO_3 acuoso 0.5 M en forma de gradiente. Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente y son retenidas, mientras que las que están cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida y son eluidas. La fuerza de adsorción aumenta con el aumento de la carga neta. A mayor carga neta, mayor es la adsorción y mayor será la concentración de sales que se necesitará para desorber la muestra. Por tanto, los trifosfatos quedarán más retenidos en la resina que los correspondientes di- y monofosfatos. La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue reduciendo la carga neta cambiando el pH del eluyente o aumentando la concentración salina (Figura 1.25). Por último, se liofilizan las fracciones donde se encuentre el analito deseado para eliminar el exceso de NH_4HCO_3 acuoso en forma de amoníaco y dióxido de carbono gaseosos.

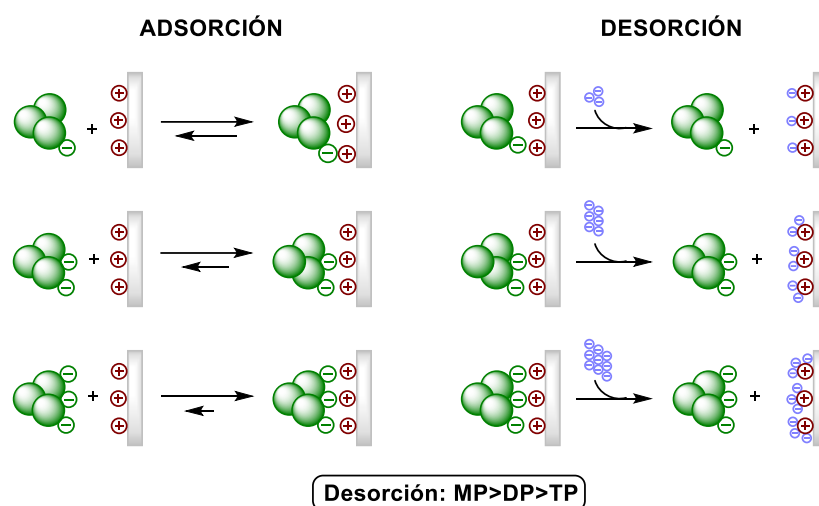
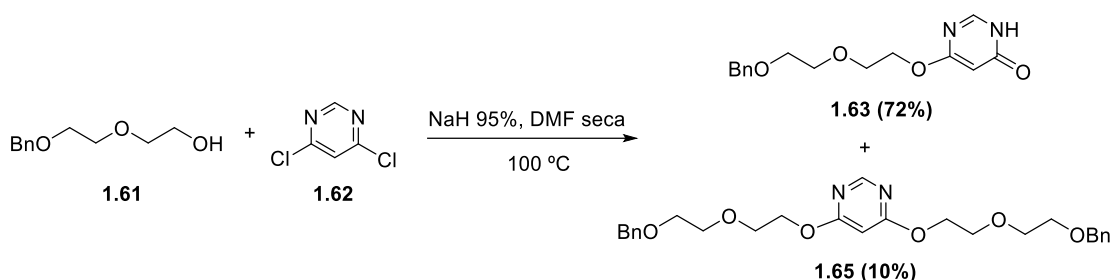


Figura 1.25. Esquema general de la cromatografía de intercambio iónico.

4.1.4. Síntesis de compuestos de estructura dimérica

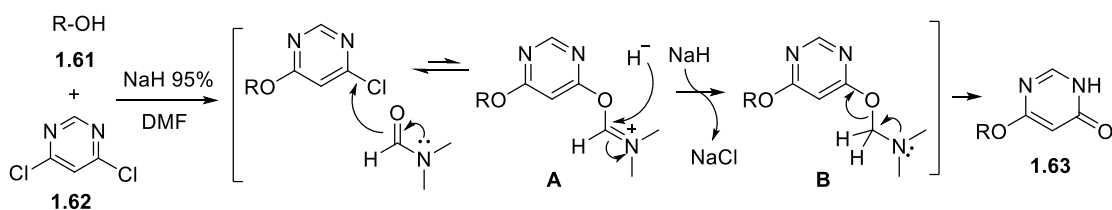
Como se ha comentado anteriormente, en la reacción de alquilación de **1.17** con 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.34**) y 4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.35**) se obtuvieron de forma minoritaria los productos resultantes de disustitución **1.37** y **1.39** como subproductos de la reacción (Esquema 1.17). Con el fin de estudiar el potencial biológico de estos compuestos, se procedió a la optimización de las condiciones de reacción para obtener de forma exclusiva el producto de disustitución. Para ello, se debe llevar a cabo la reacción utilizando un exceso de **1.17** con respecto a la nucleobase (**1.14**).

A fin de optimizar las condiciones de reacción elegimos el alcohol lineal **1.61**¹¹³ para una vez puestas a punto dichas condiciones, aplicarlas al derivado de tetrahidrofurano **1.17**. Así, el tratamiento de 2.5 equivalentes de **1.61**¹¹³ con 1 equivalente de 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) en presencia de 5 equivalentes de NaH al 95% en DMF seca a 100 °C durante la noche dio lugar al producto **1.63** (72% de rendimiento) de forma mayoritaria, donde se ha sustituido uno de los átomos de cloro por una unidad lineal y en el otro se observa la formación de un enlace C=O, junto con el derivado dimérico **1.65** en bajo rendimiento (10%) (Esquema 1.28).



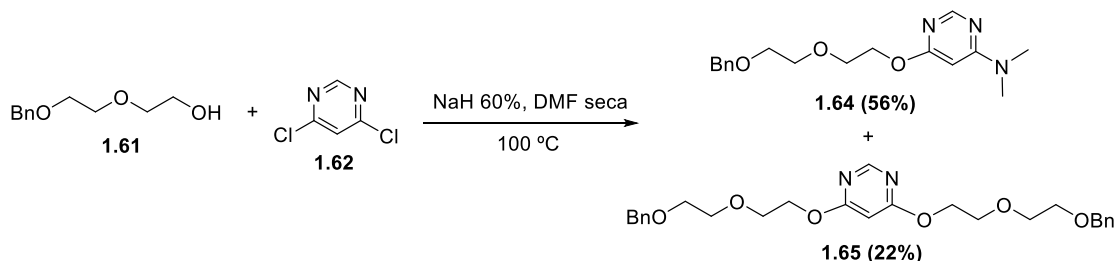
Esquema 1.28. Síntesis del cetoderivado **1.63**.

Este nuevo átomo de oxígeno puede proceder de la DMF utilizada como disolvente. Tal y como se recoge en la bibliografía,¹¹⁴ la DMF además de ser un excelente disolvente polar también puede reaccionar tanto con electrófilos como con nucleófilos y ser una fuente de distintos grupos funcionales. En nuestro caso, la DMF actuaría como dador de oxígeno, y basándonos en la literatura¹¹⁵ proponemos el mecanismo descrito en el Esquema 1.29 para la formación de **1.63**. El átomo de oxígeno de la DMF reaccionaría con el derivado halogenado para formar la sal de amonio **A**. Esta sal sufriría un ataque nucleófilo del anión hidruro (NaH) dando lugar al intermedio **B** que evolucionaría al derivado observado **1.63**. La determinación estructural del cetoderivado **1.63** se realizó a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. En el espectro de IR se observa una banda a 1698 cm⁻¹ que corresponde al grupo carbonilo. Además, en el espectro de ¹³C-RMN se observa una señal a 170.7 ppm correspondiente al C carbonílico.



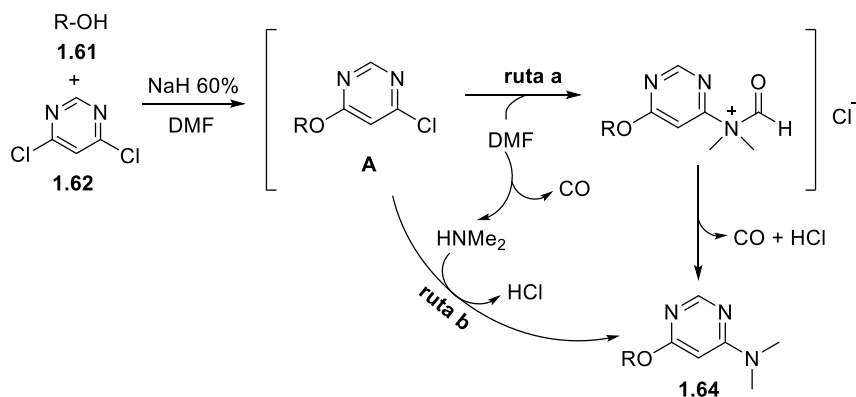
Esquema 1.29. Mecanismo propuesto para la formación del compuesto **1.63**.

Cuando en la reacción de **1.61** con **1.62** se emplea NaH al 60% en lugar de al 95% en DMF seca, se obtiene el derivado **1.64** (56% de rendimiento) resultante de la sustitución de uno de los átomos de Cl por el alcohol **1.61** y el otro por un grupo NMe₂ junto con el derivado dimérico **1.65** en bajo rendimiento (22%) (Esquema 1.30).



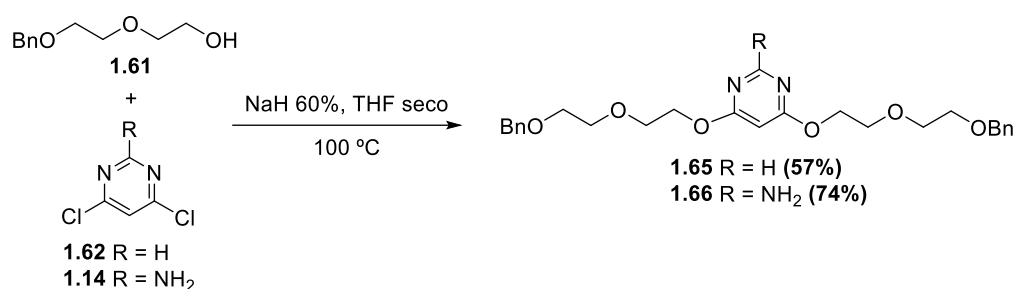
Esquema 1.30. Síntesis del compuesto **1.64**.

La formación del dimetilamino derivado **1.64** podría explicarse por la reacción del sustrato **A** bien con la DMF seguido de la pérdida de monóxido de carbono (Esquema 1.31, ruta a) o bien con la dimetilamina generada por la descomposición de la DMF (Esquema 1.31, ruta b). Es conocido en la literatura¹¹⁶ que cuando se calienta a altas temperaturas la DMF se descompone parcialmente originando dimetilamina y monóxido de carbono. Esta reacción ocurre también a temperatura ambiente en presencia de algunos ácidos o bases.



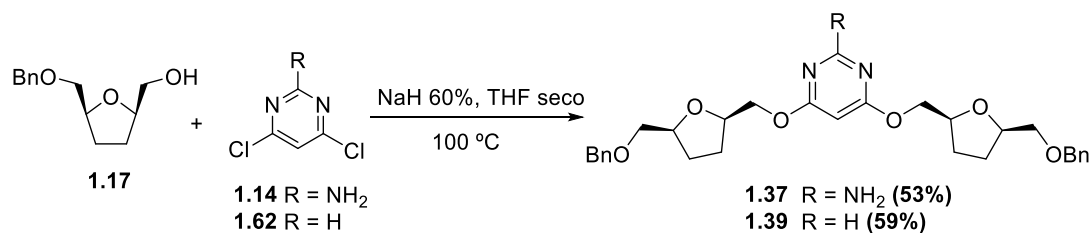
Esquema 1.31. Mecanismo propuesto para la formación del compuesto **1.64**.

Finalmente, cuando la reacción se lleva a cabo en THF seco en lugar de DMF seca (para evitar la formación de productos de sustitución) y en presencia de NaH al 60% se obtuvo el producto de disustitución deseado **1.65** en un 57% de rendimiento. Igualmente se obtiene exclusivamente el derivado disustituido **1.66** con buen rendimiento (74%) cuando **1.61** se hace reaccionar con **1.14** en presencia de NaH al 60% y THF seco como disolvente (Esquema 1.32).



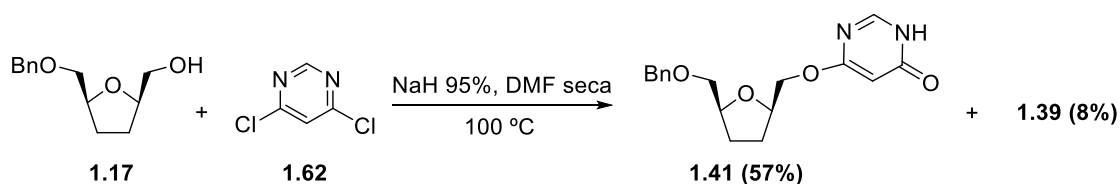
Esquema 1.32. Síntesis de los compuestos disustituidos 1.65 y 1.66.

Una vez puestas a punto las condiciones óptimas de reacción aplicamos dichas condiciones a la obtención de los derivados **1.37** y **1.39** (Esquema 1.33). El tratamiento de 2.5 equivalentes de **1.17** con 1 equivalente de 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) o de 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) con NaH al 60% en THF seco a 100 °C durante la noche condujo a los productos disustituidos deseados **1.37** y **1.39** en un 53% y 59% de rendimiento, respectivamente.



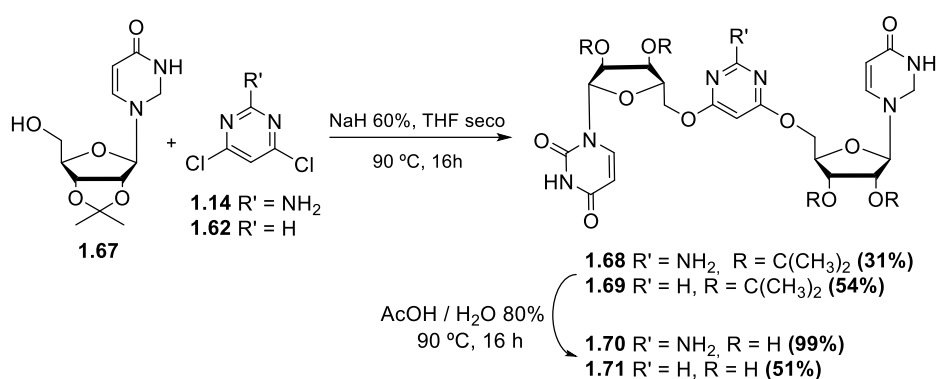
Esquema 1.33. Síntesis de los compuestos disustituidos 1.37 y 1.39.

Asimismo, se llevó a cabo la reacción de **1.17** con **1.62** con NaH al 95% en DMF, lo que permitió obtener el producto monosustituido **1.41** (57%) que no fue posible obtener por vía directa a partir de **1.38** por reacción con BBr₃ (Esquema 1.19). En la reacción se obtuvo una pequeña proporción del derivado disustituido **1.39** (8%) (Esquema 1.34). Al igual que en el caso de **1.63** la presencia en el espectro de IR de una banda a 1676 cm⁻¹ y de la señal a 169.1 ppm en el espectro de ¹³C-RMN confirmó la estructura del cetoderivado **1.41**.



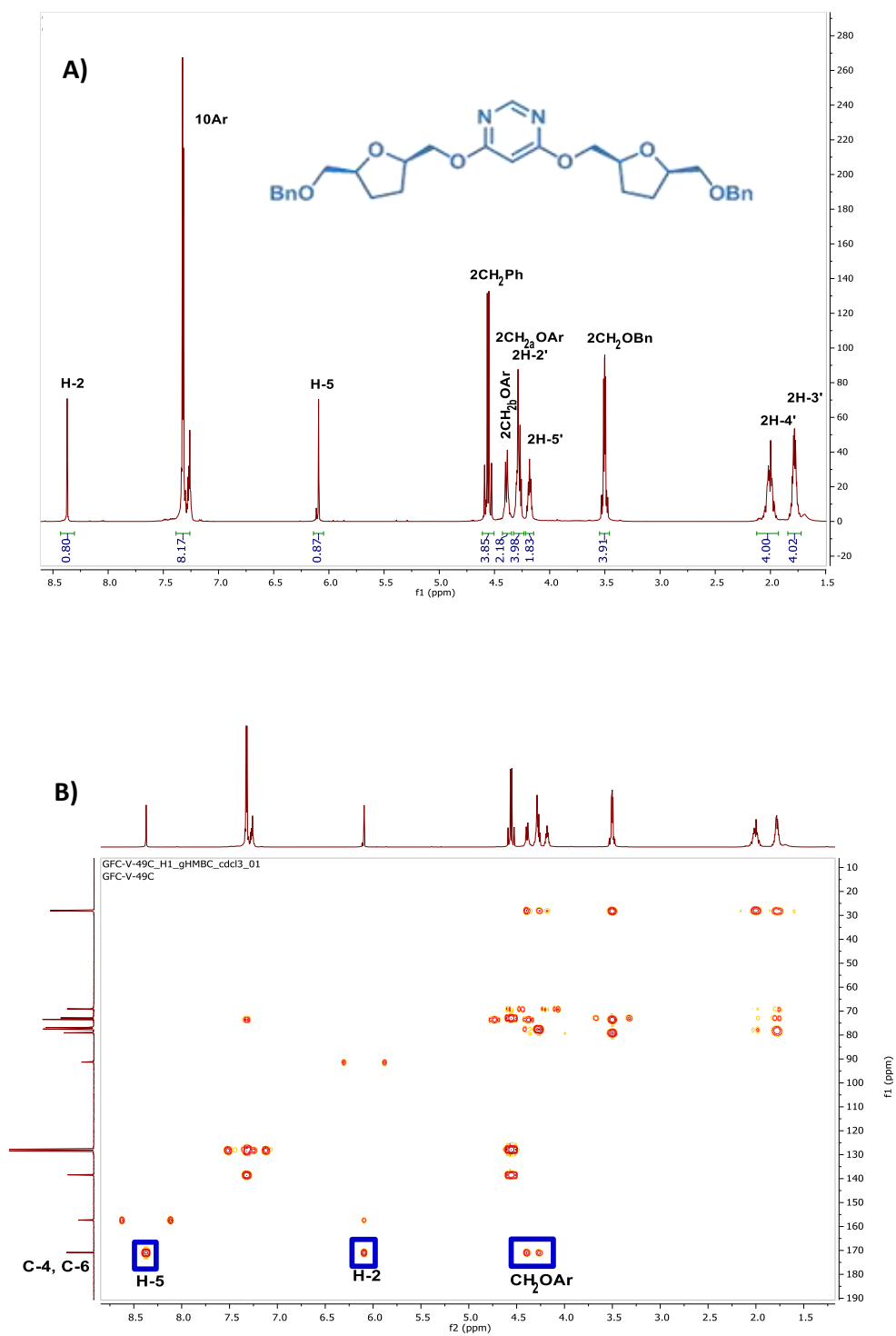
Esquema 1.34. Síntesis del cetoderivado 1.41.

Finalmente, preparamos los derivados de uridina **1.70** y **1.71**. Así, el tratamiento de uridina convenientemente protegida (**1.67**) con las pirimidinas **1.14** o **1.62** en presencia de NaH al 60% y THF anhidro condujo a los productos esperados **1.68** y **1.69** en un 31% y 54%, respectivamente. La desprotección de estos compuestos en condiciones ácidas (AcOH/H₂O 80%, 90 °C, 16 horas) dio lugar a los derivados **1.70** y **1.71** con un 99% y un 51%, respectivamente (Esquema 1.35).



Esquema 1.35. Síntesis de los compuestos **1.70** y **1.71**.

La asignación estructural de los derivados de estructura dimérica se llevó a cabo mediante RMN, de forma análoga a la descrita anteriormente para los metiloxinucleósidos. Esta asignación se ilustra con un ejemplo recogido en la Figura 1.26. Los valores de la integral en el espectro de ¹H-RMN confirmaron la presencia de dos unidades de tetrahidrofurano (Figura 1.26A). La posición de estos anillos pudo determinarse inequívocamente mediante espectros de HMBC donde se observa que ambos carbonos cuaternarios C-4 y C-6 de la pirimidina central se unen directamente al CH₂OAr, únicamente compatible con una especie dimérica como la que se propone (Figura 1.26B).

Figura 1.26. Espectro ¹H-RMN y HMBC del derivado 1.39.

4.2. ESTUDIO CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN POR RMN DE LOS METILOXINUCLEÓSIDOS 1.16b y 1.25

Con el fin de determinar si la libertad conformacional del anillo de furanosa estaba restringida en esta nueva familia de metiloxinucleósidos no convencionales, se llevaron a cabo estudios conformacionales en disolución de los compuestos **1.16b** y de su 3',4'-didesoxi análogo **1.25**. La conformación global de un nucleósido "clásico" (Figura 1.27) viene definida mediante los siguientes parámetros:

- La conformación alrededor del enlace exocíclico C4'-C5' que indica la orientación relativa del grupo 5'-OR respecto a la furanosa y está definida por el ángulo γ .
- La conformación alrededor del enlace glicosídico que se representa mediante el ángulo de torsión χ , y aporta información sobre la orientación relativa de la base con respecto al anillo de furanosa.
- La conformación del anillo de furanosa que puede presentar dos posibles conformaciones: "sobre" o "twist".

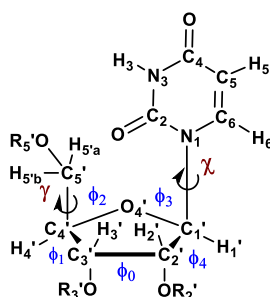


Figura 1.27. Parámetros que definen la conformación global de un nucleósido "clásico".

Dado que los compuestos **1.16b** y **1.25** no responden a la estructura de un nucleósido "clásico", para definir la conformación global de este tipo de nucleósidos se han de tener en cuenta previamente los siguientes parámetros conformacionales (Figura 1.28):

- (1) La conformación alrededor de los enlaces exocíclicos C5'-C6' y C2'-C1' que indican la orientación relativa de los grupos 6'-OR o 1'-OBase respecto a la furanosa y está definida por los ángulos γ .
- (2) La conformación alrededor del "enlace glicosídico" C1'-OBase que se representa mediante el ángulo de torsión χ , y aporta información sobre la orientación relativa de la base con respecto al anillo de furanosa.
- (3) La conformación del anillo de furanosa que puede presentar dos posibles conformaciones: "sobre" o "twist".

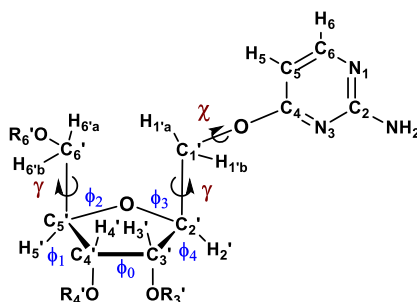


Figura 1.28. Parámetros que definen la conformación global de nuestros metiloxinucleósidos.

Hay que destacar que la numeración del anillo de furanosa en el caso de los nucleósidos no convencionales no coincide con la numeración de estos anillos en los nucleósidos clásicos, dado que lo que se está determinando es la conformación del anillo de furanosa. Los números se ven incrementados en una unidad [C1'(2')-C2'(3')-C3'(4')-C4'(5')-C5'(6')]. En paréntesis se recoge el número que corresponde a los carbonos del anillo furanósico de estos nucleósidos no convencionales.

4.2.1. Determinación de la conformación del anillo de furanosa

El plegamiento del anillo de furanosa en disolución se puede determinar usando el concepto de pseudorrotación.^{117,118} Los anillos de cinco eslabones pueden adoptar conformaciones tipo “sobre” o tipo “twist”, a lo largo de lo que se denomina el circuito pseudorrotacional (Figura 1.29). Cada conformación del anillo de furanosa viene definida mediante dos parámetros pseudorrotacionales: el ángulo de fase de pseudorrotación (P) y la amplitud de plegamiento o desviación de la planaridad del anillo de furanosa (τ_m).¹¹⁹ Dichos parámetros pseudorrotacionales se relacionan matemáticamente con los cinco ángulos endocíclicos ϕ_0 - ϕ_4 que definen la geometría del anillo de furanosa.¹²⁰

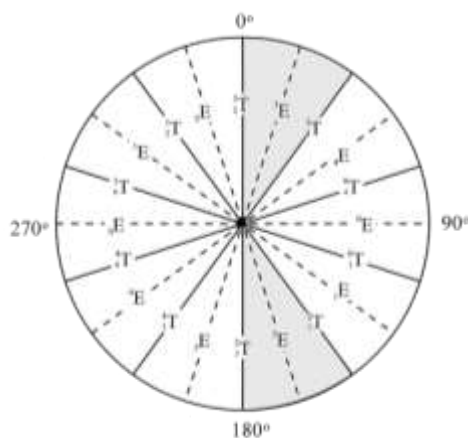


Figura 1.29. Circuito pseudorrotacional para anillos de 5 miembros.

Los anillos furanósicos en nucleósidos, en la mayoría de los casos, adoptan conformaciones en dos estrechos intervalos del circuito pseudorrotacional con confórmeros N (norte) y S (sur) centrados a valores de P de 18° y 162° , respectivamente (zona sombreada, Figura 1.29). Dado que el anillo de furanosa es altamente flexible en disolución, es posible la existencia de un equilibrio conformacional N/S, de forma que las constantes de acoplamiento son valores promedio de las correspondientes a ambos confórmeros. Por lo tanto, a partir de los valores de las constantes interprotónicas ($^3J_{H,H}$) y del programa PSEUROT¹²¹ (que asume la existencia de un equilibrio entre dos confórmeros N y S), es posible obtener información sobre la geometría y la población de ambos confórmeros Norte y Sur en disolución. El programa calcula, a partir de dichas constantes de acoplamiento, los valores de P y τ y las fracciones molares (X_n) para cada confórmero existente en disolución (P_N , τ_N , P_S , τ_S y X_n).

Para obtener una solución inequívoca son necesarias al menos cinco constantes de acoplamiento interprotónicas. Para el caso, del compuesto **1.25** se disponen de ocho variables, por lo tanto, el sistema se encuentra perfectamente definido. En cambio para el compuesto **1.16b**, solamente se disponen de tres constantes experimentales, por lo que será necesario constreñir el valor de dos variables para realizar el cálculo. En este caso, se constriñe el valor del plegamiento haciendo cálculos a partir de las estructuras minimizadas obtenidas mediante mecánica molecular. Los ángulos diedros obtenidos mediante estos cálculos guardan una buena relación con los obtenidos a partir de RMN, siendo en ambos casos mínimos de energía.

Los resultados obtenidos para ambos compuestos se muestran en la Tabla 1.4. Los parámetros conformacionales obtenidos para el compuesto **1.16b** ($P_N = 43.0^\circ$, $\tau_N = 40.0^\circ$, $P_S = 133.5^\circ$, $\tau_S = 40.0^\circ$ y $X_n = 0.34$) corresponden a un equilibrio conformacional entre una conformación tipo sobre ${}_4E$ y a una conformación tipo sobre ${}_1E$ pero desplazado hacia el confórmero Sur (${}_1E$). Es decir, este compuesto presenta conformaciones para el anillo de furanosa en una zona próxima aunque distinta a donde aparecen los nucleósidos “clásicos” (Figura 1.30).

Tabla 1.4. Parámetros pseudorrotacionales para **1.16b** y **1.25** obtenidos mediante el programa PSEUROT.

<i>J</i>	1.16b		1.25	
	Exp. ^a	Calc.	Exp. ^{a,b}	Calc.
$J_{H2',H3'a}$	6.58	6.68	5.30	5.18
$J_{H2',H3'b}$	-		6.20	6.34
$J_{H3'a,H4'a}$	5.35	5.17	7.00	6.89
$J_{H3'a,H4'b}$	-		6.50	6.51
$J_{H3'b,H4'a}$			6.50	6.33
$J_{H3'b,H4'b}$	-		7.10	6.89
$J_{H4'a,H5'}$	4.32	4.42	5.80	5.97
$J_{H4'b,H5'}$			6.00	6.24
P_N		43.0		8.1
τ_N		40.0 ^c		39.4
P_S		133.5		158.5
τ_S		40.0 ^c		36.9
X_n		0.34		0.47
r.m.s. ^d		0.13		0.16

^a Medidas en DMSO a 400 MHz. Constantes de acoplamiento en Hz.

^b Valores obtenidos mediante simulación del espectro.

^c Valores constreñidos.

^d Valor cuadrático medio en Hz.

Para el caso del compuesto **1.25** los parámetros conformacionales ($P_N = 8.1^\circ$, $\tau_N = 39.4^\circ$, $P_S = 158.5^\circ$, $\tau_S = 36.9^\circ$ y $X_n = 0.47$) (Tabla 1.4) nos muestran que el anillo de furanosa adopta un equilibrio entre una conformación tipo ³E y otra tipo ²E (Figura 1.30) dentro del rango habitual para didesoxinucleósidos ($P_N = 0-36$ y $P_S = 144-180$).¹²²

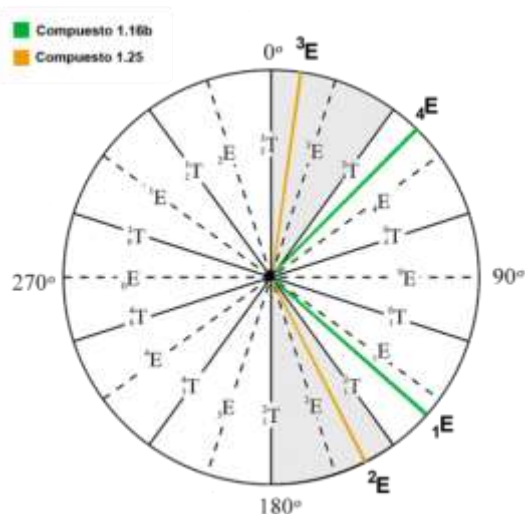


Figura 1.30. Circuito pseudorrotacional para los compuestos **1.16b** y **1.25**.

4.2.2. Determinación de la conformación alrededor de los enlaces exocíclicos C5'-C6' y C2'-C1'

El análisis conformacional alrededor del enlace exocíclico C5'-C6' se lleva a cabo a partir de las constantes de acoplamiento $^3J_{H5'-H6'a}$ y $^3J_{H5'-H6'b}$ aceptando como modelo la existencia de un equilibrio entre tres rotámeros de mínima energía, denominados gauche+ (g+), gauche- (g-) y trans (t) (Figura 1.31).^{123,124}

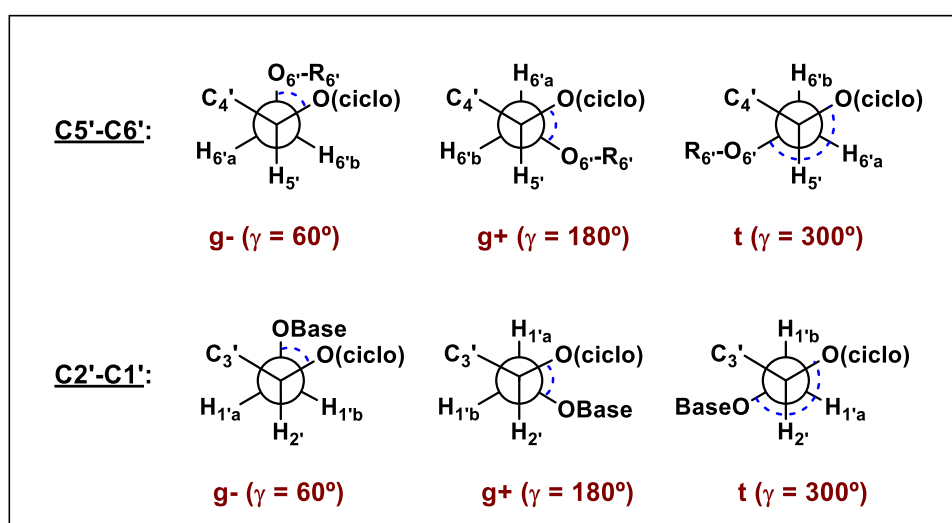


Figura 1.31. Rotámeros de los enlaces exocíclicos C5'-C6' y C2'-C1'.

La población de los tres rotámeros (n_{g^+} , n_{g^-} y n_t) se puede determinar a partir del valor de las constantes de acoplamiento vecinales entre H5' y los dos protones H6' ($^3J_{H5'-H6'a}$ y $^3J_{H5'-H6'b}$) ya que no es posible medir experimentalmente las constantes de acoplamiento de cada rotámero, éstas deben ser calculadas mediante la ecuación de Karplus generalizada, parametrizada para tres sustituyentes.¹²⁵ En la Tabla 1.5 se recogen los valores de las constantes de acoplamiento experimentales así como las poblaciones de los rotámeros, calculadas a partir de las mismas, para los nucleósidos **1.16b** y **1.25**. Los datos reflejados en la tabla indican que para ambos compuestos no existe un rotámero predominante en disolución, lo que sugiere una situación de libre giro alrededor del enlace C5'-C6'.

Tabla 1.5. Constantes de acoplamiento (Hz) y parámetros conformacionales para los compuestos **1.16b** y **1.25** para los enlaces exocíclicos C5'-C6' y C2'-C1'.

Enlace exocíclico C5'-C6'		Compuestos	
		1.16b	1.25
Constantes de acoplamiento	$^3J_{H5',H6'a}$	4.2	5.2
	$^3J_{H5',H6'b}$	5.0	5.2
Parámetros conformacionales	n_{g-}	35	31
	n_{g+}	33	34
	n_t	32	35
Enlace exocíclico C2'-C1'		Compuestos	
		1.16b	1.25
Constantes de acoplamiento	$^3J_{H2',H1'a}$	3.2	3.7
	$^3J_{H2',H1'b}$	6.7	6.7
Parámetros conformacionales	n_{g-}	47	47
	n_{g+}	43	50
	n_t	10	3

Asimismo, se estudió en ambos compuestos la conformación alrededor del enlace exocíclico C1'-C2' empleando el mismo modelo. Para el compuesto **1.16b**, los valores experimentales de $^3J_{H1'a,H2'} = 3.2$ Hz y $^3J_{H1'b,H2'} = 6.7$ Hz, sugieren una preferencia aproximadamente igual por los rotámeros g- (47%) y g+ (43%). Al igual que para el compuesto **1.25** cuyos valores experimentales de $^3J_{H1'a,H2'} = 3.7$ Hz y $^3J_{H1'b,H2'} = 6.7$ Hz indican también una preferencia en disolución por los rotámeros g- (47%) y g+ (50%) (Tabla 1.5).

4.2.3. Determinación de la conformación alrededor del “enlace glicosídico” (C1'-O4-Base)

Finalmente, la conformación alrededor del “enlace glicosídico” (C1'-O4-Base) (disposición de la base respecto al anillo de furanosa) se determinó a partir de los picos de cruce correspondientes a la señal del protón H-5 de la base nucleosídica observados en experimentos NOESY. Así, mientras que para el compuesto **1.25** se observan picos de correlación del protón H-5 con alguno de los protones de la cara- β de la furanosa (H-6'a, H-6'b y H-3'a) (Figura 1.33), para el compuesto **1.16b** sólo se observa una correlación pequeña con H-6'a (Figura 1.32). Estos datos apuntan a una preferencia por la conformación *anti* para este enlace en ambos compuestos.

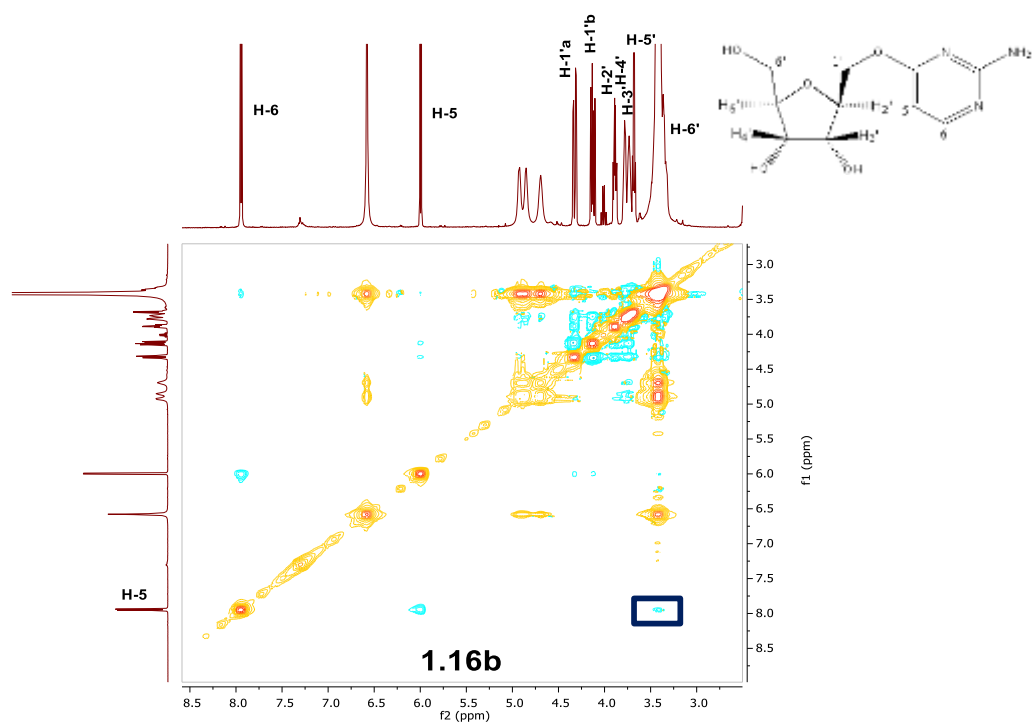


Figura 1.32. Experimentos NOESY del compuesto 1.16b.

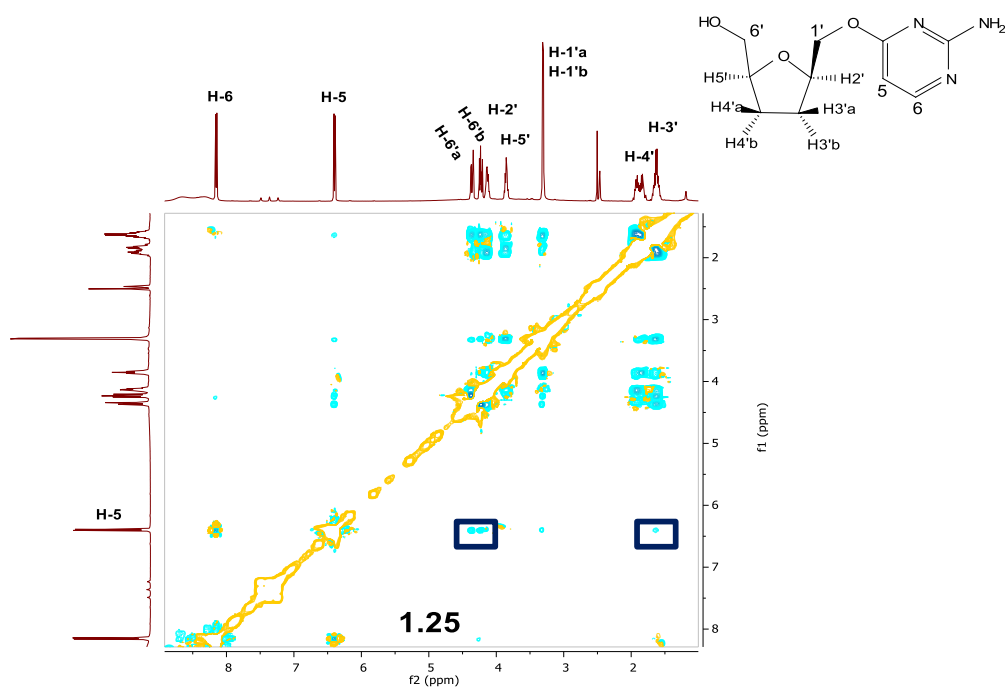


Figura 1.33. Experimentos NOESY del compuestos 1.25.

Con el fin de contrastar las conformaciones calculadas a partir de los datos de RMN llevamos a cabo una minimización por mecánica molecular (MM) de dichos confórmeros. Los ángulos diedros obtenidos guardan una buena relación con los obtenidos a partir de RMN, siendo en ambos casos mínimos de energía. En la Figura 1.34 se representan los modelos moleculares para los confórmeros en ambos compuestos (**1.16b** y **1.25**) a partir de los ángulos diedros, calculados mediante la ecuación de Karplus-Altona para las distintas constantes de acoplamiento recogidas en la Tabla 1.4, así como la conformación alrededor del “enlace glicosídico” (C1'-O4-Base) determinada mediante experimentos NOESY.

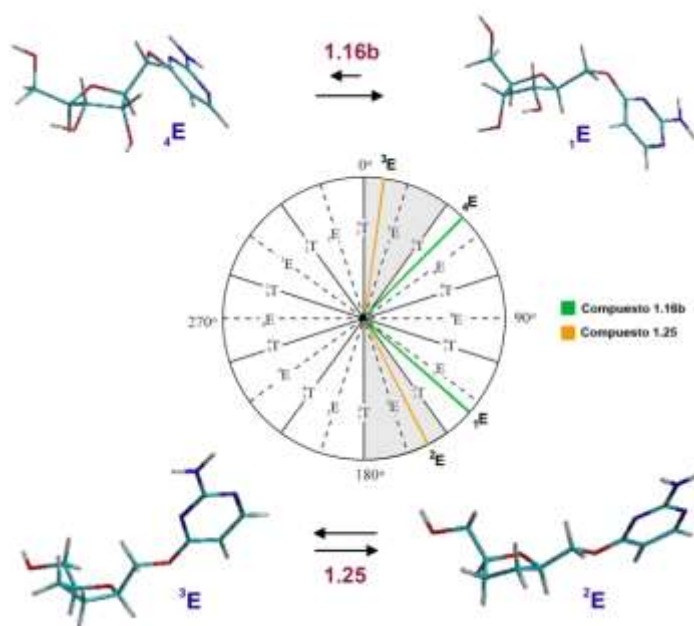


Figura 1.34. Modelos moleculares de los confórmeros MM de los compuestos **1.16b** y **1.25**, determinados mediante el programa PSEUROT.

A modo de resumen, y como se observa en la Tabla 1.5 y en la Figura 1.34, los dos metiloxinucleósidos estudiados muestran una preferencia por una conformación *anti* en la orientación de la base respecto del anillo de furanosa, una situación de libre giro en la conformación del enlace exocíclico C5'-C6' y una preferencia por los rotámeros g⁺ y t en la conformación del enlace exocíclico C2'-C1'.

En lo que respecta a la conformación del anillo de furanosa, para **1.16b** muestra la existencia de un equilibrio conformacional entre una conformación tipo N que corresponde a un sobre ${}_4E$ ($P_N = 43.0^\circ$) [los cuatro átomos del anillo de furanosa (C5'-O-C2'-C3') están en el mismo plano y el átomo C4' localizado por debajo del plano definido por los 4 átomos anteriores] y una conformación tipo S que corresponde a un sobre ${}_1E$ ($P_S = 133.5^\circ$) [los cuatro átomos del anillo de furanosa (C4'-O-C2'-C3') están en el mismo plano y el átomo C1' localizado por debajo del plano definido por los 4 átomos anteriores],

con dicho equilibrio ligeramente desplazado hacia la conformación tipo Sur. Dicho equilibrio está próximo aunque en distinta zona donde aparecen los nucleósidos “clásicos”. Para **1.25** dicho equilibrio conformacional está dentro del rango N/S habitual de los didesoxinucleósidos. Así, el anillo de furanosa adopta un equilibrio entre una conformación tipo N³E ($P_N = 8.1^\circ$) y una conformación tipo Sur²E ($P_S = 158.5^\circ$). Por otra parte, los dos derivados muestran altos grados de plegamiento (τ) de dicha furanosa ($\tau_N = 40.0$, $\tau_S = 40.0$ para **1.16b** y $\tau_N = 39.4$, $\tau_S = 36.9$ para **1.25**).

4.3. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METILOXINUCLEÓSIDOS SINTETIZADOS

Dada la novedad estructural de los “nucleósidos” descritos en este capítulo decidimos explorar el perfil actividad/toxicidad de los mismos.

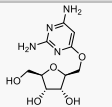
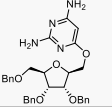
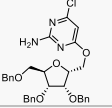
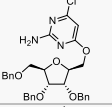
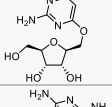
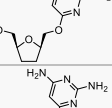
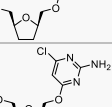
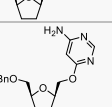
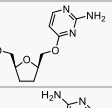
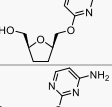
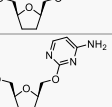
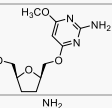
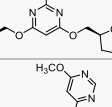
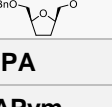
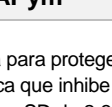
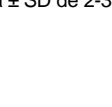
4.3.1. Evaluación biológica frente a la replicación del VIH-1 y VIH-2

Primeramente se evaluaron los compuestos frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando líneas celulares T-linfocíticas CD4⁺ (CEM) por el equipo del Prof. Jan Balzarini en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

Estos ensayos se basaron en la inhibición del efecto citopático inducido por VIH-1 y VIH-2 en células CEM/0 según procedimientos descritos.¹²⁶ En ambos casos, la actividad antiviral se expresa en CE₅₀ o concentración efectiva 50, que se define como la concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH. Paralelamente, se evalúa la toxicidad de los compuestos en líneas celulares, que se expresa como CC₅₀ o concentración citotóxica 50, que se define como la concentración citotóxica que inhibe el crecimiento del 50% de las células no infectadas. Los resultados de dicha evaluación se hayan recogidos en la Tabla 1.6.

Aunque ninguno de los compuestos mostró actividad anti-VIH a concentraciones subtóxicas, no podía descartarse que esta inactividad antiviral fuera debida a la falta de conversión metabólica de estos nucleósidos no convencionales a los correspondientes 5'-trifosfatos quizá porque no fuesen reconocidos por las quinasas que los fosforilarían a los correspondientes trifosfatos necesarios para su interacción con la transcriptasa inversa (TI) del VIH. Los nucleósidos se ensayaron frente a distintas quinasas [incluidas la timidina quinasa-1 (TK-1), timidina quinasa-2 (TK-2), timidina quinasa de herpes (HSV-1 TK) desoxinucleósido quinasa de drosófila melanogaster (Dm-dNK), timidina quinasa del virus varicela zoster (VZV-TK)]. Todos los nucleósidos fueron malos sustratos de las quinasas con CI₅₀ > 500 μ M.

Tabla 1.6. Actividad anti-VIH-1 y -VIH-2 y propiedades citostáticas de los compuestos de ensayo en linfocitos T humanos (CEM).

Compuesto	CE ₅₀ (μM) ^{a,c}		CC ₅₀ (μM) ^{b,c}	
	VIH-1	VIH-2		
1.1b		>100	>100	>250
1.4a,b		>10	>10	23 ± 2.1
1.15a		>250	>250	>250
1.15b		>10	>10	35 ± 8.5
1.16b		>100	>100	>250
1.20		>250	>250	>250
1.21		>250	>250	>250
1.23		>50	>50	110 ± 4.9
1.24		>50	>50	129 ± 7.1
1.25		>250	>250	>250
1.26		>250	>250	>250
1.28		>250	>250	>250
1.29		>250	>250	>250
1.36		>10	>10	52 ± 2.8
1.37		>10	>10	28 ± 4.2
1.38		>10	>10	50 ± 2.8
(R)-PMPA		1.1 ± 0.7	1.3 ± 1.2	>250
PMEO-DAPym		2.7 ± 1.2	1.9 ± 0.6	33

^a Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático de VIH-1 y VIH-2.

^b Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento al 50% de las células no infectadas.

^c Los datos son la media ± SD de 2-3 experimentos independientes.

Tabla 1.6 (continuación).

Compuesto	CE ₅₀ (μM) ^{a,c}		CC ₅₀ (μM) ^{b,c}	
	VIH-1	VIH-2		
1.39		>10	>10	21 ± 3.5
1.42		>50	>50	>50
1.43		>50	>50	>50
1.46		>250	>250	>250
1.47		>250	>250	>250
1.49		>50	>50	>50
1.54		>50	>50	191 ± 16
1.55		>2	>2	13 ± 0.71
1.56		>250	>250	>250
1.57		>250	>250	>250
(R)-PMPA		1.1 ± 0.7	1.3 ± 1.2	>250
PMEO-DAPym		2.7 ± 1.2	1.9 ± 0.6	33

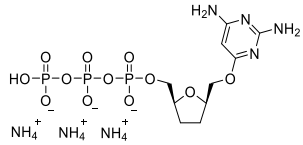
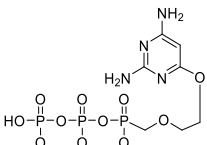
^a Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático de VIH-1 y VIH-2.

^b Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento al 50% de las células no infectadas.

^c Los datos son la media ± SD de 2-3 experimentos independientes.

Por tanto, con el fin de estudiar la capacidad de este nuevo tipo de metiloxinucleósidos de interactuar con las ADN polimerasas [p. ej. la actividad de la ADN polimerasa de la transcriptasa inversa (TI) del VIH] preparamos el compuesto **1.60** (trifosfato derivado del compuesto **1.21**) como compuesto modelo y se evaluó su actividad inhibitoria frente a la transcriptasa inversa del VIH-1 donde se incluyó como control positivo a PMEODAPym-pp. Como se muestra en la Tabla 1.7, **1.60** interactúa con la TI del VIH-1 sólo cuando se emplea poli(rU:dA) como molde/cebador al igual que ocurre en el caso de PMEODAPym-pp. Dado que la TI del VIH-1 es inhibida por **1.60** únicamente en presencia de este molde/cebador,⁸³ se podría asumir que este compuesto, actúa como un mimético de nucleótido de adenina al igual que PMEODAPym-pp, aunque es peor sustrato de la polimerasa que PMEODAPym-pp.

Tabla 1.7. Actividad inhibitoria del compuesto **1.60** y DAPym-pp frente a la TI de VIH-1 con distintos moldes/cebadores (template/primers) y sustratos radiomarcados.

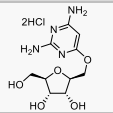
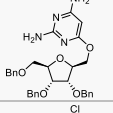
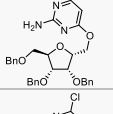
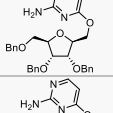
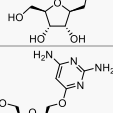
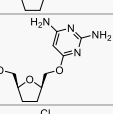
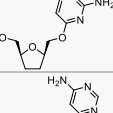
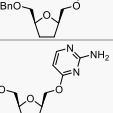
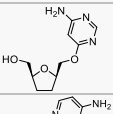
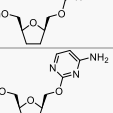
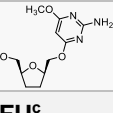

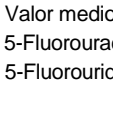

		 1.60			 PME0-DAPym-pp		
Molde/cebador	Sustrato		CI ₅₀ (μM) ^a				
			1.60	PME0-DAPym-pp			
poli(rC:dG)	dGTP	MgCl ₂	>500	>100			
poli(rC:dG)	dGTP	MnCl ₂	>500	14 ± 2			
poli(rA:dT)	dTTP	MgCl ₂	>500	>100			
poli(rl:dC)	dCTP	MgCl ₂	>500	>100			
poli(rU:dA)	dATP	MnCl ₂	352	0.75 ± 0.66			

^a Concentración inhibitoria 50%; los datos son la media ± SD de por lo menos 1-4 experimentos independientes.

