Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas

Laboratorio de Síntesis Orgánica

TESIS DE LICENCIATURA:

“Síntesis de análogos de profármacos HepDirect acoplados a estavudina d4T”

Para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA:

Karen Areli Guarneros Cruz

ASESOR Y DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Silvano Cruz Gregorio

Puebla, Pue., marzo 2020

BUAP

OFICIO C.Q./CT 005A/2020

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno(a) de la Carrera de Químico Farmacobiólogo

KAREN ARELI GUARNEROS CRUZ

realizada en el área de Química orgánica, comunican a usted la autorización para su impresión del Trabajo de Tesis, con el siguiente título:

"Síntesis de análogos de profármacos HepDirect acoplados a estavudina d4T"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, el día 17 de febrero de 2020.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 17 de febrero de 2020

D.C. ROSA LUISA MEZA LEÓN

D.C. FERNANDO SARTILLO PISCIL

D.C. MARÍA DE GUADALUPE MUÑOZ ARENAS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA · FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS · 1578

c.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Silvano Cruz Gregorio contando con el apoyo económico por parte de CONACYT por el proyecto ***A1-S-24140*** *en el laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE COMPUESTOS…… 5

ABREVIATURAS……... 6

INTRODUCCIÓN…… 7

ANTECEDENTES……..... 9

Terapéutica antiviral contra el virus del VIH……..…….. 9

Análogos de profármacos derivados de nucleósidos…….. 11

Análogos de Profármacos HepDirect…….. 13

El efecto anomérico en análogos de profármacos HepDirect……. 15

Asignación de la configuración del átomo de P en fosfatos cíclicos de 6 miembros……. 23

OBJETIVOS…… 24

Objetivo General……. 24

Objetivos Particulares…… 24

DISCUSIÓN DE RESULTADOS……. 25

Propuesta retrosintética de análogos de profármacos HepDirect **41** a **44**…….. 25

Síntesis del precursor 2',3'-Didehidro-3'-desoxitimidina (d4T)…… 26

Síntesis de los 1,3-dioles **13** y **14** precursores de fosfatos análogos de profármacos HepDirect……. 33

Síntesis de profármacos análogos de profármacos HepDirect **41- 44**….. 34

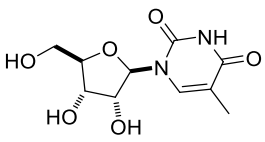
Reducción del doble enlace en C2'-C3' de los análogos de profármacos HepDirect **41b** y **42b**…….. 40