4.3.2. Evaluación biológica frente a distintas líneas tumorales

Según se observa en la Tabla 1.6 los compuestos **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39**, y **1.55** resultaron ser citostáticos en células T-linfocíticas CEM tumorales con valores de CC₅₀ en un rango entre 13 y 50 μM, lo que nos llevó a explorar el potencial de los mismos como antitumorales. Así, los compuestos se ensayaron en distintas líneas celulares tumorales, incluyendo leucemia murina L1210, carcinoma de próstata humano PC3, carcinoma de riñón CAKI-1 y células de carcinoma de cérvix humano HeLa. Los resultados de dichos ensayos se recogen en las Tablas 1.8 y 1.9, en las que se incluyen el 5-Fluorouracilo y la 5-Fluorouridina como controles positivos. Como se observa en las Tablas 1.8 y 1.9, la mayoría de los compuestos ensayados resultaron ser citostáticos frente a las distintas líneas celulares tumorales ensayadas. En lo que respecta a los nucleósidos (Tabla 1.8) los que mejores actividades mostraron en las distintas líneas celulares fueron los derivados de pirimidinas **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36** y **1.38** y el derivado de purina **1.55** con actividades en el rango micromolar. Los derivados portadores de un anillo de triazina (**1.46** y **1.47**) resultaron activos aunque a altas concentraciones y solo frente leucemia murina (L1210) y carcinoma de riñón (CAKI-1). Además según se deduce de los datos reflejados en la tabla estos nucleósidos presentan una clara tendencia hacia una mejor actividad citostática en los ensayos de proliferación frente a leucemia y células tumorales de linfomas que frente a células tumorales de carcinomas sólidos (HeLa, PC3, CAKI-1).

Tabla 1.8. Actividad antiproliferativa expresada con CI_{50} (μM)^a de los “nucleósidos” en células tumorales de leucemia murina (L1210), linfocitos T humanos (CEM), células de carcinoma de cérvix humano (HeLa), células de carcinoma de próstata (PC3) y células de carcinoma de riñón humano (CAKI-1).

Compuesto	CI_{50} (μM) ^b				
	L1210	CEM	HeLa	PC3	CAKI-1
1.1b 	175 ± 21	>250	>250	>250	137 ± 53
1.4a,b 	18 ± 1	23 ± 2	22 ± 1	22 ± 2	22 ± 1
1.15a 	>250	>250	>250	>250	>250
1.15b 	33 ± 0	35 ± 8	104 ± 14	45 ± 7	76 ± 17
1.16b 	>250	>250	>250	>250	202 ± 68
1.20 	>250	>250	>250	130 ± 12	144 ± 1
1.21 	>250	>250	>250	>250	>250
1.23 	132 ± 1	110 ± 5	179 ± 7	115 ± 7	120 ± 34
1.24 	182 ± 16	129 ± 7	208 ± 60	136 ± 9	127 ± 7
1.25 	>250	>250	>250	>250	156 ± 81
1.26 	>250	>250	>250	>250	154 ± 35
1.28 	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250
1.29 	≥250	>250	230 ± 5	≥250	202 ± 16
1.36 	70 ± 4	52 ± 3	171 ± 6	69 ± 6	107 ± 21
5-FU^c	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	1.6 ± 1.0	2.6 ± 0.4
5-Fud^d	0.014 ± 0.000	-	0.014 ± 0.002	-	0.046 ± 0.016

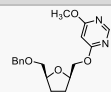
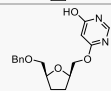
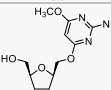
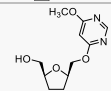
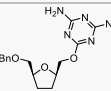
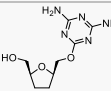
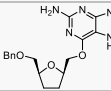
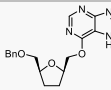
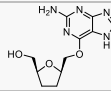
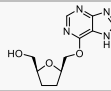
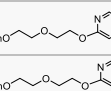
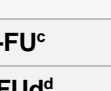
^a Concentración inhibitoria 50%.

^b Valor medio de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^c 5-Fluorouracilo.

^d 5-Fluorouridina.

Tabla 1.8. (continuación).

Compuesto	CI ₅₀ (μM) ^b				
	L1210	CEM	HeLa	PC3	CAKI-1
1.38 	83 ± 1	50 ± 3	67 ± 17	90 ± 10	90 ± 4
1.41 	206 ± 62	>250	211 ± 54	>250	148 ± 11
1.42 	>250	>250	>250	>250	240 ± 14
1.43 	196 ± 35	>250	≥250	≥250	150 ± 39
1.46 	235 ± 20	>250	>250	>250	134 ± 2
1.47 	>250	>250	>250	>250	210 ± 27
1.54 	140 ± 6	191 ± 16	203 ± 6	189 ± 2	184 ± 13
1.55 	29 ± 6	13 ± 1	220 ± 42	84 ± 35	139 ± 8
1.56 	≥250	>250	>250	>250	183 ± 10
1.57 	>250	>250	>250	>250	≥250
1.63 	239 ± 15	>250	>250	>250	151 ± 89
1.64 	130 ± 3	159 ± 9	>250	135 ± 7	133 ± 42
5-FU^c	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	1.6 ± 1.0	2.6 ± 0.4
5-FUd^d	0.014 ± 0.000	-	0.014 ± 0.002	-	0.046 ± 0.016

^a Concentración inhibitoria 50%.

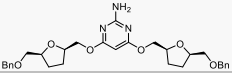
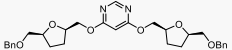
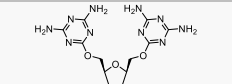
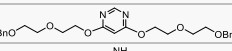
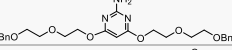
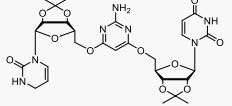
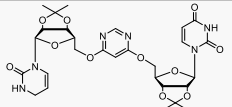
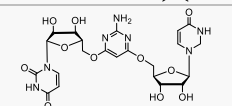
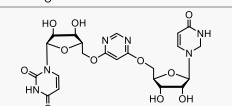
^b Valor medio de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^c 5-Fluorouracilo.

^d 5-Fluorouridina.

En cuanto a los compuestos de estructura dimérica (Tabla 1.9) el derivado portador de dos anillos de triazina (**1.49**) y los análogos de pirimidina portadores de dos uridinas (**1.68-1.71**) no mostraron actividad antiproliferativa excepto **1.70** que mostró cierta actividad frente a Leucemia murina L1210 y casi marginal frente a carcinoma de riñón (CAKI-1). El resto de los compuestos ensayados (**1.37**, **1.39**, **1.65** y **1.66**) mostraron actividad antiproliferativa en el rango μM frente a las distintas líneas tumorales ensayadas. Los derivados **1.37** y **1.39** fueron los compuestos que mostraron mejor actividad antiproliferativa.

Tabla 1.9. Actividad antiproliferativa expresada con CI_{50} (μM)^a de los compuestos de estructura dimérica **1.37**, **1.39**, **1.49**, **1.65**, **1.66**, **1.68-1.71** en células tumorales.

Compuesto	CI_{50} (μM) ^b				
	L1210	CEM	HeLa	PC3	CAKI-1
1.37 	25 ± 1	28 ± 4	65 ± 16	20 ± 0	40 ± 13
1.39 	20 ± 3	21 ± 4	175 ± 68	17 ± 0	33 ± 7
1.49 	>250	>250	>250	>250	≥250
1.65 	71 ± 15	85 ± 35	182 ± 36	50 ± 28	105 ± 26
1.66 	68 ± 42	50 ± 7	95 ± 12	30 ± 8	78 ± 31
1.68 	>250	>250	>250	>250	>250
1.69 	>250	>250	>250	>250	>250
1.70 	98 ± 30	>250	>250	>250	240 ± 13
1.71 	>250	>250	>250	>250	≥250
5-FU ^c	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	1.6 ± 1.0	2.6 ± 0.4
5-FUd ^d	0.014 ± 0.000	-	0.014 ± 0.002	-	0.046 ± 0.016

^a Concentración inhibitoria 50%.

^b Valor medio de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

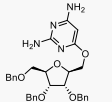
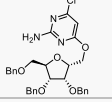
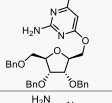
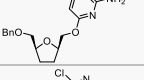
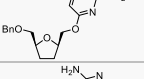
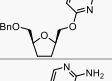
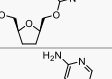
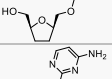
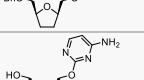
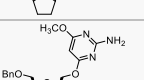
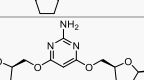
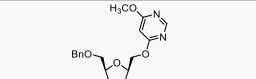
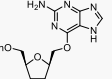
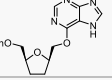
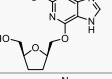
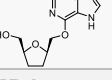
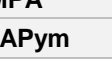
^c 5-Fluorouracilo.

^d 5-Fluorouridina.

4.3.3. Evaluación biológica frente al virus del sarcoma murino (VSM)

Seguidamente llevamos a cabo la evaluación frente al virus del sarcoma murino (VSM), un virus oncogénico aislado de un rhabdomiosarcoma por Moloney en 1966. Es una especie de retrovirus tipo C de replicación defectuosa capaz de transformar las células linfoides de ratas y producir leucemia eritroide. También transforma los linfoblastos humanos en cultivo, las células epiteliales de hígado de ratas y las células adrenocorticales de ratas. Este virus es capaz de transformar las células, pero se replica y produce tumores solo en presencia de virus de leucemia murina.¹²⁷ Los resultados se recogen en la Tabla 1.10. Según se refleja en la tabla los compuestos **1.4a,b**, **1.29**, **1.38**, y **1.55** fueron capaces de inhibir la transformación de los fibroblastos murinos C3H/3T3 por el virus del sarcoma murino de Moloney (VSM). El mejor compuesto fue el derivado **1.4a,b** (CE_{50} = 13 μM).

Tabla 1.10. Efecto inhibitorio de los compuestos frente a la transformación de fibroblastos de embrión murino C3H/3T3 inducido por VSM in vitro.

Compuesto	CE ₅₀ (μM) ^a	CMI (μM) ^b
1.4a,b 	13 ± 0	100 (>20)
1.15a 	>100	>100
1.15b 	>100	>100
1.20 	>100	>100
1.23 	>100	>100
1.24 	>100	>100
1.25 	>100	>100
1.26 	>100	>100
1.28 	>100	>100
1.29 	63 ± 13	>100
1.36 	>20	100 (>20)
1.37 	>20	100 (>20)
1.38 	60 ± 8	>100
1.54 	>100	>100
1.55 	49 ± 4	≥100
1.56 	>100	>100
1.57 	>100	>100
(R)-PMPA	4.2 ± 2.7	>100
PMEO-DAPym	0.48 ± 0.12	>100

^a Concentración efectiva 50%; los datos son la media ± de al menos 3 experimentos independientes.^b Concentración mínima inhibitoria; los datos son la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

4.3.4. Evaluación biológica frente a la replicación de otros virus

Seguidamente decidimos ensayar los compuestos sintetizados frente a un amplio panel de virus tales como virus herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1/VHS-2), virus varicela zoster (VVZ), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus vacuna (VV), virus coxackie B4, virus respiratorio sincitial, citomegalovirus humano (CMVH), reovirus-1, virus sindbis, virus punta de toro, virus corona felino (VFIP), virus herpes felino (FHSV), virus influenza H1N1, virus influenza H3N2, virus influenza B y virus parainfluenza 3 siguiendo procedimientos descritos.¹²⁸ Los ensayos fueron realizados por el equipo del Prof. Jan Balzarini (mencionado anteriormente).

La mayoría de los derivados evaluados resultaron inactivos frente a la replicación de los mencionados virus a excepción de los compuestos que se enumeran a continuación (Figura 1.35). El compuesto **1.16b** mostró actividad y especificidad frente al virus herpes felino (FHSV) ($CE_{50} = 1.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$). El derivado **1.49** (portador de dos anillos de triazina) mostró actividad significativa frente a la replicación del virus varicela zoster (VVZ) en el rango micromolar bajo ($CE_{50} = 6.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Finalmente, el derivado **1.68**, portador de dos uridinas, mostró actividad significativa frente a la replicación del citomegalovirus humano (CMVH) en el rango micromolar bajo ($CE_{50} = 7.31 \pm 1.29 \mu\text{M}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) (Figura 1.35). Estos tres compuestos pueden considerarse como 3 “hits” interesantes para el desarrollo de antivirales frente a los mencionados virus.

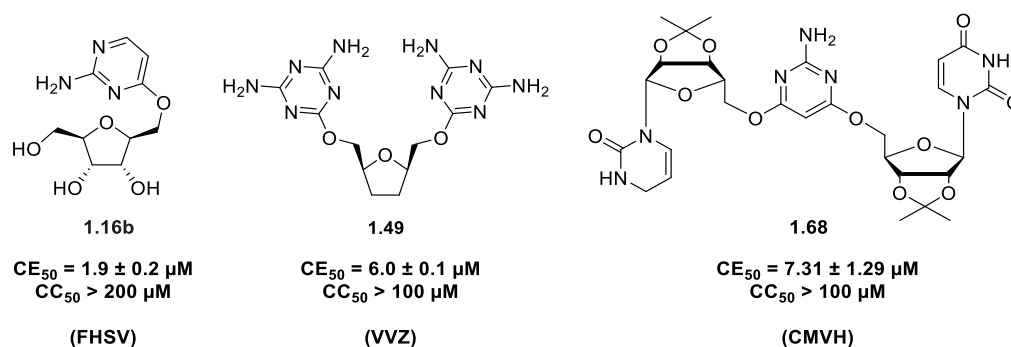


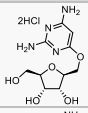
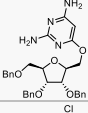
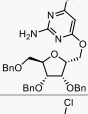
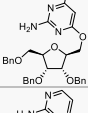
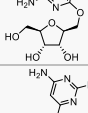
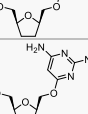
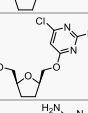
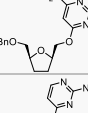
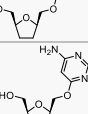
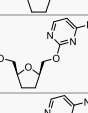
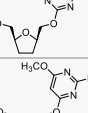
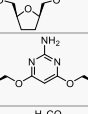
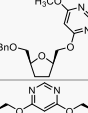
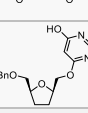
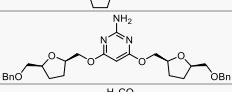
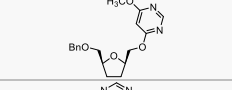
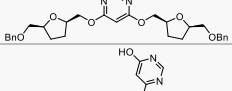

Figura 1.35. Posibles “hits” frente FHSV, VVZ y CMVH.

4.3.5. Evaluación biológica frente a la replicación del virus Chikungunya

Siguiendo con nuestro interés en la determinación del potencial biológico de estos nuevos nucleósidos no convencionales sintetizados en el presente capítulo decidimos evaluar los compuestos frente al virus chikungunya (CHIKV). Este virus es el causante de la fiebre de chikungunya que se transmite por la picadura de mosquitos infectados.^{129,130} El principal vector es el mosquito *Aedes aegypti*.¹³¹ Esta enfermedad es considerada una de las enfermedades emergentes, originalmente endémica de África y Asia, y a día de hoy afecta a personas en los distintos continentes. Actualmente, la fiebre chikungunya se ha identificado en casi 40 países. El virus se ha adaptado a un nuevo vector, el mosquito *Aedes albopictus* (mosquito tigre), cada vez más extendido en zonas templadas de Europa, Estados Unidos o Australia.¹³² En la actualidad no existe tratamiento ni vacuna para combatir este virus.

Los compuestos fueron evaluados frente al virus chikungunya en células Vero por el equipo del Prof. Johan Neyts del Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica). En la Tabla 1.11 se pueden ver los datos obtenidos junto con la cloroquina como compuesto de referencia.¹³³ Los resultados se expresan como concentración efectiva 50 (CE₅₀), que indica la concentración efectiva a la que un compuesto protege al 50% de las células frente al efecto citopático del virus. Para aquellos compuestos que han mostrado actividad significativa se ha determinado la CE₉₀, o concentración de compuesto que protege al 90% de las células del efecto citopático viral. En paralelo se ha determinado la CC₅₀, que es la concentración a la que aparece un daño celular evidente al 50% de los cultivos tratados no infectados.

Tabla 1.11. Evaluación biológica frente a la replicación del virus chikungunya (cepa 899) en células Vero (subtipo A).

Compuesto	CE ₅₀ (μM) ^a	CE ₉₀ (μM) ^b	CC ₅₀ (μM) ^c
1.1b 	>100	-	>100
1.4a,b 	7.6 ± 1.8	11.4 ± 1.5	50
1.15a 	4.71 ± 0.78	8.2 ± 2.82	110
1.15b 	7.1 ± 1.82	9.76 ± 2.97	107
1.16b 	>100	-	>100
1.20 	>100	-	>100
1.21 	>100	-	>100
1.23 	>100	-	250
1.24 	>100	-	>100
1.25 	>100	-	>100
1.26 	>100	-	>100
1.28 	>100	-	>100
1.29 	167 ± 33.1	-	281
1.36 	129	-	250
1.37 	22.4 ± 95	-	58
1.38 	10.4 ± 1	-	21
1.39 	19.8 ± 2.2	-	35
1.41 	>100	-	>100
Cloroquina	11 ± 7	-	89 ± 28

^a CE₅₀ = Concentración efectiva 50.

^b CE₉₀ = Concentración efectiva 90.

^c CC₅₀ = Concentración citotóxica 50.

Tabla 1.11. (continuación).

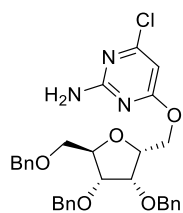
Compuesto	CE ₅₀ (μM) ^a	CE ₉₀ (μM) ^b	CC ₅₀ (μM) ^c
1.46	>100	-	>100
1.47	>100	-	>100
1.54	>100	-	>100
1.55	>100	-	>100
1.56	>100	-	>100
1.57	>100	-	>100
1.63	>100	-	>100
1.65	>100	-	>100
1.69	>100	-	>100
1.71	>100	-	>100
Cloroquina	11 ± 7	-	89 ± 28

^a CE₅₀ = Concentración efectiva 50.

^b CE₉₀ = Concentración efectiva 90.

^c CC₅₀ = Concentración citotóxica 50.

Según los datos recogidos en la Tabla 1.11 los derivados de pirimidina **1.15a** y **1.15b** fueron los compuestos que mostraron mejor actividad frente a la replicación del virus chicungunya (CE₅₀ = 4.7-7.1 μM, CE₉₀ = 8.2-9.7 μM CC₅₀ = 107-110 μM). Estos compuestos muestran un perfil de actividad/toxicidad similar al de la cloroquina. La sustitución del átomo de Cl por un grupo NH₂ (**1.4b**) dio lugar a un compuesto que mantiene la actividad pero que resultó ser más tóxico. Los derivados de estructura dimérica **1.37** y **1.39** resultaron activos aunque fueron muy tóxicos. Los derivados **1.15a** y **1.15b** pueden considerarse como dos cabezas de serie con los que seguir profundizando en el estudio de este tipo de nucleósidos no convencionales como inhibidores de la replicación del virus chicungunya (Figura 1.36).

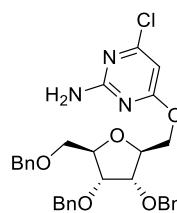


1.15a

CE₅₀ = 4.71 ± 0.78 μM

CE₉₀ = 8.2 ± 2.8 μM

CC₅₀ > 120 μM



1.15b

CE₅₀ = 7.1 ± 1.82 μM

CE₉₀ = 9.8 ± 2.8 μM

CC₅₀ > 110 μM

Figura 1.36. Posibles “hits” frente al virus chikungunya.

5. CONCLUSIONES

El objetivo global del presente capítulo ha sido el diseño, síntesis y evaluación biológica, como potenciales inhibidores de polimerasas virales y por tanto de la replicación viral, de análogos de nucleósidos “no convencionales”. Así, se describe por primera vez, la primera serie de una nueva clase de análogos de metiloxinucleósidos de estructura desconocida, que combinan en su estructura nucleobases no naturales (diaminopirimidinas, diaminopurinas o diamino-1,3,5-triazinas) con azúcares no convencionales [D-alitol, D-altritol o (2*R*,5*S*)-2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano] unidos al C-6 de la nucleobase mediante un enlace tipo éter. Este tipo de unión podría dotar a los compuestos de una mayor estabilidad metabólica respecto a los nucleósidos clásicos o convencionales. Los derivados de D-alitol y D-altritol se diseñaron como miméticos de ribonucleósidos, mientras que los análogos de tetrahidrofurano pueden considerarse como sus didesoxianálogos y miméticos de los 2',3'-didesoxinucleósidos.

Desde el punto de vista químico-sintético las conclusiones más importantes que se pueden extraer del trabajo realizado son las siguientes:

1. Para la síntesis de los nucleósidos portadores de anillos de D-alitol y D-altritol fue necesario preparar los intermedios de azúcar correspondientes en una síntesis en 8 pasos que requirió de una cuidadosa puesta a punto y optimización de cada una de las etapas de reacción así como de las condiciones de purificación de dichas etapas.
2. Los nucleósidos se prepararon por alquilación de las nucleobases Cl-sustituidas con los correspondientes alcóxidos, generados *in situ* y debidamente protegidos, de D-alitol, D-altritol o 2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano.
3. En la ruta sintética para la preparación de este tipo de nucleósidos no convencionales se obtuvieron algunos derivados de estructura dimérica (**1.37** y **1.39**), desconocidos hasta ese momento, como productos secundarios. Se ha llevado a cabo la puesta a punto de un procedimiento sintético que ha permitido la obtención exclusiva de dichos compuestos diméricos así como de otros análogos (**1.49**, **1.65**, **1.66**, **1.70** y **1.71**).
4. Se ha llevado a cabo un estudio conformacional en disolución mediante RMN de ambos tipos de metiloxinucleósidos (ribomiméticos y didesoxianálogos) empleando **1.16b** y **1.25** como modelos de ambos tipos de nucleósidos. Ambos compuestos muestran preferencia por una conformación *anti* en la orientación de la base respecto

del anillo de furanosa, una situación de libre giro en la conformación del enlace exocíclico C5'-C6' y una preferencia por los rotámeros g⁺ y t en la conformación del enlace exocíclico C2'-C1'. En los nucleósidos polihidroxiados (**1.16b**) el anillo de tetrahidrofurano adopta un equilibrio conformacional (N/S), próximo aunque en distinta zona donde aparecen los nucleósidos “clásicos”, entre ⁴E y ¹E desplazado hacia el confórmero tipo sur (⁴E). Para los correspondientes didesoxianálogos (**1.25**), el equilibrio conformacional se encuentra en el rango N/S habitual de los didesoxinucleósidos entre ³E y ²E.

Desde el punto de vista biológico las conclusiones más importantes son las siguientes:

1. Todos los metiloxinucleósidos sintetizados se ensayaron frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) aunque ninguno resultó activo frente al virus en cultivo celular a concentraciones sub-tóxicas. Esta falta de actividad podría ser debida bien, a la falta de conversión metabólica de los nucleósidos a los correspondientes nucleósido 5'-trifosfatos (NTPs) debido a que los compuestos no fueran reconocidos por las quinasas correspondientes responsables de dichas fosforilaciones, y/o bien a que dichos NTPs presentaran una nula o muy baja afinidad por la ADN polimerasa viral [Transcriptasa inversa (TI) del VIH].
2. Con el fin de explicar dicha falta de actividad y estudiar la capacidad de estos nuevos metiloxinucleósidos de interaccionar con las ADN polimerasas, se sintetizó el trifosfato **1.60**, como compuesto modelo de este tipo de nucleósidos, empleando la metodología de Ludwig-Yoshikawa. Se ensayó la capacidad inhibitoria del compuesto frente a VIH-TI observándose que el compuesto afecta a la TI del VIH solo cuando se emplea poli(rU:dA) como molde/cebador (al igual que ocurre con PME0-DAPym-pp). A la vista de este resultado se puede asumir que **1.60**, al igual que PME0-DAPym-pp, se comporta como un mimético de adenina aunque es mucho menos potente que este último.
3. Con el fin de explorar el potencial biológico de estos nuevos nucleósidos no convencionales, los compuestos se ensayaron como inhibidores de la replicación de un amplio panel de virus ADN y ARN. De dicha evaluación han surgido posibles “hits” frente a la replicación de diversos virus que merecen un posterior estudio y desarrollo como antivirales. Así, **1.15a**, **1.15b** mostraron buena actividad frente al virus chikungunya con valores de CE₅₀ en torno a 4 y 7 μM, respectivamente y no fueron

tóxicos ($CC_{50} > 105-110 \mu\text{M}$). El derivado **1.16b** resultó activo y no tóxico frente al virus del herpes felino (FHSV) ($CE_{50} = 1.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$; $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$). El dímero **1.49** mostró una buena actividad frente al virus varicela zóster (VVZ) ($CE_{50} = 6.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$; $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) y el dímero **1.68** fue activo frente a la replicación del citomegalovirus humano (CMVH) con valores de $CE_{50} = 7.31 \pm 1.29 \mu\text{M}$ y $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$.

4. Varios de los compuestos (**1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** y **1.55**) mostraron citotoxicidad en células CEM CD4⁺ T-linfocíticas tumorales con valores de CC_{50} entre 13 y 50 μM . Asimismo, se ensayaron frente a distintas líneas tumorales (leucemia murina (L1210), carcinoma de próstata humano (PC3), carcinoma de riñón (CAKI-1) y carcinoma cervical (HeLa). Todos estos compuestos mostraron buena actividad frente a dichas líneas tumorales observándose que presentan una marcada tendencia hacia una mejor actividad citostática en los ensayos de proliferación frente a leucemia y células tumorales de linfomas que frente células tumorales de carcinomas sólidos (HeLa, PC3, CAKI-1). Algunos de los derivados ensayados (**1.4a,b**, **1.29**, **1.38** y **1.55**) fueron capaces de inhibir la transformación de los fibroblastos murinos C3H/3T3 por el virus del sarcoma murino de Moloney (VSM), siendo, el análogo **1.4a,b** superior a los demás ($CE_{50} = 13 \mu\text{M}$) y por tanto el derivado más potente.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MÉTODOS GENERALES

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron en estrictas condiciones anhidras bajo atmósfera de argón. Los sólidos higroscópicos fueron presecados en una pistola de vacío durante 24 horas empleando P_2O_5 como desecante. El THF se secó destilándolo sobre Na y benzofenona recogiendo sobre tamiz molecular de 4 Å activado previamente en el microondas. La DMF, la piridina y el DMSO anhidro se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo Initiator™ Eight (Biotage AB).

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F_{254} (MERCK), de un espesor de capa de 0.2 mm. Los compuestos se detectaron con luz UV de 254 y 365 nm o mediante pulverización con disolución de H_2SO_4 al 5% en EtOH y calefacción.

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por: a) cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en un Cromatotrón® Harrison Research modelo 8924 (gel de sílice 60 PF 254 con Ca_2SO_4), en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min, respectivamente; b) cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema "Isolera One" (Biotage), empleando cartuchos SNAP de sílice KP-Sil de 50 g (39 x 81 mm) o 100 g (39 x 157 mm); c) cromatografía de extracción en fase sólida (SPE) a vacío en el manifold en cartuchos DSC-Si 1 g (Supelco).

Los productos fueron liofilizados disueltos en una mezcla de CH_3CN/H_2O empleando un liofilizador Telstar 6-80.

La pureza de los compuestos se ha medido por HPLC en: a) un equipo Waters 2690 empleando una columna de fase reversa Sunfire C18 (4.6 mm x 50 mm, 3.5 μ m) equipado con un detector de Photodiode Array, y como fase móvil mezclas de CH_3CN (0.04% TFA) (A)/ H_2O (0.05% TFA) (B) en modo gradiente; b) un equipo Agilent Technologies 1120 Compact LC empleando una columna de fase reversa ACE 5 C18-300 (4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m) equipado con un detector de Photodiode Array, y como fase móvil mezclas de CH_3CN (A)/ H_2O (0.05% TFA) (B) en modo gradiente. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 217 y 254 nm. Los gradientes empleados fueron los siguientes: a) gradiente 1: gradiente lineal A:B 80:20 a 100:0 en 5 minutos; b) gradiente 2: gradiente lineal A:B 40:60 a 70:30 en 8 minutos; c) gradiente 3: gradiente lineal A:B 10:90 a 100:0 en 10 minutos; d) gradiente 4: gradiente lineal A:B 2:98 a 30:70 en 10 minutos; e) gradiente 5: gradiente

lineal A:B 50:50 a 100:0 en 10 minutos; f) gradiente 6: elución isocrática con H₂O durante 10 minutos, luego gradiente lineal A:B 1:99 a 95:5 en 10 minutos.

Los “nucleótidos” se analizaron en un equipo Waters 600 empleando una columna de intercambio iónico Waters Spherisorb® SAX (4.6 mm x 250 mm, 10.0 µm) equipado con un detector de UV/Visible de longitud de onda variable. La fase móvil empleada fue una disolución 0.5 M de KH₂PO₄ en modo isocrático. En todos los casos el flujo fue de 1.5 mL/min y la detección de los picos se realizó mediante UV a 220 y 254 nm.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) se realizó en un cromatógrafo Waters integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiode Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000, empleando una columna de fase reversa Sunfire C18 (4.6 mm x 50 mm, 3.5 µm). Como fase móvil se emplearon mezclas de A: CH₃CN (0.08% ácido fórmico) y B: H₂O (0.1% ácido fórmico). Se utilizó un gradiente de 10% A a 100% A en 5 minutos. En todos los casos el flujo fue de 1 ml/min y la detección de los picos se realizó mediante UV a 217 y 254 nm.

Los puntos de fusión de los sólidos obtenidos se midieron en un aparato Metter Toledo M170 y no están corregidos

Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un equipo Perkin Elmer Spectrum One.

Los poderes de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 241. Las medidas fueron registradas a temperatura ambiente, irradiando la muestra situada en una microcelda de 1 mL con una lámpara de sodio (línea D del sodio, 589 nm).

Los espectros de masas se han registrado en un equipo Hewlett-Packard HP-1100 MSD acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tipo cuadrupolo, en modo positivo o negativo, utilizando como eluyentes en la inyección directa metanol y agua con 0.1% de ácido acético.

Los espectros de masas de alta resolución se han registrado en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS que consiste en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series acoplado a un espectrómetro de masas con analizador híbrido Q-TOF, utilizando electrospray positivo como fuente de ionización. Se emplearon como eluyentes metanol y agua con 0.1% de ácido acético. El error máximo en la determinación de la composición de las moléculas para esta técnica es de ± 5 ppm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian UNITY INOVA-300 (a 300 y 75 MHz),

Varian UNITY INOVA-400 (a 400 y 100 MHz), Varian MERCURY-400 (a 400 y 100 MHz) y Varian SYSTEM-500 (a 500 y 125 MHz) equipado con una sonda fría; y los espectros de ^{31}P -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian MERCURY-400 (a 162 MHz). Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; td, triplete de dobletes; m, multiplete), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de la constante de acoplamiento (Hz) y la asignación estructural. Los espectros monodimensionales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se obtuvieron en condiciones estándar. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H de tipo COSY y NOESY, y las de ^{13}C -RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C de tipo HSQC y HMBC.

6.2. PRODUCTOS COMERCIALES

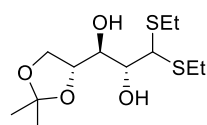
Acetato sódico	Fluka
Ácido acético glacial	Scharlau
Ácido clorhídrico 37%	Scharlau
Ácido peracético (32% en ácido acético)	Aldrich
Ácido sulfúrico 97%	Scharlau
2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina	TCI
2-amino-6-cloropurina	Aldrich
4-amino-2-cloropirimidina	Aldrich
4-amino-6-cloropirimidina	TCI
2-amino-4,6-dicloropirimidina	Aldrich
4-cloro-6-metoxipirimidina	TCI
6-cloropurina	Aldrich
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	Aldrich
2,4-diamino-6-cloropirimidina	TCI
4,6-dicloropirimidina	Aldrich
2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina)	Aldrich
Bicarbonato de trietilamonio 1M (TEAB)	Aldrich
(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano	Fluorochem
Bromuro de bencilo	Aldrich
Bromuro de trimetilsililo	Aldrich
CaCO_3	Aldrich

Cloruro de <i>tert</i> -butildifenilsilano (TBDPSCI)	Aldrich
1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano	Aldrich
Dietilenglicol	Aldrich
Dietil (hidroximetil)fosfonato	Aldrich
4-(Dimetilamino)piridina (DMAP)	Aldrich
2,2-dimetoxipropano	Aldrich
1,8-bis(dimetilamino)naftaleno (esponja protónica™)	Aldrich
KBr	Aldrich
2,6-lutidina	Aldrich
NaH al 60 %	Aldrich
NaH al 95 %	Aldrich
Oxicloruro de fósforo	Aldrich
Pd/C 10%	Aldrich
Pd(OH) ₂ /C 20%	Aldrich
Pirofosfato de tributilamonio	Aldrich
D-ribosa dietilditioacetal	Orgentis
<i>p</i> -toluensulfonato de piridinio (PPTS)	Fluka
Resina Dowex 1x2	Aldrich
Resina Sephadex-DEAE A-25	Aldrich
Tributilamina	Aldrich
Trietilamina seca	Aldrich
Trimetilfosfato	Aldrich
Yoduro de metilo	Aldrich

6.3. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PARTIDA

6.3.1. Preparación del producto de partida 1.2a,b

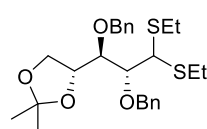
4,5-O-Isopropiliden-D-ribosa dietilditioacetal y 2,3-di-O-bencil-4,5-O-isopropiliden-D-ribosa dietilditioacetal (**1.5** y **1.6**)¹³⁴



Una suspensión de D-ribosa dietilditioacetal (**A**) (3.05 g, 11.9 mmol), 2,2-dimetoxipropano (2.95 mL, 23.8 mmol), y *p*-toluensulfonato de piridinio (0.29 g, 1.19 mmol) en acetona (60 mL), se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se neutraliza con una disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y se concentra a presión reducida. El residuo se extrae con acetato de etilo (60 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 40 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad, para obtener **1.5** que se utiliza en la siguiente etapa de reacción sin purificación previa. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹³⁴

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.12-1.26 (m, 6H, SCH₂CH₃), 1.38, 1.43 (s, 6H, CH₃ isoprop), 2.60-2.80 (m, 4H, SCH₂CH₃), 3.65-4.45 (m, 6H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5).

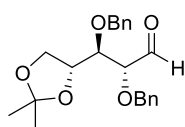
EM (ES, positivo): *m/z* 297 (M+H)⁺.



A una disolución de **1.5** y BnBr (5.66 mL, 47.6 mmol) en THF seco (50 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (1.90 g, 47.6 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se diluye con éter etílico (50 mL) y se añade, lentamente, una disolución saturada de NH₄Cl (25 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (2 x 25 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **1.6** (4.60 g, 81%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹³⁴

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.18-1.28 (m, 6H, SCH₂CH₃), 1.32, 1.41 (s, 6H, CH₃ isoprop), 2.52-2.77 (m, 4H, SCH₂CH₃), 3.70 (t, 1H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 5.4 Hz, H-2), 3.80 (t, 1H, *J*_{4,5a} = *J*_{5a,5b} = 7.8 Hz, H-5a), 3.94 (t, 1H, *J*_{4,5b} = *J*_{5a,5b} = 7.8 Hz, H-5b), 4.11 (d, 1H, *J*_{1,2} = 5.4 Hz, H-1), 4.20 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 5.4 Hz, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, H-3), 4.44 (td, 1H, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, *J*_{4,5a} = *J*_{4,5b} = 7.8 Hz, H-4), 4.67-4.86 (d, 4H, *J* = 11.4 Hz, CH₂Ph), 7.24-7.41 (m, 10H, Ar).

EM (ES, positivo): *m/z* 499 (M+Na)⁺.

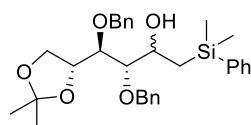
2,3-Di-O-bencil-4,5-O-isopropiliden-D-ribosa (1.7)

A una disolución de **1.6** (1.81 g, 3.80 mmol) en acetona/H₂O 4:1 (20 mL) se añade CaCO₃ (2.66 g, 26.60 mmol) y CH₃I (3.32 mL, 52.3 mmol), y la mezcla se calienta a 70 °C en tubo cerrado durante 5 horas. Se diluye con acetato de etilo (15 mL) y se elimina el CaCO₃ por filtración. El filtrado se concentra a sequedad y se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 9:1). De las fracciones de mayor movilidad, se aísla **1.7** (845 mg, 60%) en forma de aceite. El producto resultó ser inestable y se utiliza inmediatamente en el siguiente paso de reacción. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹³⁴

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.30 (s, 6H, CH₃ isoprop), 3.71 (m, 1H, H-3), 3.85 (dd, 1H, *J*_{4,5b} = 4.3 Hz, *J*_{5a,5b} = 8.7 Hz, H-5b), 4.11 (m, 2H, H-2, H-5a), 4.34 (m, 1H, H-4), 4.47, 4.58, 4.68, 4.78 (d, 4H, *J* = 11.4 Hz, CH₂Ph), 7.25-7.50 (m, 10H, H), 9.70 (s, 1H, CHO, H-1).

De las fracciones de menor movilidad, se aísla **2,3-di-O-bencil-D-ribosa (1.8)** (363 mg, 29%) resultante de la desprotección del grupo isopropilideno.

EM (ES, positivo): *m/z* 331 (M+1)⁺.

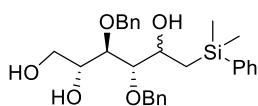
3,4-Di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-5,6-O-isopropiliden-D-alitol y 3,4-di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-5,6-O-isopropiliden-D-altritol (1.9a y 1.9b)⁸⁸

Sobre una disolución de **1.7** (740 mg, 2.0 mmol) en THF seco (5 ml), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añade una disolución 1M en THF seco de cloruro de (fenildimetilsilil)metilmagnesio⁸⁸ previamente sintetizado. La mezcla de reacción se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. Se enfría la disolución a 0 °C, se añade éter etílico (20 mL) y se neutraliza con NH₄Cl al 20% (10 mL). Se separa la fase orgánica, se lava con una disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción **1.9a,b** se utiliza en la siguiente etapa de reacción sin purificación previa. Una pequeña muestra se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (hexano/éter etílico 4:1) y se comprueba que los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁸⁸

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.32, 0.33 (s, 6H, SiCH₃), 1.02 (dd, 1H, *J*_{1a,2} = 5.4 Hz, *J*_{1a,1b} = 11.1 Hz, H-1a), 1.10 (m, 1H, H-1b), 1.31, 1.39 (s, 6H, CH₃ isoprop), 2.82 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, OH), 3.39 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 4.9 Hz, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, H-3), 3.80 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, *J*_{4,5} = 5.2 Hz, H-4), 3.90-4.00 (m, 3H, H-2, H-6), 4.25 (m, 1H, H-5), 4.60 (d, 2H, *J* = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.68 (s, 2H, CH₂Ph), 7.23-7.54 (m, 15H, Ar).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₃₁H₄₀O₅Si 520.2651; encontrada 520.2645.

3,4-Di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-alitol y 3,4-di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-altritol (1.10a y 1.10b)⁸⁸

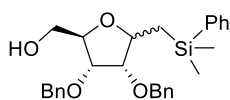


El crudo de reacción anterior **1.9a,b** se disuelve en AcOH/H₂O 80% (10 mL) y se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se elimina el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 1:4) para obtener **1.10a,b** (1 g, 75%, rendimiento global desde **1.7**) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁸⁸

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.33, 0.34 (s, 6H, SiCH₃), 1.07 (dd, 1H, *J*_{1a,2} = 5.4 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.5 Hz, H-1a), 1.16 (dd, 1H, *J*_{1b,2} = 9.1 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.5 Hz, H-1b), 2.49 (s ancho, 3H, OH), 3.56 (t, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 3.7 Hz, H-3), 3.62 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.7 Hz, *J*_{4,5} = 6.7 Hz, H-4), 3.71 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 5.0 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, H-6a), 3.78 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 3.7 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, H-6b), 3.88-3.97 (m, 2H, H-2, H-5), 4.53 (d, 2H, *J* = 11.1 Hz, CH₂Ph), 4.56 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, CH₂Ph), 4.78 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, CH₂Ph), 7.25-7.55 (m, 15H, Ar).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₂₈H₃₆O₅Si 480.2331; encontrada 480.2332.

2,5-Anhidro-3,4-di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-alitol y 2,5-anhidro-3,4-di-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-altritol y 3,4-di-O-bencil-1,2-didesoxi-D-ribo-hex-1-enitol (1.11a, 1.11b y 1.12)^{88,91}



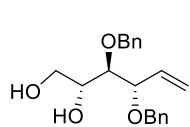
Una disolución de **1.10a,b** (960 mg, 1.99 mmol) en THF seco (7 mL) y H₂SO₄ (49.5 μL) se calienta a 50 °C durante 48 horas. A continuación, se añade acetato de etilo (15 mL) y se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 7:3). De las fracciones de mayor movilidad se aísla **1.11a,b** (532 mg, 58%) en forma de aceite. El espectro de ¹H-RMN indica que se trata de una mezcla de productos de ciclación 2,3-*cis* y 2,3-*trans* (1:2). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{88,91} HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): *t_R* = 10.84 min (95%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.30, 0.33 (s, 6H, SiCH₃_{trans}), 0.31, 0.33 (s, 6H, SiCH₃_{cis}), 1.00 (dd, 1H, *J*_{1a,2} = 9.7 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.4 Hz, H-1a_{trans}), 1.12 (dd, 1H, *J*_{1b,2} = 4.9 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.4 Hz, H-1b_{trans}), 1.16 (dd, 1H, *J*_{1b,2} = 5.8 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.5 Hz, H-1b_{cis}), 1.44 (dd, 1H, *J*_{1a,2} = 9.2 Hz, *J*_{1a,1b} = 14.5 Hz, H-1a_{cis}), 3.42 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 2.9 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.9 Hz, H-6a_{trans}), 3.45 (m, 1H, H-3_{trans}), 3.47 (m, 1H, H-3_{cis}), 3.63 (dd, 1H,

$J_{5,6b} = 3.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, H-6b_{trans}), 3.72 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, H-6a_{cis}), 3.75 (t, 1H, $J_{3,4} = 3.9$ Hz, H-4_{cis}), 3.85 (t, 1H, $J_{3,4} = 5.5$ Hz, H-4_{trans}), 3.95-4.09 (m, 4H, H-2_{trans,cis}, H-5_{cis}, H-6b_{cis}), 4.18 (m, 1H, H-5_{trans}), 4.41-4.80 (d, 8H, $J = 11.8$ Hz, CH₂Ph_{trans,cis}), 7.25-7.53 (m, 30H, Ar_{trans,cis}).

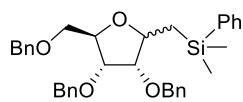
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₂₈H₃₄O₄Si 462.2240; encontrada 462.2266.

De las fracciones de menor movilidad se aísla **3,4-di-O-bencil-1,2-didesoxi-D-ribo-1-hex-1-enitol (1.12)**⁸⁸ (260 mg, 40%) cuyos datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{88,91} EM (ES, positivo): m/z 351 (M+Na)⁺.



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.10 (s ancho, 2H, OH), 3.61 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 6.1$ Hz, H-4), 3.71-3.78 (m, 3H, H-5, H-6), 4.08 (dd, 1H, $J_{2,3} = 7.7$ Hz, $J_{3,4} = 6.1$ Hz, H-3), 4.52 (d, 2H, $J = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 4.62 (d, 2H, $J = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 5.36-5.46 (m, 2H, H-1), 5.91 (ddd, 1H, $J_{1a,2} = 16.7$ Hz, $J_{1b,2} = 11.0$ Hz, $J_{2,3} = 7.7$ Hz, H-2), 7.25-7.40 (m, 10H, Ar).

2,5-Anhidro-3,4,6-tri-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-alitol y 2,5-anhidro-3,4,6-tri-O-bencil-1-desoxi-1-fenildimetilsilil-D-altritol (1.13a y 1.13b)



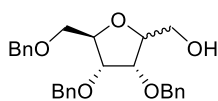
Sobre una disolución de **1.11a,b** (1.05 g, 2.26 mmol) y BnBr (0.54 mL, 4.52 mmol) en THF seco (15 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (181 mg, 4.52 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, se diluye en éter etílico (15 mL), se añade lentamente una disolución saturada de NH₄Cl (5 mL) y se separan las fases. La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (2 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 9:1) para dar **1.13a,b** (1.02 g, 82%) como un aceite. El espectro de ¹H-RMN indica que existe una mezcla de productos 2,3-*cis* y 2,3-*trans* (1:4) que se confirma mediante análisis en el HPLC Analítico. HPLC-Analítico (Waters 2690, gradiente 1): $t_R = 4.57$ min (20%) y 4.74 min (80%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.31, 0.32 (s, 6H, SiCH₃_{trans}), 0.32, 0.33 (s, 6H, SiCH₃_{cis}), 1.04 (dd, 1H, $J_{1a,2} = 9.0$ Hz, $J_{1a,1b} = 14.5$ Hz, H-1a_{trans}), 1.14-1.30 (m, 2H, H-1b_{trans,cis}), 1.46 (dd, 1H, $J_{1a,2} = 8.0$ Hz, $J_{1a,1b} = 14.5$ Hz, H-1a_{cis}), 3.40-3.51 (m, 4H, H-3_{trans}, H-6a,b_{trans}, H-6a_{cis}), 3.56 (m, 1H, H-6b_{cis}), 3.76 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 4.1$ Hz, H-4_{cis}), 3.88 (dd, 1H, $J_{2,3} = 5.2$ Hz, $J_{3,4} = 4.5$ Hz, H-4_{trans}), 4.04-4.20 (m, 4H, H-2_{trans,cis}, H-5_{trans,cis}), 4.30-4.80 (m, 12H, CH₂Ph_{trans,cis}), 7.24-7.58 (m, 40H, Ar_{trans,cis}).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ : -2.3, -1.5 (SiCH_3 _{trans}), -2.2, -1.8 (SiCH_3 _{cis}), 17.1 (C-1_{cis}), 21.6 (C-1_{trans}), 70.5 (C-6_{cis}), 70.9 (C-6_{trans}), 71.9, 72.1, 73.5 (CH_2Ph _{trans}), 72.6, 73.0, 73.5 (CH_2Ph _{cis}), 77.6 (C-4_{trans}), 78.8 (C-4_{cis}, C-3_{cis}), 79.0 (C-2_{trans}), 79.4 (C-2_{cis}), 80.5 (C-5_{cis}), 81.3 (C-5_{trans}), 83.6 (C-3_{trans}), 127.5-133.8 (CH Ar _{trans,cis}), 138.1, 138.3, 138.4, 139.6 (C Ar_{trans}), 138.2, 138.5, 138.8, 139.5 (C Ar_{cis}).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Si}$ 552.2688; encontrada 552.2696.

2,5-Anhidro-3,4,6-tri-O-bencil-D-alitol y 2,5-anhidro-3,4,6-tri-O-bencil-D-altritol (1.2a y 1.2b)



Sobre una disolución de acetato sódico (1.97 g, 24.05 mmol) en ácido acético glacial (9 mL) se añade **1.13a,b** (1.02 g, 1.85 mmol). A continuación, se añade KBr (0.26 g, 2.22 mmol) y la mezcla se enfría a 10 °C. Bajo exclusión de luz, se procede a la adición de ácido peracético (32 % en ácido acético) (18 mL), muy lentamente, ya que se libera gran cantidad de oxígeno. La mezcla de reacción se agita a 10 °C durante 4 horas. Posteriormente, se diluye con acetato de etilo (20 mL) y se añade una disolución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a 0 °C. Se separa la fase orgánica y ésta se neutraliza con NaHCO_3 hasta que cesa la emisión de gas. Se vuelven a separar las fases y la fase orgánica se lava con agua (2 x 50 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 3:2) para dar **1.2a,b** (632 mg, 77%) en forma de aceite. El espectro de ^1H -RMN indica que existe una mezcla de productos 2,3-*cis* y 2,3-*trans* (1:6), siendo mayoritario el isómero 2,3-*trans* (**1.2b**), por lo que sólo se indicarán a continuación los desplazamientos químicos del isómero mayoritario. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): t_R = 9.52 min (95%).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.70 (s ancho, 1H, OH), 3.50 (m, 2H, H-1a, H-6a), 3.70 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 3.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, H-6b), 3.80 (dd, 1H, $J_{1b,2} = 2.7$ Hz, $J_{1a,1b} = 12.1$ Hz, H-1b), 4.03 (dd, 1H, $J_{2,3} = 4.0$ Hz, $J_{3,4} = 5.2$ Hz, H-3), 4.11 (dd, 1H, $J_{3,4} = 5.2$ Hz, $J_{4,5} = 6.1$ Hz, H-4), 4.16-4.23 (m, 2H, H-2, H-5), 4.43 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 4.47 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.53 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.61 (s, 2H, CH_2Ph), 7.22-7.37 (m, 15H, Ar).

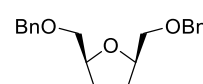
^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 62.2 (C-1_{cis}), 63.4 (C-1_{trans}), 69.7 (C-6_{trans}), 70.3 (C-6_{cis}), 72.7, 73.2, 73.6 (CH_2Ph _{cis}), 72.2, 72.4, 73.6 (CH_2Ph _{trans}), 78.0, 78.1 (C-3_{trans}, C-4_{trans}), 78.2, 78.7 (C-3_{cis}, C-4_{cis}), 81.0 (C-2_{trans}), 79.7 (C-2_{cis}), 80.9 (C-5_{cis}), 83.0 (C-5_{trans}), 127.8-128.7 (CH Ar _{trans,cis}), 137.6, 137.9, 138.0 (C Ar_{trans}), 137.7, 137.9, 138.1 (C Ar_{cis}).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5$ 434.2108; encontrada 434.2093.

6.3.2. Preparación del producto de partida 1.17

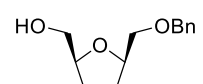
(2*RS*,5*SR*)-5-(benciloximetil)-2-(hidroximetil)tetrahidrofurano y (2*R*,5*S*)-2,5-bis(benciloximetil)tetrahidrofurano (1.17 y 1.19)

Sobre una disolución de (2*R*,5*S*)-2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano (**1.18**) (1.00 g, 7.57 mmol) y de BnBr (1.17 mL, 9.84 mmol) en DMF anhidro (15 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (394 mg, 9.84 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, se diluye en acetato de etilo (25 mL), se añade una disolución saturada de NH₄Cl (2 x 15 mL) y se separan las fases. La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (10 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 2:3). De las fracciones de mayor movilidad, se aísla el producto dibencilado **1.19** (0.44 g, 19%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹³⁵ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 9.84$ min (90%).

 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.70-1.94 (m, 4H, H-3, H-4), 3.48 (d, 2H, $J_{CH2a,CH2b} = 9.9$ Hz, $J_{CH2a,2} = 4.8$ Hz, CH_{2a}OBn), 3.53 (d, 2H, $J_{CH2a,CH2b} = 9.9$ Hz, $J_{CH2b,2} = 5.6$ Hz, CH_{2b}OBn), 4.14 (m, 2H, H-2 y H-5), 4.55 (d, 2H, $J = 12.2$ Hz, CH₂Ph), 4.59 (d, 2H, $J = 12.2$ Hz, CH₂Ph), 7.26-7.35 (m, 10H, Ar).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 28.2 (C-3, C-4), 72.9 (C-2, C-5), 73.6 (2CH₂Ph), 78.3 (2CH₂OBn), 127.7, 127.9, 128.5 (CH Ar), 138.7 (C Ar). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₂₀H₂₄O₃ 312.1729; encontrada 312.1725.

De las fracciones de menor movilidad, se aísla el producto deseado **1.17** (1 g, 60%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹³⁶ $[\alpha]_D^{20} = 0.0$ ° ($c = 0.5$, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 6.39$ min (97%).

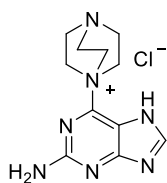
 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.82-1.98 (m, 4H, H-3, H-4), 2.63 (m, 1H, OH), 3.46 (dd, 2H, $J_{2,CH2a} = J_{5,CH2a} = 4.8$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2a}OH, CH_{2a}OBn), 3.61 (dd, 1H, $J_{2,CH2b} = 3.6$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2b}OBn), 3.76 (dd, 1H, $J_{5,CH2b} = 3.6$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2b}OH), 4.09 (m, 1H, H-5), 4.15 (m, 1H, H-2), 4.55 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH₂Ph), 4.59 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH₂Ph), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 27.4, 28.3 (C-3, C-4), 65.5 (CH₂OH), 72.5 (CH₂OBn), 73.5 (CH₂Ph), 78.7 (C-2), 80.2 (C-5), 127.9, 128.5 (CH Ar), 137.9 (C Ar).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₃H₁₈O₃ 222.1260; encontrada 222.1256.