CONCLUSIONES…….. 42

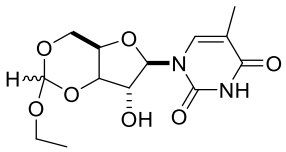
SECCIÓN EXPERIMENTAL…… 43

REFERENCIAS…….. 54

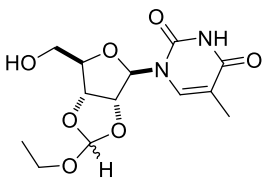
ÍNDICE DE COMPUESTOS



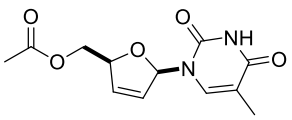
34



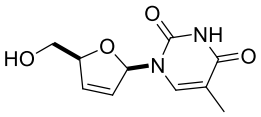
35



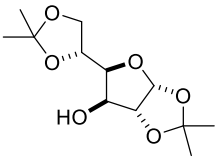
36



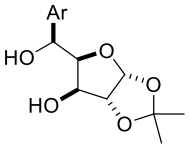
37



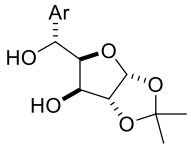
5



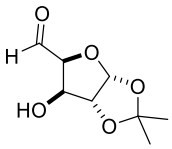
38



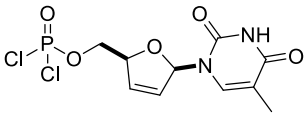
14b: Ar = *p*-F-Ph
14d: Ar = *p*-OMe-Ph



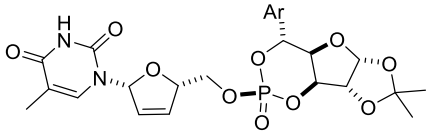
13b: Ar = *p*-F-Ph
13d: Ar = *p*-OMe-Ph



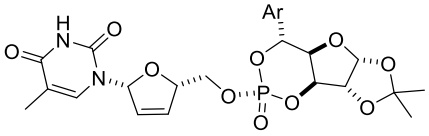
39



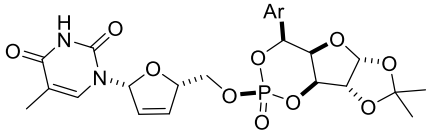
40



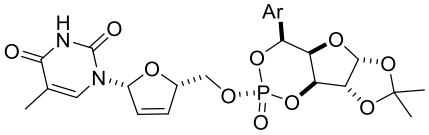
41b: Ar = *p*-F-Ph **41d:** Ar = *p*-OMe-Ph



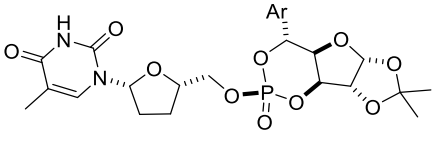
42b: Ar = *p*-F-Ph **42d:** Ar = *p*-OMe-Ph



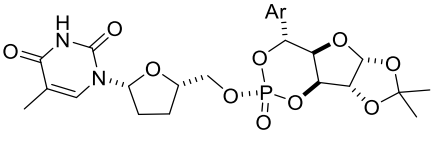
43: Ar = *p*-OMe-Ph



44: Ar = *p*-OMe-Ph



45: Ar = *p*-F-Ph



46: Ar = *p*-F-Ph

ABREVIATURAS

Ar	Arilo
AcoEt	Acetato de etilo
dd	doble de dobles
ddd	doble de doble de dobles
dt	doble de triples
c	cuádruple
CCF	Cromatografía en capa fina
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
D_2O	Óxido de deuterio
e^-	Electrones
HMBC	Correlación heteronuclear; de enlace múltiple
HSQC	Correlación heteronuclear; de cuántica simple
J	Constante de acoplamiento
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ^{31}P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo
s	simple
t	triple
t.a.	temperatura ambiente

INTRODUCCIÓN

El diseño y la modificación molecular de fármacos es una de las muchas aplicaciones que tiene la química orgánica, la cual consiste en tomar como origen a un compuesto químico de estructura y actividad biológica conocida; para sintetizar y ensayar a sus congéneres estructurales, homólogos o análogos.

Teniendo como objetivos principales el diseñar nuevos modelos de estructuras moleculares que posean propiedades biológicas superiores al compuesto y/o fármacos ya conocidos. Esto incluye el desarrollo de principios activos más selectivos, más estables, que no generen efectos tóxicos en el organismo y que no requieran de dosis elevadas para su administración.

Además, el modificar estructuralmente los principios activos contribuye a dilucidar como se relaciona la composición, estructura química, estereoquímica y muchas veces la conformación de un fármaco con su mecanismo de acción biológica. Principalmente de aquellos que son utilizados en la terapéutica de patologías graves para las cuales aún no se ha desarrollado una cura definitiva.[1]

Un claro ejemplo de una patología grave con un alto nivel de mortalidad es el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) el cual constituye la etapa crítica de la infección causada por el virus de inmunodeficiencia Humana (VIH). El portador del VIH posee un sistema inmunológico incapaz de reponer los linfocitos T $CD4^+$ que pierde bajo el ataque del virus haciéndolo susceptible a infecciones oportunistas.

A pesar de que en los últimos años ha aumentado la información acerca del VIH y sus formas de infección, la epidemia del SIDA sigue siendo un grave problema de salud pública en todo el mundo. Desde los primeros casos presentados en 1981, aproximadamente 60 millones de personas han visto infectadas por el virus de las cuales cerca de 20 millones han muerto.[2]

Desde la identificación del VIH como el agente causal del SIDA en 1983, el desarrollo de terapias selectivas dirigidas al VIH ha representado uno de los desafíos más extenuantes de la comunidad científica.[3] Dado que la proliferación del virus es dependiente de la maquinaria celular, no se puede erradicar al virus sin generar también un daño a la célula hospedera.

Actualmente, los antivirales empleados en la terapéutica contra el VIH funcionan alterando alguna de las etapas en el proceso de replicación. De manera que pueden inhibir la adhesión del virus a la membrana celular (p.ej. enfuvirtide) o inhibir la actividad de enzimas participantes; la retro-transcriptasa (p.ej. zidovudina), integrasa (p.ej. raltegravir) o la proteasa (p.ej. fosamprenavir) (*Figura 1*).[4]

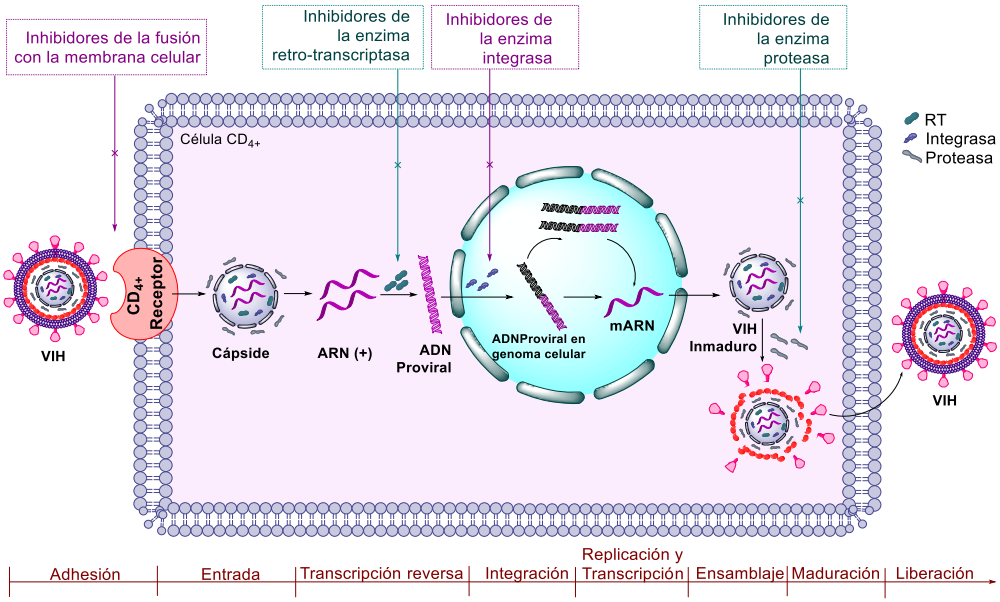


Figura 1. *Sitios diana de acción de antivirales en el proceso de replicación del VIH.*

La potente terapia combinatoria de medicamentos contra el VIH dirigida a diferentes etapas en el ciclo de vida del virus ha tenido un éxito considerable en el control de la infección por VIH. Sin embargo, aún existen problemáticas como la aparición de cepas del VIH ampliamente resistente y los efectos adversos (poca tolerabilidad, interacciones entre medicamentos, toxicidades) debido a que los tratamientos son de larga duración.

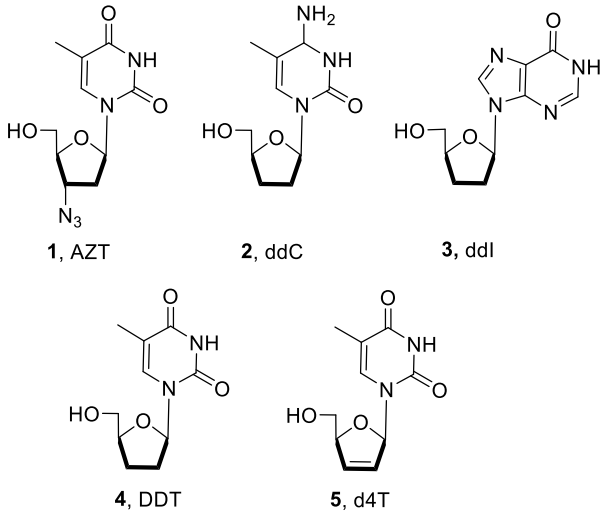
Por tal motivo, existe una necesidad inminente de nuevos candidatos a fármacos contra el VIH con mayor potencia, propiedades farmacocinéticas mejoradas y efectos secundarios reducidos.[5]