6.3.3. Preparación de DABCO-purinas (1.52 y 1.53)

Cloruro de 1-(2-amino-7*H*-purin-6-il)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-io (1.52)^{107,108}

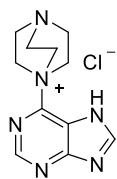


Sobre una disolución de 2-amino-6-cloropurina (**1.50**) (100 mg, 0.58 mmol) en DMSO (3.5 mL) se añade 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (363 mg, 3.24 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, se filtra el precipitado y se lava con DMSO. Posteriormente, el sólido se disuelve en una mezcla agua/acetonitrilo (1:1) y se liofiliza para obtener **1.52** (120 mg, 85%) en forma de sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{107,108}

¹H-RMN (300 MHz, D₂O) δ: 3.46 (m, 6H, CH₂), 4.22 (m, 6H, CH₂), 8.26 (s, 1H, H-8).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₁H₁₆N₇ 246.1471; encontrada 246.1467.

Cloruro de 1-(7*H*-purin-6-il)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-io (1.53)^{107,108}



Sobre una disolución de 6-cloropurina (**1.51**) (300 mg, 1.94 mmol) en DMSO (5 mL) se añade 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (1197 mg, 10.7 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, se filtra el precipitado y se lava con DMSO. Posteriormente, el sólido se disuelve en una mezcla agua/acetonitrilo (1:1) y se liofiliza para obtener **1.53** (335 mg, 65%) en forma de sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{107,108}

¹H-RMN (300 MHz, D₂O) δ: 3.42 (m, 6H, CH₂), 4.17 (m, 6H, CH₂), 8.37 (s, 1H, H-8), 8.61 (s, 1H, H-2).

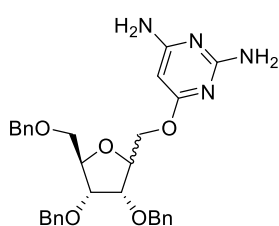
HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₁H₁₅N₆ 231.1367; encontrada 231.1358.

6.4. SÍNTESIS DE METILOXINUCLÉOSIDOS DE 2,5-ANHIDROALITOL Y DE 2,5-ANHIDROALTRITOL

6.4.1. Síntesis de metiloxinucleósidos bencilados de 2,5-anhidroalitol y de 2,5-anhidroaltritol (1.4a,b y 1.15a,b)

Procedimiento general A: Sobre una disolución de **1.2a,b** (1 eq) en THF seco (10 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (2 eq). Se agita a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se añade la correspondiente cloropirimidina (2 eq). La mezcla de reacción se calienta a 90 °C en tubo cerrado durante 6-16 horas. Se destruye el exceso de NaH con metanol y se evapora a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en acetato de etilo (10 mL) y se lava con HCl 1N (3 x 5 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El método de purificación, los eluyentes, y los rendimientos se indicarán a continuación en cada caso.

2,6-Diamino-4-(2',5'-anhidro-3',4',6'-tri-O-bencil-D-altritolil)pirimidina y 2,6-diamino-4-(2',5'-anhidro-3',4',6'-tri-O-bencil-D-alitolil)pirimidina (1.4a y 1.4b)



Seguendo el procedimiento general A, una disolución de **1.2a,b** (50 mg, 0.12 mmol) se trata con 2,4-diamino-6-cloropirimidina (**1.3**) (34 mg, 0.24 mmol) en tubo cerrado durante 16 horas. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol 9:1) para dar **1.4a,b** (54 mg, 82%) como un aceite. El espectro de ¹H-RMN indica que existe una mezcla (4:1) de los derivados bencilados de D-alitol y D-altritol que se confirma mediante análisis en el HPLC Analítico. HPLC-Analítico (Waters 2690, gradiente 2): *t_R* = 3.45 min (80%) y 3.86 min (20%).

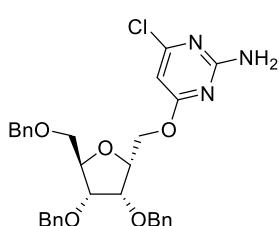
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.52 (dd, 1H, *J*_{5',6'a} = 4.4 Hz, *J*_{6'a,6'b} = 10.6 Hz, H-6'a_{trans}), 3.58 (dd, 1H, *J*_{5',6'b} = 4.0 Hz, *J*_{6'a,6'b} = 10.5 Hz, H-6'b_{trans}), 3.93 (m, 2H, H-3'_{trans}, H-4'_{trans}), 4.06 (m, 1H, H-4'_{cis}), 4.16 (m, 1H, H-3'_{cis}), 4.26 (m, 2H, H-1'a_{trans}, H-5'_{trans}), 4.33 (m, 2H, H-1'b_{trans}, H-2'_{trans}), 4.48-4.65 (m, 6H, CH₂Ph_{trans,cis}), 5.12 (s, 1H, H-5_{trans}), 5.25 (s, 1H, H-5_{cis}), 7.27-7.37 (m, 15H, Ar_{trans,cis}).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 64.1 (C-1'_{cis}), 65.6 (C-1'_{trans}), 70.0 (C-6'_{cis}), 70.3 (C-6'_{trans}), 71.9, 72.0, 73.5 (CH₂Ph_{trans}), 72.6, 73.4 (CH₂Ph_{cis}), 77.5 (C-4'_{trans}), 77.7 (C-3'_{trans}), 78.2 (C-4'_{cis}), 78.5 (C-3'_{cis}), 78.8 (C-5_{trans}), 79.2 (C-2'_{cis}), 79.8 (C-2'_{trans}), 80.1 (C-5'_{cis}), 81.4 (C-5'_{trans}), 127.5-128.5 (CH Ar_{trans,cis}), 137.8-138.4 (C Ar_{trans,cis}), 162.6 (C-2_{trans}), 162.7 (C-2_{cis}), 165.3 (C-6_{trans}), 165.4 (C-6_{cis}), 171.0 (C-4_{trans}), 171.1 (C-4_{cis}).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₃₁H₃₄N₄O₅ 542.2527; encontrada 542.2529.

2-Amino-4-(2',5'-anhidro-3',4',6'-tri-*O*-bencil-D-altritolil)-6-cloropirimidina y 2-amino-4-(2',5'-anhidro-3',4',6'-tri-*O*-bencil-D-alitolil)-6-cloropirimidina (1.15a y 1.15b)

Siguiendo el procedimiento general A, una disolución de **1.2a,b** (200 mg, 0.46 mmol) se trata con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (133 mg, 0.92 mmol) en tubo cerrado durante 6 horas. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (hexano/éter etílico 1:1). De las fracciones de mayor movilidad, se aísla **1.15a** (40 mg, 15%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 10.63$ min (98%).

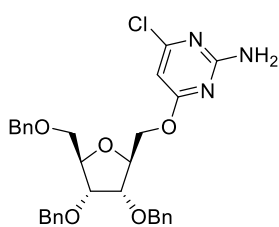


$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 3.51 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 3.7$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.6$ Hz, H-6'a), 3.60 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 3.6$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.6$ Hz, H-6'b), 4.07 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.6$ Hz, $J_{3',4'} = 4.7$ Hz, H-4'), 4.17 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 4.7$ Hz, $J_{4',5'} = 5.6$ Hz, H-3'), 4.26 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 5.6$ Hz, $J_{5',6'a} = J_{5',6'b} = 3.6$ Hz, H-5'), 4.40 (dt, 1H, $J_{2',3'} = 5.2$ Hz, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 6.7$ Hz, H-2'), 4.55 (m, 2H, H-1'), 4.48 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 4.50-4.57 (m, 4H, H-1', CH_2Ph), 4.57 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.63 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 4.74 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 5.13 (s ancho, 2H, NH_2), 6.11 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 15H, Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 65.9 (C-1'), 70.1 (C-6'), 72.7, 73.4, 73.6 (CH_2Ph), 77.6 (C-3'), 77.7 (C-2'), 79.1 (C-4'), 80.5 (C-5'), 97.4 (C-5), 127.5-128.5 (CH Ar), 137.9, 138.1, 138.2 (C Ar), 160.8 (C-2), 162.2 (C-6), 171.1 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_5$ 561.2051; encontrada 561.2030.

De las fracciones de menor movilidad, se aísla **1.15b** (184 mg, 71%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 10.47$ min (98%).



$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.49 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.2$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.5$ Hz, H-6'a), 3.54 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 4.1$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.5$ Hz, H-6'b), 3.88 (m, 1H, H-3'), 3.95 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 1H, H-5'), 4.27 (m, 1H, H-1'a), 4.33 (m, 1H, H-2'), 4.40 (dd, 1H, $J_{1'b,2'} = 3.3$ Hz, $J_{1'a,1'b} = 11.2$ Hz, H-1'b), 4.48 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 4.50 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph), 4.54 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, CH_2Ph), 4.55 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph), 4.60 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 5.05 (s ancho, 2H, NH_2), 5.95 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 15H, Ar).

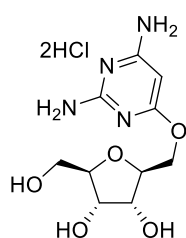
$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 66.3 (C-1'), 70.3 (C-6'), 72.0, 72.2, 73.6 (CH_2Ph), 77.2 (C-4'), 77.5 (C-3'), 79.2 (C-2'), 81.7 (C-5'), 97.4 (C-5), 127.6-128.6 (CH Ar), 137.7, 137.8, 138.2 (C Ar), 160.8 (C-2), 162.1 (C-6), 170.9 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_5$ 561.2013; encontrada 561.2030.

6.4.2. Síntesis de metiloxinucleósidos desprotegidos de 2,5-anhidroalitol y de 2,5-anhidroaltritol (1.1b y 1.16b)

Procedimiento general de hidrogenación catalítica: Una disolución del derivado bencilado (0.30 mmol) en metanol (10 mL) y HCl 37 % (49 μ L, 0.60 mmol) en presencia de Pd(OH)₂/C 20% (10 mg) se hidrogena a 30 °C y 40 psi durante la noche. A continuación se filtra el catalizador, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad. El método de purificación, los eluyentes, y los rendimientos se indicarán a continuación en cada caso.

Dihidrocloruro de 2,6-diamino-4-(2',5'-anhidro-D-alitolil)pirimidina (1.1b)



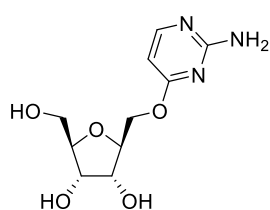
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación, con **1.4a,b** (90 mg, 0.17 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol/hidróxido amónico 4:1:0.1) obteniéndose **1.1b** (49 mg, 80%) en forma de aceite (dihidrocloruro). HPLC-Analítico (Waters 600, gradiente 4): t_R = 0.71 min (97%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.34 (dd, 1H, $J_{5',6'a}$ = 5.0 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.6 Hz, H-6'a), 3.42 (dd, 1H, $J_{5',6'b}$ = 4.3 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.6 Hz, H-6'b), 3.70 (m, 1H, H-5'), 3.74 (m, 1H, H-3'), 3.80 (dd, 1H, $J_{3',4'}$ = 5.5 Hz, $J_{4',5'}$ = 4.3 Hz, H-4'), 3.89 (m, 1H, H-2'), 4.15 (dd, 1H, $J_{1'a,2'}$ = 6.1 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 11.3 Hz, H-1'a), 4.35 (dd, 1H, $J_{1'b,2'}$ = 3.4 Hz, $J_{1'a,1'b}$ = 11.3 Hz, H-1'b), 5.35 (s, 1H, H-5).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 61.9 (C-6'), 68.3 (C-1'), 71.3 (C-4'), 71.6 (C-3'), 75.8 (C-5), 79.8 (C-2'), 85.0 (C-5'), 154.9 (C-4), 157.1 (C-2), 170.8 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₀H₁₆N₄O₅ 272.1126; encontrada 272.1121.

2-Amino-4-(2',5'-anhidro-D-alitolil)pirimidina (1.16b)



Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.15b** (80 mg, 0.14 mmol) en presencia de Pd/C 10% (10 mg) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol/hidróxido amónico 4:1:0.1) obteniéndose **1.16b** (18 mg, 50%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): t_R = 2.55 min (98%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.33 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 5.0$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 11.5$ Hz, H-6'a), 3.41 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 4.2$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 11.5$ Hz, H-6'b), 3.68 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 4.3$ Hz, $J_{5',6'a} = 5.0$ Hz, $J_{5',6'b} = 4.2$ Hz, H-5'), 3.73 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.6$ Hz, $J_{3',4'} = 5.4$ Hz, H-3'), 3.78 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 5.4$ Hz, $J_{4',5'} = 4.3$ Hz, H-4'), 3.89 (td, 1H, $J_{2',3'} = 6.6$ Hz, $J_{1'a,2'} = 6.7$ Hz, $J_{1'b,2'} = 3.2$ Hz, H-2'), 4.13 (dd, 1H, $J_{1'a,2'} = 6.7$ Hz, $J_{1'a,1'b} = 11.4$ Hz, H-1'a), 4.33 (dd, 1H, $J_{1'b,2'} = 3.2$ Hz, $J_{1'a,1'b} = 11.4$ Hz, H-1'b), 4.69 (s ancho, 1H, OH), 4.85 (s ancho, 1H, OH), 4.92 (s ancho, 1H, OH), 6.00 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-5), 6.58 (s ancho, 2H, NH₂), 7.94 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-6).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 62.1 (C-6'), 66.5 (C-1'), 71.3 (C-4'), 71.8 (C-3'), 80.1 (C-2'), 84.9 (C-5'), 96.4 (C-5), 158.4 (C-6), 163.2 (C-2), 169.4 (C-4).

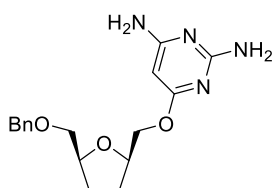
HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₀H₁₅N₃O₅ 257.1014; encontrada 257.1012.

6.5. SÍNTESIS DE 3',4'-DIDESOXI METILOXINUCLEÓSIDOS

6.5.1. Síntesis de los 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos bencilados de tetrahidrofurano (1.20, 1.23, 1.24, 1.28, 1.36, 1.38, 1.42, 1.43, 1.46, 1.47, 1.54 y 1.55)

Procedimiento general B: Sobre una disolución de **1.17**, **1.18** o **1.44** (1 eq) en THF o DMF anhidro (10 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (2 eq). Se agita a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se añade la correspondiente nucleobase (1.2-2 eq). La mezcla de reacción se calienta a 90-120 °C en tubo cerrado durante 16-48 horas o en microondas durante 1-3 horas. Se destruye el exceso de NaH con metanol y se evapora a sequedad. El método de purificación, los eluyentes, y los rendimientos se indicarán a continuación en cada caso.

2,6-Diamino-4-[[[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (1.20)



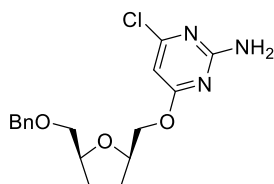
Siguiendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (850 mg, 3.82 mmol) en THF seco (10 mL), se trata con 2,4-diamino-6-cloropirimidina (**1.3**) (828 mg, 5.73 mmol) a 90 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1) para dar **1.20** (693 mg, 55%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Waters 2690, gradiente 2): $t_R = 3.51$ min (79%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.75-1.99 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.50 (m, 2H, CH_{2a}OAr , CH_{2a}OBn), 4.20 (m, 4H, H-2', H-5', CH_{2b}OBn , CH_{2b}OAr), 4.56 (m, 2H, CH_2Ph), 4.68 (s ancho, 2H, NH_2), 4.86 (s ancho, 2H, NH_2), 5.22 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 27.9 (C-3', C-4'), 68.2 (CH_2OBn), 73.0 (CH_2OAr), 73.3 (CH_2Ph), 77.7 (C-5), 78.4 (C-2'), 78.8 (C-5'), 127.5, 127.7, 128.4 (CH Ar), 138.5 (C Ar), 162.2 (C-6), 164.9 (C-2), 171.3 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$ 330.1698; encontrada 330.1692.

2-Amino-6-cloro-4-[[*(2'RS,5'SR)*-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (**1.23**)



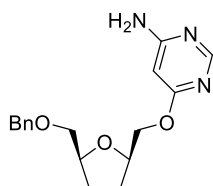
Siguiendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (259 mg, 1.16 mmol) se trata con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (228 mg, 1.39 mmol) en DMF seco (5 mL) a 90 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1) para dar **1.23** (321 mg, 79%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): t_R = 8.40 min (93%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.64-1.94 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.39 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_{2a}} = 5.8$ Hz, $J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}} = 10.2$ Hz, CH_{2a}OBn), 3.43 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_{2b}} = 4.6$ Hz, $J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}} = 10.2$ Hz, CH_{2b}OBn), 4.04 (m, 1H, H-5'), 4.15 (m, 2H, H-2', CH_{2a}OAr), 4.25 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_{2b}} = 6.5$ Hz, $J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}} = 13.4$ Hz, CH_{2b}OAr), 4.48 (m, 2H, CH_2Ph), 6.07 (s, 1H, H-5), 7.08 (s ancho, 2H, NH_2), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 27.3, 27.5 (C-3', C-4'), 68.5 (CH_2OAr), 72.2 (CH_2Ph), 72.5 (CH_2OBn), 76.5 (C-2'), 78.3 (C-5'), 94.3 (C-5), 127.3, 127.4, 128.3 (CH Ar), 138.5 (C Ar), 160.0 (C-2), 162.8 (C-6), 170.5 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_3$ 349.1211; encontrada 349.1193.

6-Amino-4-[[*(2'RS,5'SR)*-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (**1.24**)



Siguiendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (85 mg, 0.38 mmol) en THF seco (10 mL), se trata con 4-amino-6-cloropirimidina (**1.22**) (59 mg, 0.46 mmol) a 100 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (acetato de etilo/metanol 9:1) para obtener **1.24**

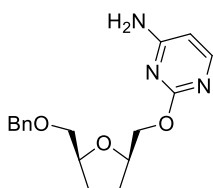
(69 mg, 58%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Waters 2690, gradiente 3): $t_R = 3.17$ min (99%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.78-2.00 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.49 (dd, 2H, $J_{5',\text{CH}_2\text{a}} = 5.3$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2aOBn), 3.52 (dd, 2H, $J_{5',\text{CH}_2\text{b}} = 4.9$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2bOBn), 4.14-4.31 (m, 3H, H-2', H-5', CH_2bOAr), 4.38 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_2\text{a}} = 3.2$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.2$ Hz, CH_2aOAr), 4.54 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, CH_2Ph), 4.83 (s ancho, 2H, NH_2), 5.77 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar), 8.23 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 27.9, 28.0 (C-3', C-4'), 68.7 (CH_2OAr), 72.9 (CH_2OBn), 73.5 (CH_2Ph), 77.7 (C-2'), 79.1 (C-5'), 87.7 (C-5), 127.7, 127.8, 128.4 (CH Ar), 138.4 (C Ar), 158.0 (C-2), 164.3 (C-6), 170.0 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ 315.1571; encontrada 315.1583.

4-Amino-2-[(2'*RS*,5'*SR*)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxipirimidina (1.28)



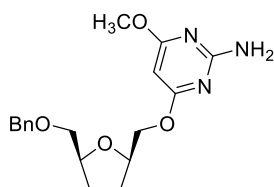
Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (111 mg, 0.50 mmol) se trata con 4-amino-2-cloropirimidina (**1.27**) (228 mg, 1.39 mmol) en DMF seco (5 mL) a 90 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1) para dar **1.28** (59 mg, 37%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 5.59$ min (92%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.76-2.02 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.49 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{a}} = 5.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.0$ Hz, CH_2aOBn), 3.52 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{b}} = 5.9$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.0$ Hz, CH_2bOBn), 4.16 (m, 1H, H-5'), 4.28 (m, 3H, H-2', CH_2OAr), 4.53 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 5.04 (s ancho, 2H, NH_2), 6.06 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-5), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar), 7.99 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 28.1, 28.3 (C-3', C-4'), 69.1 (CH_2OAr), 73.1 (CH_2OBn), 73.5 (CH_2Ph), 77.5 (C-2'), 78.9 (C-5'), 99.6 (C-5), 127.7, 127.8, 128.5 (CH Ar), 138.5 (C Ar), 157.3 (C-6), 164.8 (C-4), 165.1 (C-2).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ 315.1594, encontrada 315.1583.

2-Amino-6-metoxi-4-[[[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina y 2-amino-4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.36 y 1.37)



Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (200 mg, 0.90 mmol) se trata con 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.34**) (176 mg, 1.10 mmol) en DMF seco (10 mL) a 100 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 3:2). De las fracciones de mayor movilidad se aísla el producto deseado **1.36** (168 mg, 54%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 6.92$ min (97%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.80-2.02 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.50 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{a}} = 5.4$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2aOBn), 3.53 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{bOBn}} = 4.3$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2bOBn), 3.91 (s, 3H, CH_3), 4.15-4.35 (m, 4H, CH_2OAr , H-2', H-5'), 4.53 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.56 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 5.50 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 27.8, 27.9 (C-3', C-4'), 56.2 (CH_3), 70.9 (CH_2OAr), 72.7 (CH_2OBn), 73.4 (CH_2Ph), 77.0 (C-2'), 78.3 (C-5), 79.3 (C-5'), 127.3, 127.9, 128.4 (CH Ar), 138.3 (C Ar), 157.8 (C-2), 169.2 (C-6), 171.1 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ 345.1704; encontrada 345.1689.

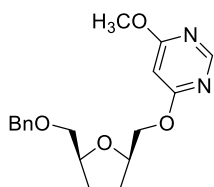
De las fracciones de menor movilidad se aísla **2-amino-4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.37)** (42 mg, 9%) en forma de aceite. $[\alpha]_D^{20} = -0.9^\circ$ ($c = 0.25$, CHCl_3). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): $t_R = 4.67$ min (99%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.80-2.06 (m, 8H, H-3', H-4') 3.48 (dd, 2H, $J_{5',\text{CH}_2\text{a}} = 4.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.0$ Hz, CH_2aOBn), 3.51 (dd, 2H, $J_{5',\text{CH}_2\text{b}} = 5.4$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.0$ Hz, CH_2bOBn), 4.14-4.36 (m, 8H, CH_2OAr , H-2', H-5'), 4.55 (m, 4H, CH_2Ph), 5.52 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 10H, Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 27.9, 28.1 (C-3', C-4'), 71.3 (CH_2OAr), 72.8 (CH_2OBn), 73.5 (CH_2Ph), 77.2 (C-2'), 78.9 (C-5), 79.5 (C-5'), 127.7, 127.8, 128.4 (CH Ar), 138.4 (C Ar), 157.5 (C-2'), 169.7 (C-4', C-6').

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ 535.2695; encontrada 535.2682.

6-Metoxi-4-[[[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina y 4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.38 y 1.39)



Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (200 mg, 0.90 mmol) se trata con 4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.35**) (159 mg, 1.10 mmol) en DMF seco (10 mL) a 100 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1). De las fracciones de mayor movilidad se aísla el producto deseado **1.38** (133 mg, 45%) en forma de aceite. $[\alpha]_D^{20} = -0.1^\circ$ (c = 0.5, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 8.56$ min (97%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.78-2.03 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.48 (dd, 1H, $J_{5',CH2a} = 4.9$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2a}OBn), 3.52 (dd, 1H, $J_{5',CH2b} = 5.3$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2b}OBn), 3.93 (s, 3H, CH₃), 4.18 (m, 1H, H-5'), 4.25-4.44 (m, 3H, CH₂OAr, H-2'), 6.07 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar), 8.41 (s, 1H, H-2).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 27.9, 28.1 (C-3', C-4'), 54.2 (CH₃), 69.1 (CH₂OAr), 72.8 (CH₂OBn), 73.5 (CH₂Ph), 77.6 (C-2'), 79.1 (C-5'), 90.8 (C-5), 127.7, 127.8, 128.4 (CH Ar), 138.4 (C Ar), 157.5 (C-2), 170.9 (C-4), 171.3 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₈H₂₂N₂O₄ 330.1592; encontrada 330.1580.

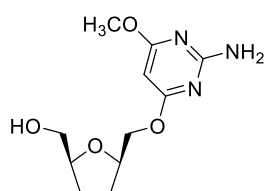
De las fracciones de menor movilidad se aísla **4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.39)** (38 mg, 8%) en forma de aceite. $[\alpha]_D^{20} = -0.8^\circ$ (c = 0.25, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): $t_R = 6.84$ min (99%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.77-2.03 (m, 8H, H-3', H-4'), 3.49 (dd, 2H, $J_{5',CH2a} = 4.9$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2a}OBn), 3.51 (dd, 2H, $J_{5',CH2b} = 5.3$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.0$ Hz, CH_{2b}OBn), 4.18 (m, 2H, H-5'), 4.29 (m, 4H, CH_{2a}OAr, H-2'), 4.38 (m, 2H, CH_{2b}OAr), 4.53 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, CH₂Ph), 4.56 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, CH₂Ph), 6.10 (s, 1H, H-5), 7.27-7.37 (m, 10H, Ar), 8.37 (s, 1H, H-2).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 27.9, 28.1 (C-3', C-4'), 69.1 (CH₂OAr), 72.8 (CH₂OBn), 73.5 (CH₂Ph), 77.6 (C-2'), 79.1 (C-5'), 91.3 (C-5), 127.7, 127.8, 128.4 (CH Ar), 138.4 (C Ar), 157.3 (C-2), 170.9 (C-4, C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₃₀H₃₆N₂O₆ 520.2597; encontrada 520.2573.

2-Amino-6-metoxi-4-[[*(2' RS,5' SR)*-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (**1.42**)

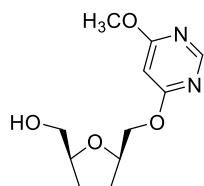


Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.44**¹⁰⁵ (120 mg, 0.32 mmol) se trata con 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.34**) (61 mg, 0.38 mmol) en DMF seco (5 mL) a 100 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (acetato de etilo/metanol 10:1) para obtener **1.42** (16 mg, 10%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 3.71$ min (99%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.62-1.94 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.35 (m, 2H, CH₂OH), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.86 (m, 1H, H-2'), 4.09 (m, 2H, CH_{2a}OAr, H-5'), 4.16 (m, 1H, CH_{2b}OAr), 4.65 (s ancho, 1H, OH), 5.33 (s, 1H, H-5), 6.56 (s ancho, 2H, NH₂).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 27.2, 27.5 (C-3', C-4'), 53.2 (OCH₃), 63.9 (CH₂OH), 68.1 (CH₂OAr), 76.7 (C-5'), 78.1 (C-5), 80.3 (C-2'), 162.7 (C-2), 171.2 (C-6), 171.4 (C-4). HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₁H₁₇N₃O₄ 255.1224; encontrada 255.1219.

6-Metoxi-4-[[*(2' RS,5' SR)*-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (**1.43**)



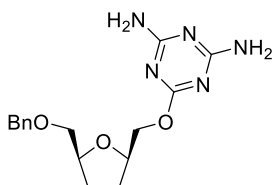
Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.44**¹⁰⁵ (120 mg, 0.32 mmol) se trata con 4-cloro-6-metoxipirimidina (**1.35**) (56 mg, 0.38 mmol) en DMF seco (5 mL) a 100 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (acetato de etilo/metanol 10:1) para obtener **1.43** (18 mg, 12%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 4.83$ min (92%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.79-2.07 (m, 4H, H-3', H-4'), 2.80 (s ancho, 1H, OH), 3.50 (dd, 1H, $J_{2',CH2a} = 4.4$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 11.8$ Hz, CH_{2a}OH), 3.74 (dd, 1H, $J_{2',CH2b} = 3.0$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 11.8$ Hz, CH_{2a}OH), 3.93 (s, 3H, CH₃), 4.12 (m, 1H, H-2'), 4.33 (m, 2H, CH_{2a}OAr, H-5'), 4.45 (m, 1H, CH_{2b}OAr), 6.09 (s, 1H, H-5), 8.40 (s, 1H, H-2).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 26.7, 28.3 (C-3', C-4'), 54.3 (OCH₃), 64.6 (CH₂OH), 69.0 (CH₂OAr), 77.9 (C-5'), 80.8 (C-5), 91.0 (C-2'), 157.4 (C-2), 170.8 (C-6), 171.5 (C-4).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₁H₁₆N₂O₄ 240.1101; encontrada 240.1110.

4,6-Diamino-2-[[[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-1,3,5-triazina (1.46)



Seguendo el procedimiento general B, una disolución de **1.17** (105 mg, 0.47 mmol) se trata con 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) (96 mg, 0.66 mmol) en DMF seco (6 mL) a 100 °C durante 3 horas en el microondas, añadiendo NaH al 60% (19 mg, 0.47 mmol) y **1.45** (48 mg, 0.33 mmol) cada hora. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 9:1) para dar **1.46** (98 mg, 62%) en forma de sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{20} = -0.1^\circ$ ($c = 0.5$, CH₃OH). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 5.71$ min (93%).

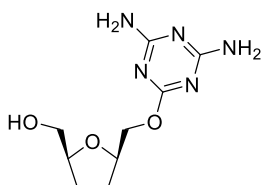
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.65-1.94 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.40 (dd, 1H, $J_{5',CH2a} = 5.8$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.2$ Hz, CH_{2a}OBn), 3.44 (dd, 1H, $J_{5',CH2b} = 4.6$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.2$ Hz, CH_{2b}OBn), 4.05 (m, 1H, H-5'), 4.16 (m, 1H, H-2'), 4.20 (dd, 1H, $J_{2',CH2a} = 6.1$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.8$ Hz, CH_{2a}OAr), 4.31 (dd, 1H, $J_{2',CH2b} = 3.7$ Hz, $J_{CH2a,CH2b} = 10.8$ Hz, CH_{2b}OAr), 4.48 (m, 2H, CH₂Ph), 7.23-7.37 (m, 5H, Ar), 7.83 (s ancho, 4H, 2NH₂).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 27.2, 27.5 (C-3', C-4'), 69.6 (CH₂OAr), 72.2 (CH₂Ph), 72.5 (CH₂OBn), 76.3 (C-2'), 78.4 (C-5'), 127.3, 127.4, 128.2 (CH Ar), 138.5 (C Ar), 163.0 (C-4, C-6), 166.4 (C-2).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₆H₂₁N₅O₃ 331.1636; encontrada 331.1644.

4,6-diamino-2-[[[(2' RS,5' SR)-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-1,3,5-triazina y (2R,5S)-2,5-bis[(4',6'-diamino-1',3',5'-triazin-2'-il)oximetil]tetrahidrofurano (1.47 y 1.49)

Seguendo el procedimiento general B, sobre una disolución de **1.18** (150 mg, 1.13 mmol) en DMF seco (5 mL) se adiciona NaH al 60% (136 mg, 3.39 mmol) y se trata con 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) (329 mg, 2.26 mmol) a 100 °C durante 48 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por cromatografía preparativa en capa fina en diclorometano/metanol/ácido acético (9:1:0.1).



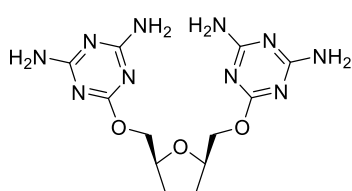
De las bandas de mayor movilidad se aísla el producto **1.47** (114 mg, 42%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): $t_R = 4.95$ min (98%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.65-1.92 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.35 (m, 2H, CH₂OH), 3.88 (m, 1H, H-5'), 4.13 (m, 1H, H-2'), 4.23 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2a}$ = 6.3 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 11.0 Hz, CH_{2a}OAr), 4.33 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2b}$ = 3.9 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 11.0 Hz, CH_{2b}OAr), 8.30 (s ancho, 4H, NH₂).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.1, 27.2 (C-3', C-4'), 63.9 (CH₂OH), 70.2 (CH₂OAr), 75.9 (C-2'), 80.4 (C-5'), 161.0 (C-4, C-6), 165.1 (C-2).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₉H₁₅N₅O₃ 241.1179; encontrada 241.1175.

De las bandas de menor movilidad, se aísla **(2R,5S)-2,5-bis[(4',6'-diamino-1',3',5'-triazin-2'-il)oximetil]tetrahidrofurano (1.49)** (55 mg, 14%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): t_R = 5.46 min (76%).

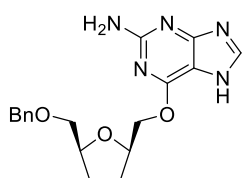


^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 + HCOOH) δ : 1.69-1.96 (m, 4H, H-3, H-4), 4.12 (m, 6H, H-2, H-5, 2CH₂OAr), 6.63 (s ancho, 8H, 4NH₂).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6 + HCOOH) δ : 27.6 (C-3, C-4), 68.0 (2CH₂OAr), 77.0 (C-2, C-5), 168.3 (C-4', C-6'), 170.6 (C-2').

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₂H₁₈N₁₀O₃ 350.1571; encontrada 350.1563.

2-Amino-6-[[[(2'RS,5'SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-7H-purina (1.54)

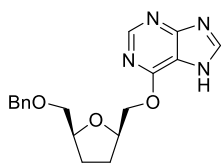


Seguendo el procedimiento general B, sobre una disolución de **1.17** (50 mg, 0.22 mmol) en DMF seco (5 mL) se adiciona NaH al 60% (18 mg, 0.44 mmol) y se trata con **1.52** (74 mg, 0.26 mmol) a 120 °C durante una hora en el microondas. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.54** (38 mg, 50%) en forma de sólido amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): t_R = 5.62 min (98%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.70-2.00 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.42 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}2a}$ = 5.6 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 10.1 Hz, CH_{2a}OBn), 3.46 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}2b}$ = 4.5 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 10.1 Hz, CH_{2b}OBn), 4.07 (m, 1H, H-5'), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.32 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2a}$ = 6.4 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 10.9 Hz, CH_{2a}OAr), 4.41 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2b}$ = 3.9 Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b}$ = 10.9 Hz, CH_{2b}OAr), 4.48 (m, 2H, CH₂Ph), 6.25 (s, 2H, NH₂), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar), 7.82 (s, 1H, H-8), 12.42 (s, 1H, NH).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.5, 27.9 (C-3', C-4'), 67.9 (CH₂OAr), 72.2 (CH₂Ph), 72.6 (CH₂OBn), 76.8 (C-2'), 78.3 (C-5'), 112.4 (C-5), 127.3, 127.4, 128.2 (CH Ar), 138.3 (C Ar), 138.5 (C-8), 155.8(C-4), 159.6 (C-6), 159.7 (C-2).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₈H₂₁N₅O₃ 355.1647; encontrada 355.1644.

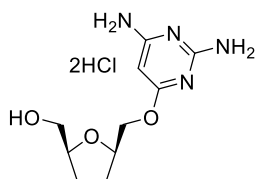
6-[[{(2'RS,5'SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-7H-purina (1.55)

Seguindo el procedimiento general B, sobre una disolución de **1.17** (390 mg, 1.75 mmol) en DMF seca (10 mL) se adiciona NaH al 60% (280 mg, 7.00 mmol) y se trata con **1.53** (650 mg, 2.62 mmol) a 90 °C durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.55** (0.60 g, 53%) en forma de sólido amorfo. $[\alpha]_D^{20} = +0.4^\circ$ ($c = 0.9$, CHCl_3). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 6.42$ min (99%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.75-2.01 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.41 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2a} = 5.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2a,\text{CH}_2b} = 10.3$ Hz, CH_2aOBn), 3.46 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2b} = 4.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2a,\text{CH}_2b} = 10.3$ Hz, CH_2bOBn), 4.07 (m, 1H, H-5'), 4.30 (m, 1H, H-2'), 4.43 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_2a} = 6.6$ Hz, $J_{\text{CH}_2a,\text{CH}_2b} = 11.2$ Hz, CH_2aOAr), 4.46 (m, 2H, CH_2Ph), 4.58 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_2b} = 3.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2a,\text{CH}_2b} = 11.2$ Hz, CH_2bOAr), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar), 8.39 (s, 1H, H-2), 8.47 (s, 1H, H-8), 13.42 (s ancho, 1H, NH).

¹³C-RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.4, 27.5 (C-3', C-4'), 68.7 (CH_2OAr), 72.2 (CH_2Ph), 72.6 (CH_2OBn), 76.7 (C-2'), 78.3 (C-5'), 120.2 (C-5), 127.3, 127.4, 128.1 (CH Ar), 138.6 (C Ar), 141.8 (C-8), 150.8 (C-2), 153.1 (C-4), 159.7 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ 340.1531; encontrada 340.1535.

6.5.2. Síntesis de 3',4'-didesoxi metiloxinucleósidos desprotegidos de tetrahidrofurano (1.21, 1.25, 1.26, 1.29, 1.56 y 1.57)**Dihidroclicloruro de 2,6-diamino-4-[[{(2'RS,5'SR)-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.21)**

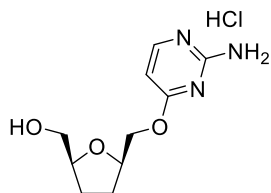
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.20** (100 mg, 0.30 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol/hidróxido amónico 4:1:0.1) para obtener **1.21** (48 mg, 51%) en forma de aceite (dihidroclicloruro). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): $t_R = 3.16$ min (97%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.60-1.86 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.33 (m, 2H, CH_2OH), 3.85 (m, 1H, H-5'), 4.04 (m, 3H, H-2' y CH_2OAr), 4.66 (s ancho, 1H, OH), 5.02 (s, 1H, H-5), 5.90 (s, 2H, NH_2), 6.03 (s, 2H, NH_2).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.2, 27.4 (C-3', C-4'), 63.9 (CH_2OH), 67.4 (CH_2OAr), 76.2 (C-5), 76.9 (C-2'), 80.2 (C-5'), 162.8 (C-6), 166.0 (C-2), 169.9 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ 240.1231; encontrada 240.1222.

Hydrochloride of 2-amino-4-[[[(2'*RS*,5'*SR*)-5'-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2'-il]methoxy]pyrimidina (1.25)



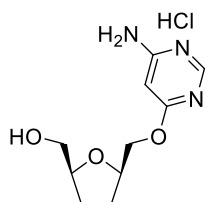
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.23** (46 mg, 0.13 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por cromatografía de extracción en fase sólida a vacío en el manifold utilizando un cartucho DSC-Si 1g (SUPELCO) (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.25** (25 mg, 74%) en forma de aceite (hidrocloruro). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 3.76$ min (98%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.66-1.95 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.34 (m, 2H, CH₂OH), 3.88 (m, 1H, H-5'), 4.17 (m, 2H, H-2'), 4.26 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2\text{a}} = 6.8$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}2\text{b}} = 11.1$ Hz, CH_{2a}OAr), 4.39 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2\text{b}} = 3.6$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}2\text{b}} = 11.1$ Hz, CH_{2b}OAr), 6.43 (d, 1H, $J_{5,6} = 6.9$ Hz, H-5), 8.18 (d, 1H, $J_{5,6} = 6.9$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.1, 27.3 (C-3', C-4'), 63.7 (CH₂OH), 70.1 (CH₂OAr), 76.0 (C-2'), 80.5 (C-5'), 98.9 (C-5), 147.0 (C-6), 156.8 (C-4), 171.3 (C-2).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₀H₁₅N₃O₃ 225.1115; encontrada 225.1113.

Hydrochloride of 6-amino-4-[[[(2'*RS*,5'*SR*)-5'-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2'-il]methoxy]pyrimidina (1.26)



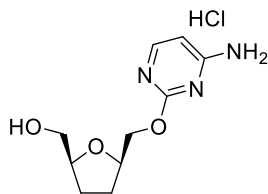
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.24** (57 mg, 0.18 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.26** (10 mg, 20%) en forma de aceite (hidrocloruro). HPLC-Analítico (Waters 600, gradiente 2): $t_R = 0.58$ min (97%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.62-1.90 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.35 (m, 2H, CH₂OH), 3.86 (m, 1H, H-5'), 4.09 (m, 1H, H-2'), 4.09 y 4.18 (m, 2H, CH₂OAr), 4.64 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, OH), 5.67 (s, 1H, H-5), 6.62 (s, 2H, NH₂), 8.06 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.4, 27.5 (C-3', C-4'), 64.1 (CH₂OH), 68.1 (CH₂OAr), 76.9 (C-2'), 80.3 (C-5'), 85.8 (C-5), 157.9 (C-2), 165.5 (C-6), 168.9 (C-4).

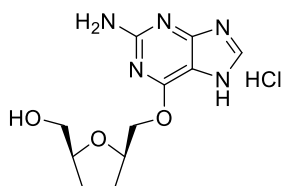
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₀H₁₅N₃O₃ 225.1119; encontrada 225.1113.

Hidrocloreto de 4-amino-2-[[[(2'*RS*,5'*SR*)-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (1.29)



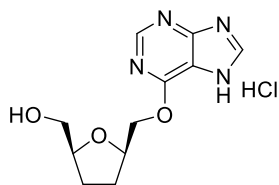
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.28** (34 mg, 0.11 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por cromatografía de extracción en fase sólida a vacío en el manifold utilizando un cartucho DSC-Si 1g (SUPELCO) (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.29** (8 mg, 28%) en forma de aceite (hidrocloreto). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): $t_R = 4.94$ min (99%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.65-1.92 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.33 (m, 2H, CH₂OH), 3.86 (m, 1H, H-5'), 4.10 (m, 3H, CH₂OAr, H-2'), 4.63 (s ancho, 1H, OH), 6.06 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-5), 6.84 (s ancho, 2H, NH₂), 7.83 (d, 1H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.2, 27.5 (C-3', C-4'), 63.9 (CH₂OH), 68.5 (CH₂OAr), 76.7 (C-2'), 80.2 (C-5'), 99.4 (C-5), 156.1 (C-6), 164.7 (C-4), 165.4 (C-2). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₀H₁₆N₃O₃ 226.1197; encontrada 226.1192.

Hidrocloreto de 2-amino-6-[[[(2'*RS*,5'*SR*)-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-7*H*-purina (1.56)



Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.54** (52 mg, 0.15 mmol) durante la noche. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.56** (25 mg, 41%) en forma de aceite (hidrocloreto). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): $t_R = 5.61$ min (99%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.68-1.98 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.35 (m, 2H, CH₂OH), 3.89 (m, 1H, H-5'), 4.21 (m, 1H, H-2'), 4.30 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2a} = 6.6$ Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b} = 11.0$ Hz, CH_{2a}OAr), 4.40 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}2b} = 4.2$ Hz, $J_{\text{CH}2a,\text{CH}2b} = 11.0$ Hz, CH_{2b}OAr), 4.70 (s ancho, 1H, OH), 6.25 (s, 2H, NH₂), 7.84 (s, 1H, H-8), 12.45 (s ancho, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.2, 27.6 (C-3', C-4'), 63.9 (CH₂OH), 68.2 (CH₂OAr), 76.7 (C-2'), 80.4 (C-5'), 113.4 (C-5), 137.7 (C-8), 155.0 (C-4), 159.6 (C-6), 172.2 (C-2). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₁H₁₅N₅O₃ 265.1162; encontrada 265.1175.

Hidrocloruro de 6-[[[(2' *RS*,5' *SR*)-5'-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]-7*H*-purina (1.57)



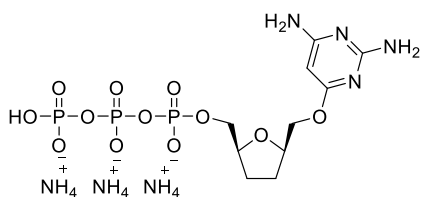
Se sigue el procedimiento general de hidrogenación con **1.55** (59 mg, 0.17 mmol) durante la noche. Después del procesamiento de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **1.57** (17 mg, 35%) en forma de aceite (hidrocloruro). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 4): $t_R = 3.89$ min (91%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.73-1.99 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.36 (m, 2H, CH_2OH), 3.90 (m, 1H, H-5'), 4.27 (m, 1H, H-2'), 4.45 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_2\text{a}} = 6.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 11.2$ Hz, CH_2aOAr), 4.60 (dd, 1H, $J_{2',\text{CH}_2\text{b}} = 3.8$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 11.2$ Hz, CH_2bOAr), 8.56 (s, 1H, H-2), 8.70 (s, 1H, H-8).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO-d_6) δ : 27.2, 27.4 (C-3', C-4'), 63.8 (CH_2OH), 69.2 (CH_2OAr), 76.5 (C-2'), 80.4 (C-5'), 116.4 (C-5), 142.8 (C-8), 151.8 (C-2), 154.0 (C-4), 158.6 (C-6). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ 250.1054; encontrada 250.1066

6.6. SÍNTESIS DEL TRIFOSFATO 1.60

Sal triamónica de 2,6-diamino-4-[[[(2' *RS*,5' *SR*)-5'-(trifosfooximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidina (1.60)



Sobre una disolución del producto **1.21** (150 mg, 0.54 mmol) y 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno (esponja protónicaTM; 196 mg, 0.92 mmol), previamente secados a vacío durante 5 horas, en trimetilfosfato (2 mL) a 0 °C, se añade lentamente oxiclórico de fósforo (0.14 mL, 1.46 mmol). La mezcla de reacción se agita a 5 °C durante toda la noche. Se añade pirofosfato de tributilamonio (1.6 g, 2.92 mmol) y tributilamina (0.56 mL, 2.38 mmol) en DMF anhidra (2.7 mL) y se agita a 0 °C durante 20 minutos. Seguidamente se hidroliza la reacción con una disolución 1M de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) (6.7 mL) y se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se liofiliza. El crudo de reacción se purifica mediante una columna cromatográfica de intercambio iónico Sephadex-DEAE A-25 (500 mL, gradiente lineal, 0-0.5 M NH_4HCO_3) para obtener el nucleótido **1.60** (sal amónica) (23 mg, 8%) en forma de sólido blanco amorfo tras varios ciclos de liofilización. HPLC (Waters 600, condiciones isocráticas 0.5 M KH_2PO_4): $t_R = 6.49$ min (98%).

¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 1.72-1.92 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.53-4.14 (m, 6H, CH₂OP, CH₂OAr, H-2', H-5'), 5.56 (s, 1H, H-5). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ: -21.31, -8.49, 1.16. HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₁₀H₁₈N₄O₁₂P₃ 480.0216; encontrada 480.0212.

6.7. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE ESTRUCTURA DIMÉRICA (1.37, 1.39, 1.65, 1.66 y 1.68-1.71)

Procedimiento general C: Sobre una disolución de **1.17**, **1.61** o **1.67** (2.5 eq) en THF o DMF seco (2 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se adiciona NaH al 60% (5 eq). Se agita a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se añade la correspondiente dicloropirimidina (1 eq). La mezcla de reacción se calienta a 100 °C en tubo cerrado durante 16 horas. Se destruye el exceso de NaH con metanol y se evapora a sequedad. El método de purificación, los eluyentes, y los rendimientos se indicarán a continuación en cada caso.

6-{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}pirimidin-4-ona y 4,6-bis{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}pirimidina (1.63 y 1.65)

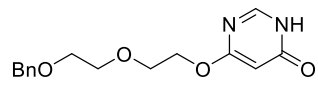
Siguiendo el procedimiento general C, sobre una disolución de **1.61**¹¹³ (0.8 g, 4.1 mmol) en DMF seco (10 mL), se adiciona NaH al 95% (0.21 g, 8.2 mmol). Posteriormente, se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (0.25 g, 1.70 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 1:1). De las fracciones de mayor movilidad se aísla el producto dimérico **1.65** (80 mg, 10%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): *t_R* = 5.74 min (99%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.65 (m, 4H, CH₂OBn), 3.72 (m, 4H, CH₂CH₂OBn), 3.83 (m, 4H, CH₂O), 4.49 (m, 4H, OCH₂), 4.57 (s, 4H, CH₂Ph), 6.13 (s, 1H, H-5), 7.27-7.36 (m, 10H, Ar), 8.38 (s, 1H, H-2).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 66.1 (OCH₂), 69.5 (CH₂OBn), 69.6 (CH₂O), 70.9 (CH₂CH₂OBn), 73.4 (OCH₂Ph), 91.4 (C-5), 127.8, 127.9, 128.5 (CH Ar), 138.3 (C Ar), 157.4 (C-2), 170.8 (C-4, C-6).

HRMS (ES, positivo): *m/z* calculada para C₂₆H₃₂N₂O₆ 468.2256; encontrada 468.2260.

De las fracciones de menor movilidad se aísla el producto **1.63** (356 mg, 72%) en forma de sólido blanco amorfo. IR (KBr): 1698 cm⁻¹ (C=O). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): *t_R* = 5.83 min (98%).



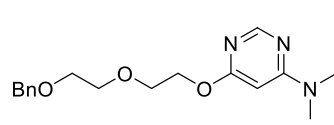
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.65 (m, 2H, CH_2OBn), 3.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 3.83 (m, 2H, CH_2O), 4.41 (m, 2H, OCH_2), 4.56 (s, 2H, CH_2Ph), 5.75 (s, 1H, H-5), 7.27-7.36 (m, 5H, Ar), 7.98 (s, 1H, H-2).
 $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 67.0 (OCH_2), 69.4 (CH_2OBn), 69.5 (CH_2O), 70.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 73.4 (OCH_2Ph), 93.0 (C-5), 127.7, 127.8, 128.5 (CH Ar), 138.2 (C Ar), 148.9 (C-2) 166.6 (C-4), 170.7 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ 290.1256; encontrada 290.1267.

6-{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}-4-*N,N*-dimetilaminopirimidina y 4,6-bis{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}pirimidina (1.64 y 1.65)

Siguiendo el procedimiento general C, una disolución de **1.61**¹¹³ (0.34 g, 1.73 mmol) se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (104 mg, 0.70 mmol) en DMF seco (5 mL) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 1:1). De las fracciones de mayor movilidad se aísla el producto dimérico **1.65** (72 mg, 22%) en forma de aceite.

De las fracciones de menor movilidad se aísla el producto **1.64** (124 mg, 56%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): t_R = 5.93 min (99%).

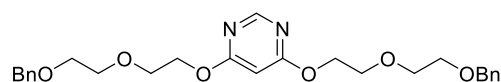


$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.05 (s, 6H, CH_3), 3.65 (m, 2H, CH_2OBn), 3.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 3.88 (m, 2H, CH_2O), 4.47 (m, 2H, OCH_2), 4.57 (s, 2H, CH_2Ph), 5.76 (s, 1H, H-5), 7.27-7.36 (m, 5H, Ar), 8.28 (s, 1H, H-2).

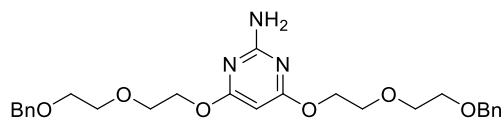
$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.4 (2 CH_3), 65.3 (OCH_2), 69.6 (CH_2OBn), 69.8 (CH_2O), 70.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 73.4 (OCH_2Ph), 85.3 (C-5), 127.7, 127.9, 128.5 (CH Ar), 138.4 (C Ar), 157.2 (C-2) 164.1 (C-4), 169.7 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ 317.1738; encontrada 317.1739.

4,6-bis{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}pirimidina (1.65)



Siguiendo el procedimiento general C, una disolución de **1.61**¹¹³ (80 mg, 0.41 mmol) en THF seco (2 mL) se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (25 mg, 0.16 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **1.65** (43 mg, 57%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): t_R = 5.74 min (99%).

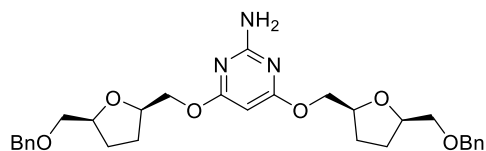
2-Amino-4,6-bis{2-[2-(benciloxi)etoxi]etoxi}pirimidina (1.66)

Siguiendo el procedimiento general C, una disolución de **1.61**¹¹³ (80 mg, 0.41 mmol) en THF seco (2 mL) se trata con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (25 mg, 0.16 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesamiento de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **1.66** (57 mg, 74%) en forma de aceite. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): $t_R = 4.10$ min (95%).