ANTECEDENTES

Terapéutica antiviral contra el virus del VIH

En la actualidad, la enzima retro-transcriptasa (RT) es la diana terapéutica principal en el tratamiento de infecciones por VIH. El bloqueo de su actividad ocasiona la interrupción del elongamiento de la cadena de ADN proviral y en consecuencia la replicación del virus.[6]

Los únicos fármacos inhibidores de la enzima retro-transcriptasa que han demostrado tener beneficios clínicos en pacientes VIH (+) son los análogos de los 2',3'-didesoxinucleósidos (ddN). Dentro de los ddN más significativos se encuentran: la 3'-azido-3'-deoxitimidina **1** (zidovudina, AZT), la 2',3'-dideoxicitidina **2** (zalcitabina, ddC), la 2',3'-dideoxiinosina **3** (didanosina, ddI), la 3'-deoxitimidina **4** (ddT) y la 2',3'-didehidro-3'-deoxitimidina **5** (estavudina, d4T), (*Esquema 1).*[7]



Esquema 1. *Principales análogos de nucleósidos empleados en la terapéutica de las infecciones por VIH.*

Los ddN son inhibidores competitivos de la enzima RT al contender por su unión al sitio activo de la enzima con los 2'-deoxinucleosidos-5'-trifosfatos (dNTP) endógenos. Para este fin, los ddN necesitan ser activados por diferentes enzimas quinas intracelulares (EK) mediante una reacción de fosforilación a sus derivados mono, di y trifosfato. Los ddN-5'-trifosfatos (ddNTP) son incorporados a la cadena emergente de ADN por la enzima RT. Su incorporación provoca la terminación prematura la elongación del ADN debido a la ausencia del grupo

hidroxilo en C3' en los ddNTP que impide la formación del enlace fosfodiéster con otro dNTP. Impidiendo así la síntesis del ADN viral y en consecuencia la replicación del virus (*Figura 2*).

Sin embargo, la fosforilación de los ddN a sus correspondientes ddN-5'-monofosfato (ddNMP) se ve limitada debido a la poca afinidad de estos a la enzima nucleósido quinasa (*Figura 2a*). La transición lenta de los ddN a sus derivados fosfato provoca que se degraden y/o biotransformen en compuestos no deseados, generando efectos adversos en los pacientes al producir metabolitos tóxicos.[8]