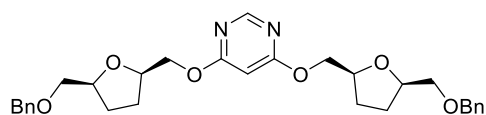
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.64 (m, 4H, CH₂OBn), 3.69 (m, 4H, CH₂CH₂OBn), 3.80 (m, 4H, CH₂O), 4.36 (m, 4H, OCH₂), 4.57 (s, 4H, CH₂Ph), 4.87 (s ancho, 2H, NH₂), 5.52 (s, 1H, H-5), 7.27-7.36 (m, 10H, Ar).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 65.6 (OCH₂), 69.5 (CH₂OBn), 69.6 (CH₂O), 70.8 (CH₂CH₂OBn), 73.4 (OCH₂Ph), 80.8 (C-5), 127.8, 127.9, 128.5 (CH Ar), 138.3 (C Ar), 157.4 (C-2), 170.8 (C-4, C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₂₆H₃₃N₃O₆ 483.2380; encontrada 483.2369.

2-amino-4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.37)

Siguiendo el procedimiento general C, una disolución de **1.17** (80 mg, 0.36 mmol) en THF seco (2 mL) se trata con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (25 mg, 0.15 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesamiento de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **1.37** (42 mg, 53%) en forma de aceite. $[\alpha]_D^{20} = -0.9^\circ$ ($c = 0.25$, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): $t_R = 4.67$ min (99%).

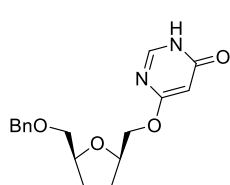
4,6-bis{[(2' RS,5' SR)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina (1.39)

Siguiendo el procedimiento general C, una disolución de **1.17** (80 mg, 0.36 mmol) en THF seco (2 mL) se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (22 mg, 0.15 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesamiento de la reacción, el crudo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **1.39** (46 mg, 59%) en forma de aceite. $[\alpha]_D^{20} = -0.8^\circ$ ($c = 0.25$, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 5): $t_R = 6.84$ min (99%).

4,6-bis{[(2' *RS*,5' *SR*)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi}pirimidina y 4-[[[(2' *RS*,5' *SR*)-5'-(benciloximetil)tetrahidrofuran-2'-il]metoxi]pirimidin-6-ona y (1.39 y 1.41)

Seguendo el procedimiento general C, sobre una disolución de **1.17** (0.32 g, 1.44 mmol) en DMF seco (5 mL) se adiciona NaH al 95% (73 mg, 2.88 mmol). Posteriormente, se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (86 mg, 0.58 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 7:3). De las fracciones de mayor movilidad se aísla el producto deseado **1.39** (24 mg, 8%) en forma de aceite.

De las fracciones de menor movilidad se aísla el producto **1.41** (105 mg, 57%) en forma de sólido blanco amorfo. IR (KBr): 1676 cm^{-1} (C=O). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 6.27$ min (94%).

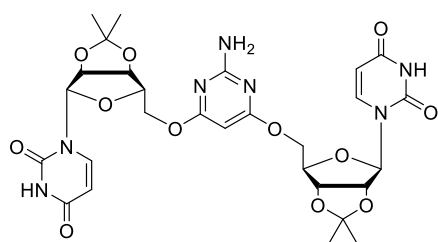


$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.65-1.92 (m, 4H, H-3', H-4'), 3.40 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{a}} = 4.1$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2aOBn), 3.43 (dd, 1H, $J_{5',\text{CH}_2\text{b}} = 5.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.1$ Hz, CH_2bOBn), 4.05 (m, 2H, H-5', CH_2aOAr) 4.12 (m, 2H, H-2', CH_2bOAr), 4.49 (m, 2H, CH_2Ph), 5.50 (s, 1H, H-5), 7.27-7.36 (m, 5H, Ar), 8.08 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 27.2, 27.5 (C-3', C-4'), 69.4 (CH_2OAr), 72.2 (CH_2Ph), 72.5 (CH_2OBn), 76.7 (C-2'), 78.3 (C-5'), 91.2 (C-5), 127.4, 127.5, 128.2 (C Ar), 138.5 (C Ar), 150.3 (C-2), 163.2 (C-6), 169.1 (C-4).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ 316.1421; encontrada 316.1423.

2-Amino-4,6-bis[(2',3'-O-isopropiliden)-5'-O-uridinil]pirimidina (1.68)



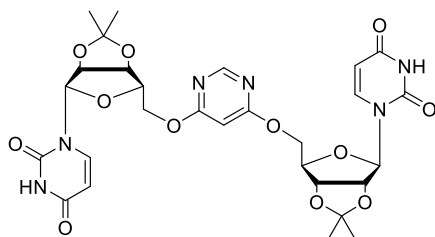
Seguendo el procedimiento general C, una disolución de 2',3'-O-isopropilidenuridina (**1.67**) (100 mg, 0.35 mmol) en DMF seco (2 mL) se trata con 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**1.14**) (23 mg, 0.14 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado.

Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 7:3) para dar **1.68** (29 mg, 31%) en forma de sólido amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 5.93$ min (98%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.36, 1.56 (s, 12H, CH_3 isoprop), 4.45-4.56 (m, 6H, H-4', H-5'), 4.89 (dd, 2H, $J_{3',4'} = 3.4$ Hz, $J_{2',3'} = 6.4$ Hz, H-3'), 5.01 (dd, 2H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.4$ Hz, H-2'), 5.66 (d, 2H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 5.72 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5), 6.12 (s, 1H, H-5 $_{\text{Pyrim}}$), 7.28 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 25.4 (CH_3 isoprop), 27.3 (CH_3 isoprop), 66.5 (C-5'), 81.4 (C-3'), 84.7 (2C-2'), 85.7 (C-4'), 95.4 (2C-1'), 97.0 (C-5 $_{\text{Pym}}$), 102.7 (C-5), 114.7 (C $_{\text{isopr}}$), 142.4 (C-6), 150.1 (C=O C-2), 162.3 (C-2 $_{\text{Pym}}$), 163.3 (C=O C-4), 170.6 (C-4 $_{\text{Pym}}$, C-6 $_{\text{Pym}}$).
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_{12}$ 659.2162; encontrada 659.2187.

4,6-bis[(2',3'-O-isopropiliden)-5'-O-uridinil]pirimidina (1.69)

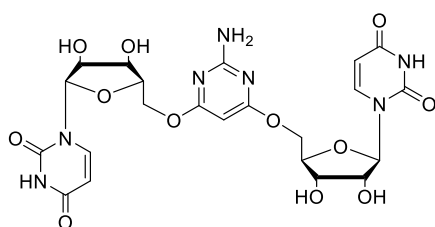


Seguindo el procedimiento general C, una disolución de 2',3'-O-isopropilidenuridina (**1.67**) (1.19 g, 4.20 mmol) en DMF seco (10 mL) se trata con 4,6-dicloropirimidina (**1.62**) (0.25 g, 1.68 mmol) durante 16 horas en tubo cerrado. Después del procesado de la reacción, el crudo se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 3:2) para dar **1.69** (0.58 g, 54%) en forma de sólido amorfo. $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -4.9^\circ$ ($c = 0.25$, CH_3OH). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_{\text{R}} = 6.30$ min (99%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.29, 1.48 (s, 12H, CH_3 isoprop), 4.35 (m, 2H, H-4'), 4.50 (m, 4H, H-5'), 4.85 (dd, 2H, $J_{3',4'} = 3.7$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, H-3'), 5.08 (dd, 2H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, H-2'), 5.58 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 5.80 (d, 2H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 6.32 (s, 1H, H-5 $_{\text{Pym}}$), 7.66 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6), 8.45 (s, 1H, H-2 $_{\text{Pym}}$), 11.5 (s ancho, 2H, NH).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 25.1 (CH_3 isoprop), 27.0 (CH_3 isoprop), 66.6 (C-5'), 81.0 (C-3'), 83.6 (C-2'), 84.3 (C-4'), 90.5 (C-5 $_{\text{Pym}}$), 92.9 (C-1'), 101.9 (C-5), 113.2 (C $_{\text{isopr}}$), 142.6 (C-6), 151.1 (C=O C-2), 157.5 (C-2 $_{\text{Pym}}$), 164.5 (C=O C-4), 170.2 (C-4 $_{\text{Pym}}$, C-6 $_{\text{Pym}}$).
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}$ 644.2095; encontrada 644.2078.

2-Amino-4,6-bis(5'-O-uridinil)pirimidina (1.70)



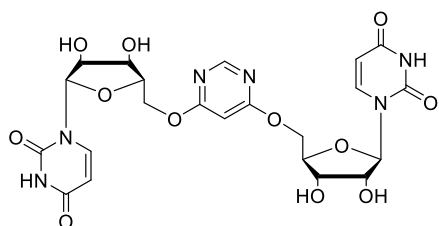
El compuesto **1.68** (20 mg, 0.03 mmol) se disuelve en $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80% (2 mL) y se agita a 90°C durante la noche. Se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 2:1) para dar **1.70** (17 mg, 99 %) en forma de sólido amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_{\text{R}} = 4.17$ min (98%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.98 (m, 2H, H-4'), 4.09 (m, 4H, H-2', H-3'), 4.43 (m, 4H, H-5'), 5.68 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5), 5.78 (d, 2H, $J_{1',2'} = 5.1$ Hz, H-1'), 6.19 (s, 1H, H-5_{Pym}), 7.66 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 11.37 (s ancho, 2H, NH).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 65.8 (C-5'), 69.9 (C-4'), 72.6 (C-2'), 81.2 (C-3'), 88.5 (C-1'), 94.3 (C-5_{Pym}), 101.9 (C-5), 140.8 (C-6), 150.7 (C=O C-2), 160.2 (C-2_{Pym}), 163.0 (C=O C-4), 170.3 (C-4_{Pym}, C-6_{Pym}).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_{12}$ 579.1553; encontrada 579.1561.

4,6-bis(5'-O-uridinil)pirimidina (1.71)



El compuesto **1.69** (400 mg, 0.62 mmol) se disuelve en AcOH/H₂O 80% (10 mL) y se agita a 90 °C durante la noche. Se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por HPFC

mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 2:1) para dar **1.71** (180 mg, 51%) en forma de sólido amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 3.66$ min (90%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.02 (m, 2H, H-4'), 4.13 (m, 4H, H-2', H-3'), 4.52 (m, 4H, H-5'), 5.35 (s ancho, 2H, OH), 5.50 (s ancho, 2H, OH), 5.68 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5), 5.78 (d, 2H, $J_{1',2'} = 5.2$ Hz, H-1'), 6.42 (s, 1H, H-5_{Pym}), 7.68 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 8.51 (s, 1H, H-2_{Pym}), 11.37 (s ancho, 2H, NH).

^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 66.5 (C-5'), 70.0 (C-4'), 72.6 (C-2'), 81.4 (C-3'), 88.5 (C-1'), 90.4 (C-5_{Pym}), 102.1 (C-5), 140.8 (C-6), 150.7 (C=O C-2), 157.6 (C-2_{Pym}), 163.0 (C=O C-4), 170.4 (C-4_{Pym}, C-6_{Pym}).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{12}$ 564.1465; encontrada 564.1452.

6.8. MÉTODOS BIOLÓGICOS

6.8.1. Evaluación biológica frente a la replicación del VIH-1 y del VIH-2¹²⁶

Todos los ensayos biológicos frente a VIH han sido realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 [VIH-1 (IIB)] fue proporcionado por el Dr. R. C. Gallo y el Dr. M. Popovic (Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD). El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2 [VIH-2 (ROD)] fue proporcionado por el Dr. L. Montaigner (Pasteur Institute, Paris, France). Las células humanas T-linfocíticas CD4⁺ (CEM), se obtuvieron de la American Type Culture

Collection (Manassas, VA) y se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgium), 2 mM L-glutamina y 0.075 M NaHCO₃.

Se suspenden células CEM (4×10^5 células/mL) en medio de cultivo y se infectan con VIH-1 o VIH-2 a una concentración 100 veces superior a la dosis infectiva 50% (CCDI₅₀). Se distribuyen en una placa de 96 pocillos (100.000 por pocillo) y tras un periodo de adsorción de dos horas a 37 °C y en atmósfera controlada de CO₂, se añadieron los compuestos ensayados a distintas concentraciones. La formación de células gigantes (sincitios) en células CEM inducida por VIH-1 se determina microscópicamente tras incubación a 37 °C durante 4-5 días. La concentración efectiva 50% (CE₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios y la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular.

6.8.2. Ensayos de actividad inhibitoria de la TI del VIH-1 en presencia de un molde/cebador artificial

Para preparar los moldes/cebadores para los experimentos de la TI, se mezclan 0.15 mM poly(U), poly (A), poly(C) y poly(I) con el mismo volumen de 0.0375 mM oligo(dA), oligo(dT), oligo(dG) y oligo(dC) respectivamente. La concentración final de los moldes en la mezcla de reacción de la TI fue 0.015 mM. La mezcla de reacción (50 µL) contiene: 50 mM Tris.HCl (pH = 7.8), 5 mM ditiotretitol, 300 mM de glutation, 500 µM de EDTA, 150 mM de KCl, 5 mM MgCl₂, 1.25 µg de suero de albúmina bovina, la adecuada concentración de cada uno de los sustratos marcados con tritio dTTP, dCTP, dGTP o dATP (2 µCi por ensayo), una concentración fija del molde/cebador poly(A):oligo(dT) (0.015mM), poly(I):oligo(dC) (0.015mM), poly(C):oligo(dG) (0.015mM) y poly(U):oligo(dA) (0.015mM), 0.06% Triton X-100, 10 µL de la disolución del inhibidor (que contiene diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar) y 1 µL de enzima Transcriptasa Inversa preparada. La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Se añaden 100 µL de ARN de levadura (1 mg/mL) y 1 mL de Na₄P₂O₇ (0.02 M) en ácido tricloroacético (5% v/v). Las disoluciones se mantienen en hielo durante 30 min, después de los cuales se lavó el material insoluble en ácido y se analizó por radiactividad. Para los experimentos en los que se determinó la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) de los compuestos a ensayar, se usaron unas concentraciones fijas de 1.25 µM [³H]dTTP, 1.75 µM [³H]dATP, 2.5 µM [³H]dGTP o 2.5 µM [³H]dCTP.

6.8.3. Ensayos de citotoxicidad¹²⁸

Todos los ensayos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos. A cada pocillo se le añadieron $(5-7.5) \times 10^4$ de células tumorales y una cantidad dada de los compuestos a ensayar. Dichas células se dejaron proliferar durante 48 h (células de leucemia murina L1210), 72 h [linfocitos T humanos (CEM)] o 96 h (células HeLa de carcinoma de cérvix humano, células Caki-1 de carcinoma de riñón humano y células Huh-7 de carcinoma de hígado humano) a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ controlada. Al final del periodo de incubación, se hace un recuento de células mediante un contador Coulter. La CI₅₀ (concentración inhibitoria al 50%) se define como la concentración de compuesto necesaria para inhibir la proliferación celular al 50%. La citotoxicidad se expresa como la CC₅₀, o concentración de producto capaz de reducir en un 50% el crecimiento del cultivo celular.

6.8.4. Inhibición de la transformación de los fibroblastos murinos C3H/3T3 inducida por el virus del sarcoma murino de Moloney (MSV)¹³⁷

Los ensayos anti-MSV se realizan tal como se describe en bibliografía.¹²⁶ Todos los ensayos se desarrollaron en microplacas de 48 pocillos de 1 cm². A cada pocillo se le añaden 5×10^5 células/mL de células fibroblastos C3H/3T3. Después de 24 horas, los cultivos celulares se infectan con 80 unidades formadoras de focos de MSV (preparadas a partir de tumores inducidos en ratones NMRI de 3 días tras inoculación intramuscular del VSM, tal como se describe previamente⁷¹) durante 90-120 minutos incubadas a 37 °C. A continuación, se aspira el medio de cultivo y se sustituye por 1 mL de medio recién preparado que contiene los compuestos a ensayar a diferentes concentraciones. Después de 6 días, se observa la transformación de los cultivos celulares en el microscopio. La CE₅₀ define la concentración de compuesto necesaria para inhibir la transformación de las células al 50% inducida por MSV.

6.8.5. Evaluación biológica frente a la replicación de otros virus¹²⁸

Los compuestos fueron evaluados frente a un amplio panel de virus tales como virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) [cepas KOS, timidinoquinasa deficiente (TK⁻) y KOS resistente a ACV (ACV^r)], virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2) [cepas Lyons y G], virus varicela zóster (VVZ) [cepas Oka, timidinoquinasa deficiente TK⁻ y 07-1], citomegalovirus humano (CMVH) [cepas AD-169 y Davis], virus vacuna (VV) [cepa Lederle], virus respiratorio sincitial (VRS) [cepa Long], virus de la estomatitis vesicular (VSV),

Coxsackie B4, virus influenza A (subtipos H1N1, H3N2), virus influenza B, virus parainfluenza 3, virus Sindbis, reovirus-1, virus Punta Toro, virus corona felino (VFIP) y virus herpes felino (FHSV) siguiendo los procedimientos descritos.¹²⁸

Los ensayos de actividad antiviral se basaron en la inhibición del efecto citopático inducido por el virus o la formación de placas virales en células embrionarias de pulmón humano (HEL), células renales de mono verde africano (Vero), células epiteliales de carcinoma de cérvix humano (HeLa) o células de riñón canino Madin Darby (MDCK). Para ello, se emplearon cultivos celulares confluentes de fibroblastos que se hacen crecer en placas de 96 pocillos donde se inocula 100 veces la $CCDI_{50}$ del virus (dosis de virus necesaria para infectar el 50% de los cultivos celulares) hasta la formación de 20 unidades de placas virales (PFU) para VVZ o 100 PFU para CMVH a diferentes concentraciones de los productos a ensayar. Los cultivos celulares fueron incubados hasta que se observó un efecto citopático completo o la formación de placas virales en los cultivos infectados y en el cultivo control infectado por el virus pero no tratado con los productos ensayados. La actividad antiviral fue expresada como CE_{50} (concentración efectiva 50) que se define como la concentración de compuesto que inhibe el efecto citopático inducido por el virus o la formación de placas virales determinadas microscópicamente en un 50%.

6.8.6. Evaluación biológica frente a la replicación del virus Chikungunya

El virus utilizado ha sido el virus Chikungunya (cepa 899). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos según procedimientos descritos.¹³³ La incubación se realizó durante 6-7 días, tiempo en el que se detecta el mayor efecto citopático del virus en células control infectadas no tratadas. A continuación se aspira el medio de cultivo y se añaden 75 μ L de una disolución al 5% de un compuesto de tetrazolio (MTS) en fenol y se incuba por 1.5 h. A continuación se mide la absorbancia a 498 nm. Las lecturas obtenidas se transforman en porcentajes respecto al control, y se determinan los valores de CE_{50} y CC_{50} a partir de curvas dosis-respuesta. En los pocillos donde se detecta un efecto antiviral superior al 50%, se realiza una inspección al microscopio para detectar posibles efectos citopáticos sobre la célula hospedadora o posibles cambios morfológicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Parker, W. B. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2880–2893.
2. Herdewijn, P. Modified nucleosides: in biochemistry, biotechnology and medicine; Wiley, **2008**; 587–600.
3. Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M. Nucleosides and nucleotides. In *Nucleic acids in chemistry and biology*; Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2006**; 77–142.
4. Adams, R. L. P.; Knowler, J. T.; Leader, D. P. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*; Springer Netherlands: Dordrecht, **1992**.
5. Finch, R.; Greenwood, D.; Norrby, S. R.; Whitley, R. J. *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*; Livingstone, C., Ed.; Churchill Livingstone, **2003**.
6. Rang, H. H.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Pharmacology*; Churchill Livingstone, **1999**.
7. Norbeck, D. W. Chapter 16. Recent advances in anti-retroviral chemotherapy for AIDS. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **1990**; Vol. 25, 149–158.
8. Chu, C. K.; Baker, D. C. *Nucleosides and nucleotides as antitumor and antiviral agents*; Plenum Press, **1993**.
9. Périgaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Nucleoside analogues as chemotherapeutic agents: a review. *Nucleosides and Nucleotides*. **1992**, *11*, 903–945.
10. De Clercq, E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. *Rev. Med. Virol.* **2009**, *19*, 287–299.
11. Cihlar, T.; Laflamme, G.; Fisher, R.; Carey, A. C.; Vela, J. E.; Mackman, R.; Ray, A. S. Novel nucleotide human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor GS-9148 with a low nephrotoxic potential: characterization of renal transport and accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 150–156.
12. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **2013**, *12*, 447–464.
13. De Clercq, E. A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 1–24.
14. De Clercq, E. Ten paths to the discovery of antivirally active nucleoside and nucleotide analogues. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **2012**, *31*, 339–352.

15. Gumina, G.; Choi, Y.; Chu, C. K. Recent advances in Antiviral nucleosides. In *Antiviral nucleosides: chiral synthesis and chemotherapy*; Elsevier, **2003**.
16. Avendaño López, M. del C. *Introducción a la química farmacéutica (2ª Ed.)*; McGraw-Hill/Interamericana, **2001**.
17. Romeo, R.; Carnovale, C. Chapter 4: Phosphonated nucleoside analogues. In *Chemical synthesis of nucleoside analogues*; Merino, P., Ed.; Wiley, **2013**; 163–208.
18. Aguado, L. Síntesis y estudios computacionales de derivados de bases nucleícas de interés en quimioterapia., UCM, **2009**.
19. Sinha, S.; Srivastava, R.; De Clercq, E.; Singh, R. K. Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1, 3-dideazaadenine and diketopiperazine. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **2004**, 23, 1815–1824.
20. Wedemeyer, H.; Hardtke, S.; Cornberg, M. Therapie der hepatitis C. *Chemother. J.* **2012**, 21, 1–7.
21. Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K. Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*. **1972**, 177, 705–706.
22. Smith, R. A.; Kirkpatrick, W. *Ribavirin, a broad spectrum antiviral agent*; Academic, New York, **1980**.
23. Crotty, S.; Cameron, C.; Andino, R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* **2002**, 80, 86–95.
24. De Clercq, E. Milestones in the discovery of antiviral agents: nucleosides and nucleotides. *Acta Pharm. Sin. B.* **2012**, 2, 535–548.
25. De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P. J.; Jones, A. S.; Walker, R. T. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: A potent and selective anti-herpes agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 76, 2947–2951.
26. De Clercq, E. (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). *Med. Res. Rev.* **2005**, 25, 1–20.
27. Alladeen, H. S.; Kozarich, J. W.; Bertino, R.; De Clercq, E. On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 2698–2702.
28. Gumina, G.; Olgen, S.; Chu, C. K. Chiral synthesis of antiviral nucleosides from carbohydrate Templates. In *Antiviral Nucleosides: Chiral synthesis and Chemotherapy*; C. K. Chu, Ed.; Elsevier, **2003**; 77–189.

29. Boutureira, O.; Matheu, M. I.; Díaz, Y.; Sergio Castellón. Chapter 7: Synthesis of C-nucleosides. In *Chemical synthesis of nucleoside analogues*; Merino, P., Ed.; Wiley, **2013**; 263–318.
30. Reist, E. J.; Benitez, A.; Goodman, L.; Baker, B. R.; Lee, W. Potential anticancer agents. LXXVI. Synthesis of purine nucleosides of β -D-arabinofuranose. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3274–3279.
31. Parks, R.; Stoeckler, J.; Cambor, C.; Savarese, T.; Crabtree, G.; Chu, S. *Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents*; Sartorelli, A., Lazo, T., Bertino, J., Eds.; Academic Press, New York: New York, **1981**.
32. Yoshimura, Y.; Kitano, K.; Watanabe, M.; Satoh, H.; Sakata, S.; Miura, S.; Ashida, N.; Machida, H.; Matsuda, A. Synthesis and biological activities of 2'-modified 4'-thionucleosides. *Nucleosides and Nucleotides.* **1997**, *16*, 1103–1106.
33. Romeo, G.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Merino, P. Chemical synthesis of heterocyclic-sugar nucleoside analogues. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3337–3370.
34. Merino, P. Heterocyclic nucleosides: Chemical synthesis and biological properties. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 539–545.
35. Hayashi, M.; Yaginuma, S.; Muto, N.; Tsujino, M. Structures of neplanocins, new antitumor antibiotics. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1980**, *8*, S65-67.
36. Bisacchi, G. S.; Chao, S. T.; Bachard, C.; Daris, J. P.; Innaimo, S.; Jacobs, G. A.; Kocy, O.; Lapointe, P.; Martel, A.; Merchant, Z.; et al. BMS-200475, a novel carbocyclic 2'-deoxyguanosine analog with potent and selective anti-hepatitis B virus activity in vitro. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 127–132.
37. Katagiri, N.; Nomura, M.; Sato, H.; Chikara, K.; Yusa, K.; Tsuruo, T. Synthesis and anti-HIV activity of 9-[c-4,t-5-bis(hydroxymethyl)cyclopent-2-en-r-1-yl]-9H-adenine. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1882–1886.
38. Dobkin, J. K. Abacavir enters the clinic. *Infect. Med.* **1999**, *16*, 7–7.
39. Marquez, V. E. Carbocyclic nucleosides. *Adv. Antivir. Drug Des.* **1996**, *2*, 89–146.
40. Qiu, Y.; Hempel, A.; Camerman, N.; Camerman, A.; Geiser, F.; Ptak, R. G.; Breitenbach, J. M.; Kira, T.; Li, L.; Gullen, E.; et al. (R)-(-)- and (S)-(+)-Synadenol: Synthesis, absolute configuration, and enantioselectivity of antiviral effect. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5257–5264.
41. Qiu, Y.; Ksebati, M. B.; Ptak, R. G.; Fan, B. Y.; Breitenbach, J. M.; Lin, J.; Cheng, Y.; Kern, E. R.; Drach, J. C.; Zemlicka, J. (Z)-(E)-2-((Hydroxymethyl)cyclopropylidene)methyladenine and -guanine. New nucleoside analogues with a broad-spectrum antiviral activity. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 10–23.

42. Hoshino, H.; Shimizu, N.; Shimada, N.; Takita, T.; Takeuchi, T. Inhibition of infectivity of human immunodeficiency virus by oxetanocin. *J. Antibiot.* **1998**, *40*, 1077–1078.
43. Hayashi, S.; Norbeck, D. W.; Rosenbrook, W.; Fine, R. L.; Matsukura, M.; Plattner, J. J.; Broder, S.; Mitsuya, H. Cyclobut-A and cyclobut-G, carbocyclic oxetanocin analogs that inhibit the replication of human immunodeficiency virus in T cells and monocytes and macrophages in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 287–294.
44. McLeod, G. X. Zidovudine: five years later. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117*, 487.
45. Vivet-Boudou, V.; Didierjean, J.; Isel, C.; Marquet, R. Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 163–186.
46. Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127–6133.
47. Balzarini, J.; De Clercq, E. Analysis of inhibition of retroviral reverse transcriptase. *Methods Enzymol.* **1996**, *275*, 472–502.
48. De Clercq, E. Development of resistance of human immunodeficiency virus (HIV) to anti-HIV agents: How to prevent the problem? *Int. J. Antimicrob. Agents.* **1997**, *9*, 21–36.
49. Balzarini, J.; Naesens, L.; Clercq, E. De. New antivirals - mechanism of action and resistance development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *1*, 535–546.
50. De Clercq, E. The design of drugs for HIV and HCV. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 1001–1018.
51. Hao, Z.; Cooney, D.; Hartman, N.; Perno, C.; Fridland, A.; DeVico, A.; Sarngadharan, M.; Broder, S.; Johns, D. Factors determining the activity of 2',3'-dideoxynucleosides in suppressing human immunodeficiency virus in vitro. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 431–435.
52. Schaeffer, H. J.; Beauchamp, L.; de Miranda, P.; Elion, G. B.; Bauer, D. J.; Collins, P. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* **1978**, *272*, 583–585.
53. De Clercq, E.; Li, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 695–747.
54. de Miranda, P.; Blum, M. R. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J. Antimicrob. Chemother.* **1983**, *12*, suppl B, 29–37.

55. O'Brien, J. J.; Campoli-Richards, D. M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. **1989**, *37*, 233–309.
56. De Miranda, P.; Good, S. S. Species differences in the metabolism and disposition of antiviral nucleoside analogues: 1. Acyclovir. *Antivir. Chem. Chemother.* **1992**, *3*, 1–8.
57. Wagstaff, A.; Faulds, D.; Goa, K. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. **1994**, *47*, 153–205.
58. zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. **2009**, *384*, 260–265.
59. Moody, C. A.; Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer*. **2010**, *10*, 550–560.
60. Sullivan, V.; Talarico, C. L.; Stanat, S. C.; Davis, M.; Coen, D. M.; Biron, K. K. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human. *Nature*. **1992**, *358*, 162–164.
61. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5716–5720.
62. Vere Hodge, R. A. Famciclovir and penciclovir. The mode of action of famciclovir including its conversion to penciclovir. *Antivir. Chem. Chemother.* **1993**, *4*, 67–84.
63. De Clercq, E.; Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940.
64. Ying, C.; Holy, A.; Hocková, D.; Havlas, Z.; De Clercq, E.; Neyts, J. Novel acyclic nucleoside phosphonate analogues with potent anti-hepatitis B virus activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1177–1180.
65. De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*. **1986**, *323*, 464–467.
66. Clercq, E. De; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res.* **1987**, *8*, 261–272.
67. Pauwels, R.; Balzarini, J.; Schols, D.; Baba, M.; Desmyter, J.; Rosenberg, I.; Holy, A.; De Clercq, E. Phosphonylmethoxyethyl purine derivatives, a new class of anti-human immunodeficiency virus agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 7, 1025–1030.

68. Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Dvorakova, H.; Hao, Z.; Snoeck, R.; Herdewijn, P.; Johns, D. G.; De Clercq, E. 9-[(2RS)-3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 4961–4965.
69. Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; De Clercq, E. Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: Potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)- 2,6-diaminopurine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 332–338.
70. Balzarini, J.; Hao, Z.; Herdewijn, P.; Johns, D. G.; De Clercq, E. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1499–1503.
71. Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; Baba, M.; Johns, D. G.; De Clercq, E. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 332–336.
72. Fridland, A. Tenofovir. *Curr. Opin. Investig. drugs.* **2000**, *2*, 295–301.
73. De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1543–1572.
74. Chimerix announces emergency investigational new drug applications for Brincidofovir authorized by FDA for patients with ebola virus disease. <http://ir.chimerix.com/releasedetail.cfm?releaseid=874647>.
75. Dallas Ebola patient receives experimental drug. http://www.huffingtonpost.com/2014/10/06/experimental-drug-dallas-ebola-thomas-eric-duncan_n_5941104.html.
76. De Clercq, E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 99–109.
77. Schultz, C. Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885–898.
78. Balzarini, J.; De Clercq, E. Biochemical pharmacology of nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV. In *Textbook of AIDS Medicine*; Merigan, T. C., Bartlett, J. G., Bolognesi, D., Eds.; Williams & Wilkins, **1999**; Vol. 29, 815–847.

79. De Clercq, E. Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: The phosphonate bridge. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 911–922.
80. Balzarini, J.; Schols, D.; Van Laethem, K.; De Clercq, E.; Hocková, D.; Masojdkova, M.; Holý, A. Pronounced in vitro and in vivo antiretroviral activity of 5-substituted 2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy] pyrimidines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 80–86.
81. Holý, A.; Votruba, I.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]pyrimidines with antiviral activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1918–1929.
82. Balzarini, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Aquaro, S.; Perno, C.-F.; Egberink, H.; Holy, A. Antiretrovirus activity of a novel class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2185–2193.
83. Herman, B. D.; Votruba, I.; Holy, A.; Sluis-Cremer, N.; Balzarini, J. The acyclic 2,4-diaminopyrimidine nucleoside phosphonate acts as a purine mimetic in HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerization. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12101–12108.
84. Kang, E. J.; Lee, E. Total synthesis of oxacyclic macrodiolide natural products. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4348–4378.
85. Faul, M. M.; Huff, B. E. Strategy and methodology development for the total synthesis of polyether ionophore antibiotics. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2407–2474.
86. van Well, R. M.; Meijer, M. E. ; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. a; Overhand, M. Synthesis of bridged sugar amino acids: a new entry into conformationally locked δ - and ϵ -amino acids. *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 2423–2434.
87. Hultin, P. G.; Mueseler, F.-J.; Jones, J. B. Enzymes in organic synthesis. Pig liver esterase and porcine pancreatic lipase catalyzed hydrolyses of 3,4-(isopropylidenedioxy)-2,5-tetrahydrofuran diesters. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5375–5380.
88. van Delft, F. L.; Rob, A.; Valentijn, P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Preparation of 2,5-anhydrohexitols (Part I). Silicon-directed stereocontrolled cyclization. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 165–190.
89. Herczegh, P.; Kovács, I.; Szilágyi, L.; Sztaricskai, F.; Berecibar, A.; Riche, C.; Chiaroni, A.; Olesker, A.; Lukacs, G. Cycloaddition reactions of carbohydrate derivatives. Part VI. Quinolizidine analogs of castanospermine. *Tetrahedron.* **1995**, *51*, 2969–2978.

90. Plaza, P. G. J.; Singh, G. Synthesis of partially benzylated arabinofuranosides, NMR analysis, and application to oligosaccharide synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, *21*, 17, 2167–2171.
91. Redlich, H.; Bruns, W.; Francke, W.; Schurig, V.; Payne, T. L.; Vité, J. P. Chiral building units from carbohydrates-XIII. : Identification of the absolute configuration of endo-brevicomine from *Dendroctonus frontalis* and synthesis of both enantiomers from D-ribose. *Tetrahedron*. **1987**, *43*, 2029–2034.
92. Process for the preparation of pure (+)- and (-)-endo-brevicomine. DE3712714 A1, **1988**.
93. Lichtenthaler, F. W.; Lorenz, K.; Ma, W. A convergent total synthesis of (-)-anamarine from D-glucose. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 47–50.
94. Falomir, E.; Murga, J.; Ruiz, P.; Carda, M.; Marco, J. A.; Pereda-Miranda, R.; Fragosó-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. Stereoselective synthesis and determination of the cytotoxic properties of spicigerolide and three of its stereoisomers. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5672–5676.
95. Peterson, J. A carbonyl olefination reaction using silyl- substituted organometallic compounds. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 780–784.
96. Lambert, J. B. The interaction of silicon with positively charged carbon. *Tetrahedron*. **1990**, *46*, 2677–2689.
97. Fleming, I.; Ghosh, S. K. Stereospecific 1,2-silyl shift in a cationic rearrangement with retention of configuration at the migration origin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1777–1779.
98. van Delft, F. L.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Efficient route to highly functionalized tetrahydrofurans by stereocontrolled silicon-directed cyclization. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas*. **1994**, *113*, 339–341.
99. van Delft, F. L.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Silicon-directed stereocontrolled cyclization. Possible route to functionalized tetrahydrofurans. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1091–1094.
100. Fleming, I.; Henning, R.; Parker, D. C.; Plaut, H. E.; Sanderson, P. E. J. The phenyldimethylsilyl group as a masked hydroxy group. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. **1995**, *4*, 317–337.
101. Delacotte, J.-M.; Parrot-Lopez, H.; Renault, J.; Cros, S.; Paoletti, C. Hétérocycles à fonction quinone XI. Synthèse et activité cytotoxique de quelques (pyrimidinyl-4)-6 naphthalénediones-1,4. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 187–192.
102. Yamanaka, H. On the reaction of 4-phenoxy-6-methylpyrimidine 1-oxide with nucleophilic reagents. *Chem. Pharm. Bull.* **1959**, *7*, 505–508.

103. Gitis, S. S.; Ivanova, V. M. Reaction of aromatic nitro compounds. XXIII. Transesterification of benzyl ethers of 2,4-dinitrophenol. *Zhurnal Org. khimii.* **1965**, *1*, 1437–1439.
104. Brown, D. J.; Sugimoto, T. Aza-analogues of pteridine. Part II. The novel use of silver oxide in transesterification of alkoxy-1,2,4,6,8-penta-azanaphthalenes, alkoxyntropyrimidines, and related systems. *J. Chem. Soc. C Org.* **1970**, *19*, 2661.
105. Dias, L. C.; Ferreira, M. a B. Total synthesis of (-)-goniotrionin. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4046–4062.
106. Afonso, C. A. M.; Lourenço, N. M. T.; Rosatella, A. de A. Synthesis of 2,4,6-tri-substituted-1,3,5-triazines. *Molecules.* **2006**, *11*, 81–102.
107. Lembicz, N. K.; Grant, S.; Clegg, W.; Griffin, R. J.; Heath, S. L.; Golding, B. T. Facilitation of displacements at the 6-position of purines by the use of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane as leaving group. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **1997**, *3*, 185–186.
108. Novák, J.; Hasník, Z.; Linhart, I. Syntheses of O6-alkyl- and arylguanine derivatives: nucleobase adducts derived from styrene 7,8- and 3,4-oxides. *European J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 507–515.
109. Ludwig, J. A new route to nucleoside 5'-triphosphates. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131–133.
110. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065–5068.
111. Varvara, A.; Monciu, C.-M.; Arama, C.; Popescu, C. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of ondansetron hydrochloride using sodium heptanesulphonate as a counterion. *Farmacia.* **2009**, *57*, 442–451.
112. Perrone, P. a.; Brown, P. R. Ion-pair chromatography of nucleotides. *J. Chromatogr. A.* **1984**, *317*, 301–310.
113. Bouzide, A.; Sauvé, G. Highly selective silver(I) oxide mediated monoprotection of symmetrical diols. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5945–5948.
114. Muzart, J. N,N-Dimethylformamide: much more than a solvent. *Tetrahedron.* **2009**, *65*, 8313–8323.
115. Jin, C. H.; Lee, H. Y.; Lee, S. H.; Kim, I. S.; Jung, Y. H. Direct etherification of alkyl halides by sodium hydride in the presence of N,N-Dimethylformamide. *Synlett.* **2007**, *17*, 2695–2698.
116. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of laboratory chemicals*; Pergamon: Oxford, **1966**.

117. Altona, C.; Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. Improved method for the interpretation of proton magnetic resonance coupling constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *95*, 2333–2344.
118. Altona, C.; Sundaralingam, M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205–8212.
119. Fuchs, B. Conformations of five-membered rings. In *Topics in Stereochemistry*; John Wiley & Sons, Inc., **1979**; 1–94.
120. Altona, C.; Geise, H. J.; Romers, C. Conformation of non-aromatic ring Compounds—XXV: Geometry and conformation of ring D in some steroids from X-ray structure determinations. *Tetrahedron.* **1968**, *24*, 13–32.
121. Wijk, J. van; Altona, C. A program for the conformational analysis of five-membered rings. *Univ. Leiden, Netherlands.* **1993**.
122. Plavec, J.; Koole, L. H.; Chattopadhyaya, J. Structural analysis of 2',3'-dideoxyadenosine, 2',3'-dideoxyguanosine and 2',3'-dideoxycytidine by 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy and ab-initio molecular orbital calculations. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1992**, *25*, 253–272.
123. Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I. An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron.* **1979**, *36*, 2783–2792.
124. Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; de Leeuw, H. P. M.; Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities. II—conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides in solution using a generalized Karplus equation. *Org. Magn. Reson.* **1981**, *15*, 43–52.
125. Fuschs, B. *Topics in stereochemistry*; Eliel, E. L., Allinger, N. L., Eds.; John Wiley & Sons, **1978**.
126. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosenberg, I.; Holý, A.; Schellekens, H.; De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS.* **1991**, *5*, 21–28.
127. Harvey, J. J.; East, J. The murine sarcoma virus (MSV). *Int. Rev. Exp. Pathol.* **1971**, *10*, 265–360.

128. De Clercq, E.; Descamps, J.; Verhelst, G.; Walker, R. T.; Jones, A. S.; Torrence, P. F.; Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563–574.
129. Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology.* **2009**, *393*, 183–197.
130. Pialoux, G.; Gaüzère, B.-A.; Jauréguiberry, S.; Strobel, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet. Infect. Dis.* **2007**, *7*, 319–327.
131. Soper, F. L. *Aedes aegypti* and yellow fever. *Bull World Heal. Organ.* **1967**, *36*, 521–527.
132. Tsetsarkin, K. A.; Vanlandingham, D. L.; McGee, C. E.; Higgs, S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 1895–1906.
133. Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Prostratin and 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2183–2187.
134. Herczegh, P.; Kovács, I.; Szilágyi, L.; Sztaricskai, F.; Berecibar, A.; Riche, C.; Chiaroni, A.; Olesker, A.; Lukacs, G. Cycloaddition reactions of carbohydrate derivatives. Part V. A hetero Diels-Alder approach to swainsonine analogs. *Tetrahedron.* **1994**, *50*, 13671–13686.
135. Spivey, A. C.; Maddaford, A.; Fekner, T.; Redgrave, A. J.; Frampton, C. S. Synthesis of C2-symmetric analogues of 4-(pyrrolidino)pyridine: new chiral nucleophilic catalysts. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **2000**, *20*, 3460–3468.
136. Bartroli, J.; Carceller, E.; Merlos, M.; Garcia-Rafanell, J.; Forn, J. Disubstituted tetrahydrofurans and dioxolanes as platelet activating factor (PAF) antagonists. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 373–386.
137. Krečmerová, M.; Holý, A.; Pískala, A.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Naesens, L.; Neyts, J.; Jan, B.; De Clercq, E.; Snoeck, R. Antiviral activity of triazine analogues of 1-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine (cidofovir) and related compounds. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1069–1077.

Capítulo 2.

Fosfonatos de nucleósidos acíclicos de 2,4-diamino-1,3,5-triazinas (PMEO-DAT)

FOSFONATOS DE NUCLEÓSIDOS ACÍCLICOS DE 2,4-DIAMINO-1,3,5-TRIAZINAS (PMEO-DAT)

1. OBJETIVOS

En este capítulo, basándonos de nuevo en la peculiar estructura de PMEODAPym y con el fin de profundizar en el potencial biológico de los fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANPs) unidos a través del oxígeno, nos planteamos la preparación de aza-análogos de PMEODAPym de fórmula general II (Figura 2.1) en los que se sustituye el anillo de 2,4-diaminopirimidina por un anillo de 2,4-diamino-1,3,5-triazina (PMEODAT) con el fin de estudiar el efecto de dicha sustitución en la actividad de los compuestos. Asimismo, en paralelo, se ha llevado a cabo la evaluación biológica frente a la replicación del VIH y del virus herpes por el equipo del Prof. Jan Balzarini del Rega Institute for Medical Research (Leuven, Belgium) y frente a la replicación del VHB por el equipo del Prof. Brent Korba (Georgetown University, Washington, USA). Por otra parte, en colaboración con el Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá, se han realizado estudios de modelado molecular que han permitido plantear una explicación racional a la selectividad antiviral encontrada para estos compuestos.

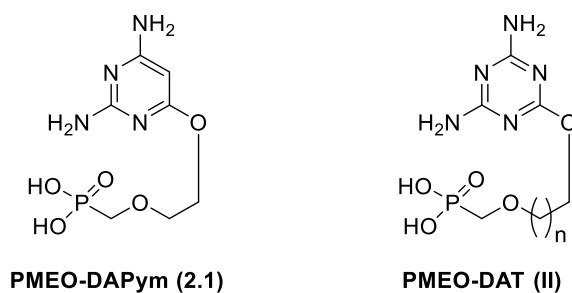


Figura 2.1. Estructuras de PMEODAPym y de los fosfonatos acíclicos objetivo (PMEODAT) de fórmula general (II).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. SÍNTESIS DE FOSFONATOS DE NUCLEÓSIDOS ACÍCLICOS DE DIAMINOTRIAZINAS (PMEO-DAT)

La síntesis de estos compuestos suponía un importante reto sintético, ya que aunque se han descrito en la literatura diversos análogos de PMEODAPym modificados en la base y en la cadena acíclica,^{1,2} no existía el análogo de 2,4-diamino-1,3,5-triazina. Como se ha comentado en la introducción del capítulo 1, PMEODAPym representa una nueva subclase de fosfonatos de nucleósidos acíclicos con una marcada actividad frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y frente al virus de la hepatitis B (VHB). Existen muy pocos antecedentes de nucleósidos acíclicos de amino-1,3,5-triazinas y aún menos unidos a través del oxígeno. En el año 2010, Krečmerová, Holý y col.¹ describieron la obtención del fosfonato protegido de aza-citosina (**2.2**) como producto secundario (< 8% de rendimiento) en la síntesis de derivados de 5-aza-citosina N-sustituidas¹ (Figura 2.2). Sin embargo, todos los intentos de desprotección de **2.2** por tratamiento con bromotrimetilsilano resultaron infructuosos y condujeron a la completa degradación del producto. En general, los diésteres de 5-aza-citosina de ANPs son más estables que los correspondientes derivados con el ácido fosfónico libre³ por ello se utilizan los ésteres como profármacos en los ensayos biológicos.³

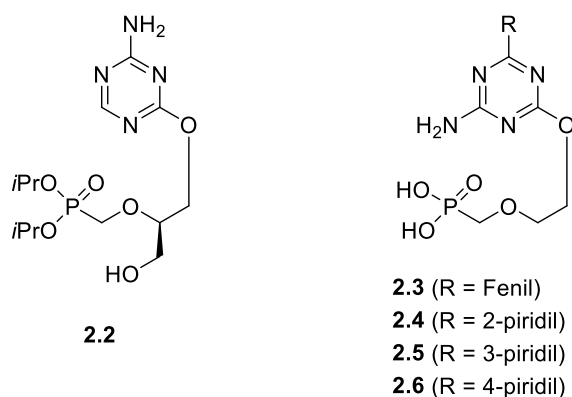
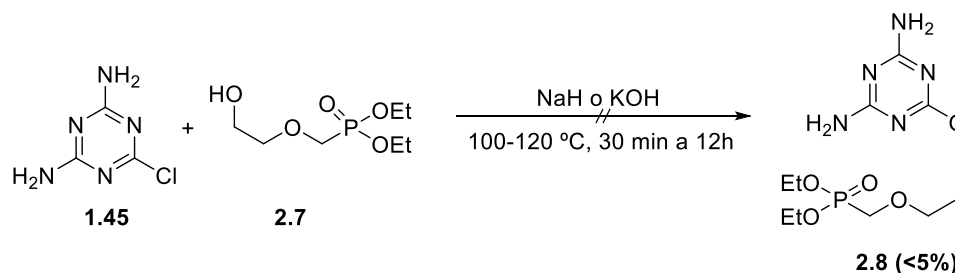


Figura 2.2. Estructuras de aza-análogos de PMEODAPym (**2.2-2.6**)

Por otro lado, se han descrito aza-análogos sustituidos en 4(6) con un grupo arilo (**2.3-2.6**) (Figura 2.2) aunque todos ellos son inactivos como antivirales ya que carecen del grupo 6-NH₂ necesario para el apareamiento de bases (base pairing).²

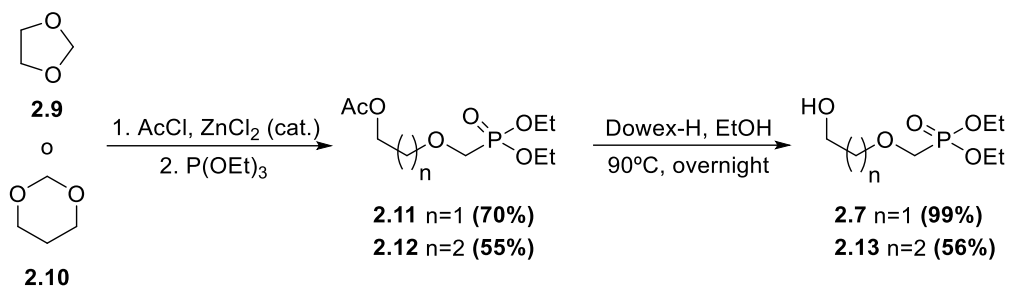
Primeramente, para la síntesis de las moléculas objetivo PMEODAT (II) nos planteamos un procedimiento sintético similar (Esquema 2.1) al descrito anteriormente para la síntesis de metiloxinucleósidos derivados de amino-1,3,5-triazinas mencionados en el capítulo 1 (Esquema 1.23).

Dicho procedimiento (Esquema 2.1) consistió en la reacción de la 2,4-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) con un exceso del fosfonato acíclico **2.7** (preparado previamente según procedimientos descritos en la literatura,⁴ como se verá más adelante), en presencia de NaH bajo irradiación con microondas a 100 °C durante 3 horas. Sin embargo, dada la baja reactividad de las diaminotriazinas cloro-sustituidas que requieren condiciones muy enérgicas de reacción,⁵ no se obtuvo el producto deseado **2.8** sino una mezcla compleja de reacción, que no pudo identificarse. El empleo tanto de otras bases nucleófilas como KOH, como de otros disolventes (DMF, H₂O o DMSO) a diferentes temperaturas (100, 110 y 120 °C) y distintos tiempos de reacción (30 min a 48 h) también dio lugar a mezclas complejas de reacción en las que solamente se pudieron detectar trazas del fosfonato deseado **2.8** (< 5%) (KOH, DMSO, 120 °C, 48 h) (Esquema 2.1).



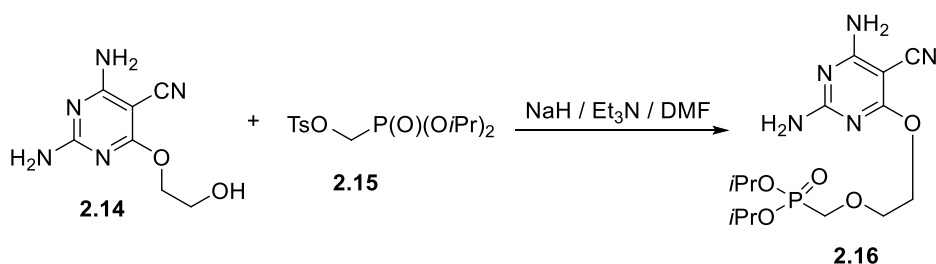
Esquema 2.1. Primera aproximación para la síntesis del producto **2.8**.

Los alcoholes **2.7** y **2.13** (cuyo empleo se comentará más adelante) se prepararon siguiendo un procedimiento descrito en la literatura⁴ consistente en la apertura de los acetales cíclicos **2.9** y **2.10** con cloruro de acetilo en presencia de cloruro de zinc seguido del tratamiento con trietilfosfito para dar **2.11** y **2.12** con rendimientos del 70 y 55%, respectivamente. La posterior desprotección del grupo acetilo de **2.11** y **2.12** en medio ácido mediante el empleo de una resina Dowex-H a 90 °C durante 18 h (Esquema 2.2) condujo a los productos deseados con buenos rendimientos.



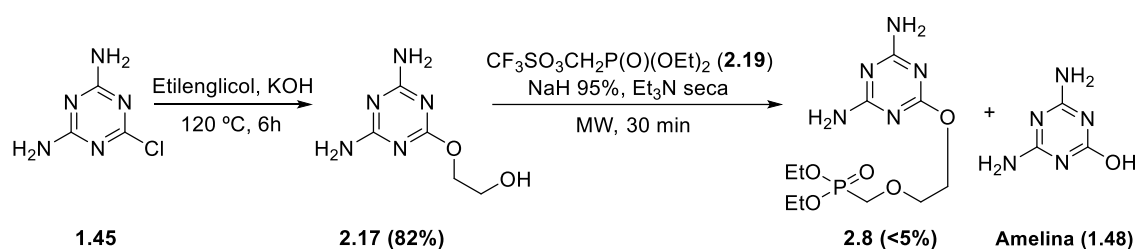
Esquema 2.2. Síntesis del alcohol 2.7 y 2.13.

Seguidamente, nos planteamos una nueva aproximación para la síntesis de **2.8** basada en el procedimiento descrito por Hocková y col.⁶ para la síntesis de fosfonatos acíclicos de 2,4-diaminopirimidinas que implica la eterificación del grupo hidroxilo presente en la cadena lateral de 2,4-diaminopirimidinas 5,6-disustituidas con el tosilato de 2-(diisopropilfosforil)metilo⁷ (**2.15**) en presencia de bases fuertes (NaH) (Esquema 2.3).



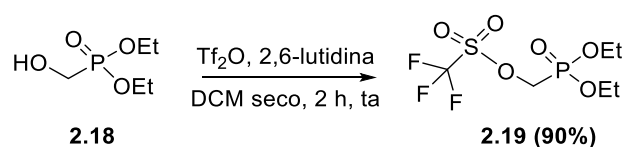
Esquema 2.3. Preparación de **2.16** por alquilación de **2.14** con el triflato **2.15**.

Dada la conocida mayor reactividad de los triflatos con respecto a los tosilatos⁸ decidimos emplear el triflato de 2-(dietoxifosforil)metilo⁹ (**2.19**) en lugar del tosilato (**2.15**). Así, diseñamos el procedimiento reflejado en el Esquema 2.4. El derivado clave en esta ruta sintética es el **2.17** que se preparó con buen rendimiento (82%) por tratamiento de la 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina¹⁰ (**1.45**) con exceso de etilenglicol (como reactivo y como disolvente) en presencia de KOH a 120 °C durante 6 horas. La alquilación del grupo hidroxilo de la cadena lateral del intermedio **2.17** con el triflato (**2.19**) en presencia de NaH (60% o 95%), a distintas temperaturas (de temperatura ambiente a 150 °C), bajo irradiación con microondas o mediante calentamiento convencional a diferentes tiempos de reacción (desde 30 min a 24 horas) dio lugar al fosfonato **2.8** buscado aunque con muy bajo rendimiento (< 5%) junto con una gran proporción de amelina (**1.48**).



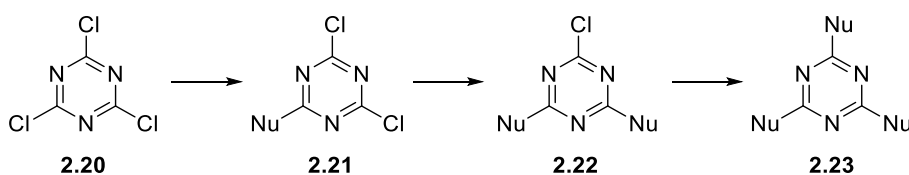
Esquema 2.4. Segunda aproximación para la síntesis del producto 2.8.

La obtención del triflato de 2-(dietoxifosforil)metilo (**2.19**) se abordó mediante el procedimiento descrito en la literatura⁹ que consiste en el tratamiento de hidroximetilfosfonato de dietilo (**2.18**) con anhídrido triflico en presencia de 2,6-lutidina en diclorometano durante 2 horas a temperatura ambiente (Esquema 2.5).



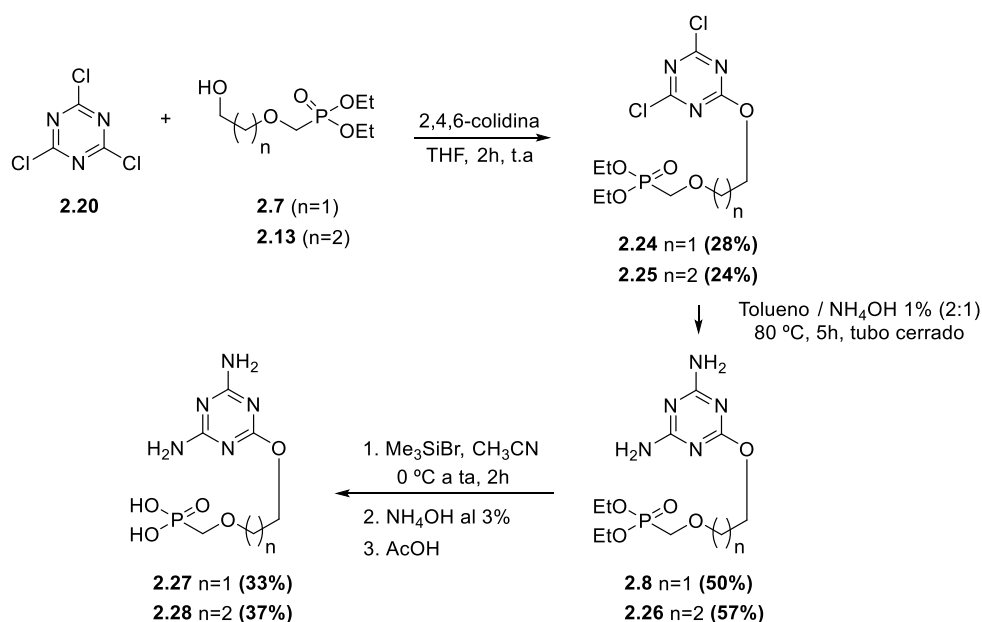
Esquema 2.5. Síntesis del triflato 2.19.

Con el fin de evitar el empleo de bases fuertes que, como se ha visto en procedimientos anteriores, dan lugar bien a mezclas complejas de reacción y/o a rendimientos muy bajos del aza-nucleósido deseado, nos planteamos un nuevo procedimiento sintético basado en el empleo de cloruro cianúrico (**2.20**) que es más reactivo. Una buena alternativa para la síntesis de 1,3,5-triazinas sustituidas consiste en la funcionalización del cloruro cianúrico mediante sucesivas sustituciones nucleófilas controladas de cada uno de los átomos de Cl⁵ (Esquema 2.6) teniendo en cuenta una disminución de la reactividad con el número de sustituyentes.^{11–13} Esta reactividad disminuye en el orden indicado **2.20** > **2.21** > **2.22**.



Esquema 2.6. Facilidad con la que se produce la sustitución nucleófila del cloro en 1,3,5-triazinas cloradas mediante nucleófilos (Nu): cloruro cianúrico (**2.20**) > **2.21** > **2.22**.

Así, la reacción de cloruro cianúrico (**2.20**) con los fosfonatos **2.7**⁴ y **2.13**¹⁴ en presencia de 2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina), en THF recién destilado durante 2 horas a temperatura ambiente, dio lugar a los compuestos **2.24** y **2.25** con un 28% y un 24% de rendimiento, respectivamente (Esquema 2.7). Un aumento tanto de la temperatura como de los tiempos de reacción, en busca de un mayor rendimiento, solamente conduce a la formación de productos secundarios y a mezclas complejas de reacción. El tratamiento posterior de **2.24** y **2.25** con una mezcla 2:1 de tolueno y una disolución de hidróxido amónico al 1% en tubo cerrado a 80 °C durante 5 horas condujo a los fosfonatos protegidos de diaminotriazina **2.8** y **2.26** con un 50% y un 57% de rendimiento, respectivamente. Finalmente, la desprotección de **2.8** y **2.26** con bromuro de trimetilsilano seguida de hidrólisis (NH₄OH al 3%) dio lugar a los fosfonatos desprotegidos deseados **2.27** (PMEO-DAT) y **2.28** con un 33% y un 37% de rendimiento, respectivamente. Cabe destacar que para evitar la degradación de estos productos en el paso de desprotección es necesario añadir el bromuro de trimetilsilano a baja temperatura (0 a -10 °C) y llevar cuidadosamente la mezcla de reacción en frío hasta pH≈5 con ácido acético glacial antes de evaporar el disolvente para su posterior purificación. Los fosfonatos desprotegidos **2.27** y **2.28** resultaron muy insolubles, lo que dificultó su purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice o intercambio iónico. Para su purificación se aprovechó la diferencia de solubilidad entre los fosfonatos **2.27** y **2.28** y las trazas de amelina (**1.48**) formadas. Así el crudo de reacción se lava repetidamente con diclorometano y posteriormente, se disuelve en MeOH/H₂O. El precipitado resultante (amelina) se elimina y el líquido filtrado se concentra a sequedad dando lugar a los fosfonatos desprotegidos puros.



Esquema 2.7. Síntesis optimizada de los fosfonatos **2.27** y **2.28**.

2.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS FOSFONATOS DE DIAMINOTRIAZINAS

Los fosfonatos de diaminotriazinas **2.27** y **2.28** se evaluaron en cultivos celulares frente a un amplio panel de virus tales como los virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2), el virus del sarcoma de Moloney (VSM), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), los virus herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), el citomegalovirus humano (CMVH), el virus varicela zoster (VVZ), el virus vacuna (VV), el adenovirus 2, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus influenza A y el virus influenza B.

Estos estudios fueron realizados por el equipo del Prof. Jan Balzarini en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). Los ensayos frente a la replicación del virus de la hepatitis B fueron realizados por el equipo del Prof. Brent Korba en el Georgetown University Medical Center de la Universidad de Georgetown en Washington (USA).

Tabla 2.1. Actividad antiviral de **2.27** y PMEODAPym (**2.1**) en cultivos celulares

Cepa del virus (tipo de células)	CE ₅₀ (μM) ^a		CC ₅₀ (μM) ^b		CCM ₅₀ (μM) ^c	
	2.27	PMEODAPym (2.1)	2.27	PMEODAPym (2.1)	2.27	PMEODAPym (2.1)
VIH-1 (CEM)	2.4 ± 1.8	2.7 ± 1.2	55 ± 7	63 ^e	-	-
VIH-2 (CEM)	3.7 ± 0.6	1.9 ± 0.6			-	-
MSV (C3H)	0.35 ± 0.16	0.29 ± 0.01	-	-	>100	>100
VHB (2.2.15)	3.1 ± 0.5	0.3 ± 0.2 ^d	-	379 ^d	>100	-
VHC (Huh-5.2)	>33	-	-	-	>33	-
VHS-1 (HEL)	69 ± 27	36 ± 19	49 ± 0	-	>100	>100
VHS-2 (HEL)	87 ± 14	72 ± 33				
CMVH / AD-169 (HEL)	>100	>100 ^e				
CMVH / Davis (HEL)	>100	>100 ^e				
VVZ / OKA (HEL)	3.1 ± 1.9	8.6 ^e				
VVZ / 07-1 (HEL)	7.9 ± 0.1	4.2 ^e				
VV (HEL)	>100	>100				
Adenovirus-2 (HEL)	>100	>100				
VSV (HEL)	>100	>100				
INF-A (MDCK)	>100	>100	-	-	>100	-
INF-B (MDCK)	>100	>100	-	-	>100	-

^a Concentración efectiva 50%.

^b Concentración citotóxica 50 o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular.

^c Concentración citotóxica mínima o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular.

^d Datos obtenidos en cultivos celulares de HepAD38 y HepAD79, y tomados de la bibliografía de Ying y col.¹⁵

^e Datos tomados de la bibliografía: Holy y col.¹⁶ y Balzarini y col.¹⁷

Los resultados de dicha evaluación biológica se recogen en la Tabla 2.1. En la tabla se ha incluido como compuesto de referencia PMEODAPym (**2.1**).^{15,18,19} El derivado **2.28** no mostró actividad antiviral cuando se evaluó frente a los virus VIH-1, VIH-2 y VSM. Sin embargo, el derivado **2.27** (PMEODAT) fue un inhibidor potente de la replicación de los virus VIH-1, VIH-2, VHB, VVZ y VSM con valores de CE_{50} del orden micromolar bajo. Asimismo, mostró una actividad modesta frente VHS-1 y VHS-2 (CE_{50} ~69-87 μ M) resultando inactivo a concentraciones superiores a 100 μ M frente a la replicación del resto de los virus ensayados (Tabla 2.1).

El hecho de que **2.28**, que contiene un metileno extra en la cadena acíclica (metiloxipropoxi) con respecto a **2.27**, sea inactivo frente a VIH-1, VIH-2 y VSM, y **2.27** sea activo frente a los mencionados virus indica que la cadena tipo metoxietoxi es la longitud óptima entre el fosfonato y la nucleobase [diaminotriazina (DAT)] para la actividad.

Caben destacar las diferencias de actividad observadas frente a los distintos virus de la familia de los herpes que van desde potentes (VVZ; CE_{50} = 3.1-7.9 μ M), moderados (VHS-1 y VHS-2; CE_{50} = 69-87 μ M) o incluso inactivos (CMVH; CE_{50} >100 μ M). Dado que los ensayos de actividad frente a los distintos virus herpes se realizaron en los mismos cultivos celulares de células HEL, las variaciones en la potencia inhibitoria observadas no se pueden atribuir a diferencias en el mecanismo de activación metabólica de **2.27** a su correspondiente difosfato. Por otro lado, **2.27** mostró una actividad citostática moderada frente a la proliferación de células CEM, PC-3, Caki-1 y HEL, pero no se detectó actividad citotóxica en cultivos celulares de células HEL y células 2.2.15 a concentraciones mayores de 100 μ M.

A la vista de todo lo expuesto hasta este punto se puede concluir que el perfil biológico de **2.27** (PMEODAT) es muy similar al de PMEODAPym (**2.1**). Sin embargo, cuando se añade **2.27** a cultivos celulares de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a diferentes concentraciones (100, 20 y 4 μ M), no se observa una inducción de quimio/citoquinas, mientras que una exposición corta de PBMC a PMEODAPym (**2.1**) desencadena la secreción de una amplia variedad de quimio/citoquinas, incluidos los agonistas del receptor CCR5 como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β .²⁰ Hay que destacar que este efecto inmunomodulador de PMEODAPym es desencadenado directamente por el propio compuesto y no es necesaria la conversión metabólica a su forma difosfato.

Por tanto, aunque los requisitos estructurales en la familia de derivados de PMEODAPym para desencadenar la inducción de quimio/citoquinas todavía no están muy claros parece, a la vista de los resultados, que el anillo de triazina de **2.27** no es reconocido por la(s) diana(s) celular(es) que interacciona(n) eficientemente con el correspondiente derivado de diaminopirimidina (PMEODAPym). Es decir, los anillos de triazina y

pirimidina son reconocidos de forma diferente por la(s) diana(s) celular(es) responsable(s) del efecto de inducción de quimio/citoquinas.

La capacidad de formación de enlaces de hidrógeno del anillo de diaminotriazina de **2.27** es, en principio, similar a la del anillo de diaminopirimidina de PMEODAPym (**2.1**), lo que no explicaría la diferencia de comportamiento de ambos compuestos en cuanto a la interacción con las dianas celulares responsables de la inducción de quimio/citoquinas. Con el fin de poder entender esta diferencia de comportamiento entre ambos anillos, llevamos a cabo estudios de modelado molecular.

2.3. ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR

En la Figura 2.3 se muestran los potenciales electrostáticos moleculares (PEM) calculados a partir de las geometrías optimizadas de la parte heterocíclica plana de PMEODAPym (**2.1**, izquierda) y PMEODAT (**2.27**, derecha).

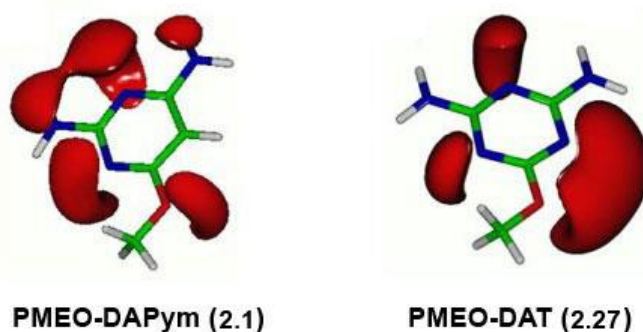


Figura 2.3. Regiones negativas (isocontornos rojos) de los potenciales electrostáticos moleculares calculados a partir de las geometrías optimizadas de la parte heterocíclica plana de PMEODAPym (**2.1**, izquierda) y PMEODAT (**2.27**, derecha).

Como se observa en la figura, existen diferencias significativas en la distribución electrónica, no sólo en la zona del N del anillo de **2.27** que reemplaza al C de **2.1** sino también en los N, tanto sp^2 del anillo como en los N sp^3 de las aminas. Por tanto, estas diferencias en los PEM calculados para **2.27** y PMEODAPym reflejan diferencias en los orbitales moleculares y en la polarización de los enlaces de ambos anillos que podrían dar lugar a interacciones diferentes no solo con la base correspondiente del molde (“template”) sino también con residuos próximos en la proteína y, posiblemente, con moléculas de agua en el sitio activo de las ADN polimerasas virales con las que interaccionan estos compuestos.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la plasticidad de la cavidad (sitio activo), cuyo volumen y forma viene definido tanto por la pared enzimática como por la hebra del “template”, depende de la arquitectura de la enzima (ADN polimerasa), la cual

varía entre las diferentes familias y depende de la secuencia concreta de aminoácidos en cada polimerasa.

Teniendo en cuenta que las ADN polimerasas virales son posiblemente las dianas frente a las que **2.27** y PMEODAPym ejercen su acción antiviral, intentamos explicar el perfil de actividad mostrado por **2.27** y PMEODAPym (**2.1**) (Tabla 2.1) el cual apunta a que deben existir pequeñas diferencias en los sitios activos de esas enzimas en los distintos virus (VHS, VVZ, VIH, VHB y VSM). Para comprender estas diferencias nos centramos en la estructura tridimensional de estas enzimas virales ya que, debido a que los ensayos de actividad se realizaron en el mismo tipo de cultivos celulares (células humanas eritroleucémicas, HEL), no deberían existir diferencias apreciables en la activación metabólica de los compuestos a los correspondientes difosfatos.

Se conocen y están bien caracterizadas las estructuras tridimensionales de las transcriptasas inversas (TI) de VIH-1 y VIH-2, que son heterodiméricas, y de la monomérica del VSM. Las tres enzimas comparten una misma arquitectura en sus respectivos sitios activos.²¹ Basándonos en alineamientos múltiples de secuencias y en datos funcionales,²² hicimos extensible esta arquitectura a la ADN polimerasa del VHB, la cual no ha sido aún resuelta por técnicas de cristalografía de R-X.²³

Se ha descrito en la literatura el modelo de PMEODAPym unido al sitio activo (ADN polimerasa) de la TI del VIH-1 en complejo con la doble hélice constituida por las hebras de los polinucleótidos molde y cebador (“primer”).²⁴ En dicho modelo el modo de unión de este ligando es muy similar al modo de unión determinado experimentalmente para el Tenofovir-difosfato²³ (TNV-pp, **2.29**) (Figura 2.4). En este modelo la base (diaminopirimidina) se aparea mediante enlaces de hidrógeno (Watson-Crick) a una timina, ya que, como se ha comentado anteriormente, el anillo de pirimidina en PMEODAPym mimetiza un anillo abierto e incompleto de diaminopurina (como el presente en TNV).²⁵ Por tanto, se puede asumir con relativa seguridad que este modo de unión es el mismo para el difosfato del derivado de diaminotriazina **2.27** (**2.27-pp**), no solo para las TI de VIH-1 y VIH-2 sino también para la TI del VSM y la ADN polimerasa del VHB.

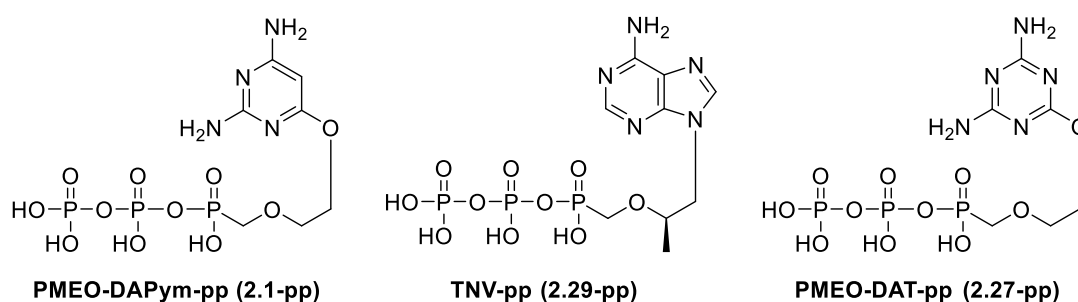


Figura 2.4. Estructuras de PMEODAPym (**2.1-pp**), TNV-pp (**2.29-pp**) y PMEODAT (**2.27-pp**).

En la Figura 2.5 se recoge el modelo de interacción de **2.27**-pp en el sitio activo de la TI del VIH-1 (verde oscuro), de la ADN polimerasa del VHB (azul) y de la TI del VSM (cian) en complejo con una doble hebra molde/cebador. Para facilitar la visualización del modelo, se destacan únicamente las cadenas laterales de los residuos de Tyr/Phe y Met/Val entre los que encaja la cadena acíclica de **2.27**.

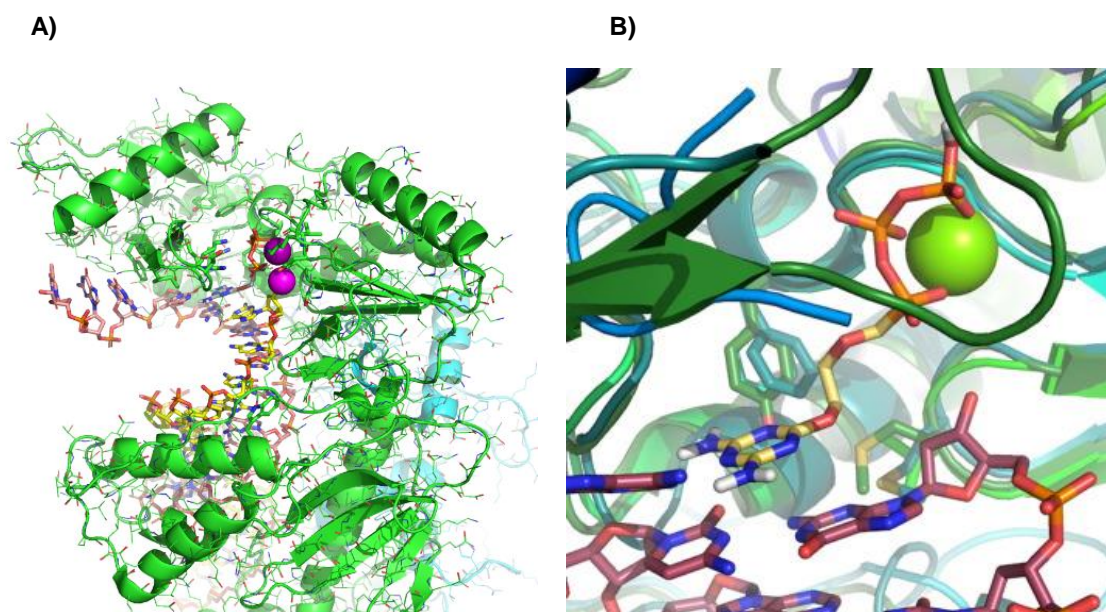


Figura 2.5. **A)** Modelo de interacción de **2.27**-pp en el sitio activo de la TI del VIH (subunidad p65 en verde y subunidad p51 en cian) en complejo con el molde (cadena rosa)/cebador (cadena amarilla). **B)** modelo de interacción de **2.27**-pp en el sitio activo de la TI del VIH-1 (verde oscuro), de la ADN polimerasa del VHB (azul) y la TI del VSM (cian) en complejo con un molde/cebador.

Un hecho diferencial de los complejos de las TI con **2.27** es que el N extra del anillo de triazina (respecto al de pirimidina de **2.1**) ocupa una región espacialmente muy próxima (~ 4 Å) al N-7 del tenofovir difosfato (**2.29**) y apunta hacia la cadena lateral aromática del residuo que discrimina entre ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos (Tyr115 en la TI del VIH-1 y Phe88 en la TI de VHB) y el residuo considerado como la “puerta estérica” (*steric gate*) (Gln151 en la TI de VIH-1 y Met171 en la TI de VHB). Cabe destacar que esta zona (*steric gate*) denominada sitio de pares de bases nacientes (NBS, *nascent base-pair site*, en inglés) no parece jugar un papel importante en el reconocimiento de las bases, ya que no discrimina entre purinas y pirimidinas. Sin embargo, la disposición de la base en el NBS puede dar lugar a desviaciones en el apareamiento canónico del ligando entrante con la base del molde, como se observa en la estructura del complejo VIH-1 TI/**2.29**-pp²⁴ (Figura 2.6).

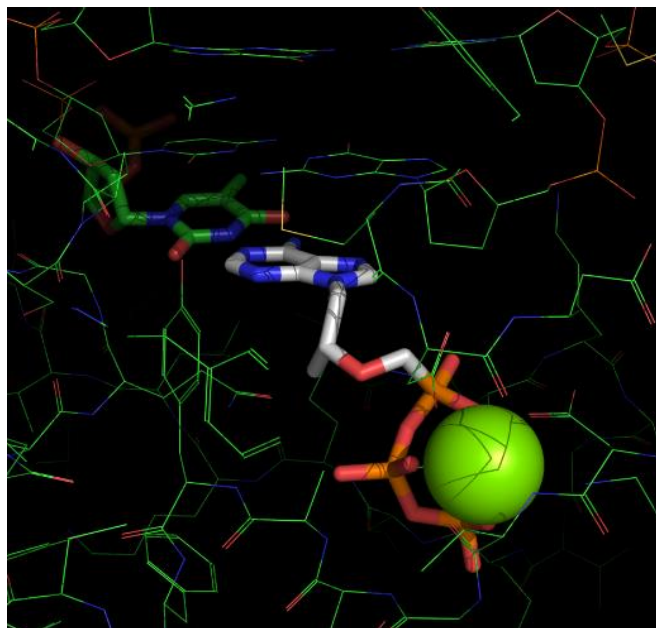


Figura 2.6. Modelo del complejo VIH-1 TI / 2.29-pp.

En todos los complejos la cadena acíclica del fosfonato unido en el sitio activo (Figura 2.6) está intercalada entre las cadenas laterales de los residuos aromáticos que discriminan entre los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos (Tyr115, Phe115 o Phe88 en las enzimas de VIH-1, VSM y VHB, respectivamente) y el segundo residuo hidrófobo en el motivo YMDD/YVDD (Met184, Val223 o Met204, respectivamente). Esto significa que la naturaleza de este último residuo, que resulta crítico para la sensibilidad frente a 2',3'-didesoxi-3-tiocitidina (3TC),²⁶ es irrelevante para estos inhibidores. A modo de ejemplo, cabe mencionar que el nitrógeno extra del anillo de triazina de **2.27** apunta, en la ADN polimerasa del VVZ, hacia el residuo discriminante de nucleótidos entrantes (Tyr687, que ocupa la misma posición que Tyr722 en la ADN polimerasa de VHS-1) así como la Tyr782 que ocupa una posición equivalente a la Tyr567 en la ADN polimerasa RB69 (RB69 pol) (Figura 2.7).

En cuanto al derivado **2.28**, la presencia de una cadena alquílica de mayor longitud impide que éste se disponga adecuadamente en el reducido espacio del NBS, lo cual permite explicar la falta de actividad antiviral de este compuesto.

En el caso de las polimerasas de los virus herpes, topológicamente distintas, los residuos equivalentes son Tyr722/Tyr687/Tyr722 y Thr887/Thr852/Trp911 para VHS-1, VVZ y CMVH, respectivamente. Estas diferencias permitirían explicar la falta de actividad de los compuestos frente a CMVH, lo que significa que los factores que confieren el alto nivel de resistencia en el CMVH (y por tanto, la falta de actividad frente a este virus) habría que buscarlos en otra zona de la polimerasa, posiblemente en las regiones variables presentes entre los aminoácidos altamente conservados necesarios para la unión de los

nucleótidos y la catálisis, como se observa en la ADN polimerasa del bacteriófago RB69²⁷ (Figura 2.7), ampliamente utilizada como modelo para el estudio de las ADN polimerasas de la familia de los virus herpes.

DPOLA_HUMAN	611	QKALKLTANSMYGCLG
DPOL_BPR69	556	QINRK <u>LLIN</u> <u>SLY</u> GALG
L0N6J6_HHV1	807	QAAIKVVCNSVYGFTG
DPOL_HHV2H	812	QAAIKVVCNSVYGFTG
DPOL_HCMVA	807	QMALKVTCNAFYGFTG
DPOL_VZVD	771	QAAIKVVCNSVYGFTG

Figura 2.7. Alineamiento múltiple (T-coffee)²⁸⁻³⁰ de parte de las secuencias de la subunidad catalítica α de la ADN polimerasa humana y de las ADN polimerasas del bacteriófago RB69 y los herpesvirus humanos (entradas UNIPROT).

En la Figura 2.7, los residuos subrayados en negrita corresponden a las posiciones que tras mutación disminuyen sustancialmente la fidelidad de replicación de la ADN polimerasa de RB69 mediante un aumento en la tolerancia a los apareamientos incorrectos (“mismatches”) en el sitio de pares de bases naciente (NBS).

Tomando todos estos resultados en conjunto, nuestra hipótesis es que cuanto mayor es la capacidad para discriminar entre bases correctas o incorrectamente apareadas en el sitio activo, menor será la sensibilidad de la ADN polimerasa a este tipo de compuestos.

Las semejanzas estructurales entre las TI de los VIH-1, VIH-2, VHB y VSM permiten explicar la inhibición eficaz de estas enzimas por **2.27**. Por el contrario, el hecho sorprendente de que el VVZ sea 10 veces más sensible a **2.27** que el VHS-1, VHS-2 o particularmente el CMVH (Tabla 2.1) apunta a la necesidad de realizar estudios estructurales adicionales porque el NBS de estas cuatro ADN polimerasas posee residuos idénticos que no servirían para explicar fácilmente estas diferencias de actividad.

Como conclusión y a modo de resumen de todo lo comentado en este capítulo, PMEODAT (**2.27**) es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1, VIH-2, VHB, VSM y VVZ al igual que PMEODAPym (**2.1**). Ambos compuestos son mucho menos activos frente a la replicación de otros virus ADN, como VHS-1, VHS-2, CMVH, VV y adenovirus, o virus ARN, como VHC.

A diferencia de PMEODAPym, **2.27** no induce un aumento de las β -quimio/citoquinas cuando se añade a cultivos de PBMC. Por tanto, PMEODAT (**2.27**) se puede considerar, desde el punto de vista de la aparición de potenciales efectos secundarios a concentraciones antivirales relevantes, como un compuesto mucho más selectivo que PMEODAPym (**2.1**).

3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación biológica de aza-análogos de PMEODAPym (**2.1**) en los que se ha sustituido la 2,4-diaminopirimidina por una 2,4-diamino-1,3,5-triazina (DAT) con el fin de estudiar el efecto de dicha sustitución sobre la actividad biológica de los compuestos. Asimismo, se ha estudiado la influencia de la longitud de la cadena acíclica en la actividad biológica de los PMEODAT (**2.27**). La síntesis de este tipo de compuestos ha supuesto todo un reto sintético.

1. Para la preparación de los PMEODAT se ha puesto a punto una novedosa estrategia sintética a partir de cloruro cianúrico (**2.20**) por tratamiento de éste con los correspondientes fosfonatos (**2.7** y **2.13**), en presencia de 2,4,6-colidina, que ha conducido a los intermedios deseados **2.24** y **2.25** con rendimientos moderados. El tratamiento posterior de **2.24** y **2.25** con hidróxido amónico seguido de desprotección e hidrólisis condujo a los PMEODAT **2.27** y **2.28** con un 33% y un 37% de rendimiento, respectivamente.
2. Los fosfonatos de diaminotriazinas **2.27** y **2.28** se evaluaron en cultivos celulares frente a un amplio panel de virus (VIH-1, VIH-2, VSM, VHB, VHC, VHS-1, VHS-2, CMVH, VVZ, VV, VSV, Influenza A y B, adenovirus 2).
3. El derivado **2.28** que contiene un metileno extra en la cadena acíclica (metiloxipropoxi), resultó inactivo. Este hecho indica que la cadena tipo metoxietoxi como en **2.27** (que resultó activo) es la longitud óptima entre el fosfonato y la nucleobase (DAT) para la actividad.
4. El derivado **2.27** es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1, VIH-2, VHB, MSV y VVZ presentando valores de CE_{50} en el orden micromolar bajo ($CE_{50} = 0.35-7.9 \mu\text{M}$).
5. PMEODAT (**2.27**) al igual que PMEODAPym (**2.1**) es mucho menos activo frente a la replicación de otros virus ADN, como VHS-1, VHS-2 ($CE_{50} = 36$ y $87 \mu\text{M}$, respectivamente), e inactivo frente a CMVH, VV, adenovirus o virus ARN como VHC.
6. A la vista de lo expuesto en los puntos 4 y 5 se puede concluir que el perfil biológico de **2.27** (PMEODAT) es muy similar al de PMEODAPym (**2.1**).

7. Mediante estudios de modelado molecular de los sitios activos de las ADN polimerasas virales se ha podido proporcionar una explicación estructural plausible al hecho de que ambos compuestos presenten perfiles biológicos similares. Nuestra hipótesis es que cuanto mayor es la capacidad de discriminación entre bases correcta o incorrectamente apareadas en el sitio activo menor será la sensibilidad de la ADN polimerasa a este tipo de compuestos.

8. PME0-DAT es más selectivo que PME0-DAPym desde el punto de vista de la aparición de potenciales efectos secundarios a concentraciones antivirales relevantes, ya que no induce la aparición de las β -quimio/citoquinas cuando se añade a cultivos de PBMC, mientras que **2.1** desencadena la generación de una amplia variedad de quimio/citoquinas, incluidos los agonistas del receptor CCR5 (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MÉTODOS GENERALES

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron en estrictas condiciones anhidras bajo atmósfera de argón. Los sólidos higroscópicos fueron presecados en una pistola de vacío durante 24 horas empleando P_2O_5 como desecante. Los disolventes anhidros se secaron destilándolos tal y como se indica entre paréntesis [THF (Na, benzofenona), éter etílico (Na, $CaCl_2$), DCM ($CaCl_2$) y CH_3CN ($CaCl_2$)] y recogiéndolos sobre tamiz molecular de 4 Å activado previamente en el microondas.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F₂₅₄ (MERCK), de un espesor de capa de 0.2 mm. Los compuestos se detectaron con luz UV de 254 y 365 nm.

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por destilación a vacío o por cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema "Isolera One" (Biotage), empleando cartuchos SNAP KP-C18-HS 12 g (21 x 55 mm) o 30 g (30 x 72 mm).

Los productos fueron liofilizados disueltos en una mezcla de CH_3CN/H_2O empleando un liofilizador Telstar 6-80.

La pureza de los compuestos se ha medido por HPLC en un equipo Agilent Technologies 1120 Compact LC empleando una columna de fase reversa ACE 5 C18-300 (4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m) equipado con un detector de Photodiode Array, y como fase móvil mezclas de CH_3CN (A)/ H_2O (0.05% TFA) (B) en modo gradiente. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 220 y 254 nm. Los gradientes empleados fueron los siguientes: gradiente 1: elución isocrática con H_2O durante 10 minutos, luego gradiente lineal A:B 1:99 a 95:5 en 10 minutos.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) se realizó en un cromatógrafo Waters integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiode Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000, empleando una columna de fase reversa Sunfire C18 (4.6 mm x 50 mm, 3.5 μ m). Como fase móvil se emplearon mezclas de A: CH_3CN (0.08% ácido fórmico) y B: H_2O (0.1% ácido fórmico). Se utilizó un gradiente de 10% A a 100% A en 5 minutos. En todos los casos el flujo fue de 1 ml/min y la detección de los picos se realizó mediante UV a 220 y 254 nm.

Los puntos de fusión de los sólidos obtenidos se midieron en un aparato Metter Toledo M170 y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un equipo Perkin Elmer Spectrum One.

Los espectros de masas se han registrado en un equipo Hewlett-Packard HP-1100 MSD acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tipo cuadrupolo, en modo positivo o negativo, utilizando como eluyentes en la inyección directa metanol y agua con 0.1% de ácido acético.

Los espectros de masas de alta resolución se han registrado en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS que consiste en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series acoplado a un espectrómetro de masas con analizador híbrido Q-TOF, utilizando electrospray positivo como fuente de ionización. Se emplearon como eluyentes metanol y agua con 0.1% de ácido acético. El error máximo en la determinación de la composición de las moléculas para esta técnica es de ± 5 ppm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian UNITY INOVA-300 (a 300 y 75 MHz), Varian UNITY INOVA-400 (a 400 y 100 MHz), Varian MERCURY-400 (a 400 y 100 MHz) y Varian SYSTEM-500 (a 500 y 125 MHz) equipado con una sonda fría; y los espectros de ^{31}P -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian MERCURY-400 (a 162 MHz). Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; td, triplete de dobletes; m, multiplete), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de la constante de acoplamiento (Hz) y la asignación estructural. Los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en condiciones estándar.

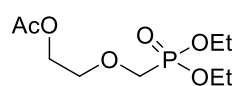
4.2. PRODUCTOS COMERCIALES

Ácido acético glacial	Scharlau
Anhídrido trifluorometanosulfónico	Aldrich
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	Aldrich
2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina)	Aldrich
Bromuro de trimetilsililo	Aldrich
Cloruro de acetilo	Aldrich
Cloruro cianúrico	Fluka
Dietil (hidroximetil)fosfonato	Aldrich
1,3-dioxolano	Aldrich
1,3-dioxano	Aldrich
Etilenglicol	Aldrich
KOH	Fluka
2,6-lutidina	Aldrich
Trietilfosfito	Aldrich
Resina Dowex 50WX8	Aldrich
ZnCl ₂ 1.0 M en éter etílico	Aldrich

4.3. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PARTIDA

4.3.1. Preparación del producto de partida 2.7

Acetato de 2-[(dietoxifosforil)metoxi]etilo⁴ (2.11)

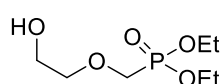


Sobre una disolución de 1,3-dioxolano (**2.9**) (10 mL, 0.14 mol) y ZnCl₂ (1.0 M en éter, 0.49 mL, 0.49 mmol) en éter etílico seco (50 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añade una disolución de cloruro de acetilo (11 mL, 0.154 mol) en éter seco (10 mL). La mezcla se deja evolucionar hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se elimina el disolvente a presión reducida manteniendo el baño por debajo de 35 °C. Sobre el residuo obtenido se añade trietilfosfito (0.132 mol, 22.7 mL) bajo atmósfera de argón durante 45 minutos. La mezcla obtenida se agita a 110 °C durante 2 horas. El crudo de reacción se purifica por destilación a vacío a 180 °C y 1 mm Hg (lit.⁴ 170 °C a 0.5 mm Hg), para obtener **2.11** (19 g, 85%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁴

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, 2CH_3), 2.08 (s, 3H, CH_3CO), 3.81 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H, CH_2O), 3.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_2P), 4.17 (m, 4H, 2CH_2), 4.24 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H, CH_2OAc).

EM (ES, positivo): m/z 255 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

[(2-hidroxietoxi)metil]fosfonato de dietilo⁴ (2.7)



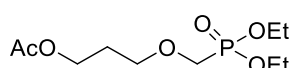
Una suspensión de **2.11** (19 g, 74.74 mol) y Dowex-50WX8 (forma H^+) (25 g) en etanol (90 mL) se calienta a 80 °C durante 18 h. Se elimina la resina ácida por filtración y el crudo resultante se evapora a vacío, dando lugar a **2.7** (14.88 g, 94%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁴

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, 2CH_3), 3.70-3.77 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 3.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, CH_2P), 3.89 (s, 1H, OH), 4.19 (m, 4H, 2CH_2).

EM (ES, positivo): m/z 213 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

4.3.2. Preparación del producto de partida 2.13

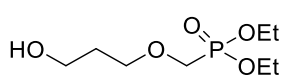
Acetato de 3-[(dietoxifosforil)metoxi]propilo¹⁴ (2.12)



Sobre una disolución de 1,3-dioxano (**2.10**) (5 g, 0.057 mol) y ZnCl_2 (1.0 M en éter, 0.20 mL, 0.20 mmol) en éter etílico seco (20 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añade una disolución de cloruro de acetilo (4.5 mL, 0.063 mmol) en éter seco (5 mL). La mezcla se deja evolucionar hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se elimina el disolvente a presión reducida manteniendo el baño por debajo de 35 °C. Sobre el residuo obtenido se añade trietilfosfito (22.7 mL, 0.132 mol) bajo atmósfera de argón durante 45 minutos. La mezcla obtenida se agita a 110 °C durante 2 horas. El crudo de reacción se purifica por destilación a vacío a 183 °C y 1 mm Hg (lit.¹⁴ 170 °C a 0.5 mm Hg) para obtener **2.12** (8.36 g, 55%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.¹⁴

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.22 (m, 6H, 2CH_3), 1.79 (m, 2H, CH_2), 1.98 (s, 3H, CH_3CO), 3.54 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.76 (m, 2H, CH_2P), 4.02 (m, 6H, 2CH_2 , CH_2O).

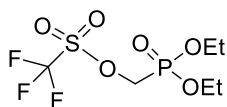
EM (ES, positivo): m/z 269 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

[(2-hidroxietoxi)metil]fosfonato de dietilo¹⁴ (2.13)

Una suspensión de **2.12** (19 g, 74.74 mol) y Dowex-50WX8 (forma H⁺) (10 g) en etanol (50 mL) se calienta a 80 °C durante 18 h. Se elimina la resina ácida por filtración y el crudo resultante se evapora a vacío dando lugar a **2.13** (3.7 g, 56%) en forma de aceite. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹⁴

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₃), 1.62 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.42 (m, 2H, CH₂O), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂O), 3.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH₂P), 4.01 (dc, *J* = 8.2 Hz, 7.0 Hz, 4H, 2CH₂).

EM (ES, positivo): *m/z* 227 (M+H)⁺

4.3.3. Preparación del producto de partida 2.19**Triflato de 2-(dietoxilfosforil)metilo⁹ (2.19)**

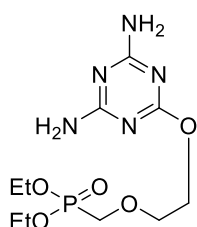
A una disolución de hidroximetilfosfonato de dietilo (**2.18**) (4.5 mL, 30.5 mmol) y 2,6-lutidina (4.4 mL, 37.6 mmol) en diclorometano (50 mL) a -50 °C y bajo atmósfera de argón, se añade anhídrido triflico (10 g, 35.4 mmol). La mezcla de reacción se deja que evolucione a temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se diluye con éter etílico (300 mL) y el sólido formado se elimina por filtración. La fase orgánica se lava con HCl 1 N (3 x 10 mL) y una disolución saturada de NaCl (3 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad para obtener 8.30 g de **2.19** (90%) como un líquido amarillo pálido. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁹

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 6H, 2CH₃), 4.01 (d, *J* = 12.0 Hz, 4H, 2CH₂), 4.19 (m, 2H, CH₂).

EM (ES, positivo): *m/z* 301 (M+H)⁺

4.4. SÍNTESIS DE LOS PMEО-DAT (2.27 y 2.28)

2,4-Diamino-6-[2-(dietoxifosforilmetoxi)etoxi]-1,3,5-triazina (2.8)



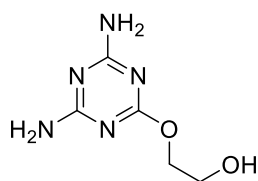
Sobre una disolución de **2.24** (150 mg, 0.44 mmol) en tolueno (5 mL) se adiciona una disolución de hidróxido amónico al 1% (3 mL). La mezcla de reacción se calienta a 80 °C en tubo cerrado durante 5 horas. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por HPFC en fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1) para obtener **2.8** (70 mg, 50%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 13.01$ min (95%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.22 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 3.80 (m, 2H, CH_2O), 3.87 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, OCH_2P), 4.02 (c, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 4.04 (c, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 4.40 (m, 2H, OCH_2), 7.62 (s ancho, 4H, NH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH_3), 61.7 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, CH_2), 63.3 (OCH_2), 65.4 (d, $J_{\text{C-P}} = 116.8$ Hz, OCH_2P), 70.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 11.7$ Hz, CH_2O), 168.2 (C-2, C-4), 170.6 (C-6). $^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.8.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ 321.1202; encontrada 321.1202.

2,4-Diamino-6-[2-(hidroxi)etoxi]-1,3,5-triazina (2.17)

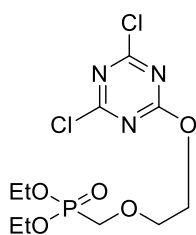


Una disolución de 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (**1.45**) (5 g, 34.3 mmol) y KOH (2.3 g, 41.2 mmol) en etilenglicol (25 mL) se calienta a 120 °C durante la noche. Se elimina el disolvente a presión reducida y se coevapora con tolueno (3 x 10 mL) obteniéndose un sólido que se recristaliza en THF/ H_2O (1:1 v/v) para dar **2.17** (4.8 g, 82%) en forma de agujas. P.f = 185-187 °C. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 4.88$ min (99%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.60 (m, 2H, CH_2OH), 4.15 (m, 2H, OCH_2), 4.79 (s ancho, 1H, OH), 6.58 (s, 4H, NH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 59.4 (CH_2OH), 67.3 (OCH_2), 168.3 (C-2, C-4), 170.8 (C-6).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_2$ 171.0750; encontrada 171.0756.

2,4-Dicloro-6-[2-(dietoxifosforilmetoxi)etoxi]-1,3,5-triazina (2.24)

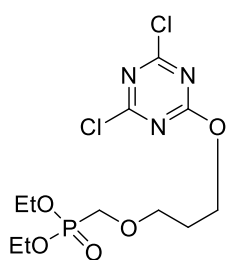
Sobre una disolución de cloruro cianúrico (**2.20**) (100 mg, 0.54 mmol) en THF seco (5 mL) se añade 2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina) (84 μ L, 0.65 mmol) y el fosfonato **2.7**⁴ (126 mg, 0.59 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se filtra a través de celita, y el líquido filtrado se vierte sobre hielo. La fase orgánica se extrae con acetato de etilo (3 x 20 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica por HPFC en fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 2:1) para obtener **2.24** (54 mg, 28%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 16.42$ min (97%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.22 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 1.24 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 3.75 (m, 2H, CH_2O), 3.84 (t, 2H, $J = 8.3$ Hz, OCH_2P), 3.87 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, OCH_2P), 4.04 (c, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2), 4.06 (c, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2), 4.50 (m, 2H, OCH_2).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH_3), 16.4 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH_3), 61.7 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, CH_2), 61.8 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, CH_2), 64.0 (d, $J_{\text{C-P}} = 162.8.0$ Hz, OCH_2P), 67.4 (OCH_2), 72.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 11.7$ Hz, CH_2O), 150.0 (C-6), 161.5 (C-2, C-4).

³¹P-RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ : 22.1.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ 359.0205; encontrada 359.0207.

2,4-Dicloro-6-[3-(dietoxifosforilmetoxi)propoxi]-1,3,5-triazina (2.25)

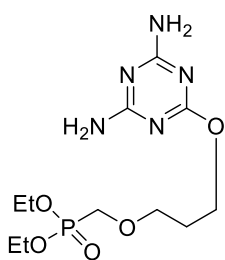
Sobre una disolución de cloruro cianúrico (**2.20**) (100 mg, 0.54 mmol) en THF seco (5 mL) se añade 2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina) (84 μ L, 0.65 mmol) y el fosfonato **2.13**¹⁴ (126 mg, 0.59 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se filtra a través de celita, y el líquido filtrado se vierte sobre hielo. La fase orgánica se extrae con acetato de etilo (3 x 20 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica por HPFC en fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 2:1) para obtener **2.25** (49 mg, 24%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 9.24$ min (97%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.33 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 1.35 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 1.98 (m, 2H, CH_2), 3.70-3.80 (m, 4H, CH_2O , OCH_2P), 4.16 (m, 4H, CH_2), 4.59 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, OCH_2).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 16.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz, CH_3), 16.7 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz, CH_3), 32.2 (CH_2), 62.5 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.4$ Hz, CH_2), 62.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.4$ Hz, CH_2), 65.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 166.6$ Hz, OCH_2P), 67.5 (OCH_2), 71.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 9.1$ Hz, CH_2O), 171.2 (C-6), 172.7 (C-2, C-4). ^{31}P -RMN (162 MHz, CDCl_3) δ : 22.9.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ 373.0361; encontrada 373.0358.

2,4-Diamino-6-[3-(dietoxifosforilmetoxi)propoxi]-1,3,5-triazina (2.26)

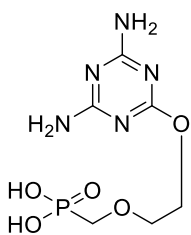


Sobre una disolución de **2.25** (150 mg, 0.44 mmol) en tolueno (5 mL) se adiciona una disolución de hidróxido amónico al 1% (3 mL). La mezcla de reacción se calienta a 80 °C en tubo cerrado durante 5 horas. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 1:1) para obtener **2.26** (84 mg, 57%) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 13.31$ min (97%).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.33 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 2.01 (m, 2H, CH_2), 3.69 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH_2O), 3.79 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, OCH_2P), 4.15 (c, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.17 (c, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 4.36 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, OCH_2), 5.24 (s ancho, 4 H, NH_2).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 16.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz, CH_3), 29.2 (CH_2), 62.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, CH_2), 63.6 (OCH_2), 65.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 167.1$ Hz, OCH_2P), 70.1 (d, $J_{\text{C-P}} = 13.1$ Hz, CH_2O), 168.6 (C-2, C-4), 171.5 (C-6). ^{31}P -RMN (162 MHz, CDCl_3) δ : 21.7. HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ 335.1358; encontrada 335.1359.

2,4-Diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]-1,3,5-triazina (2.27)



Sobre una disolución de **2.8** (30 mg, 0.09 mmol) en acetonitrilo seco (2 mL) (previamente enfriada a -10 °C), se añade gota a gota una disolución de bromotrimetilsilano (60 μL , 0.45 mmol) en acetonitrilo seco (5 mL) a 0 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporan las fracciones volátiles y el residuo obtenido se enfría con hielo y a continuación se añade una disolución de hidróxido amónico al 3% (1 mL). La mezcla se agita a 0 °C durante 5 minutos y se añade ácido acético glacial hasta pH = 5. El disolvente se evapora a presión reducida. El residuo obtenido se lava con diclorometano, luego se disuelve en

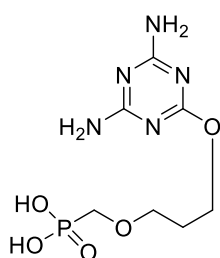
metanol y se filtra. El líquido filtrado se evapora a sequedad para dar **2.27** (8 mg, 33%) en forma de sólido amorfo blanco. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 1.50$ min (98%).

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.47 (m, 2H, CH_2O), 3.60 (m, 2H, OCH_2P), 4.13 (m, 2H, OCH_2).

^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 59.3 (OCH_2), 64.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 182.8$ Hz, OCH_2P), 70.5 (CH_2O), 168.2 (C-2, C-4), 170.0 (C-6). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.67.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ 265.0568; encontrada 265.0576.

2,4-Diamino-6-[3-(fosfometoxi)propoxi]-1,3,5-triazina (2.28)



Sobre una disolución de **2.26** (30 mg, 0.09 mmol) en acetonitrilo seco (2 mL) (previamente enfriada a -10 °C), se añade gota a gota una disolución de bromotrimetilsilano (60 μL , 0.45 mmol) en acetonitrilo seco (5 mL) a 0 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporan las fracciones volátiles y el residuo obtenido se enfría con hielo y a continuación se añade una disolución de hidróxido amónico al 3% (1 mL). La mezcla se agita a 0 °C durante 5 minutos y se añade ácido acético glacial hasta $\text{pH} = 5$. El disolvente se evapora a presión reducida. El residuo obtenido se lava con diclorometano, luego se disuelve en metanol y se filtra. El líquido filtrado se evapora a sequedad para dar **2.28** (10 mg, 37%) en forma de sólido amorfo blanco. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 0.99$ min (98%).

^1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ : 2.05 (m, 2H, CH_2), 3.35 (m, 2H, CH_2O), 3.45-3.57 (m, 4H, OCH_2P , OCH_2).