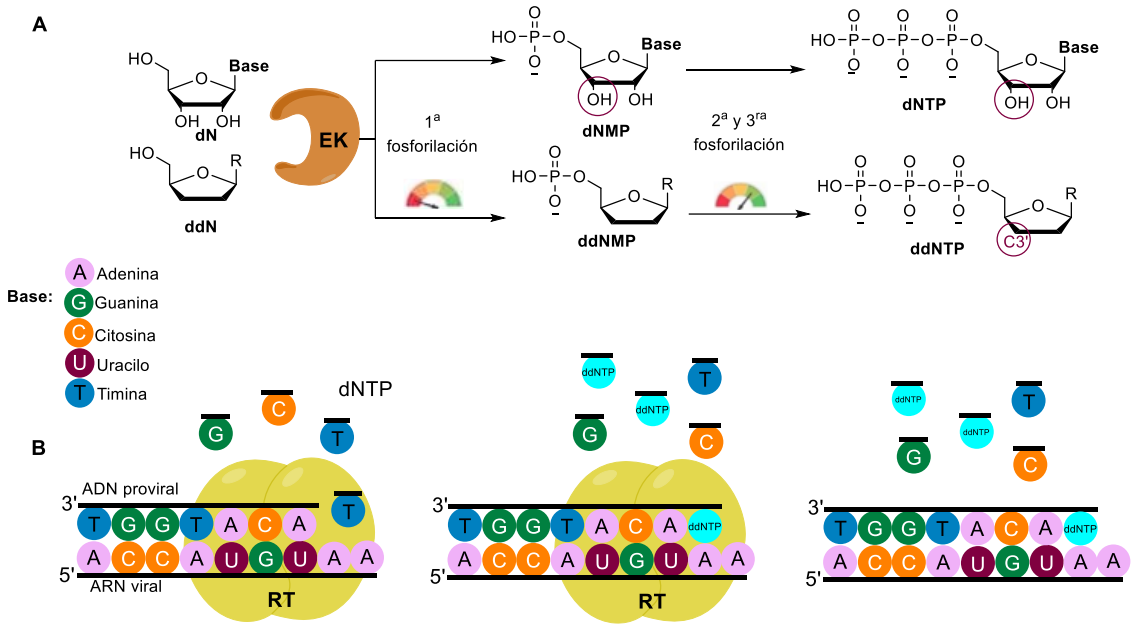


Figura 2. *a) Transformación de los ddN y desoxinucleótidos dN por enzimas nucleósido quinasas (EK) a sus derivados trifosfatos (dNTP, ddNTP). b) Retro-transcripción del ARN viral a ADN proviral por la enzima RT interrumpido por la incorporación de ddNTP.*

Ejemplo de ello es el AZT **1**, el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del VIH. El AZT genera alta toxicidad en los pacientes debido a la acumulación intracelular de su derivado monofosfato el cual induce una severa inhibición de la EK que lo transforma a su producto difosfato. Al no poder seguir fosforilandose, el AZT monofosfato es transformado por la célula al metabolito toxico 3'-amino-3'-deoxitimidina. Razón por lo cual a menudo se interrumpe el uso del AZT en el tratamiento en pacientes con VIH.

En 1987, se identificó al nucleósido estavudina (d4T, **5**) como un nucleósido potente contra el VIH con actividad comparable a AZT y con menor

actividad toxica. Al parecer, el derivado monofosfato de la d4T (D4T-MP) no inhibe las fosforilaciones posteriores del nucleósido. [9] Dado que D4T-MP no se acumula intracelularmente la estavudina resulta un mejor candidato en la terapia contra el VIH. Sin embargo, su transformación al derivado monofosfato es más lenta que la del AZT por lo que genera toxicidad en los pacientes con VIH.

En consecuencia, el uso de terapias combinatorias de uno o más ddN con otros antirretrovirales es necesario para controlar la infección por VIH. Por lo que resulta imperativo la búsqueda de nuevas propuestas para mejorar la terapéutica ante este virus.[10]

Análogos de profármacos derivados de nucleósidos.

Durante mucho tiempo el diseño de nuevos análogos de nucleósidos con actividad antiviral ha basado en modificaciones en la base o el azúcar. Al ser identificada la primera fosforilación como la reacción limitante en el proceso de activación de los ddN,[11] los esfuerzos se orientaron hacia la preparación de análogos de ddN monofosfatados los cuales serían capaces de atravesar membranas celulares de una manera eficaz comparado con su respectivo ddN libre.

La introducción del nucleósidos mono, di o tri-fosfatos libres no eran considerados una opción farmacológica viable, debido a su escasa estabilidad y alta polaridad que imposibilita su paso a través de membranas celulares. Trasladando entonces el trabajo de diversos grupos de investigación a la síntesis de nucleósidos monofosfatos “protegidos”. Estos profármacos de nucleótidos protegidos son diseñados para optimizar el paso por membranas celulares permitiendo la localización del profármaco en la célula o tejido afectado. Una vez internados en la célula, la desprotección del nucleótido puede transcurrir mediante una escisión química o enzimática seguida de las subsecuentes reacciones de fosforilación para la obtención del nucleósido activo trifosfato (*Figura 3*).