^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O) δ : 30.9 (CH_2), 58.5 (OCH_2), 65.7 (d, $J_{\text{C-P}} = 158.6$ Hz, OCH_2P), 70.4 (CH_2O), 148.9 (C-6), 157.9 (C-2, C-4). ^{31}P -RMN (162 MHz, D_2O) δ : 22.8.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ 279.0732; encontrada 279.0733.

4.5. MÉTODOS BIOLÓGICOS

4.5.1. Evaluación biológica frente a la replicación del VIH-1 y VIH-2³¹

Todos los ensayos biológicos frente a VIH han sido realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 [VIH-1 (IIB)] fue proporcionado por el Dr. R. C. Gallo y el Dr. M. Popovic (Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD). El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2 [VIH-2 (ROD)] fue proporcionado por el Dr. L. Montaigner (Pasteur Institute, Paris, France). Las células humanas linfocitos T, CEM, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgium), 2 mM L-glutamina y 0.075 M NaHCO₃.

Se suspenden células CEM (3×10^5 células/mL) en medio de cultivo y se infectan con VIH-1 o VIH-2 a una concentración 100 veces superior a la dosis infectiva 50% (CCDI₅₀). Se distribuyen en una placa de 96 pocillos (100.000 por pocillo) y tras un periodo de adsorción de dos horas a 37 °C y en atmósfera controlada de CO₂, se añadieron los compuestos ensayados a distintas concentraciones. La formación de células gigantes (sincitios) en células CEM inducida por VIH-1 se determina microscópicamente tras incubación a 37 °C durante 4-5 días. La concentración efectiva 50% (CE₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios y la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular.

4.5.2. Evaluación biológica frente a la replicación del VHB.³²

Los ensayos fueron realizados por el Prof. Brent Korba, en el departamento de microbiología e inmunología del Georgetown University Medical Center (Washington, USA).

Los ensayos de actividad antiviral frente al virus de la hepatitis B (VHB) se realizan tal como se describe en bibliografía.³² Se emplean cultivos celulares confluentes de células 2.2.15 [expresadas por el virus de la hepatitis B (VHB)] que se hacen crecer en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 2% (FBS). Los cultivos (seis para cada concentración a ensayar y por duplicado) fueron tratados con 7 dosis diarias consecutivas de cada compuesto a

ensayar. El medio se cambia diariamente con disoluciones recién preparadas de los compuestos a ensayar. Los niveles de ácidos nucleicos del VHB se miden cada 24 horas después del último tratamiento. Los niveles de ADN extracelular del VHB (virion) fueron evaluados mediante hibridación de transferencia cuantitativa. Con ayuda de un colorante rojo neutro se determina el nivel de toxicidad tras 24 horas después de la última exposición al fármaco. El A_{510} de un colorante internalizado se utilizó para el análisis semicuantitativo.

4.5.3. Evaluación biológica frente a otros virus.³³

Los compuestos fueron evaluados frente a los siguientes virus: virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) [cepas KOS, timidinoquinasa deficiente (TK⁻) y KOS resistente a ACV (ACV^r)], virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2) [cepas Lyons y G], virus varicela zóster (VVZ) [cepas Oka, timidinoquinasa deficiente TK⁻ y 07-1], citomegalovirus humano (CMVH) [cepas AD-169 y Davis], virus vaccinia (VV) [cepa Lederle], virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus influenza A (subtipos H1N1, H3N2), virus influenza B y adenovirus-2 siguiendo los procedimientos descritos.³³

Los ensayos de actividad antiviral se basaron en la inhibición del efecto citopático inducido por el virus o la formación de placas virales en células embrionarias de pulmón humano (HEL), células renales de mono verde africano (Vero), células epiteliales de carcinoma de cérvix humano (HeLa) o células de riñón canino Madin Darby (MDCK). Para ello, se emplearon cultivos celulares confluentes de fibroblastos que se hacen crecer en placas de 96 pocillos donde se inocula 100 veces la $CCID_{50}$ del virus (dosis de virus necesaria para infectar el 50% de los cultivos celulares) hasta la formación de 20 unidades de placas virales (PFU) para VVZ o 100 PFU para CMVH a diferentes concentraciones de los productos a ensayar. Los cultivos celulares fueron incubados hasta que se observó un efecto citopático completo o la formación de placas virales en los cultivos infectados y en el cultivo control infectado por el virus pero no tratado con los productos ensayados. La actividad antiviral fue expresada como CE_{50} (concentración efectiva 50) que se define como la concentración de compuesto que inhibe el efecto citopático inducido por el virus o la formación de placas virales determinadas microscópicamente en un 50%.

4.5.4. Evaluación de actividad antiviral frente al VSM.³⁴

El efecto inhibitorio de los compuestos a ensayar sobre la transformación celular de fibroblastos murinos C3H/3T3 inducida por VSM se examina microscópicamente al 6º día después de la infección. Se adicionan 75 unidades formadoras de focos de VSM a cultivos celulares confluentes de C3H/3T3 en microplacas de cultivo de 48 pocillos. El primer foco de células transformadas en los cultivos celulares aparece entre el 3^{er} y 4º día, y cubre prácticamente toda la superficie del cultivo celular hacia el 6º día. La CE₅₀ se define como la concentración de compuesto requerida para inhibir la transformación de las células C3H/3T3 al 50% inducida por el VSM.

4.5.5. Ensayos de citotoxicidad.³³

Todos los ensayos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos. A cada pocillo se le añadieron $(5-7.5) \times 10^4$ de células tumorales y una cantidad dada de los compuestos a ensayar. Dichas células se dejaron proliferar durante 48 h (células de leucemia murina L1210), o 72 h [linfocitos T humanos (CEM)] o 96 h (células HeLa de carcinoma de cérvix humano, células Caki-1 de carcinoma de riñón humano y células Huh-7 de carcinoma de hígado humano) a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂-controlada. Al final del periodo de incubación, se hace un recuento de células mediante un contador Coulter. La citotoxicidad se expresa como la CC₅₀, o concentración de producto capaz de reducir en un 50% el crecimiento del cultivo celular. Otro parámetro indicativo de la toxicidad es la concentración citotóxica mínima (CCM), concentración que causa un cambio microscópicamente detectable en la morfología de las células tratadas con diferentes compuestos.

4.5.6. Detección de citoquinas mediante el ensayo sistema Bio-Plex

Se cultivan células mononucleares de sangre periférica recién aisladas (PBMCs) (de 2 donantes diferentes) en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **2.27** (100, 20y 4 µM) y el mitógeno PHA (2 µg/mL) y se recoge el sobrenadante del cultivo después de 24 horas. El perfil de producción de citoquinas se determinó mediante un sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad) y utilizando un kit de Bio-Plex Human Cytokine 27-plex assay de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El kit de ensayo 27-Plex assay contiene microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos para IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de estimulación de colonias

de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias granulocito macrófago (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), IP-10 (proteína inducible de interferón-10), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), MIP-1 α (proteína inflamatoria del macrófago-1 α), MIP-1 β , factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), RANTES (regulation upon activation normal T-cell expressed and secreted), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Para cada citoquina, se realizaron 9 patrones en el rango de 0.5 pg/mL a 32,000 pg/mL, y la dosis mínima detectable fue entre 0.5 y 5 pg/mL. Las curvas de calibración y la concentración de citoquinas en cada una de las muestras se realizaron mediante el software Bio-Plex Manager 4.1.³⁵

4.6. MODELADO MOLECULAR

Como geometría de partida, se utilizó la estructura tridimensional de [2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-metiletoxi]metil-trifosfato (tenofovir difosfato, **2.29**-pp) coordinado a un átomo de Mg²⁺ depositada en la base de datos Protein Data Bank (PDB, código 3JSM³⁶, en vez de la conformación más tensionada de código 1T05²⁴) como una plantilla para la construcción de **2.27** dentro del módulo de edición molecular disponible en PyMOL.³⁷ La optimización de la geometría se realizó a nivel del método de la teoría del funcional de la densidad (DFT) usando el funcional híbrido B3LYP con 6-311+G** como funciones base y aplicando el modelo continuo polarizable (PCM) para incluir el efecto del disolvente (agua). Todos los cálculos se llevaron a cabo usando el programa Gaussian 09, D.01.³⁸ Como control, se llevó a cabo un cálculo de Tenofovir-difosfato con Mg²⁺ (**2.29**) en las mismas condiciones que para **2.27**. Dicho cálculo dio lugar a una estructura optimizada con pequeños cambios en las longitudes de enlace y los ángulos relativos en la conformación de rayos X del cristal en la parte nucleosídica de la molécula, pero con una variación esperada en los ángulos de torsión de **2.29** como consecuencia de la ausencia de interacciones adicionales de residuos de proteínas con el Mg²⁺ y con los fosfatos. Sobre las estructuras optimizadas se calcularon los potenciales electrostáticos moleculares y se generaron las imágenes correspondientes usando el programa MOLDEN.³⁹

Cabe destacar que, a pesar de su baja identidad de secuencias global, las ARN polimerasas dependientes muestran un pliegue similar y alto grado de conservación de un número de residuos en varios dominios que son críticos para la selección de nucleótidos y la catálisis.⁴⁰ Un exhaustivo modelado por homología y alineamiento estructural tridimensional usando los servidores Phyre⁴¹ y Dalí⁴², respectivamente, nos permitió construir modelos fiables de los sitios activos (a pesar de $\leq 22\%$ de identidad

de secuencia), por un lado, de la TI del VHB, y por otro lado, de las ADN polimerasas del VVZ y CMVH. Que nosotros sepamos ninguna de estas enzimas ha sido resuelta experimentalmente hasta la fecha. Las plantillas preferidas para la TI de VHB fueron las subunidades p68 y p55 de la TI del VIH-2 (entrada 1MU2 en el PDB), las subunidades p66 y p51 de la TI del VIH-1 (entradas 1T03, 1T05, 3JSM, 3JYT y 1RTD en el PDB), y el fragmento de conexión de la polimerasa de la TI monomérica del virus xenotrópico relacionado con el virus de leucemia murina, un pariente cercano del virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM), en complejo con un substrato híbrido ARN/ADN (entrada 4HKQ en el PDB). De este modo, 307 residuos (89% de la longitud de la proteína completa) podrían ser modelados con un > 90% de confianza usando múltiples plantillas.

Las mejores plantillas para las ADN polimerasas del VVZ y CMVH fueron las ADN polimerasa del VHS-1 (entrada 2GV9 en el PDB; de conformación abierta)⁴³ y la subunidad catalítica de la ADN polimerasa δ del *Saccharomyces cerevisiae* (entrada 3IAY en el PDB),⁴⁴ con un 60% y un 28% de identidad de secuencias para los primeros y un 36% y un 30% para los segundos, que en conjunto nos permitió construir modelos de 1084 residuos (91%) y 1171 residuos (94%), respectivamente, con un >90% de confianza.

La superposición de pares de átomos equivalentes del anillo de triazina de **2.27**-pp, del anillo de adenosina de **2.29**-pp, o del dNTP entrante nos permitió acoplar a **2.27** en el sitio activo, por un lado con las TIs de los VIH-1, VIH-2, VSM y VHB salvajes, y por otro lado, con las ADN polimerasas del VHS-1, VVZ y CMVH, en un lugar compatible con el apareamiento de bases a un residuo de dTMP de una hebra molde.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Krečmerová, M.; Masojídková, M.; Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates with 5-azacytosine base moiety substituted in C-6 position. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 387–395.
2. Otmar, M.; Dracinsky, M.; Krecmerova, M.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Snoeck, R. Synthesis of O2- and N3-(2-phosphonomethoxy)ethyl derivatives of 6-phenyl- and 6-pyridinyl-5-azacytosine. *Heterocycles.* **2011**, *83*, 797–813.
3. Krečmerová, M.; Holý, A.; Pohl, R.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Naesens, L.; Neyts, J.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Snoeck, R. Ester prodrugs of cyclic 1-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-5-azacytosine: synthesis and antiviral activity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5765–5772.
4. Wei Chen, N.; Michael T. Flavin, D.; Ze-Qi Xu, N. Method for the preparing 9-12-(diethoxyphosphonomethoxy)ethyladenine and analogues thereof. US005874577A, **1999**.
5. Afonso, C. A. M.; Lourenço, N. M. T.; Rosatella, A. de A. Synthesis of 2,4,6-tri-substituted-1,3,5-triazines. *Molecules.* **2006**, *11*, 81–102.
6. Hocková, D.; Holý, A.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Synthesis and antiviral activity of 2,4-diamino-5-cyano-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3197–3202.
7. Holý, A. Synthesis and biological activity of isopolar acyclic nucleotide analogs. In *Recent advances in nucleosides: chemistry and chemotherapy*; Elsevier, **2002**; Vol. 6, 167–238.
8. Smith, M. B.; March, J. *March's advanced organic chemistry*; Wiley, **2007**.
9. Xu, Y.; Flavin, M. T.; Xu, Z.-Q. Preparation of new Wittig reagents and their application to the synthesis of alpha, beta-unsaturated phosphonates. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7697–7701.
10. Sun, X.; Cao, Z.; Sun, Y. N -Chloro-alkoxy-S-triazine-based antimicrobial additives : Preparation , characterization, and antimicrobial and biofilm-controlling functions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 607–612.
11. Dudley, J. R.; Thurston, J. T.; Schaefer, F. C.; Holm-Hansen, D.; Hull, C. J.; Adams, P. Cyanuric chloride derivatives. III. Alkoxy-s-triazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2986–2990.
12. Kaiser, D. W.; Thurston, J. T.; Dudley, J. R.; Schaefer, F. C.; Hechenbleikner, I.; Holm-Hansen, D. Cyanuric chloride derivatives. II. Substituted melamines. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2984–2986.

13. Thurston, J. T.; Dudley, J. R.; Kaiser, D. W.; Hechenbleikner, I.; Schaefer, F. C.; Holm-Hansen, D. Cyanuric chloride derivatives. I. Aminochloro-s-triazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2981–2983.
14. Shankar, R. B.; Yonkey, M. M.; Qi, Y.; Kamber, N. E. Organophosphorous compounds for flame retardant polyurethane foams. WO 2014 056138 A1, **2014**.
15. Ying, C.; Holy, A.; Hocková, D.; Havlas, Z.; De Clercq, E.; Neyts, J. Novel acyclic nucleoside phosphonate analogues with potent anti-hepatitis B virus activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1177–1180.
16. Holý, A.; Votruba, I.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]pyrimidines with antiviral activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1918–1929.
17. Balzarini, J.; Pannecouque, C.; Naesens, L.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Hocková, D.; Holý, A. 6-[2-phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines: a new class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates with antiviral activity. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* **2004**, *23*, 1321–1327.
18. Balzarini, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Aquaro, S.; Perno, C.-F.; Egberink, H.; Holy, A. Antiretrovirus activity of a novel class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2185–2193.
19. De Clercq, E.; Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940.
20. Balzarini, J.; Andrei, G.; Balestra, E.; Huskens, D.; Vanpouille, C.; Introini, A.; Zicari, S.; Liekens, S.; Snoeck, R.; Holý, A.; et al. A multi-targeted drug candidate with dual anti-HIV and anti-HSV activity. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, 1–18.
21. Novák, J.; Hasník, Z.; Linhart, I. Syntheses of O6-alkyl- and arylguanine derivatives: nucleobase adducts derived from styrene 7,8- and 3,4-oxides. *European J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 507–515.
22. Menéndez-Arias, L.; Alvarez, M.; Pacheco, B. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *8*, 1–9.
23. Vörös, J.; Urbanek, A.; Rautureau, G. J. P.; O'Connor, M.; Fisher, H. C.; Ashcroft, A. E.; Ferguson, N. Large-scale production and structural and biophysical characterizations of the human hepatitis B virus polymerase. *J. Virol.* **2014**, *88*, 2584–2599.

24. Tuske, S.; Sarafianos, S. G.; Clark, A. D.; Ding, J.; Naeger, L. K.; White, K. L.; Miller, M. D.; Gibbs, C. S.; Boyer, P. L.; Clark, P.; et al. Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 469–474.
25. Herman, B. D.; Votruba, I.; Holy, A.; Sluis-Cremer, N.; Balzarini, J. The acyclic 2,4-diaminopyrimidine nucleoside phosphonate acts as a purine mimetic in HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerization. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12101–12108.
26. Halvas, E. K.; Svarovskaia, E. S.; Freed, E. O.; Pathak, V. K. Wild-type and YMDD mutant murine leukemia virus reverse transcriptases are resistant to 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J. Virol.* **2000**, *74*, 6669–6674.
27. Xia, S.; Konigsberg, W. H. RB69 DNA polymerase structure, kinetics, and fidelity. *Biochemistry.* **2014**, *53*, 2752–2767.
28. Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 205–217.
29. McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Cowley, A. P.; Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W597–W600.
30. Li, W.; Cowley, A.; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Lopez, R.; A., R.; et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W580–W584.
31. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosenberg, I.; Holý, A.; Schellekens, H.; De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS.* **1991**, *5*, 21–28.
32. Korba, B. E.; Gerin, J. L. Use of a standardized cell culture assay to assess activities of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* **1992**, *19*, 55–70.
33. De Clercq, E.; Descamps, J.; Verhelst, G.; Walker, R. T.; Jones, A. S.; Torrence, P. F.; Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141*, 563–574.
34. Krečmerová, M.; Holý, A.; Pískala, A.; Masojdková, M.; Andrei, G.; Naesens, L.; Neyts, J.; Jan, B.; De Clercq, E.; Snoeck, R. Antiviral activity of triazine analogues of 1-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine (cidofovir) and related compounds. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1069–1077.

35. Huskens, D.; Férir, G.; Vermeire, K.; Kehr, J. C.; Balzarini, J.; Dittmann, E.; Schols, D. Microvirin, a novel $\alpha(1,2)$ -mannose-specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24845–24854.
36. Das, K.; Bandwar, R. P.; White, K. L.; Feng, J. Y.; Sarafianos, S. G.; Tuske, S.; Tu, X.; Clark, A. D.; Boyer, P. L.; Hou, X.; et al. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35092–35100.
37. Schrödinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. 2010.
38. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenb, D. J. Gaussian 09, Revision E.01. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA 2009.
39. Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures*; Kluwer Academic Publishers, **2000**; Vol. 14.
40. te Velthuis, A. J. W. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cell. Mol. life Sci.* **2014**, *71*, 4403–4420.
41. Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858.
42. Hasegawa, H.; Holm, L. Advances and pitfalls of protein structural alignment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 341–348.
43. Liu, S.; Knafels, J. D.; Chang, J. S.; Waszak, G. A.; Baldwin, E. T.; Deibel, M. R.; Thomsen, D. R.; Homa, F. L.; Wells, P. A.; Tory, M. C.; et al. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18193–18200.
44. Swan, M. K.; Johnson, R. E.; Prakash, L.; Prakash, S.; Aggarwal, A. K. Structural basis of high-fidelity DNA synthesis by yeast DNA polymerase delta. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 979–986.

Capítulo 3.

Nucleopéptidos como modelo de VPgpU o VPgpFU

NUCLEOPÉPTIDOS COMO MODELO DE VPgpU o VPgpFU

1. INTRODUCCIÓN

La fiebre aftosa (FMD, foot-and-mouth disease, en inglés) es una enfermedad viral, muy contagiosa, que afecta a todas las especies de animales de pezuña partida o hendida tanto domésticos como salvajes.¹ Concretamente afecta a los bovinos y porcinos, así como a los ovinos, caprinos y otros rumiantes de pezuña hendida. Asimismo, todas las especies de ciervos y antílopes así como elefantes y jirafas son susceptibles a esta enfermedad.² En una población susceptible, la morbilidad es de casi un 100%, siendo los animales de cría intensiva más susceptibles que los de razas tradicionales. Rara vez la enfermedad es fatal en los animales adultos, pero la mortalidad entre los animales jóvenes suele ser alta debido a lesiones cardíacas o a la falta de amamantamiento si la madre está afectada por la enfermedad.

La fiebre aftosa se caracteriza por fiebre; pérdida de apetito; aumento de la salivación; úlceras o lesiones vesiculares en forma de ampollas en la lengua y labios, en la boca, en las ubres y entre las pezuñas; y muchas veces cojera ocasionada por las lesiones en las patas.² Las ampollas se curan, en general, en un plazo de al menos 7 días, sin embargo, el impacto de la enfermedad sobre las tasas de crecimiento o producción láctica puede persistir tras la recuperación. Los animales que se han recuperado de la infección pueden ser portadores del virus e iniciar nuevos focos de enfermedad.

El virus de la fiebre aftosa se puede encontrar en todas las secreciones y excreciones de los animales infectados de forma aguda, incluyendo el aire expirado, la saliva, la orina, la mucosa intestinal y nasal, la leche, las heces y el semen, así como también en el fluido de las vesículas asociadas con la fiebre aftosa y en el líquido amniótico. La incidencia de la fiebre aftosa está ligada a la facilidad con que el virus se difunde por los siguientes medios: introducción de nuevos animales portadores del virus (saliva, leche, semen, etc) que pueden contagiar a un rebaño; corrales, edificios o vehículos contaminados tales como paja, piensos, agua, leche o productos biológicos; prendas o calzado contaminados de las personas, o equipos usados contaminados; carne o productos animales infectados por el virus crudos o insuficientemente cocidos y utilizados en la alimentación de los animales; y dispersión en forma de aerosol del virus de una propiedad infectada mediante las corrientes de aire.²

1.1. El virus de la fiebre aftosa

El virus responsable de esta enfermedad es el virus de la fiebre aftosa (FMDV, foot-and-mouth disease virus, en inglés) que pertenece a la familia de los picornavirus. Se han descrito siete serotipos distintos del virus (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1), existen además más de 65 subtipos así como numerosas variantes antigénicas.⁴ Esta gran diversidad es un reflejo de su alta variabilidad genética, lo que condiciona la falta de vacunas efectivas contra la enfermedad.

Los picornavirus contienen un genoma que consiste en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de polaridad positiva de alrededor 8 kb de longitud. Estos virus carecen de envoltura lipídica y las partículas virales o viriones consisten en una estructura proteica de simetría icosaédrica denominada cápsida, dentro de la cual se encuentra el ARN viral.⁵

Al igual que otros picornavirus, el virus de la fiebre aftosa presenta un ciclo infeccioso corto en cultivo celular. Dependiendo de la multiplicidad de la infección (relación entre partículas virales y número de células susceptibles de ser infectadas) los viriones infecciosos recién formados comienzan a aparecer entre 4 y 6 horas después de la infección.⁶ El ciclo completo tiene lugar en su totalidad en el citoplasma de la célula huésped y consta de las siguientes etapas (Figura 3.2):

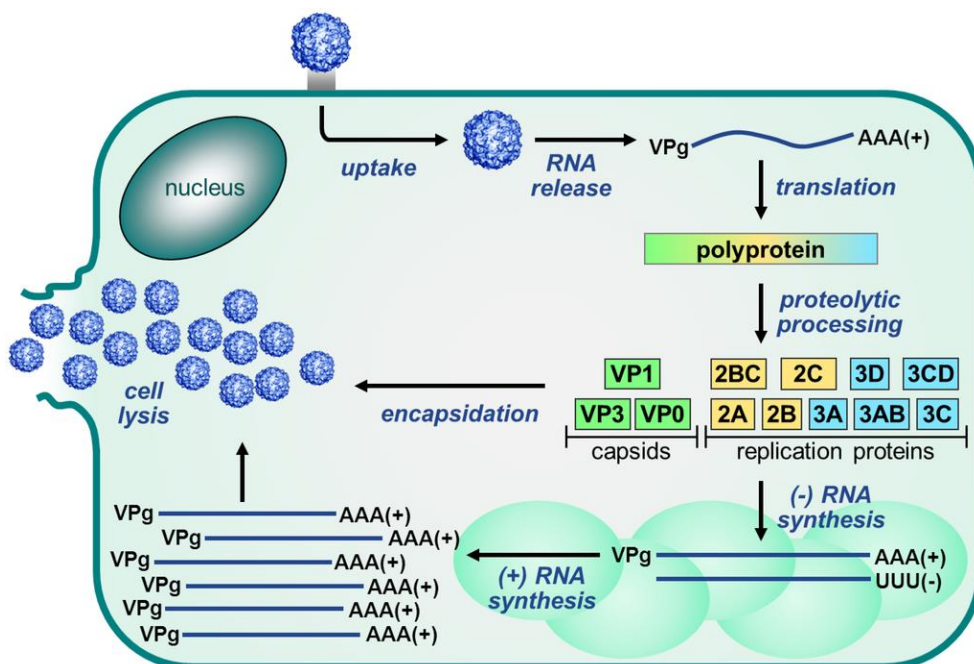


Figura 3.2. Ciclo replicativo del FMDV.

- a) **Entrada del virus en la célula.** La infección de las células se produce cuando las proteínas de adhesión, localizadas en la parte externa del virus, se unen a los receptores de la superficie celular (generalmente proteínas, glicoproteínas, carbohidratos o lípidos). No se conocen exactamente los receptores por los que el FMDV penetra hacia el interior de la célula, pero existen evidencias de la mediación de integrinas tales como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_6$.⁷ Una vez unido al receptor celular, la penetración del virus se realiza mediante endocitosis dando lugar a los endosomas.^{8,9} El pH ácido del interior del endosoma es aprovechado por el virus como mecanismo desencadenante de la desencapsidación y posterior liberación al citoplasma del ARN viral unido covalentemente a la proteína 3B o VPg (viral protein genome-linked, en inglés).
- b) **Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína precursora.** El genoma de los virus ssARN(+) presenta la misma polaridad que el ARN mensajero (ARNm) y puede ser empleado directamente para la síntesis de proteínas virales usando la maquinaria de traducción de la célula huésped. En primer lugar, el ARN se dirige a los ribosomas para ser traducido. La poliproteína obtenida es procesada por proteasas virales dando lugar a las proteínas estructurales que forman la cápsida del virus (VP1-4) y a las no estructurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol}) así como a algunos precursores estables necesarios para la replicación del virus en la célula huésped.⁶
- c) **Replicación del genoma.** El ARN(+) viral es reconocido por la ARN polimerasa viral ARN dependiente (RpRd o 3D^{pol}) para generar la copia de ARN(-) que posteriormente vuelve a ser copiada para dar el ARN(+) de las nuevas partículas virales. Este proceso se explicará más detalladamente en el siguiente apartado.
- d) **Encapsidación.** Las proteínas estructurales (VP1, VP3 y VP0), generadas a partir del procesamiento de la poliproteína viral, se unen para formar un virus inmaduro el cual se asocia con el ARN(+) recién sintetizado y se autoensambla completando la formación de la cápsida. En este proceso únicamente las moléculas de ARN(+) unidas a 3B (VPg) son encapsidadas. Posteriormente, es necesaria la maduración de VP0 mediante una ruptura catalítica a VP4 y VP2, ya que los virus que no sufren este proceso presentan un impedimento para liberar el ARN al citoplasma de las células infectadas.⁶
- e) **Liberación de los viriones maduros.** Por último, los viriones maduros salen al exterior mediante la destrucción de la célula huésped (ciclo lítico).

1.2. Replicación del genoma viral

Veamos en algo más de detalle cómo se produce la replicación del genoma viral.

La replicación del virus de la fiebre aftosa se produce gracias a la acción de una ARN polimerasa ARN dependiente viral (RdRp), denominada $3D^{pol}$, a través de una hebra de ARN negativa intermedia. Esta enzima usa una proteína unida covalentemente al extremo 5' del ARN viral llamada VPg como cebador para iniciar el proceso de replicación tanto de la hebra intermedia [ARN(-)] como de la hebra final [ARN(+)]

En un primer paso del proceso de replicación, la polimerasa $3D^{pol}$ cataliza la unión de dos uridinas monofosfato (UMP) sobre el grupo hidroxilo de la tirosina (estrictamente conservada) de la proteína cebadora VPg, empleando como molde el elemento *cre* ("cis-acting replication element") (Figura 3.3). Este proceso se denomina uridilación. La proteína VPg junto con la polimerasa viral, otras proteínas y los elementos *cre* del ARN viral constituyen el llamado "complejo de uridilación de VPg" responsable de la uridilación *in vivo* de la VPg. Existen diferentes modelos de unión establecidos entre la VPg y $3D^{pol}$ aunque el mecanismo exacto del proceso de uridilación es aún desconocido a pesar de los extensos estudios estructurales y bioquímicos llevados a cabo.¹⁰

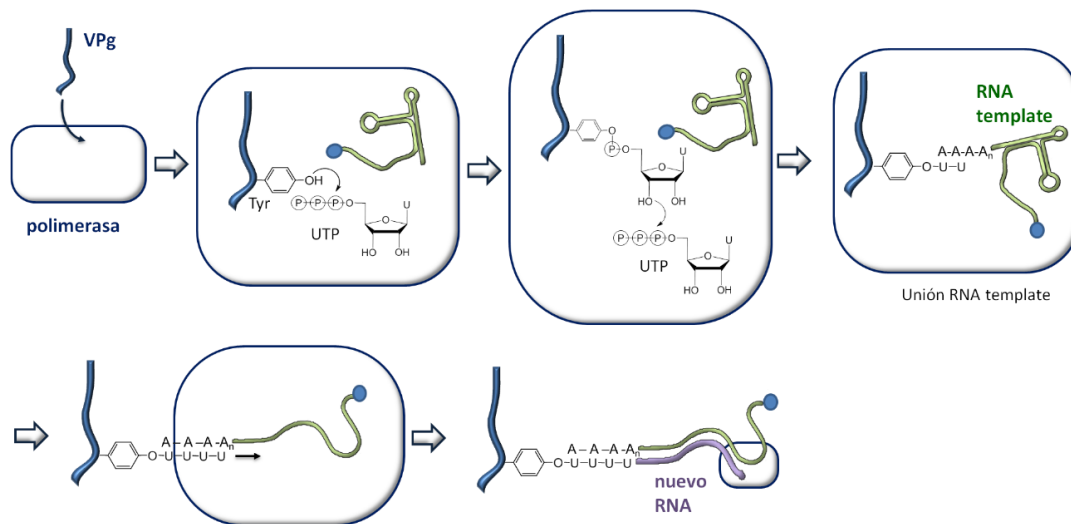


Figura 3.3. Replicación del ARN viral en el FMDV.

A diferencia del resto de picornavirus, en los que la secuencia *cre* se encuentra dentro de la región de codificación viral, en el virus de la fiebre aftosa el molde *cre* está ubicado en el extremo 5' de la región no traducida del ARN (5'-UTR)¹¹ y una vez la VPg es diuridilada (VPg-pUpU) es necesaria la disociación y transferencia del molde de ARN a la posición 3' para que la polimerasa pueda iniciar la replicación viral.¹² A pesar de que

la polimerasa 3D^{pol} cataliza tanto el proceso de uridilación como el de replicación, el análogo de nucleósido 5-fluorouridina trifosfato (FUTP) es un potente inhibidor de la uridilación de la VPg pero no de la elongación del ARN.¹³

El virus de la fiebre aftosa es el único picornavirus que codifica tres moléculas diferentes de VPg (VPg1, VPg2 y VPg3)¹⁴ cuya longitud varía entre 23-24 aminoácidos (Figura 3.4). Todas ellas pueden actuar como iniciadores de la síntesis del ARN viral aunque la eliminación de cualquier copia individual de VPg da lugar a un efecto perjudicial en la replicación del ARN.¹⁵

	1	23
VPg₁	H-G-P-Y-A-G-P-L-E-R-Q-R-P-L-K-V-R-A-K-L-P-R-Q-E-OH	
	1	24
VPg₂	H-G-P-Y-A-G-P-M-E-R-Q-K-P-L-K-V-K-A-R-A-P-V-V-K-E-OH	
	1	24
VPg₃	H-G-P-Y-E-G-P-V-K-K-P-V-A-L-K-V-K-A-K-N-L-I-V-T-E-OH	

Figura 3.4. VPgs del virus de la fiebre aftosa (VPg1, VPg2 y VPg3).

1.3. ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) como diana terapéutica

La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del virus de la fiebre aftosa es una diana atractiva para el desarrollo de inhibidores debido a su papel central dentro del ciclo replicativo del virus y a la alta conservación de su secuencia entre los distintos serotipos.

Esta enzima ha sido extensamente estudiada y se ha determinado la estructura cristalina tanto en su forma aislada, como formando complejos con el ARN molde/cebador¹⁶ y diversos nucleótidos y análogos de nucleótidos¹⁷, como la del complejo de iniciación con la proteína cebadora VPg¹⁸. La RdRp del virus de la fiebre aftosa adopta una arquitectura clásica de mano derecha, con subdominios de dedos, palma y pulgar, proporcionando la disposición geométrica adecuada del sustrato y los iones metálicos en el sitio activo de la polimerasa para la catálisis.¹⁸ Las RdRps presentan una conformación denominada de “mano derecha cerrada” mediante la interacción de los subdominios de dedos y pulgar, a diferencia de las polimerasas que adoptan una disposición abierta o de U. Esta conformación da lugar a un centro activo completamente rodeado y limita en gran medida la movilidad entre los dominios.

Se han identificado tres canales bien definidos en la estructura de la RdRp que permiten el acceso al centro activo de los nucleótidos entrantes, del template de ARN, así como la salida de la nueva hebra de ARN formada¹⁸ (Figura 3.5).

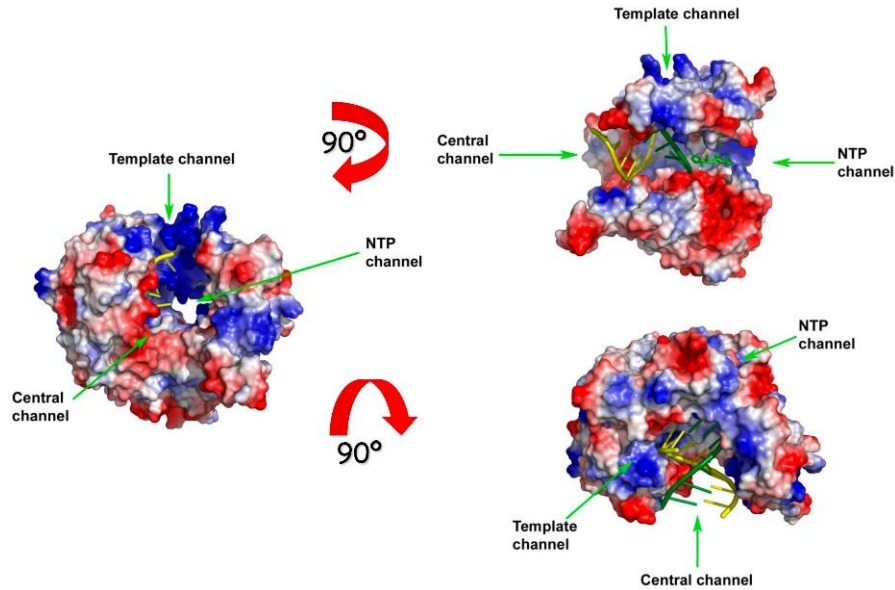


Figura 3.5. Estructura de la RdRp del FMDV. Figura adaptada de la referencia 19 (Viral genome replication, chapter 18).

A pesar del papel clave de la enzima en el ciclo replicativo del virus, en la actualidad existen pocas moléculas descritas que han mostrado ser inhibidores de esta enzima. En la Figura 3.6 se recogen algunos ejemplos:

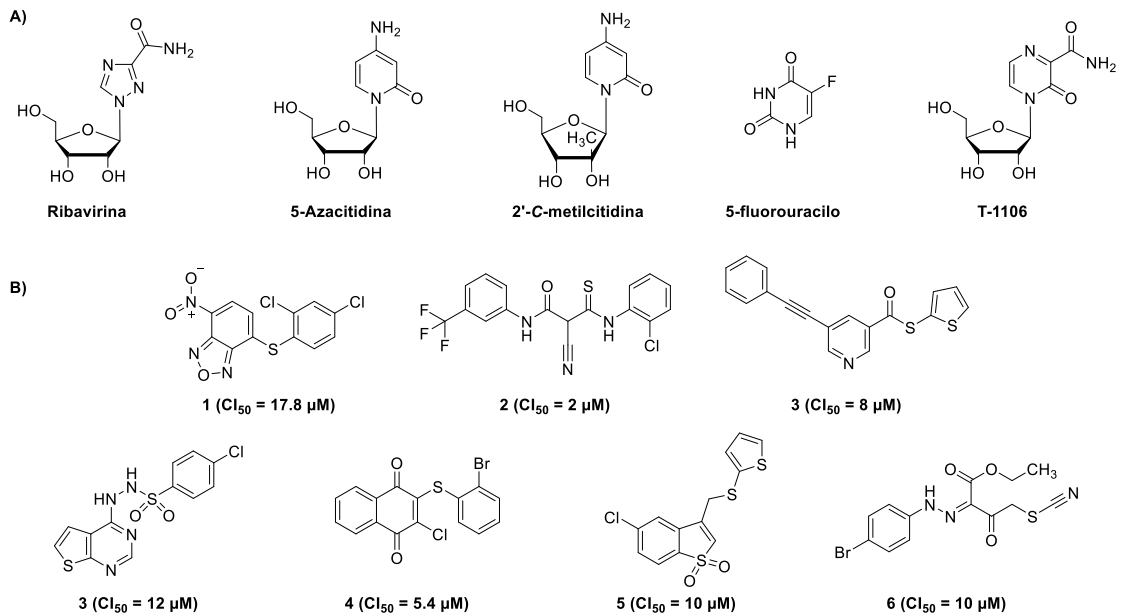


Figura 3.6. Inhibidores nucleosídicos (A) y no nucleosídicos (B) de la RdRp del FMDV.

Los inhibidores nucleosídicos (Figura 3.6 A) necesitan ser metabolizados a los correspondientes nucleótido trifosfatos para ejercer su acción antiviral. Sin embargo, cada uno de ellos presenta un mecanismo de acción diferente. La ribavirina y la 5-azacitidina son conocidos agentes mutagénicos que se incorporaran a la cadena de

ARN viral en crecimiento.²⁰ La 2'-C-metilcitidina trifosfato interfiere con la replicación del virus de la fiebre aftosa en un paso que coincide con el inicio de la síntesis de ARN viral intracelular.²¹ Mientras que el 5-fluorouracilo (5-FU) actúa tanto como agente mutagénico mediante su incorporación al ARN naciente como inhibiendo la síntesis del ARN viral.^{15,22} En el caso del T-1106, un compuesto análogo al Favipiravir, aún no se conoce su mecanismo de acción, si bien se ha determinado que su trifosfato²³ es el metabolito activo. Finalmente, los inhibidores no nucleosídicos (Figura 3.6 B) se unen a un bolsillo próximo pero distinto al centro activo que se cree podría impedir la entrada del sustrato (nucleótido) y la salida del producto (pirofosfato).²⁴

2. ANTECEDENTES

Fluorouridina, un inhibidor del virus de la fiebre aftosa

Como se ha mencionado anteriormente, el 5-FU actúa como agente mutagénico frente a varios virus ARN, incluyendo el virus de la fiebre aftosa.²⁵ Cuando las células infectadas por el virus son tratadas con 5-FU, éste es metabolizado a la correspondiente 5-fluorouridina trifosfato (FUTP) y como tal se incorpora al ARN(-) viral enfrentado a una adenina del ARN(+) molde. En el siguiente paso de replicación la hebra de ARN(-) con el 5-FUMP unido actúa como molde y permite la incorporación tanto de AMP como de GMP a la nueva hebra de ARN(+) en crecimiento. Con el fin de estudiar el mecanismo de este proceso, el Dr. Esteban Domingo utilizó la RdRp purificada para examinar tanto el proceso de uridilación de la VPg como la síntesis del polinucleótido en presencia de FUTP. Los resultados obtenidos mostraron una inhibición potente del proceso de replicación cuando FUTP estaba presente.^{15,22}

Con el fin de determinar si la inhibición observada conlleva la fluorouridilación de la VPg, el Dr. Domingo llevó a cabo el análisis de los productos resultantes de la digestión del proceso de uridilación de la VPg en presencia tanto de uridina como de 5'-fluorouridina, mediante técnicas de espectrometría de masas.²⁵ Estos estudios mostraron la presencia de tirosina covalentemente unida al FUMP, lo que sugiere que la fluorouridilación de la VPg impide la incorporación posterior del segundo residuo de UMP, necesario para iniciar la replicación del ARN viral. Sin embargo, las bases moleculares de este proceso de inhibición aún no se conocen.

3. OBJETIVOS

Con el fin de intentar esclarecer el mecanismo de inhibición de la 5-FU sobre el proceso de uridilación de la VPg y, por tanto, sobre la replicación del ARN del virus de la fiebre aftosa, en este capítulo se propone el diseño y síntesis de un modelo de VPg fluorouridilado (VPgpFU) de fórmula general I (Figura 3.7) así como el estudio de su estructura en complejo con la polimerasa viral mediante técnicas de rayos X.

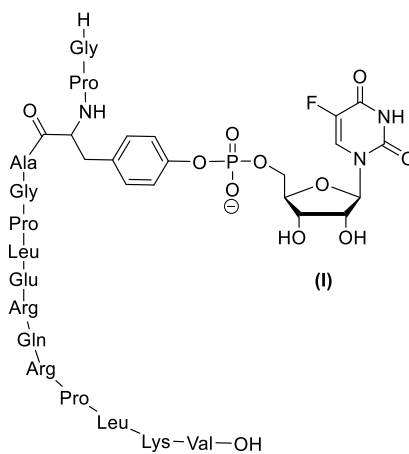


Figura 3.7. Estructura general del nucleopéptido objetivo VPgpFU (I).

Dado que las tres VPgs que codifica el virus de la fiebre aftosa son capaces de actuar como cebadores (primers) del ARN viral y no muestran diferencias significativas entre ellas, para lograr este objetivo se ha elegido la VPg1.

A continuación se recogen de manera detallada los resultados obtenidos en la síntesis y cristalización de estos compuestos en complejo con la polimerasa viral.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis del nucleopéptido VPgpFU

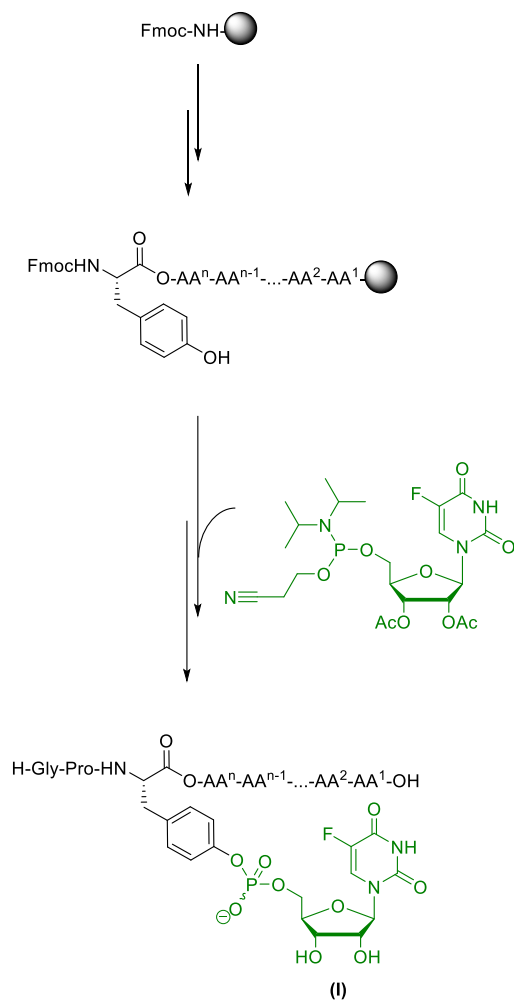
En términos generales, se denominan **nucleopéptidos**,²⁶ a aquellos conjugados naturales en los que se establece una unión de tipo fosfodiéster entre uno de los extremos (5' o 3') de un oligonucleótido y el grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o tirosina de un polipéptido.

Sin duda, la preparación de híbridos péptido-oligonucleótido es un reto sintético, ya que implica reunir en una misma estructura dos moléculas muy ricas en grupos funcionales de características muy variadas. Aunque se dispone de protocolos excelentes para la síntesis de péptidos y ácidos nucleicos, la síntesis de nucleopéptidos requiere de unas condiciones especiales donde se mantenga intacta la integridad del péptido, del ácido nucleico y del enlace fosfodiéster que los conecta.²⁷ En la síntesis de nucleopéptidos con un enlace fosfodiéster entre la tirosina y el oligonucleótido no pueden emplearse bases nucleófilas (como los aniones fluoruro o hidróxido), que atacarían al átomo de fósforo dando lugar a la eliminación de fenóxido.^{28,29}

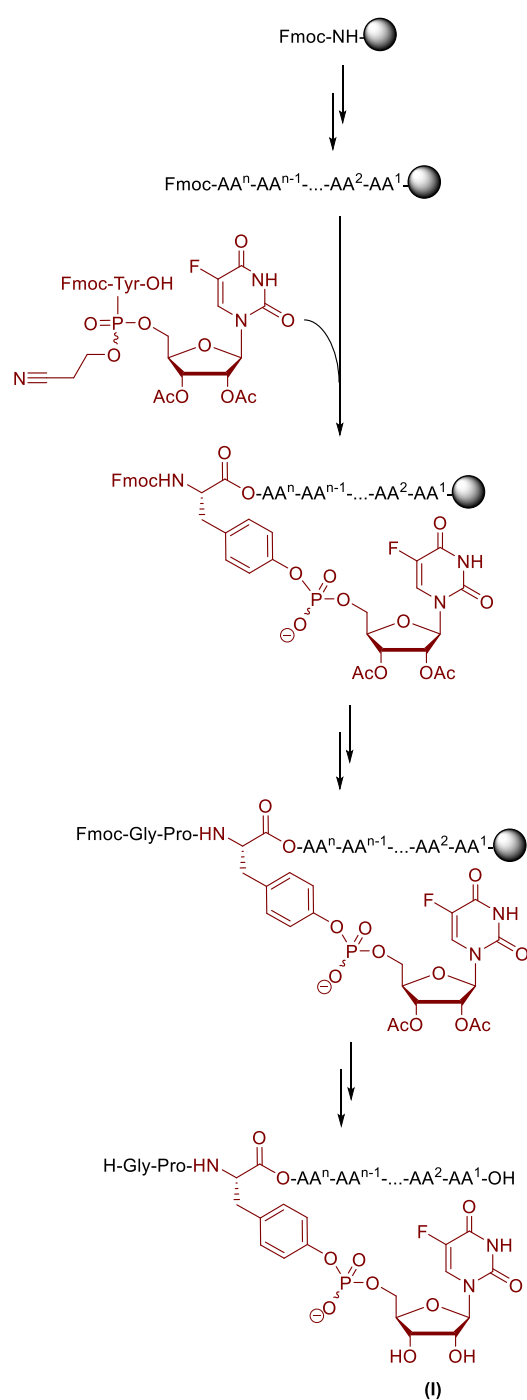
La síntesis del nucleopéptido objetivo (**I**) se podría realizar mediante dos estrategias (Esquema 3.1):

- (1) La primera consistiría en la síntesis completa del péptido y el posterior acoplamiento de FUMP sobre el OH de la tirosina de la posición 3.
- (2) La segunda consistiría en la síntesis previa del monómero de tirosina fluorouridilado, seguido de la síntesis de la secuencia peptídica en la que se incorpora este monómero en la posición adecuada. A pesar de que a priori la primera estrategia parece más sencilla desde el punto de vista sintético, se ha descrito en la literatura³⁰ que no es posible el acoplamiento de péptidos a un fosforamidito (en nuestro caso el intermedio de FUMP).

Estrategia sintética 1



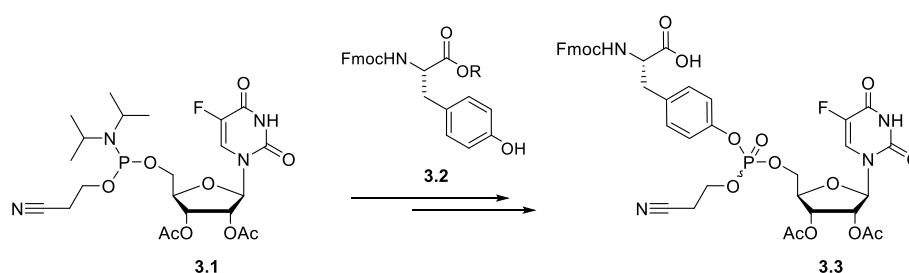
Estrategia sintética 2



Esquema 3.1. Estrategias sintéticas para la preparación del nucleopéptido objetivo (I).

4.1.1. Síntesis del monómero de tirosina fluorouridilada (3.3)

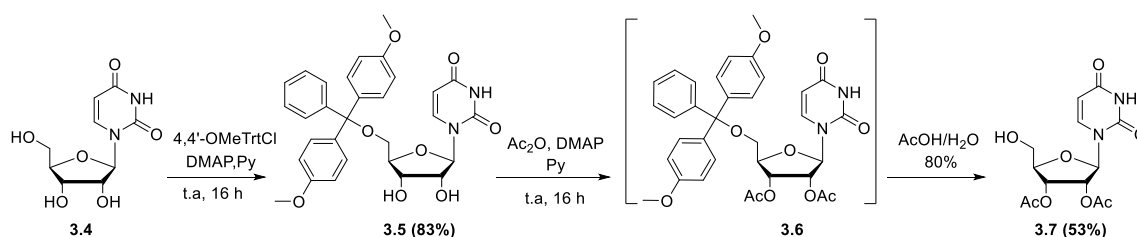
El primer paso para alcanzar la molécula objetivo (**I**) fue la preparación del monómero de tirosina fluorouridilada **3.3**. La obtención de este monómero puede lograrse mediante el procedimiento sintético descrito en el Esquema 3.2, que consiste en el acoplamiento de los intermedios convenientemente protegidos **3.1** y **3.2** y la posterior liberación del grupo ácido, que permitiría la incorporación del monómero a la secuencia peptídica mediante síntesis en fase sólida.



Esquema 3.2. Esquema general de síntesis del monómero de tirosina fluorouridilado (**3.3**).

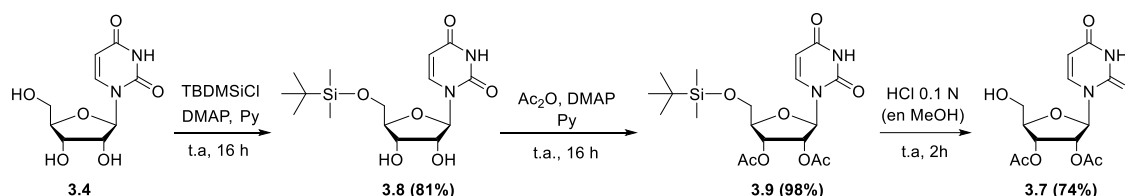
Dada la dificultad sintética de los nucleopéptidos y el elevado coste del producto de partida (5-fluorouridina), decidimos utilizar uridina como modelo para el estudio de las condiciones de reacción necesarias para obtener el compuesto objetivo, para posteriormente aplicar dichas condiciones a la síntesis del monómero fluorouridilado buscado (**3.3**).

Así, siguiendo la metodología de síntesis de oligonucleótidos,²⁶ el primer paso de la reacción consistió en la protección selectiva del grupo hidroxilo en posición 5' de la uridina comercial (**3.4**) en forma de 4,4'-dimetoxitritilo, mediante tratamiento con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTCl)³¹ y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) en piridina para dar el compuesto **3.5** con buen rendimiento (83%) (Esquema 3.3). La posterior acetilación de los grupos hidroxilo de las posiciones 2' y 3' de **3.5** empleando anhídrido acético/DMAP³¹ en piridina condujo al intermedio **3.6** que tras hidrólisis ácida (AcOH/H₂O 80%) dio lugar a **3.7** con un rendimiento moderado (53%, desde **3.5**).



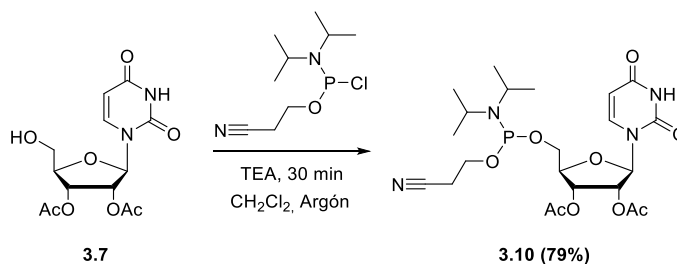
Esquema 3.3. Síntesis del compuesto **3.7**.

Sin embargo, los rendimientos obtenidos mediante esta vía no eran fácilmente reproducibles, en especial en el último paso de reacción en la que se obtenían además productos resultantes de la desprotección parcial de los hidroxilos (2' y 3'). A la vista de estos resultados decidimos intentar una ruta alternativa para la síntesis de **3.7** (Esquema 3.4) donde se optó por el empleo de *tert*-butildimetilsililo como grupo protector del hidroxilo en 5' de la uridina (**3.4**) mediante tratamiento con cloruro de *tert*-butildimetilsilano (TBDMSCl) y DMAP en piridina para dar el compuesto **3.8**³² con un 81% de rendimiento. Del mismo modo que en la ruta anterior la acetilación de los grupos hidroxilo (2' y 3') de la uridina protegida en 5' se realiza en presencia de anhídrido acético/DMAP en piridina dando lugar a **3.9** con un excelente rendimiento (98%). La posterior hidrólisis ácida de **3.9** en presencia de HCl 0.1N en MeOH, a temperatura ambiente durante 2 horas, dio lugar al compuesto **3.7** con buen rendimiento (74%).



Esquema 3.4. Ruta alternativa de síntesis del compuesto **3.7**.

A continuación, el tratamiento de **3.7** con 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito en presencia de trietilamina (TEA)³³ (Esquema 3.5) en CH₂Cl₂ seco y atmósfera inerte, a temperatura ambiente durante media hora condujo al 5'-fosforamidito **3.10** con buen rendimiento (79%).



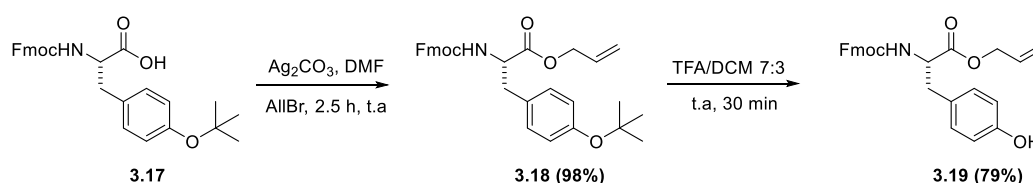
Esquema 3.5. Síntesis del fosforamidito **3.10**.

Por otro lado, la tritilación con cloruro de 2-clorotritilo de la sal de cesio de Fmoc-Tyr-OH (**3.11**) dio lugar a la tirosina protegida Fmoc-Tyr-2CITrt (**3.12**)³⁴ (Esquema 3.6) que se hizo reaccionar en el siguiente paso de reacción sin purificación previa. Hay que destacar que tanto el producto de partida (**3.11**) como el producto final (**3.12**) de este paso de reacción son sensibles tanto a la humedad como a la temperatura

y **3.14** es muy similar, no fue posible seguir el transcurso de la reacción de oxidación mediante cromatografía en capa fina ni mediante técnicas de HPLC, siendo sólo posible comprobar que la reacción de oxidación se ha completado mediante la comparación de la señal de ^{31}P -RMN. Debido a ello, decidimos utilizar I_2 como agente oxidante que permite determinar la finalización de la reacción mediante métodos colorimétricos. El cambio de agente oxidante nos permitió llegar al compuesto buscado **3.15**, aunque con bajo rendimiento (10% desde **3.10**).

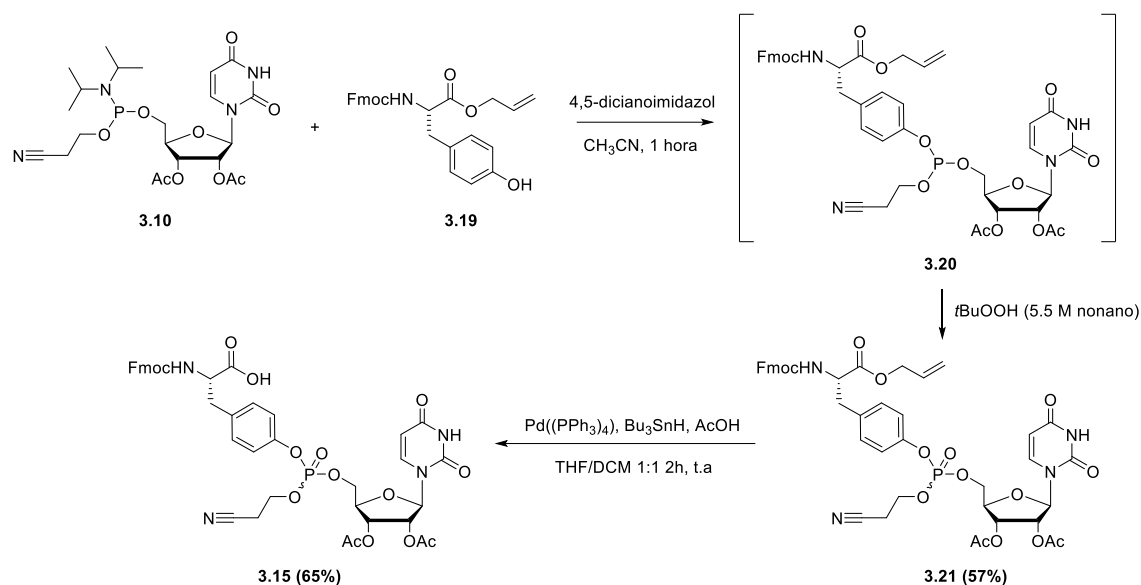
En el transcurso de la preparación de este compuesto, el Dr. Filippov³⁵ describió una nueva ruta de síntesis de **3.15** que utilizaba el grupo alilo (All) para la protección de la tirosina en lugar del grupo 2-clorotritilo, y 4,5-dicianoimidazol como agente de acoplamiento en lugar de *p*-nitrofeniltetrazol. Dada la baja reproducibilidad y los bajos rendimientos obtenidos en el procedimiento empleado por nosotros decidimos explorar esta vía para la obtención del monómero buscado.

Así, la protección de Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (**3.17**) empleando bromuro de alilo en presencia de Ag_2CO_3 , a temperatura ambiente durante 2.5 horas (Esquema 3.8) dio lugar a Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OAll (**3.18**) con buenos rendimientos (98%). En este caso se utilizó Ag_2CO_3 como base dado que se ha descrito que el empleo de Cs_2CO_3 da lugar a la desprotección del grupo Fmoc.³⁵ La posterior desprotección de la cadena lateral del derivado de tirosina **3.18** empleando TFA/ CH_2Cl_2 7:3 permitió obtener el derivado **3.19** con un 79% de rendimiento.



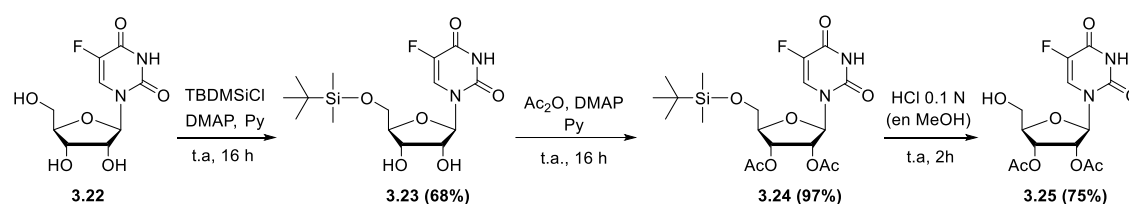
Esquema 3.8. Síntesis de la tirosina protegida **3.19**.

El posterior acoplamiento de **3.19** con el fosoramidito **3.10** (Esquema 3.9) en presencia de 4,5-dicianoimidazol dio lugar al fosfito **3.20** que, tras oxidación con *t*BuOOH 5.5M en nonano permitió obtener el fosfato protegido **3.21** con un 57% de rendimiento. Finalmente, la liberación del grupo ácido en presencia de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ como catalizador y Bu_3SnH como fuente donadora de hidrógeno condujo al monómero buscado Fmoc-Tyr(*p*U)-OH (**3.15**) con buenos rendimientos (65%).



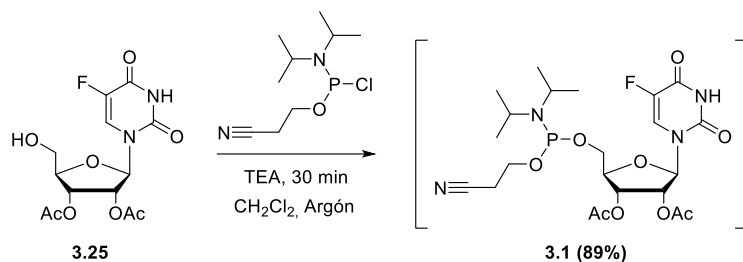
Esquema 3.9. Síntesis de la tirosina uridilada Fmoc-Tyr(pU)-OH (**3.15**)

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la obtención del monómero de uridina **3.15**, procedimos a la preparación del derivado fluorouridilado objetivo (**3.3**). De este modo, partiendo de la 5-fluorouridina comercial (**3.22**) se procedió a la protección selectiva del hidroxilo en 5' con TBDMSICI/DMAP³⁶ en piridina a temperatura ambiente durante 16 horas para obtener el compuesto **3.23** (68% de rendimiento) que posteriormente se acetiló en presencia de Ac₂O/DMAP³⁷ en piridina para obtener **3.24** con excelentes rendimientos (97%). La hidrólisis ácida de este último condujo al intermedio **3.25** con un 75% de rendimiento (Esquema 3.10).



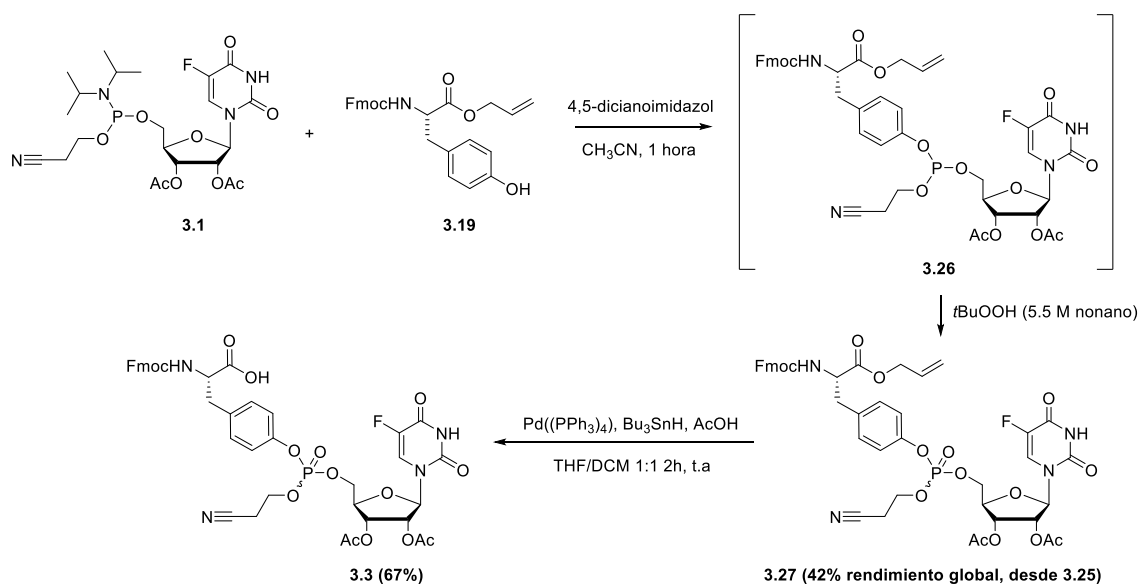
Esquema 3.10. Síntesis del compuesto **3.25**.

A continuación, el tratamiento de **3.25** con 2-ciano-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito en presencia de TEA³³ (Esquema 3.11) a temperatura ambiente durante media hora dio lugar al 5'-fosforamidito **3.1** que se utilizó inmediatamente en el siguiente paso de reacción sin purificar debido a la menor estabilidad de este derivado con respecto a su análogo de uridina.



Esquema 3.11. Síntesis del fosforamidito 3.1.

Seguindo el mismo procedimiento empleado para la síntesis de **3.15**, se realiza el acoplamiento de **3.19** con el fosforamidito **3.1** en presencia de 4,5-dicianoimidazol para dar lugar a **3.26** (Esquema 3.12) que se oxida *in situ* con *t*BuOOH 5.5M en nonano para dar lugar al fosfato **3.27** con buen rendimiento (42% de rendimiento global, desde **3.25**). Por último, la eliminación del grupo protector alilo catalizada por paladio dio lugar a la tirosina fluorouridilada **3.3** con rendimientos buenos (67%).



Esquema 3.12. Síntesis de la tirosina fluorouridilada Fmoc-Tyr(pFU)-OH 3.3.

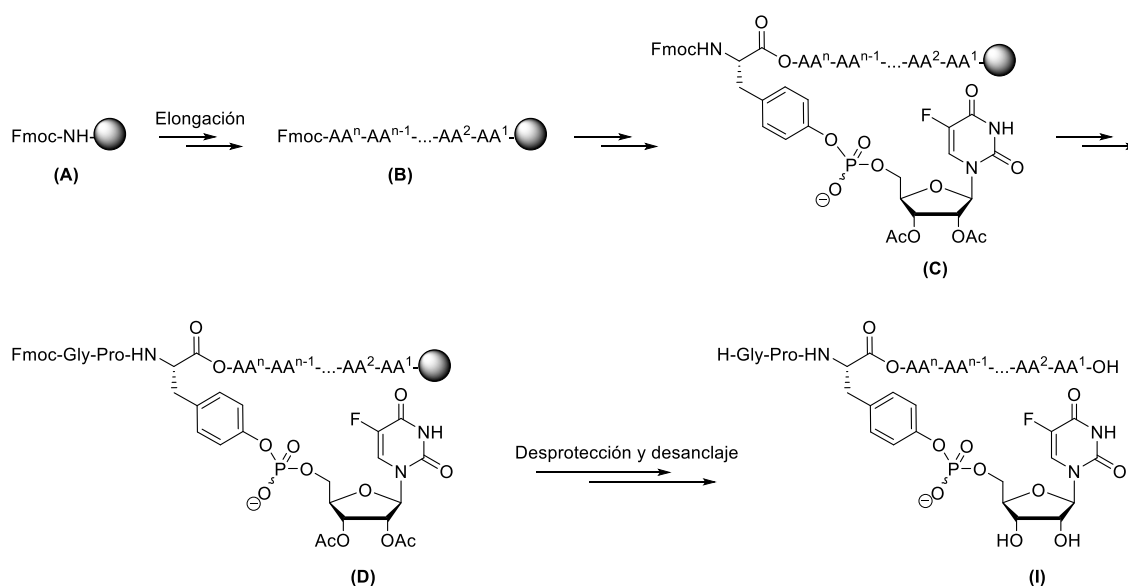
4.1.2. Síntesis en fase sólida del nucleopéptido modelo (I)

La preparación del nucleopéptido objetivo (**I**) se llevó a cabo mediante la metodología estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, Solid Phase Peptide Synthesis, en inglés) siguiendo una estrategia de protección ortogonal Fmoc/*t*Bu. La resina utilizada como soporte de la reacción fue una resina de tipo Wang (poliestireno, 1% DVB), de baja carga (0.4 mmol/g) para minimizar posibles reacciones intermoleculares no deseadas y problemas de agregación de péptidos.

El método de síntesis en fase sólida consiste en la unión del aminoácido del extremo C-terminal a un soporte polimérico insoluble (resina) y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica hacia el extremo N-terminal. Se escogió la estrategia de protección ortogonal Fmoc/*t*Bu, en la que se emplea el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) como grupo protector temporal del α aminoácido. Las cadenas laterales de los aminoácidos fueron protegidas como tritilcarbamoil derivados (Gln), como éster *terc*-butílico (Glu), como carbamato *terc*-butílico (Lys) o como Pbf (Arg). El grupo Fmoc se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido en medio básico (20% piperidina/DMF o DBU/piperidina/DMF 1:1:48, v/v). Una vez que el grupo amino en α se encuentra libre, se une el aminoácido siguiente, previa activación de su grupo carboxilo. Este proceso se repite hasta completar la secuencia peptídica deseada. En el acoplamiento se utilizó DIEA como base y HCTU³⁸⁻⁴⁰ como agente de acoplamiento. Este agente de acoplamiento es tan efectivo como otros, tales como HATU o HBTU, y permite obtener péptidos de mayor pureza. Además, su bajo coste ha hecho que se considere como una buena alternativa para la síntesis de péptidos en fase sólida.⁴¹

El seguimiento de las reacciones de acoplamiento fue monitorizado con un ensayo colorimétrico cualitativo (Kaiser o cloranilo, según la naturaleza de la amina) o mediante el tratamiento acidolítico estándar de una pequeña porción de la peptidil resina y posterior análisis del crudo de desanclaje mediante HPLC acoplado a MS.

De este modo, la síntesis del nucleopéptido modelo VPgpFU de estructura general (**I**) se abordó de forma manual en fase sólida siguiendo el procedimiento sintético recogido en el Esquema 3.13. El primer paso fue la elongación de la peptidil-resina partiendo de la resina comercial que contiene el primer aminoácido anclado (**A**) para dar el péptido (**B**). A continuación, se procede al acoplamiento de la tirosina modifica (**C**) y de los dos últimos aminoácidos para dar el nucleopéptido protegido (**D**). Finalmente, se procede a la eliminación de los grupos protectores presentes tanto en los aminoácidos como en el nucleótido que tras el desanclaje del soporte polimérico permite obtener los nucleopéptidos objetivos (**I**).



Esquema 3.13. Síntesis general del nucleopéptido objetivo (I).

Como se ha mencionado anteriormente, el genoma del FMDV codifica tres VPgs diferentes que pueden actuar indistintamente como iniciadores de la síntesis del ARN aunque la eliminación de cualquiera de ellas da lugar a un efecto perjudicial en la replicación viral. Con el fin de intentar determinar el mecanismo de inhibición de la 5-fluorouridina elegimos la VPg1 como modelo para preparar el derivado fluorouridilado y estudiar su estructura en complejo con la polimerasa viral mediante estudios cristalográficos.

La VPg1 consta de 23 aminoácidos. Estudios de cristalografía y de mutagénesis dirigida llevados a cabo previamente por el grupo del Dr. Esteban Domingo y la Dra. Nuria Verdaguer¹⁵ permitieron determinar la estructura de los 15 primeros residuos de la VPg, por lo que decidimos iniciar nuestro estudio mediante la preparación del modelo que sólo tiene en cuenta estos 15 aminoácidos. Por otro lado, el efecto de la uridilación de la VPg mediante técnicas de difracción de R-X ya había sido observado previamente.¹⁵ Sin embargo, no existen cristales de VPg-pU de modelos de 15 aminoácidos por lo que decidimos preparar tanto el derivado objetivo VPg-pFU como su análogo VPg-pU (Figura 3.8).

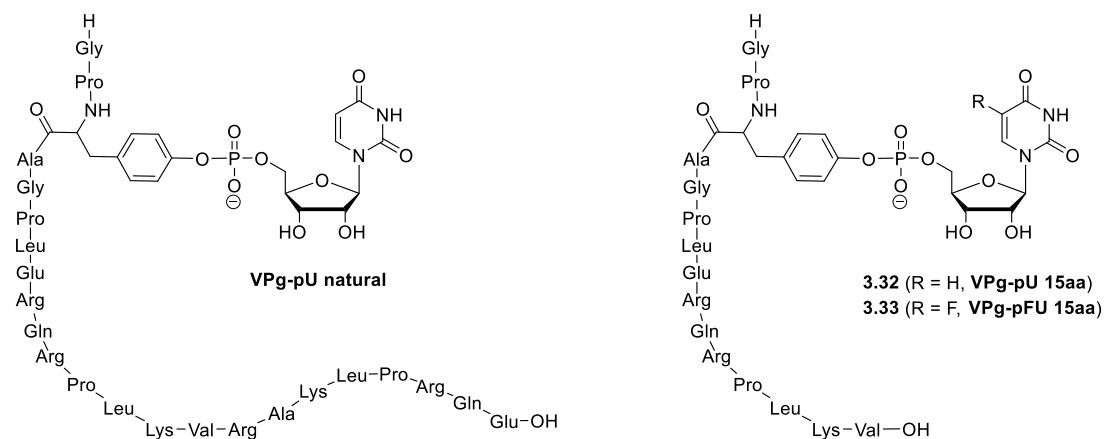
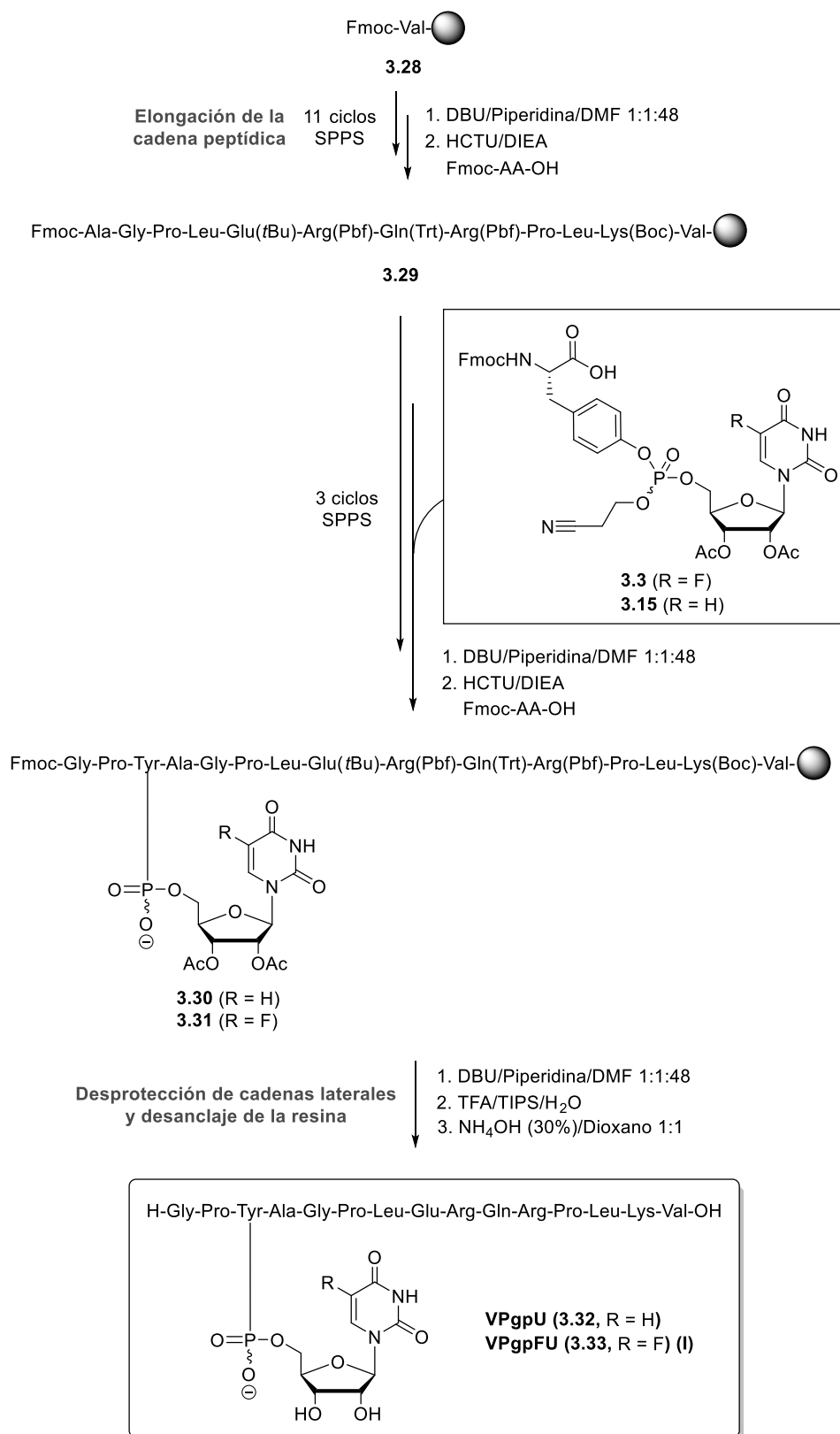


Figura 3.8. Estructura de la VPg-pU natural y de los modelos de 15 aminoácidos.

La síntesis de los nucleopéptidos VPg-pU y VPg-pFU de 15aa (**3.32** y **3.33**) se realizó mediante SPPS empleando una resina tipo Wang que tiene el primer aminoácido (Fmoc-Val-OH) anclado (**3.28**) (Esquema 3.14). A continuación, se fueron introduciendo uno a uno y de manera secuencial los aminoácidos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Ala-OH, según correspondiera en cada caso, para obtener el péptido lineal protegido en su forma Fmoc **3.29**. Posteriormente, se llevó a cabo el acoplamiento de los péptidos con cada una de las tirosinas modificadas (**3.3** y **3.15**). Finalmente el acoplamiento de Fmoc-Pro-OH y Fmoc-Gly-OH, en cada uno de los péptidos en crecimiento dio lugar a **3.30** y **3.31**, respectivamente. El acoplamiento de los 11 primeros aminoácidos se llevó a cabo en el microondas⁴² empleando 1.2 equivalentes de HCTU, 1.2 equivalentes de aminoácido y 2.4 equivalentes de DIEA en DMF, realizando 3 ciclos de 10 minutos a 40 °C para cada uno de los acoplamientos. La introducción de la tirosina uridilada (**3.15**) o fluorouridilada (**3.3**) y de los dos últimos aminoácidos se efectuó de forma manual a temperatura ambiente empleando 2 equivalentes de HCTU, 2 equivalentes de aminoácido y 4 equivalentes de DIEA en DMF, realizando 2 ciclos de 1 hora para evitar la ruptura del enlace O-P y la pérdida del nucleótido. Una vez completada la elongación y tras eliminar el grupo Fmoc, en presencia de un 1% de DBU y piperidina en DMF, se llevó a cabo el desanclaje de los nucleopéptidos de la resina mediante tratamiento acidolítico (TFA/TIPS/H₂O, en proporciones 95:2.5:2.5) y la precipitación de los mismos sobre Et₂O frío. Finalmente, los residuos obtenidos anteriormente, se someten a tratamiento básico con NH₄OH (30%)/Dioxano 1:1, con el fin de eliminar los grupos acetilo, dando lugar a los nucleopéptidos desprotegidos **3.32** y **3.33**. Los crudos finales liofilizados, se purificaron mediante HPFC en el Biotage o HPLC semipreparativo en fase reversa lo que permitió aislar los nucleopéptidos **3.32** y

3.33 con un 18% y un 10% de rendimiento global y una pureza del 97% y del 94% determinada por HPLC (Esquema 3.14).



Esquema 3.14. Esquema general de síntesis de los modelos VPgpU (**3.32**) y de VPgpFU (**3.33**).

4.1.3. Estudio de los complejos polimerasa viral-VPgpU y -VPgpFU mediante técnicas de R-X

Una vez sintetizados ambos modelos simplificados de VPgpU (3.32) y VPgpFU (3.33) de 15aa procedimos al estudio de los compuestos en complejo con la polimerasa viral mediante el empleo de técnicas de difracción de rayos X. Los complejos polimerasa-VPgpU y polimerasa-VPgpFU fueron obtenidos por el equipo de la Dra. Nuria Verdaguer del Instituto de Biología Molecular del CSIC en Barcelona (IBMB-CSIC).

En la Figura 3.9 se recogen las estructuras de R-X obtenidas del complejo polimerasa-VPgpFU. En la Figura 3.9A se ilustra la comparación de las conformaciones de la polimerasa del FMDV (azul) con el complejo polimerasa-VPgpFU 3.33 (verde). En la Figura 3.9B se recoge la superposición de la polimerasa del FMDV (azul), del complejo polimerasa-VPgpFU (verde) y el RNA template (amarillo).

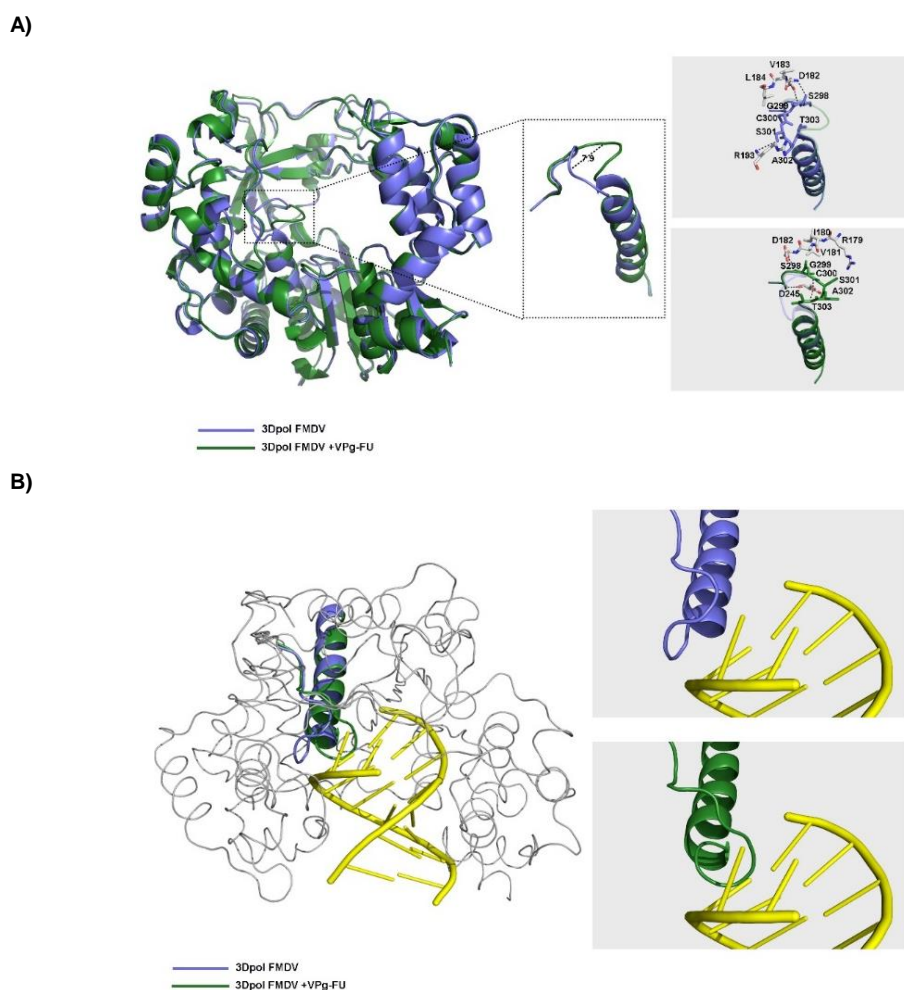


Figura 3.9. Estructuras de rayos X del complejo polimerasa-VPgpFU 15aa (3.33): **A)** Comparación de las conformaciones de la polimerasa del FMDV con el complejo polimerasa-VPgpFU 15aa; **B)** Complejo polimerasa FMDV-RNA template.

Tal y como se percibe en la ampliación, en presencia de nuestro modelo (**3.33**) se observa un cambio conformacional en la polimerasa viral, concretamente, en el bucle $\beta 9\text{-}\alpha 11$, próximo al motivo B de la polimerasa, que se desplaza alrededor de 8 Å de la posición activa. Este desplazamiento impide el correcto posicionamiento de la base aceptora del molde de ARN impidiendo así la incorporación del nuevo nucleótido al ARN en crecimiento.

A pesar del cambio observado en la estructura de la polimerasa viral en complejo con nuestro compuesto modelo **3.33**, no fue posible trazar la posición e interacciones de **3.33** en la polimerasa. En los cristales se detectó una densidad electrónica en el interior de la misma correspondiente a nuestro compuesto modelo, pero no fue posible determinar de manera inequívoca la posición del mismo en el complejo ya que el péptido se encontraba desordenado.

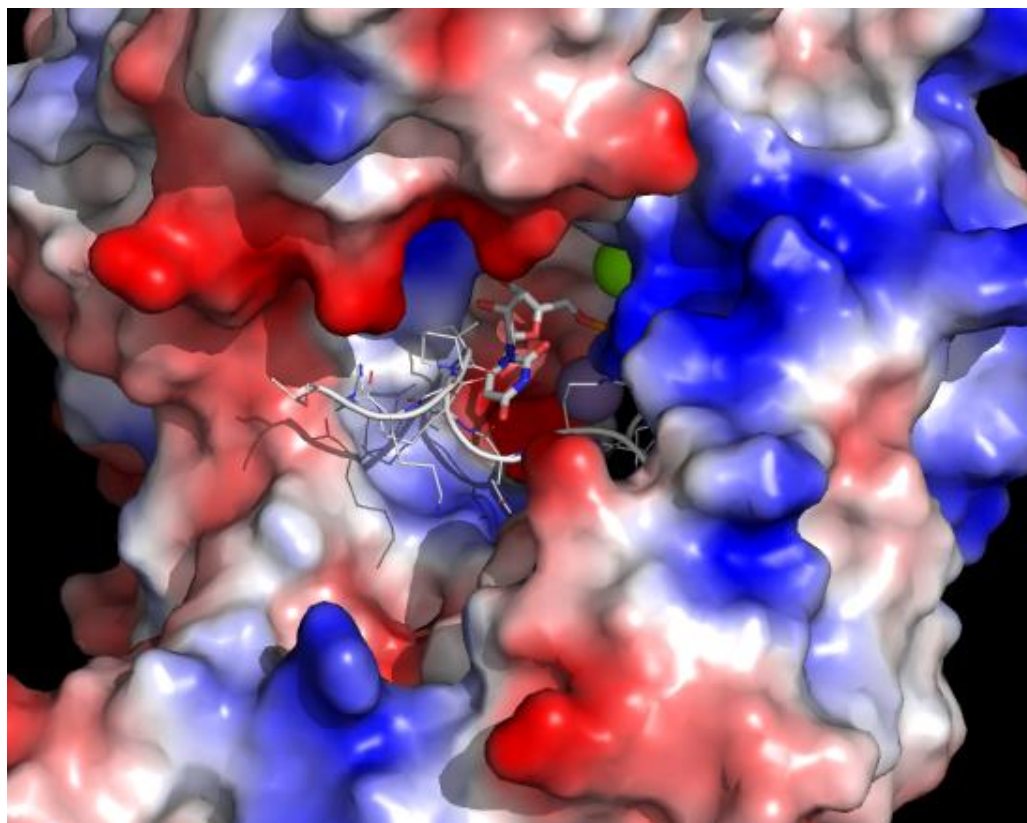


Figura 3.10. Modelo molecular del complejo polimerasa FMDV/VPgpFU(**3.33**).

Por ello, en colaboración con el Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá, mediante técnicas de modelado molecular se intentó modelar **3.33** en el interior de la polimerasa, empleando las coordenadas de R-X. Según se observa en el modelo del complejo formado por la polimerasa con nuestro compuesto VPgpFU (**3.33**) (Figura 3.10) el compuesto en su extremo C-terminal se encuentra bastante

desordenado dentro de la polimerasa. Cabe mencionar que según se observa en otros picornavirus, como el poliovirus, el extremo C-terminal parece importante para el correcto posicionamiento de la VPg en la polimerasa.⁴³ Estos resultados nos llevaron a plantearnos que quizás se requiere la presencia de la secuencia completa de la VPg para fijar dicho extremo C-terminal a lo largo de un canal cargado negativamente situado en la parte exterior próxima al sitio catalítico de la polimerasa. (Figura 3.11). Actualmente, se está llevando a cabo la síntesis del derivado VPgpFU de 23aa.

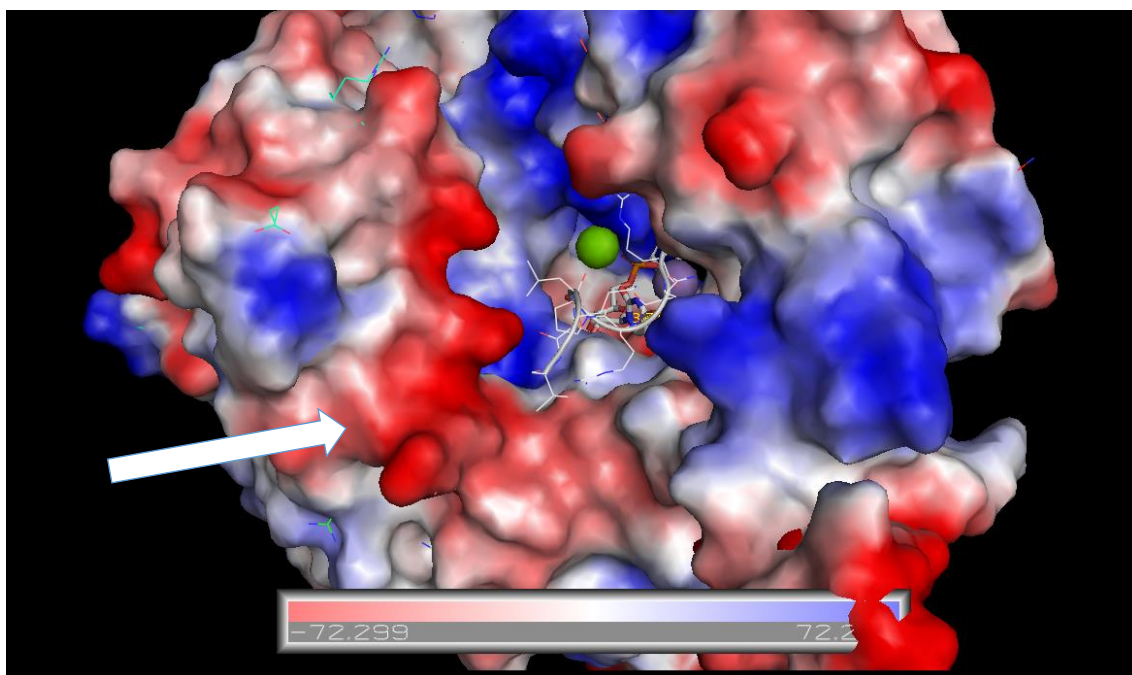


Figura 3.11. Modelo del complejo polimerasa FMDV/VPgpFU (3.33) en el que se observa el canal cargado negativamente.

Finalmente, en ninguno de los cristales analizados se observó densidad que permitiera modelar la VPgpU. En este caso la polimerasa presentaba el bucle $\beta 9$ - $\alpha 11$ en conformación abierta tal como se ve en la proteína aislada (Figura 3.9A, modelo azul).

5. CONCLUSIONES

Con el fin de comprender el mecanismo mediante el cual la 5-Fluorouridina influye en la uridilación de la VPg y, por tanto, en la replicación del ARN del virus de la fiebre aftosa, en este tercer capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de modelos simplificados de VPg tanto uridilados (VPgpU, **3.32**) como fluorouridilados (VPgpFU, **3.33**) así como el posterior estudio de sus estructuras en complejo con la polimerasa viral mediante técnicas cristalográficas de difracción de R-X.

1. Para la preparación de los nucleopéptidos objetivo (**3.32** y **3.33**) ha sido necesaria la síntesis de los monómeros de tirosina uridilada (**3.15**) y fluorouridilada (**3.3**). La síntesis de dichos monómeros se llevó a cabo en 7 pasos, y requirió la puesta a punto de cada una de las etapas de reacción, obteniéndose los monómeros buscados con un rendimiento global del 38 y 50%, respectivamente.
2. Los modelos de VPgpU (**3.32**) y VPgpFU (**3.33**) simplificados (portadores de 15aa) se prepararon mediante síntesis en fase sólida siguiendo una estrategia Fmoc/*t*Bu empleando una resina Wang de baja carga para minimizar las posibles reacciones intermoleculares no deseadas, así como problemas de agregación de péptidos.
3. En los estudios cristalográficos del complejo polimerasa-VPgpFU (**3.33**) mediante técnicas de difracción de rayos X se observa un cambio conformacional en el bucle $\beta 9-\alpha 1$ de la polimerasa viral que se desplaza alrededor de 8 Å de la posición activa. Dicho desplazamiento impide el correcto posicionamiento de la base aceptora del molde de ARN, bloqueando el centro catalítico e impidiendo así la incorporación de un nuevo nucleótido a la hebra de ARN en crecimiento. Este efecto podría explicar la inhibición observada sobre el proceso de uridilación de la VPg por la 5-fluorouridina.
4. Dado que todos los picornavirus utilizan VPg como cebadores en el proceso de replicación del ARN, los resultados obtenidos con nuestro modelo podrían proporcionar una nueva aproximación para el diseño de fármacos tanto frente al virus de la fiebre aftosa como frente a otros picornavirus.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MÉTODOS GENERALES

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron en estrictas condiciones anhidras bajo atmósfera de argón. Los sólidos higroscópicos fueron presecados en una pistola de vacío durante 24 horas empleando P_2O_5 como desecante. El THF se secó destilándolo sobre Na y benzofenona recogiendo sobre tamiz molecular de 4 Å activado previamente en el microondas. El DCM y el CH_3CN se secaron destilándolos sobre CaH_2 recogiendo sobre tamiz molecular de 4 Å activado previamente en el microondas. La DMF y la piridina anhidra se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

Las reacciones en fase sólida se sometieron a agitación orbital en un equipo IKA-100 a una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo Initiator™ Eight (Biotage AB).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga termostatazada Universal 320R de Hettich a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ y 5000 rpm utilizando tubos Falcon de polipropileno de 50 mL.

El seguimiento de las reacciones en disolución se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F_{254} (MERCK), de un espesor de capa de 0.2 mm. Los compuestos se detectaron con luz UV de 254 y 365 nm o mediante pulverización con disolución de H_2SO_4 al 5% en EtOH y calefacción.

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por: a) cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en un Cromatotrón® Harrison Research modelo 8924 (gel de sílice 60 PF 254 con Ca_2SO_4), en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min, respectivamente; b) cromatografía en columna utilizando como soporte gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh; c) cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema "Isolera One" (Biotage), empleando cartuchos SNAP de sílice KP-Sil de 50 g (39 x 81 mm) o 100 g (39 x 157 mm).

Los "nucleopéptidos" descritos en esta memoria se han purificado en fase reversa empleando diferentes métodos a distintos gradientes y utilizando como fase móvil mezclas de CH_3CN (A)/ H_2O (B): a) Cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema "Isolera one" (Biotage) usando cartuchos KP-C18-HS 12 g (21 x 55 mm); b) cromatografía de extracción en fase sólida (SPE) a vacío en el manifold en cartuchos DSC-18LT 1 g (Supelco); c) HPLC semipreparativo en un aparato Waters integrado por una bomba Delta 600, un detector de absorbancia dual 2487 y un colector de fracciones

Fraction Colector III, utilizando una columna ACE 5 C18-300 (250 x 10 mm). Para la inyección del crudo de reacción, los compuestos se disolvieron en la mínima cantidad de DMSO, ya que para llevar a cabo la separación se empleó una metodología tipo *sandwich*. En todos los casos, las distintas fracciones de la purificación se analizaron por HPLC analítico y/o HPLC-MS. Los nucleopéptidos finales presentaron una pureza superior al 95% en HPLC analítico, salvo que se indique lo contrario.

Los productos fueron liofilizados disueltos en una mezcla de CH₃CN/H₂O empleando un liofilizador Telstar 6-80.

La pureza de los compuestos se ha medido por HPLC en un equipo Agilent Technologies 1120 Compact LC empleando una columna de fase reversa ACE 5 C18-300 (4.6 mm x 150 mm, 3.5 μm) equipado con un detector de Photodiode Array, y como fase móvil mezclas de CH₃CN (A)/H₂O (0.05% TFA) (B) en modo gradiente. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 217 y 254 nm. Los gradientes empleados fueron los siguientes: a) gradiente 1: gradiente lineal A:B 10:90 a 100:0 en 10 minutos; b) gradiente 2: gradiente lineal A:B 40:60 a 100:0 en 10 minutos; c) gradiente 3: gradiente lineal A:B 50:50 a 100:0 en 10 minutos; d) gradiente 4: gradiente lineal A:B 2:98 a 30:70 en 15 minutos.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) se realizó en un cromatógrafo Waters integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiode Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000, empleando una columna de fase reversa Sunfire C18 (4.6 mm x 50 mm, 3.5 μm). Como fase móvil se emplearon mezclas de A: CH₃CN (0.08% ácido fórmico) y B: H₂O (0.1% ácido fórmico). Se utilizó un gradiente de 10% A a 100% A en 5 minutos. En todos los casos el flujo fue de 1 ml/min y la detección de los picos se realizó mediante UV a 220 y 254 nm.

Los poderes de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 241. Las medidas fueron registradas a temperatura ambiente, irradiando la muestra situada en una microcelda de 1 mL con una lámpara de sodio (línea D del sodio, 589 nm).

Los espectros de masas se han registrado en un equipo Hewlett-Packard HP-1100 MSD acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tipo cuadrupolo, en modo positivo o negativo, utilizando como eluyentes en la inyección directa metanol y agua con 0.1% de ácido acético.

Los espectros de masas de alta resolución se han registrado en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS que consiste en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series acoplado a un espectrómetro de masas con analizador híbrido Q-TOF, utilizando electrospray positivo como fuente de ionización. Se emplearon como

eluyentes metanol y agua con 0.1% de ácido acético. El error máximo en la determinación de la composición de las moléculas para esta técnica es de ± 5 ppm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian UNITY INOVA-300 (a 300 y 75 MHz), Varian UNITY INOVA-400 (a 400 y 100 MHz), Varian MERCURY-400 (a 400 y 100 MHz) y Varian SYSTEM-500 (a 500 y 125 MHz) equipado con una sonda fría, y los espectros de ^{31}P -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian MERCURY-400 (a 162 MHz). Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; td, triplete de dobletes; m, multiplete), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de la constante de acoplamiento (Hz) y la asignación estructural. Los espectros monodimensionales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se obtuvieron en condiciones estándar. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H de tipo COSY y NOESY, y las de ^{13}C -RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C de tipo HSQC y HMBC.

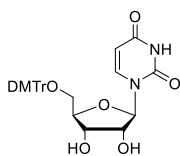
6.2. PRODUCTOS COMERCIALES

Ac-Tyr-NHMe	Bachem
Ácido trifluoroacético (TFA)	Aldrich
Ácido acético glacial (AcOH)	Scharlau
Ag_2CO_3	Aldrich
Anhídrido acético	Scharlau
2-cianoetil- <i>N,N</i> -diisopropilclorofosforamidito	Aldrich
Bromuro de alilo	Aldrich
Cloruro de 2-clorotritilo	Alfa aesar
Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo	Aldrich
Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsilano (TBDMSCl)	Aldrich
Cs_2CO_3	Fluka
DBU	Fluka
4,5-dicianoimidazol	Aldrich
Diisopropiletilamina (DIEA)	Aldrich
4-Dimetilaminopiridina (DMAP)	Aldrich
Fmoc-Ala-OH	Neosystem

Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Iris Biotech
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Novabiochem
Fmoc-Glu(<i>t</i> Bu)-OH	Fluka
Fmoc-Leu-OH	Bachem
Fmoc-Lys(Boc)-OH	NeoMPS
Fmoc-Pro-OH	NeoSystem
Fmoc-Tyr-OH	Iris Biotech
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	Aldrich
Fmoc-Val-Wang resina	Iris Biotech
5-fluorouridina	Fluorochem
HCl 1.25M en metanol	Aldrich
HCTU	Fluorochem
Hidruro de tributilestaño (Bu ₃ SnH)	Aldrich
<i>p</i> -nitrofeniltetrazol (<i>p</i> -NPT)	Alfa Aesar
Pd(PPh ₃) ₄	Aldrich
Piperidina	Aldrich
Uridina	Janssen
<i>t</i> BuOOH 5.5M (en nonano)	Aldrich
<i>t</i> BuOOH (70% en agua)	Aldrich
Trietilamina seca	Aldrich
Trietilsilano (TES)	Aldrich
Triisopropilsilano (TIPS)	Aldrich

6.3. SÍNTESIS DE LOS MONÓMEROS DE TIROSINA URIDILADA Y FLUOROURIDILADA

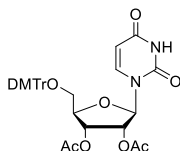
5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)uridina (**3.5**)³¹



Una disolución de uridina (**3.4**) (232 mg, 0.95 mmol), cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTrCl) (547 mg, 1.60 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (4.6 mg, 0.038 mmol) en piridina anhidra (5 mL) bajo atmósfera de argón se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación se añade diclorometano (15 mL) y se lava con agua (20 mL) y con una disolución de NaHCO₃ al 5% (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo final se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **3.5** (430 mg, 83%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³¹

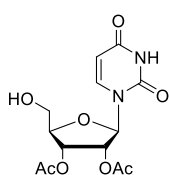
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.45-3.49 (m, 2H, H-5'), 3.78 (s, 6H, OCH₃), 4.19 (m, 1H, H-4'), 4.32-4.44 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.34 (d, *J*_{5,6} = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.95 (d, *J*_{1,2'} = 3.4 Hz, H-1'), 6.83-7.39 (m, 13H, Ar), 7.90 (d, *J*_{5,6} = 8.1 Hz, 1H, H-6), 10.36 (s ancho, 1H, NH).

2',3'-Di-O-acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)uridina (**3.6**)



Una disolución de **3.5** (200 mg, 0.35 mmol), DMAP (1.7 mg, 0.014 mmol) y anhídrido acético (165 μL, 1.75 mmol) en piridina anhidra (5 mL) se agita a temperatura ambiente durante la noche. El contenido de la reacción se vierte sobre hielo, se extrae con diclorometano (2 x 15 mL) y se lava con agua (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción **3.6** se utiliza en la siguiente etapa de reacción sin purificación previa.

2',3'-Di-O-acetiluridina (**3.7**)



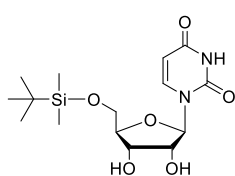
Método A: El crudo de reacción anterior **3.6** (0.86 mmol) se disuelve en AcOH/H₂O 80% (25 mL) y se agita a 50 °C durante 3 horas. Se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **3.7** (159 mg, 53%, rendimiento global desde **3.5**) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁴⁴ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): *t*_R = 3.96 min (98%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.07, 2.12 (s, 6H, COCH_3), 3.84 (dd, 1H, $J_{4',5'a} = 2.1$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 12.2$ Hz, H-5'a), 3.93 (dd, 1H, $J_{4',5'b} = 2.3$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 12.2$ Hz, H-5'b), 4.20 (m, 1H, H-4'), 5.46 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.79 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-5), 6.07 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.6$ Hz, H-1'), 7.78 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 9.55 (s ancho, 1H, NH).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ 328.0926; encontrada 328.0907.

Método B: Una disolución de **3.9** (2.56 g, 5.78 mmol) en 20 mL de HCl 0.1N en metanol se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añade ácido acético glacial (5 mL) y a continuación se lleva la reacción a pH = 5 con NaOH 1N. Se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 95:5) para obtener **3.7** (1.44 g, 74%) en forma de espuma blanca.

5'-O-*terc*-butildimetilsililuridina (**3.8**)

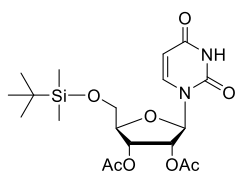


Una disolución de uridina (**3.4**) (0.50 g, 2.10 mmol), TBDMSCI (0.36 g, 2.36 mmol), y DMAP (0.13 g, 1.03 mmol) en piridina anhidra (7.5 mL) bajo atmósfera de argón se agita a temperatura ambiente durante la noche. El contenido de la reacción se vierte sobre hielo, se extrae con acetato de etilo (3 x 10 mL) y se lava con HCl 0.1N (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 3:7) para obtener **3.8** (0.60 g, 81%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³² HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 7.08$ min (99%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.11 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.92 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 3.84 (dd, 1H, $J_{4',5'a} = 1.5$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'a), 4.03 (dd, 1H, $J_{4',5'b} = 1.8$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'b), 4.13 (m, 1H, H-4'), 4.24 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.65 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5), 5.90 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.2$ Hz, H-1'), 8.06 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 10.4 (s ancho, 1H, NH).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$ 358.1544; encontrada 358.1560.

2',3'-Di-O-acetil-5'-O-*terc*-butildimetilsililuridina (**3.9**)



Una disolución de **3.8** (7.7 g, 21.6 mmol), DMAP (0.11 g, 0.86 mmol) y anhídrido acético (10 mL, 108 mmol) en piridina anhidra (75 mL) se agita a temperatura ambiente durante la noche. El contenido de la reacción se vierte sobre hielo, se extrae con diclorometano

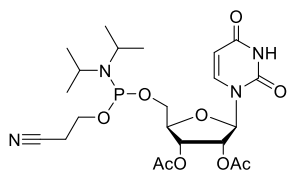
(3 x 50 mL) y se lava con HCl 0.1N (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4

anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **3.9** (9.4 g, 98%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁴⁵ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 2): $t_R = 5.87$ min (99%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.13, 0.14 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.93 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 2.07, 2.13 (s, 6H, COCH₃), 3.82 (dd, 1H, $J_{4',5'a} = 1.8$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'a), 3.92 (dd, 1H, $J_{4',5'b} = 1.9$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'b), 4.20 (m, 1H, H-4'), 5.32 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-5), 6.30 (d, 1H, $J_{1',2'} = 6.6$ Hz, H-1'), 7.86 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 9.34 (s ancho, 1H, NH).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₉H₃₀N₂O₈Si 442.1779; encontrada 442.1771.

2',3'-Di-O-acetil-5'-O-[(2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino]uridina (**3.10**)³⁵

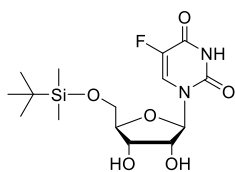


El compuesto **3.7** (1.15 g, 3.52 mmol), previamente coevaporado con CH₃CN seco (2 x 5 mL), se disuelve en diclorometano seco (15 mL) y se añade trietilamina seca (2.25 mL, 16.70 mmol) y 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamido (0.95 mL, 4.22 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añade diclorometano (15 mL) y se lava con agua (2 x 20 mL) y con una disolución de NaHCO₃ al 5% (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice previamente neutralizada con TEA al 1% (hexano/acetato de etilo 3:7), para obtener una mezcla diastereomérica de **3.10** (1.5 g, 79%) en forma de espuma blanca. El espectro de ¹H-RMN indica que se trata de una mezcla de diastereoisómeros en proporción (1:1). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{35,46} HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 4.48$ min (95%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.17 (s, 12H, iPr), 2.07, 2.12 (s, 6H, COCH₃), 2.65 (m, 2H, CH₂CN), 3.55-3.96 (m, 6H, H-5', CH iPr, CH₂CH₂CN), 4.27 (m, 1H, H-4'), 5.28-5.45 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.76 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 6.23 (d, 1H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6).

³¹P-RMN (162 MHz, CDCl₃) δ : 149.91, 151.02.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₂₂H₃₃N₄O₉P 528.1984; encontrada 528.1985.

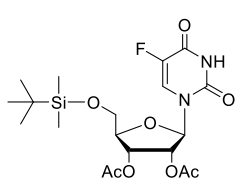
5'-O-*tert*-butildimetilsilil-5-fluorouridina (3.23)³⁶

Una disolución de 5-fluorouridina (**3.22**) (6.1 g, 23.3 mmol), cloruro de *tert*-butildimetilsilano (TBDMSCl) (4.0 g, 26.8 mmol), y DMAP (1.4 g, 11.7 mmol) en piridina anhidra (60 mL) bajo atmósfera de argón se agita a temperatura ambiente durante la noche. El

contenido de la reacción se vierte sobre hielo, se extrae con acetato de etilo (3 x 30 mL) y se lava con HCl 0.1N (3 x 25 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 9:1) para obtener **3.23** (5.9 g, 68%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁶ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 7.52$ min (99%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 3.75 (m, 1H, H-5'a), 3.83-4.05 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'b), 5.09 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, OH), 5.47 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, OH), 5.74 (d, 1H, $J_{1,2'} = 4.3$ Hz, H-1'), 8.01 (d, 1H, $J_{H-F} = 7.0$ Hz, H-6), 11.83 (s ancho, 1H, NH).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₅H₂₅N₂O₆FSi 376.1440; encontrada 376.1466.

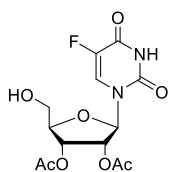
2',3'-Di-O-acetil-5'-O-*tert*-butildimetilsilil-5-fluorouridina (3.24)³⁷

Una disolución de **3.23** (5.3 g, 14.0 mmol), DMAP (0.07 g, 0.56 mmol) y anhídrido acético (6.6 mL, 70 mmol) en piridina anhidra (50 mL) se agita a temperatura ambiente durante la noche.

El contenido de la reacción se vierte sobre hielo, se extrae con diclorometano (3 x 30 mL) y se lava con HCl 0.1N (3 x 25 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 3:2) para obtener **3.24** (6.3 g, 97%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁷ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 2): $t_R = 6.51$ min (99%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.15, 0.16 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.94 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 2.06, 2.14 (s, 6H, COCH₃), 3.84 (dd, 1H, $J_{4',5'a} = 1.4$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'a), 3.94 (dd, 1H, $J_{4',5'b} = 1.7$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 11.6$ Hz, H-5'b), 4.22 (m, 1H, H-4'), 5.31 (m, 2H, H-2', H-3'), 6.26 (d, 1H, $J_{1,2'} = 6.6$ Hz, H-1'), 7.98 (d, 1H, $J_{H-F} = 6.0$ Hz, H-6), 9.78 (s ancho, 1H, NH).

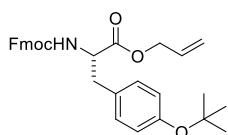
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₉H₂₉N₂O₈FSi 460.1686; encontrada 460.1677.

2',3'-Di-O-acetil-5-fluorouridina (3.25)⁴⁷

Una disolución de **3.24** (6.25 g, 13.6 mmol) en 20 mL de HCl 0.1N en metanol se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añade ácido acético glacial (5 mL) y a continuación se lleva la reacción a pH = 5 con NaOH 1N. Se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 95:5) para obtener **3.25** (3.5 g, 75%) en forma de espuma blanca. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.⁴⁷ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 3.95$ min (96%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.08, 2.14 (s, 6H, COCH₃), 3.88 (dd, 1H, $J_{4',5'a} = 1.8$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 12.0$ Hz, H-5'a), 3.97 (dd, 1H, $J_{4',5'b} = 2.1$ Hz, $J_{5'a,5'b} = 12.0$ Hz, H-5'b), 4.23 (m, 1H, H-4'), 5.44 (m, 2H, H-2', H-3'), 6.14 (d, 1H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 8.04 (d, 1H, $J_{H-F} = 6.2$ Hz, H-6), 9.49 (s ancho, 1H, NH).

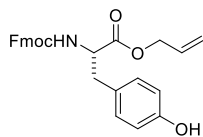
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₁₃H₁₅N₂O₈F.346.0828; encontrada 346.0812.

Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OAlI (3.18)³⁵

Sobre una disolución de Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (**3.17**) (10 g, 22 mmol) en DMF seca (100 mL) a 0 °C, se adiciona Ag₂CO₃ (12 g, 44 mmol) bajo exclusión de luz. Se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se añade bromuro de alilo (8.75 mL, 101 mmol). La mezcla de reacción se agita durante 2.5 horas, y se filtra a través de celita. El filtrado se diluye con acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se lava con KHSO₄ al 10% (2 x 25 mL) y con agua (2 x 25 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante HPFC en el Biotage (hexano/acetato de etilo 7:3) para obtener **3.18** (10.8 g, 98%) en forma de sólido amorfo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁵ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 8.14$ min (95%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.32 (s, 9H, *tert*-But), 3.09 (m, 2H, CH₂ β), 4.21 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, CH Fmoc), 4.35 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 6.9 Hz, CH_{2a} Fmoc), 4.43 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 7.3 Hz, CH_{2b} Fmoc), 4.63 (m, 3H, CH₂ All, CH α), 5.28 (m, 3H, CH₂ All, NH), 5.86 (m, 1H, CH All), 6.90 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 7.01 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 7.32 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ar Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ar Fmoc), 7.57 (m, 2H, Ar Fmoc), 7.76 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar Fmoc).

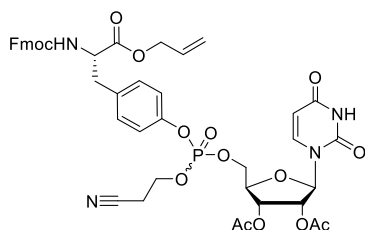
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₃₁H₃₃NO₅ 499.2350; encontrada 499.2359.

Fmoc-Tyr-OAlI (3.19)³⁵

Una disolución de **3.18** (10.8 g, 22 mmol) en TFA/CH₂Cl₂ (7:3) se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionan 50 mL de tolueno y se concentra el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (tolueno/acetato de etilo 9:1) para obtener **3.19** (7.7 g, 79%) en forma de sólido amorfo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁵ $[\alpha]^{20}_D = +21.3^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃); $[\alpha]^{20}_D$ (bibli.³⁵) = $+16.8^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃). HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 3): $t_R = 5.09$ min (93%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.02 (dd, 1H, $J = 14.0$ y 6.1 Hz, CH_{2a} β), 3.09 (dd, 1H, $J = 14.0$ y 5.6 Hz, CH_{2b} β), 4.20 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH Fmoc), 4.36 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 6.9 Hz, CH_{2a} Fmoc), 4.43 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 7.3 Hz, CH_{2b} Fmoc), 4.66 (m, 3H, CH₂ All, CH α), 5.28 (m, 3H, CH₂ All, NH), 5.88 (m, 1H, CH All), 6.72 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 6.95 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 7.31 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ar Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ar Fmoc), 7.57 (m, 2H, Ar Fmoc), 7.76 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar Fmoc).

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₂₇H₂₅NO₅ 443.1736; encontrada 443.1733.

5-[2',3'-di-O-acetiluridilato] de S-alil-N-(fluorenilmetoxicarbonil)fenilalanin-4-ilo y cianometilo (3.21)

Una mezcla de **3.10** (1.46 g, 2.76 mmol) y **3.19** (1.22 g, 2.76 mmol), previamente coevaporado con CH₃CN seco (2 x 5 mL), se disuelve en acetonitrilo seco (20 mL) y se añade 4,5-dicianoimidazol (0.49 g, 4.14 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se deja agitando durante una hora. A continuación, se añade *t*BuOOH 5.5M en nonano (2 mL, 11 mmol) y se agita durante una hora más. Se diluye con diclorometano (25 mL) y se lava con una disolución de Na₂S₂O₃ al 5% (3 x 20 mL) y agua (20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. La mezcla de reacción se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 98:2) para dar **3.21** (1.40 g, 57%) en forma de sólido blanco amorfo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁵ HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 8.85$ min (91%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.06 (s, 6H, COCH₃), 2.85 (m, 1H, CH_{2a} β), 2.94 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH₂CN), 3.06 (m, 1H, CH_{2b} β), 4.20 (t, 1H, $J = 7$ Hz, CH Fmoc), 4.25-4.71 (m, 10 H, CH₂ Fmoc, CH₂ All, CH₂CH₂CN, CH α , H-4', H-5'), 5.12-5.37 (m, 3H, H-2', CH₂

All), 5.37-5.45 (m, 1H, H-3'), 5.58-5.79 (m, 1H, H-5), 5.82-5.96 (m, 1H, CH All), 6.00-6.13 (m, 1H, H-1'), 7.04-7.20 (m, 4H, Ar Tyr), 7.26-7.34 (m, 2H, Ar Fmoc), 7.35-7.45 (m, 3H, Ar Fmoc, H-6), 7.53-7.62 (m, 2H, Ar Fmoc), 7.76 (m, 2H, Ar Fmoc).

^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ : -6.18, -5.82.

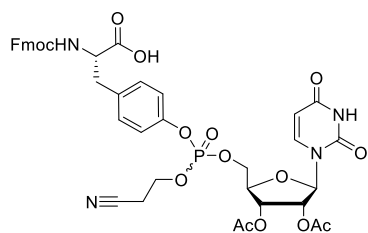
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}^+$ (M) $^+$ 886.2463; encontrada 886.2463.

5-[2',3'-di-O-acetiluridilato] de *N*-(fluorenilmetoxicarbonil)fenilalanin-4-ilo y cianometilo (3.15)^{34,35}

Procedimiento A:

A una suspensión de *N*^o-Fmoc-tirosina (**3.11**) (250 mg, 0.62 mmol) en DMF (5 mL) a 0 °C, se le añade una disolución de Cs_2CO_3 (100 mg, 0.31 mmol) en agua (100 μL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentra a presión reducida. El residuo se suspende en DMF (5 mL) y se añade cloruro de 2-clorotritilo (215 mg, 0.68 mmol) dando lugar a un precipitado blanco. Se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se hidroliza con metanol (1 mL) y el disolvente se concentra a presión reducida. A continuación, se añade acetato de etilo (15 mL) y se lava con agua (2 x 20 mL) y con una disolución de NaHCO_3 al 5% (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo de reacción **Fmoc-Tyr-2CITr** (**3.12**)³⁴ se utiliza en la siguiente etapa de reacción sin purificación previa.

Una mezcla de **3.12** (1.31 g, 2.48 mmol) y **3.10** (1.68 g, 2.48 mmol), previamente coevaporado con CH_3CN seco (2 x 5 mL), se disuelve en acetonitrilo seco (6 mL) y se añade 5-(4-nitrofenil)-2*H*-tetrazol (*p*-NPT) (0.95 g, 4.96 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se deja agitando durante 2 horas. A continuación, se añade *t*BuOOH al 70% en H_2O (1.40 mL, 9.92 mmol) y se agita durante una hora más. La mezcla de reacción se vierte sobre acetato de etilo/agua 2:1 (20 mL) y se lava con una disolución de NaHCO_3 al 5% (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad para dar el derivado **3.14** que se utiliza sin purificar. El crudo se disuelve en TFA/ CH_2Cl_2 (2/98, v/v, 6 mL) y se agita durante 10 minutos, seguidamente se adiciona TES (0.31 mL) y se agita durante 5 minutos. Se repite el proceso 2 veces más. La mezcla de reacción se purifica por HPFC mediante fase reversa en el Biotage (agua/acetonitrilo 3:2) para dar el compuesto **3.15** (200 mg, 10%, rendimiento global desde Fmoc-Tyr-OH) en forma de sólido blanco amorfo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.^{34,35}



HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 7.63$ min (97%).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 2.06 (s, 6H, COCH_3), 2.85 (m, 1H, CH_{2a} β), 2.94 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2CN), 3.06 (m, 1H, CH_{2b} β), 4.18 (m, 4H, CH_2 Fmoc, CH Fmoc, CH α), 4.30 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, H-4'), 4.41 (m, 2H, H-5'), 5.34 (m, 1H, H-3'), 5.44 (m, 1H, H-2'), 5.67 (m, 1H, H-5), 5.93 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-1'), 7.11-7.92 (m, 13H, Ar Fmoc y Tyr, H-6), 11.4 (s ancho, 1H, NH).

$^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, DMSO-d_6) δ : -11.10, -10.65.

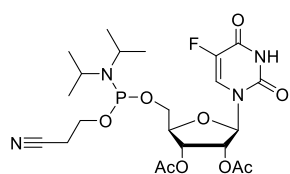
HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}$ 846.2149; encontrada 846.2150.

Procedimiento B:

A una disolución de **3.21** (1.6 g, 1.8 mmol), previamente coevaporado con CH_3CN seco (2 x 5 mL), en $\text{THF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 (10 mL) se añade ácido acético glacial (0.45 mL, 8 mmol), Bu_3SnH (0.97 mL, 3.6 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (87 mg, 0.08 mmol) bajo atmósfera de argón. Se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida, y se purifica mediante HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 94:6) para obtener **3.15** (0.99 g, 65%) en forma de sólido amorfo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en bibliografía.³⁵

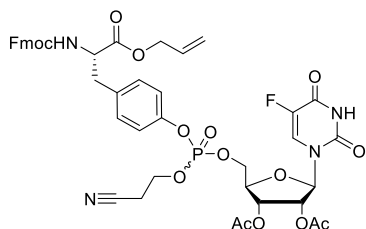
5-[2',3'-di-O-acetil-5-fluoruridilato] de S-alil-N-(fluorenilmetoxicarbonil)fenilalanin-4-ilo y cianoetilo (3.27)

El compuesto **3.25** (1.21 g, 3.5 mmol), previamente coevaporado con CH_3CN seco (2 x 5 mL), se disuelve en diclorometano seco (15 mL) y se añade trietilamina seca (2.25 mL, 16.70 mmol) y 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito (0.95 mL, 4.22 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añade diclorometano (15 mL) y se lava con agua (20 mL) y con una disolución de NaHCO_3 al 5% (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El producto de reacción **2',3'-di-O-acetil-5'-O-[(2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino]-5-fluorouridina (3.1)**



resultó ser inestable y se utiliza inmediatamente en el siguiente paso de reacción. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 4.68$ min (96%). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{FN}_4\text{O}_9\text{P}$ 546.1872; encontrada 546.1891.

A continuación, una mezcla de **3.1** (546 mg, 1 mmol) y **3.19** (443 mg, 1 mmol), previamente coevaporado con CH₃CN seco (2 x 5 mL), se disuelve en acetonitrilo seco (10 mL) y se añade 4,5-dicianoimidazol (177 mg, 1.5 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se deja agitando durante 45 minutos. A continuación, se añade *t*BuOOH 5.5M en nonano (0.73 mL, 4 mmol) y se agita durante 45 minutos. Se diluye con diclorometano (25 mL) y se lava con una disolución de Na₂S₂O₃ al 5% (3 x 20 mL) y agua (20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. La mezcla de reacción se purifica por HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 98:2) para dar el compuesto **3.27** (858 mg, 42% de rendimiento global, desde **3.25**) en forma de sólido blanco amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 8.91$ min (99%).



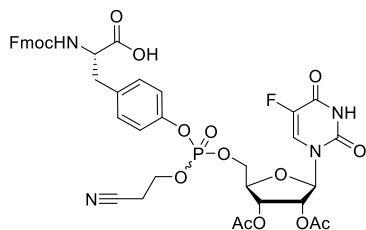
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.05, 2.07 (s, 6H, COCH₃), 2.94 (m, 3H, CH_{2a} β, CH₂CN), 3.05 (dd, 1H, $J = 13.7$ y 5.1 Hz, CH_{2b} β), 4.17-4.34 (m, 7H, CH₂ Fmoc, CH Fmoc, CH α, CH₂CH₂CN, H-4'), 4.43 (m, 2H, H-5'), 4.57 (m, 2H, CH₂ All), 5.18 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 1.6 Hz, CH_{2a} All), 5.28 (dd, 1H, $J = 17.2$ y 1.6 Hz, CH_{2b} All), 5.34 (m, 1H, H-3'), 5.43 (m, 1H, H-2'), 5.84 (m, 1H, CH All), 5.93 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, H-1'), 7.15 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 7.26-7.35 (m, 4H, Ar Fmoc y Tyr), 7.41 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar Fmoc), 7.65 (m, 2H, Ar Fmoc), 7.88 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar Fmoc), 7.92 (s ancho, 1H, NH), 8.09 (m, 1H, H-6), 12.0 (s ancho, 1H, NH).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 19.0, 19.1 (CH₂CN), 20.2, 20.3 (COCH₃), 35.6 (CH₂ β), 46.6 (CH Fmoc), 55.5 (CH α), 63.3 (CH₂CH₂CN), 64.9 (CH₂ All), 65.6 (CH₂, Fmoc), 67.0 (C-5'), 69.0 (C-3'), 71.5 (C-2'), 79.6 (C-4'), 87.4 (C-1'), 117.8 (CH₂ All), 118.1 (CN), 119.7 (CH Ar Tyr), 120.1 (CH Ar Fmoc), 125.3 (CH Ar Fmoc), 125.2 (C-6, $^2J = 36$ Hz), 127.1, 127.7 (CH Ar Fmoc), 130.6 (CH Ar Tyr), 132.2 (CH All), 134.7 (C Tyr), 139.6 (C-5, $^1J = 232.1$ Hz), 140.7 (C Fmoc), 143.7 (C Fmoc), 148.6 (C Tyr), 149.1 (C=O C-2), 155.9 (CONH), 156.9 (C=O C-4, $^2J = 26.2$ Hz), 169.3 (COCH₃), 173.3 (C=O Tyr)

³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ: -5.83, -5.87.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₄₃H₄₂FN₄O₁₅P 904.2401; encontrada 904.2402.

5-[2',3'-di-O-acetil-5-fluoruridilato] de *N*-(fluorenilmetoxicarbonil)fenilalanin-4-ilo y cianoetilo (3.3)



A una disolución de **3.27** (1.52 g, 1.68 mmol), previamente coevaporado con CH₃CN seco (2 x 5 mL), en THF/CH₂Cl₂ 1:1 (10 mL) se añade ácido acético glacial (0.42 mL, 8 mmol), Bu₃SnH (0.91 mL, 3.36 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (81 mg, 0.07 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida, y se purifica mediante HPFC en el Biotage (diclorometano/metanol 94:6) para obtener el compuesto **3.3** (0.97 g, 67%) en forma de sólido amorfo. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 7.80$ min (95%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.06 (s, 6H, COCH₃), 2.86 (dd, 1H, $J = 13.7$ y 2.8 Hz, CH_{2a} β), 2.94 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH₂CN), 3.08 (dd, 1H, $J = 13.7$ y 4.0 Hz, CH_{2b} β), 4.19 (m, 4H, CH₂ Fmoc, CH Fmoc, CH α), 4.29 (m, 3H, CH₂CH₂CN, H-4'), 4.43 (m, 2H, H-5'), 5.34 (m, 1H, H-3'), 5.44 (m, 1H, H-2'), 5.93 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-1'), 7.15 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, Ar Tyr), 7.29-7.45 (m, 6H, Ar Fmoc y Tyr), 7.65 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, Ar Fmoc), 7.75 (s ancho, 1H, NH), 7.88 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, Ar Fmoc), 8.09 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, H-6), 12.0 (s ancho, 1H, NH).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 19.0, 19.1 (CH₂CN), 20.3, 20.4 (COCH₃), 35.6 (CH₂ β), 46.6 (CH Fmoc), 55.5 (CH α), 63.3 (CH₂CH₂CN), 65.6 (CH₂ Fmoc), 67.0 (C-5'), 69.0 (C-3'), 71.5 (C-2'), 79.6 (C-4'), 87.4 (C-1'), 118.1 (CN), 119.7 (CH Ar, Tyr), 120.1 (CH Ar, Fmoc), 125.3 (CH Ar, Fmoc), 125.6 (C-6, ² $J = 36$ Hz), 127.1, 127.7 (CH Ar, Fmoc), 130.6 (CH Ar, Tyr), 135.4 (C Tyr), 139.6 (C-5, ¹ $J = 234.7$ Hz), 140.7 (C Fmoc), 143.8 (C Fmoc), 148.5 (C Tyr), 149.1 (C=O C-2), 156.0 (CONH), 157.0 (C=O C-4, ² $J = 26.3$ Hz), 169.4 (COCH₃), 173.3 (C=O Tyr)

³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ: -11.50, -11.40.

HRMS (ES, positivo): m/z calculada para C₄₀H₃₈FN₄O₁₅P 864.2047; encontrada 864.2055.

6.4. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE LOS NUCLEOPÉPTIDOS VPgpU y VPgpFU

6.4.1. Protocolos generales de síntesis en fase sólida

La síntesis de los péptidos y de los nucleopéptidos descritos en esta memoria se ha llevado a cabo manualmente en fase sólida. Para la preparación de los péptidos se ha utilizado una estrategia Fmoc/*t*Bu, empleando como único soporte polimérico una resina tipo Wang (poliestireno, 1% DVB), de baja carga (0.4 mmol/g) para minimizar posibles reacciones intermoleculares no deseadas y problemas de agregación de péptidos. Además, estas resinas se adquirieron con el primer aminoácido de la cadena peptídica anclado para evitar la racemización del Fmoc-aminoácido durante el proceso de acoplamiento con la resina Wang. Se han empleado jeringas de polipropileno provistas de filtro poroso de polietileno (*Supelco*) de 20 o 60 mL, dependiendo de la cantidad de resina de partida. Para realizar los diferentes tratamientos se mantiene la matriz sólida dentro de la jeringa y se añade la cantidad de reactivo/disolvente necesaria para hinchar totalmente el polímero. La mezcla de reacción se ha agitado con una varilla de teflón en los lavados y con agitación orbital durante las reacciones empleando un equipo *Grant-Bio* (POS-300). Tras cada lavado, los excesos de reactivos y subproductos junto al disolvente fueron eliminados mediante un sistema-bloque de síntesis de 20 posiciones conectado a vacío especial para fase sólida (*Promega*).

6.4.1.1. Seguimiento de las reacciones en fase sólida

Las reacciones se han monitorizado mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser o de cloranilo para la detección cualitativa de aminas primarias libres o secundarias, respectivamente. También se han monitorizado mediante análisis por HPLC-MS tras realizar el desanclaje del péptido de una pequeña fracción de peptidil-resina.

6.4.1.1.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina o de Kaiser⁴⁸

Este ensayo permite controlar cualitativamente la eficiencia de los acoplamientos de aminoácidos en la síntesis en fase sólida de péptidos mediante la detección colorimétrica de grupos amino primarios libres en el extremo *N*-terminal de la cadena peptídica en crecimiento.

Procedimiento general: A una alícuota de resina seca (3-4 mg) se le añaden 6 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B, calentándose la mezcla a 110 °C durante 3 minutos. Una coloración azul o azul-verdosa de la resina o del sobrenadante indica la presencia

de aminas primarias (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica ausencia de aminas primarias (ensayo negativo).

Reactivo A: se disuelven 40 mg de fenol en 10 mL de EtOH absoluto en caliente. Por otro lado se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de H₂O y se diluyen 2 mL de esta disolución en 100 mL de piridina. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 minutos. Seguidamente se filtran y se mezclan los dos filtrados.

Reactivo B: se disuelve ninhidrina (2.5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La disolución se almacena protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera inerte.

6.4.1.1.2. *Ensayo cualitativo de cloranilo*⁴⁹

El ensayo de cloranilo cualitativo se utiliza para evaluar la extensión de los acoplamientos peptídicos sobre aminas secundarias. El procedimiento consiste en preparar una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en tolueno (750 mg en 25 mL). A una alícuota de resina lavada y seca se adicionan 5 gotas de la disolución de cloranilo y 15 gotas de acetona, agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una coloración azul intensa de la resina indica la existencia de aminas secundarias libres (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica la ausencia de éstas (ensayo negativo).

6.4.1.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS)

La monitorización cuantitativa se ha llevado a cabo mediante análisis por HPLC-MS. Para ello, se trata una pequeña porción de peptidil-resina (5-10 mg) con una disolución ácida de desanclaje (composición dependiente de la naturaleza del péptido) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se recoge el filtrado así como los posteriores lavados con DCM, se concentra a presión reducida y se disuelve el crudo final en CH₃CN, H₂O y/o MeOH (hasta 1.5 mL) para ser analizado por HPLC-MS.

6.4.1.2. Elongación de la cadena peptídica

En una jeringa con filtro se hincha la resina tipo Wang (4 x 0.5 min cada vez, DCM/DMF/DCM/DMF) antes de cada reacción. A continuación se elimina el grupo protector temporal Fmoc añadiendo 3 volúmenes de una disolución de piperidina en

DMF al 20% en volumen o bien una disolución de DBU/piperidina/DMF 1:1:48 (cuando los péptidos anclados a la resina contienen 6 o más aminoácidos) (1 x 1 min y 3 x 10 min). La resina se lava cuatro veces con cada disolvente a vacío (4 x 0.5 min cada vez, DMF/DCM/ DMF/DCM). Seguidamente, se vuelve a hinchar la resina y se lleva a cabo la reacción de acoplamiento aminoacídico siguiendo dos métodos de acoplamiento:

Método A: se trasvasa la resina hinchada con una pipeta de plástico a un vial especial de microondas de 2-5 ó 5-10 mL provisto con un núcleo de agitación lenta. Se añade una disolución de Fmoc-AA-OH (1.2 eq.), HCTU (1.2 eq.) y DIEA (2.4 eq.) disueltos en la mínima cantidad de DMF (3 x 10 min). La reacción de acoplamiento se realiza en microondas⁴² (3 x 10 min) a 40 °C y a 300 rpm. Por último, se lava a vacío con cada disolvente y se deja secar a vacío durante 10 minutos aproximadamente.

Método B: sobre la resina hinchada se añade una disolución de Fmoc-AA-OH (2 eq.), HCTU (2 eq.) y DIEA (4 eq.) disueltos en una mínima cantidad de DMF anhidra. La reacción se mantiene durante 1 h sobre agitador orbital a temperatura ambiente. La adición de una nueva mezcla de acoplamiento se repitió una vez más, eliminando el sobrenadante y añadiendo una nueva mezcla de acoplamiento. Por último, se lava a vacío con cada disolvente y se deja secar a vacío durante 10 minutos aproximadamente.

Para controlar los acoplamientos se utilizó el test de ninhidrina para aminas primarias o el de cloranilo para aminas secundarias descritos anteriormente. Cuando el ensayo fue negativo se prosiguió con las síntesis añadiendo el siguiente aminoácido. Cuando el ensayo fue positivo se repite de nuevo el acoplamiento hasta obtener un resultado negativo del test.

6.4.1.3. Desprotección de las cadenas laterales, desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos

Sobre la peptidil-resina seca en una jeringa de polipropileno se añade una mezcla de desanclaje formada por TFA:TIPS:H₂O en proporciones 95:2.5:2.5 en volumen. Se cierra la jeringa y se agita sobre el agitador orbitálico a temperatura ambiente durante 4 horas. La fase soluble se añade sobre Et₂O frío en dos tubos Falcon de 50 mL. Se lava la resina con TFA y DCM un par de veces y se precipitan cantidades adicionales de péptido sobre el Et₂O frío. Se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm y a -10 °C 3 veces, se elimina el sobrenadante por decantación y se añade Et₂O nuevo cada vez. El sólido obtenido se disuelve con CH₃CN:H₂O y se liofiliza para obtener el crudo final.

6.4.1.4. Purificación de los péptidos

Los péptidos sintetizados se purifican mediante cromatografía en fase reversa empleando diferentes gradientes de H₂O y CH₃CN utilizando los tres métodos cromatográficos que se detallan en los métodos generales: Biotage, manifold o HPLC semipreparativo. En todos los casos, la pureza final de los productos se determinó mediante HPLC analítico. El tiempo de retención así como el gradiente utilizado en cada caso se especifica en la caracterización de cada uno de los péptidos sintetizados.

6.4.2. Síntesis de los nucleopéptidos modelo

Procedimiento general: La síntesis de los péptidos se lleva a cabo a partir de 0.16-0.20 mmol de soporte polimérico siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 6.4.1.2, método A) usando como aminoácidos Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH según corresponda en cada caso, para obtener finalmente el péptido protegido en su forma Fmoc anclado a la resina **3.29**. A continuación, se lleva a cabo el acoplamiento del péptido anclado con cada una de las tirosinas previamente modificadas **3.3** y **3.15**, seguido del acoplamiento con Fmoc-Pro-OH y Fmoc-Gly-OH siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 6.4.1.2, método B). Posteriormente, se procede al desanclaje de los nucleopéptidos de la resina según el protocolo general (apartado 6.4.1.3). A continuación los nucleopéptidos se disuelven en hidróxido amónico/dioxano 1:1 y se agitan a temperatura ambiente durante 5 horas. Se elimina el disolvente a sequedad. El crudo final se purifica por HPFC en el Biotage o HPLC semipreparativo mediante fase reversa aplicando el gradiente indicado en cada paso.

(H-Gly-Pro-Tyr(pU)-Ala-Gly-Pro-Leu-Glu-Arg-Gln-Arg-Pro-Leu-Lys-Val-OH) (3.32)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.039 mmol de resina, se sintetiza el péptido **3.29** utilizando HCTU como agente de acoplamiento y **3.15** como tirosina modificada. Tras desanclar el péptido del soporte polimérico, desproteger el residuo de uridina y purificar, se obtienen 14 mg (18% de rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **3.32** tras liofilizar. HPLC-Analítico

(Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 4.43$ min (97%). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $C_{85}H_{136}N_{25}O_{28}P$ 1985.9746; encontrada 1985.9724.

(H-Gly-Pro-Tyr(pFU)-Ala-Gly-Pro-Leu-Glu-Arg-Gln-Arg-Pro-Leu-Lys-Val-OH) (3.33)

Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.066 mmol de resina, se sintetiza el péptido **3.29** utilizando HCTU como agente de acoplamiento y **3.3** como tirosina modificada. Tras desanclar el péptido del soporte polimérico, desproteger el residuo de fluouridina y purificar, se obtienen 13 mg (10% de rendimiento global de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **3.33** tras liofilizar. HPLC-Analítico (Agilent 1120, gradiente 1): $t_R = 4.73$ min (94%). HRMS (ES, positivo): m/z calculada para $C_{85}H_{135}FN_{25}O_{28}P$ 2003.9611; encontrada 2003.9630.

6.5. ESTUDIOS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE R-X DE LOS NUCLEOPÉPTIDOS MODELO

Para el análisis estructural de los complejos formados por la polimerasa 3D^{pol} y los diferentes nucleopéptidos se procedió a la formación del complejo mediante la incubación de la polimerasa con los diferentes compuestos durante una noche a 4 °C. Con esta mezcla se procedió a realizar los ensayos de cristalización. La obtención de cristales adecuados para la difracción con rayos X es un paso limitante de la cristalografía de proteínas. Para la obtención de cristales, las variables que se pueden modificar para provocar una sobresaturación de la solución proteica y conseguir que esta precipite en forma de cristales son muy numerosas (pH, temperatura, concentración de sales y precipitantes, concentración de la gota...). Debido a que conocíamos las condiciones de cristalización del complejo de iniciación de la polimerasa, para cristalizar estos nuevos complejos realizamos screenings de cristalización en condiciones alrededor de las descritas previamente.

Unos cristales tetragonales ($P4_12_12_1$) aparecieron en 2-3 días a 20°C en una solución que contenía el 33% PEG 4K, 0.2 M acetato amónico, 0.1 M citrato sódico (pH=5.6) and 4% γ -butirolactona. Los cristales se congelaron en una solución crioprotectora que contenía un 20% de glicerol para prevenir la aparición de cristales de hielo. La difracción de los cristales se realizó en diferentes líneas de los sincrotrones ESRF (Grenoble), SOLEIL (París) y ALBA (Cerdanyola del Vallès).

Los datos obtenidos se indexaron con el programa XDS⁵⁰⁻⁵² o iMOSFLM^{53,54}, y se escalaron con el programa Scala (CCP4I)⁵⁵. Para la resolución de las estructuras tridimensionales se utilizó el método del reemplazo molecular utilizando un refinado de

cuerpo rígido con el programa REFMAC5^{56,57} debido a que los cristales pertenecían al mismo grupo espacial y tenían los mismos parámetros de celda que el modelo utilizado.

Se modificó manualmente la cadena polipeptídica mediante el programa Coot⁵⁸ para ajustarla a la nuevas densidades electrónicas obtenidas y se refinaron estas correcciones utilizando los programas REFMAC5^{56,57}, Buster⁵⁹ o Phenix^{60,61}. Finalmente, la validación del modelo se hizo con el programa Procheck⁶² incluido dentro del paquete informático CCP4I.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Racaniello, V. R.; Skalka, A. M. *Principles of virology*, ASM Press: Washington, **2009**.
2. OIE. Manual de la Organización mundial de sanidad animal sobre animales terrestres: Fiebre aftosa. **2014**, 206–236.
3. Organización mundial de sanidad animal (OIE). <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/es-fmd-carte/>.
4. Carrillo, C.; Tulman, E. R.; Delhon, G.; Lu, Z.; Carreno, A.; Vagnozzi, A.; Kutish, G. F.; Rock, D. L. Comparative genomics of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2005**, *79*, 6487–6504.
5. Racaniello, V. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, **2001**.
6. Grubman, M.; Baxt, B. Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 465–493.
7. Baranowski, E.; Ruiz-Jarabo, C. M.; Pariente, N.; Verdaguer, N.; Domingo, E. Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv. Virus Res.* **2003**, *62*, 19–111.
8. Berryman, S.; Clark, S.; Monaghan, P.; Jackson, T. Early events in integrin $\alpha\beta 6$ -mediated cell entry of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8519–8534.
9. O'Donnell, V.; Larocco, M.; Duque, H.; Baxt, B. Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus internalization events in cultured cells. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8506–8518.
10. Ferrer-Orta, C.; Ferrero, D.; Verdaguer, N. RNA-dependent RNA polymerases of picornaviruses: From the structure to regulatory mechanisms. *Viruses.* **2015**, *7*, 4438–4460.
11. Nayak, A.; Goodfellow, I. G.; Belsham, G. J. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7698–7706.
12. Choi, K. H. Viral polymerases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *726*, 267–304.
13. Agudo, R.; Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; de la Higuera, I.; Perales, C.; Pérez-Luque, R.; Verdaguer, N.; Domingo, E. A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001072.
14. Gao, Y.; Sun, S.-Q.; Guo, H.-C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol. J.* **2016**, *13*, 107.

15. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Agudo, R.; Pérez-Luque, R.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Verdaguer, N. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* **2006**, *25*, 880–888.
16. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Perez-Luque, R.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Verdaguer, N. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47212–47221.
17. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Pérez-Luque, R.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Verdaguer, N. Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 9463–9468.
18. Ferrer-Orta, C.; Arias, A.; Escarmís, C.; Verdaguer, N. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 27–34.
19. Ferrer-Orta, C.; Verdaguer, N. RNA virus polymerases. In *Viral genome replication*; Springer US: Boston, MA, **2009**; 383–401.
20. Pariente, N.; Sierra, S.; Airaksinen, A. Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **2005**, *107*, 183–193.
21. Goris, N.; De Palma, A.; Toussaint, J.-F.; Musch, I.; Neyts, J.; De Clercq, K. 2'-C-methylcytidine as a potent and selective inhibitor of the replication of foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res.* **2007**, *73*, 161–168.
22. Paul, A. V. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In *Molecular biology of picornavirus*; American Society of Microbiology, **2002**; 227–246.
23. Furuta, Y.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Sakamoto, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L.; Gowen, B. B.; Julander, J. G.; Morrey, J. D. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* **2009**, *82*, 95–102.
24. Durk, R. C.; Singh, K.; Cornelison, C. a; Rai, D. K.; Matzek, K. B.; Leslie, M. D.; Schafer, E.; Marchand, B.; Adedeji, A.; Michailidis, E.; et al. Inhibitors of foot and mouth disease virus targeting a novel pocket of the RNA-dependent RNA polymerase. *PLoS One.* **2010**, *5*, e15049.
25. Agudo, R.; Arias, A.; Pariente, N.; Perales, C.; Escarmís, C.; Jorge, A.; Marina, A.; Domingo, E. Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *382*, 652–666.
26. Grandas, A.; Robles, J.; Pedroso, E. Nucleopeptidos y otros híbridos péptido-oligonucleótido. In *Péptidos en biología y biomedicina*; Consejo Superior de Investigaciones, **1997**.

27. van der Heden van Noort, G. J.; van Delft, P.; Meeuwenoord, N. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. a; Filippov, D. V. Fully automated sequential solid phase approach towards viral RNA-nucleopeptides. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8093–8095.
28. Kuyl-Yeheskiely, E.; van der Klein, P. A. M.; Visser, G. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. A study directed towards the preparation of nucleopeptide fragments containing covalently linked L-serine or L-threonine. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas.* **1986**, *105*, 69–70.
29. Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M. Nucleosides and nucleotides. In *Nucleic acids in chemistry and biology*; Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2006**; 77–142.
30. Kriek, N. M. a J.; Meeuwenoord, N. J.; van den Elst, H.; Heus, H. a; van der Marel, G. a; Filippov, D. V. Chemical synthesis of picornaviral protein primers of RNA replication. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3576–3586.
31. Panayides, J. L.; Mathieu, V.; Banuls, L. M. Y.; Apostolellis, H.; Dahan-Farkas, N.; Davids, H.; Harmse, L.; Rey, M. E. C.; Green, I. R.; Pelly, S. C.; et al. Synthesis and in vitro growth inhibitory activity of novel silyl- and trityl-modified nucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2716–2724.
32. Debarge, S.; Balzarini, J.; Maguire, A. R. Design and synthesis of α -carboxy phosphonucleosides. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 105–126.
33. van der Heden van Noort, G. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. a; Filippov, D. V. Synthesis of nucleotidylated poliovirus VPg proteins. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5733–5736.
34. Kriek, N. M. a. ; Filippov, D. V; van den Elst, H.; Meeuwenoord, N. J.; Tesser, G. I.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. a. Stepwise solid phase synthesis of uridylylated viral genome-linked peptides using uridylylated amino acid building blocks. *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 1589–1597.
35. Van der Heden van Noort, G. J.; Schein, C. H.; Overkleeft, H. S.; Van der Marel, G. A.; Filippov, D. V. A general synthetic method toward uridylylated picornavirus VPg proteins. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 333–336.
36. Terada, T.; Katsuhiko Fujimoto, J. Y.; Yasumoto, M.; Takeda, S.; Uchida, J.; Wierzba, K.; Ymada, Y. 5-Substituted uridine derivatives. US5420117A, **1995**.
37. Kenten, J. H.; Casadei, J. M.; Kamireddy, B.; Mark, M.; Massey, R. Prodrugs activated by targeted catalytic proteins. WO9302703A1, **1993**.
38. Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. HCTU and TCTU. New coupling reagents development and industrial aspects. *Chim. Oggi.* **2002**, *20*, 37–41.

39. Marder, O.; Albericio, F. Industrial application of coupling reagents in peptides. *Chim. Oggi*. **2003**, *21*, 35–40.
40. El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
41. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H. Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97–101.
42. Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826–1844.
43. Kuhn, R. J.; Tada, H.; Ypma-wong, M. F.; Semler, B. L.; Wimmer, E. Mutational analysis of the genome-linked protein VPg of poliovirus. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4207–4215.
44. Bavaro, T.; Rocchietti, S.; Ubiali, D.; Filice, M.; Terreni, M.; Pregnotato, M. A versatile synthesis of 5'-functionalized nucleosides through regioselective enzymatic hydrolysis of their peracetylated precursors. *European J. Org. Chem.* **2009**, *12*, 1967–1975.
45. Tiwari, P.; Misra, A. K. Acylation of carbohydrates over Al₂O₃: preparation of partially and fully acylated carbohydrate derivatives and acetylated glycosyl chlorides. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 339–350.
46. Stolz, F.; Blume, A.; Hinderlich, S.; Reutter, W.; Schmidt, R. R. C-Glycosidic UDP-GlcNAc analogues as inhibitors of UDP-GlcNAc 2-epimerase. *European J. Org. Chem.* **2004**, *15*, 3304–3312.
47. Rocchietti, S.; Terreni, M.; Pregnotato, M. Process for the selective enzymatic hydrolysis of nucleoside polyesters. WO03057894A1, **2003**.
48. Brown, W. D.; Green, S. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
49. Christensen, T. A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand. B.* **1979**, *33*, 763–766.
50. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.
51. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133–144.
52. Kabsch, W. Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Crystallogr.* **1988**, *21*, 67–72.
53. Battye, T. G. G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Powell, H. R.; Leslie, A. G. W. IMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 271–281.

54. Powell, H. R.; Johnson, O.; Leslie, A. G. W. Autoindexing diffraction images with iMosflm. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1195–1203.
55. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 72–82.
56. Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.
57. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
58. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
59. Bricogne, G.; Blanc, E.; Brandl, M.; Flensburg, C.; Keller, P.; Paciorek, W. BUSTER version 1.10.0. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd 2011.
60. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.
61. Adams, P. D.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Hung, L. W.; Ioerger, T. R.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Read, R. J.; Sacchettini, J. C.; Sauter, N. K.; Terwilliger, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1948–1954.
62. Lashowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283–291.

Conclusiones generales

CONCLUSIONES GENERALES

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el diseño y estudio de nuevos inhibidores de polimerasas virales, directamente implicadas en la replicación de virus emergentes y/o re-emergentes tanto ARN como ADN, que puedan ser de utilidad en el tratamiento de las enfermedades causadas por los mencionados virus. Este propósito se ha abordado desde dos aproximaciones diferentes: en la primera se lleva a cabo el diseño, síntesis y evaluación biológica de nucleósidos “no convencionales” capaces de inhibir diferentes polimerasas virales y, en la segunda se lleva a cabo la preparación y el estudio cristalográfico, mediante técnicas de difracción de R-X, de nucleopéptidos que permitan elucidar el mecanismo de inhibición de la 5-fluorouridina sobre la polimerasa del virus de la fiebre aftosa.

Del trabajo realizado, cuyo hilo conductor han sido las polimerasas virales, y que se ha organizado en tres capítulos, se pueden resumir las siguientes conclusiones generales:

1. En el **primer capítulo** se ha diseñado y sintetizado por primera vez una nueva clase de análogos de nucleósidos “no convencionales”, los metiloxinucleósidos de estructura desconocida, que combinan en su estructura bases no naturales (diaminopirimidinas, diaminopurinas o diamino-1,3,5-triazinas) con azúcares “no convencionales” (D-alitol, D-altritol o (2R,5S)-2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano). Los derivados de D-alitol y D-altritol se diseñaron como miméticos de ribonucleósidos, mientras que los análogos de tetrahidrofurano pueden considerarse como sus didesoxianálogos y miméticos de los 2',3'-didesoxinucleósidos. Estos azúcares no convencionales se unen al C-6 de la nucleobase mediante un enlace tipo éter. Con este tipo de unión se podría mejorar la estabilidad metabólica de los compuestos respecto a los nucleósidos clásicos o convencionales. Los resultados más relevantes se pueden resumir en los siguientes puntos:

- La síntesis de los nucleósidos portadores de anillos de D-alitol y D-altritol requirió la preparación de los azúcares (no convencionales) en una cuidadosa síntesis en 8 pasos. La posterior alquilación de las nucleobases Cl-sustituidas con los correspondientes alcóxidos, generados *in situ* y debidamente protegidos, tanto de D-alitol, D-altritol como de 2,5-bis(hidroximetil)tetrahidrofurano condujo a los nucleósidos no convencionales objetivo.

- Se ha llevado a cabo un estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN de ambos tipos de metiloxinucleósidos (ribomiméticos y didesoxianálogos) empleando **1.16b** y **1.25** como compuestos modelo. En los nucleósidos polihidroxilados (**1.16b**) el anillo de tetrahidrofurano adopta un equilibrio conformacional (N/S), próximo aunque en distinta zona donde aparecen los nucleósidos “clásicos”, entre 4E y 1E desplazado hacia el confórmero tipo sur (4E). Para los correspondientes didesoxianálogos (**1.25**), el equilibrio conformacional se encuentra en el rango N/S habitual de los didesoxinucleósidos entre 3E y 2E .
- Los metiloxinucleósidos sintetizados resultaron inactivos frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), debido posiblemente, bien a que no son reconocidos por las quinasas que los metabolizarían a los correspondientes nucleósido 5'-trifosfatos (NTPs), y/o bien a que dichos NTPs presentaran una nula o muy baja afinidad por la ADN polimerasa viral [Transcriptasa inversa (TI) del VIH].
- Sin embargo, el trifosfato **1.60** (sintetizado como modelo de esos NTPs) sí fue reconocido por la transcriptasa inversa del VIH cuando se emplea poli(rU:dA) como molde/cebador (al igual que ocurre con PMEODAPym-pp), lo que permite asumir que **1.60**, al igual que PMEODAPym-pp, se comporta como un mimético de adenina aunque es mucho menos potente que este último.
- Del ensayo de los compuestos como inhibidores de la replicación de virus ADN y ARN han surgido buenos “hits” frente a la replicación de diversos virus que merecen un posterior estudio y desarrollo como antivirales. Así, **1.15a** y **1.15b** mostraron buena actividad frente al virus chikungunya ($CE_{50} = 4$ y $7 \mu M$, respectivamente). El derivado **1.16b** fue activo frente al virus del herpes felino (FHSV; $CE_{50} = 1.9 \pm 0.2 \mu M$), y los dímeros **1.49** y **1.68** fueron buenos inhibidores del virus varicela zóster (VVZ; $CE_{50} = 6.0 \pm 0.1 \mu M$) y del citomegalovirus humano (CMVH; $CE_{50} = 7.31 \pm 1.29 \mu M$), respectivamente.
- Los compuestos **1.4a,b**, **1.15b**, **1.36**, **1.37**, **1.38**, **1.39** y **1.55** mostraron una buena actividad en distintas líneas tumorales, presentando una marcada tendencia hacia una mejor actividad citostática en los ensayos de proliferación frente a leucemia y células tumorales de linfomas que frente células tumorales de carcinomas sólidos (HeLa, PC3, CAKI-1). Finalmente, **1.4a,b**, **1.29**, **1.38** y **1.55** inhiben la transformación de los fibroblastos murinos C3H/3T3 por el virus del sarcoma murino de Moloney (VSM) siendo el análogo **1.4a,b** el derivado más potente ($CE_{50} = 13 \mu M$).

2. En el **segundo capítulo** se han sintetizado y evaluado, frente a un amplio panel de virus, aza-análogos (**2.27** y **2.28**) de PMEODAPym en los que se ha sustituido el anillo de 2,4-diaminopirimidina por un anillo de 2,4-diamino-1,3,5-triazina (PMEODAT).

- El derivado **2.27** es un potente inhibidor ($CE_{50} = 0.35-7.9 \mu\text{M}$) de la replicación del VIH-1, VIH-2, VHB, VSM y VVZ, mientras que **2.28** resultó inactivo lo que indica que la cadena tipo metoxietoxi presente en **2.27** es la longitud óptima entre el fosfonato y la nucleobase (DAT) para la actividad. **2.27** es mucho menos activo frente a virus ADN e inactivo frente a CMVH.
- El derivado **2.27** (PMEODAT) muestra un perfil biológico similar a PMEODAPym aunque es más selectivo desde el punto de vista de la aparición de potenciales efectos secundarios a concentraciones antivirales relevantes, ya que no induce la aparición de β -quimio/citoquinas.
- Estudios de modelado molecular con ambos compuestos PMEODAT y PMEODAPym nos llevan a proponer la hipótesis de que cuanto mayor es la capacidad de discriminación entre bases correcta o incorrectamente apareadas en el sitio activo menor será la sensibilidad de la ADN polimerasa a este tipo de compuestos.

3. Con el fin de comprender el modo de inhibición de la replicación del virus de la fiebre aftosa por parte de la 5-fluorouridina, en el **tercer capítulo** se han preparado nucleopéptidos como modelos simplificados de VPg tanto uridilados (**3.32**) como fluorouridilados (**3.33**) del virus y se ha llevado a cabo el estudio de los mismos en complejo con la polimerasa viral mediante técnicas de difracción de R-X.

- Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de 5-FUMP sobre la tirosina en posición 3 del cebador (VPg) da lugar a un gran cambio conformacional en el bucle $\beta 9-\alpha 1$ de la polimerasa viral que se desplaza unos 8 Å de la posición activa de la polimerasa, impidiendo así el correcto posicionamiento de la base aceptora del molde de ARN. De este modo, se bloquea el centro catalítico impidiendo la incorporación de un nuevo nucleótido a la cadena de ARN en crecimiento.
- Este modo de inhibición podría ser de utilidad para el diseño de fármacos antivirales frente a picornavirus aprovechando el hecho de que todos ellos utilizan distintas VPg como cebadores para la síntesis del ARN viral.