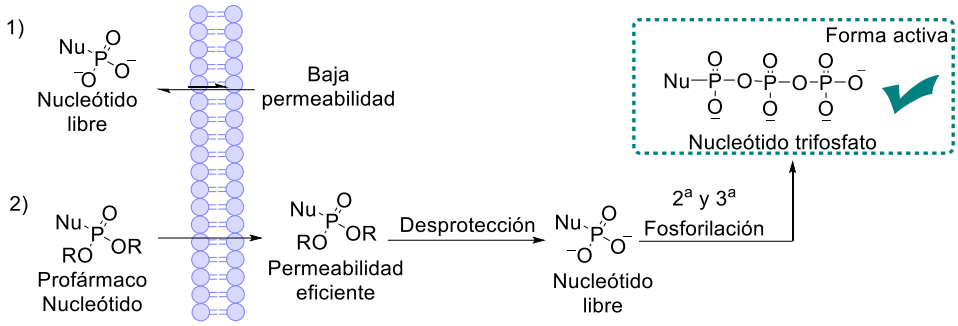


Figura 3. *1) Permeabilidad de un nucleótido libre. 2) Permeabilidad de profármacos de nucleótidos protegidos a través de membranas celulares.*

Durante los últimos 20 años, se han desarrollado diferentes estrategias que permiten la administración intracelular de análogos de nucleótidos protegidos. Los cuales no solo ha demostrado mejorar la actividad de los nucleósidos, sino también generaron compuestos potentes que de otro modo estarían inactivos en su forma de nucleósidos debido a la falta de monofosforilación.

Las diversas estrategias desarrolladas hasta la fecha incluyen: la formación de fosforamidatos que poseen un grupo aromático, un fragmento éster de aminoácido y el nucleósido unido al átomo de fósforo (Pro Tide);[12] la incorporación de grupos protectores tipo POM o POC sobre el monofosfato de nucleósido (*Figura 4*) o el uso de alcoholes salicílicos para enmascarar el grupo funcional fosfato de un nucleósido monofosfato (*cycloSal*).[13]

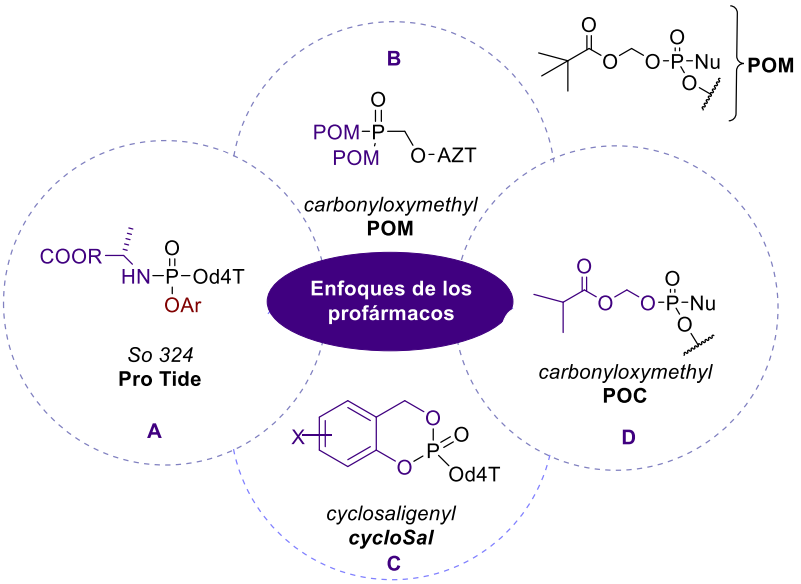


Figura 4. *Estrategias utilizadas en la síntesis de profármacos de nucleósidos.*

Estas estrategias de fosforilación han sido aplicadas en el desarrollo de profármacos para tratar infecciones por VIH y han conseguido mejorar la función biológica del nucleósido *in vitro*. Sin embargo, el mecanismo de escisión que dirige a estos profármacos se basa en el hidrólisis del fosfatoéster a causa de su inestabilidad a un respectivo pH o mediante la acción de enzimas. Lo que los vuelve susceptibles a su paso por el estómago (pH = 1) y a enzimas inespecíficas ampliamente distribuidas en el organismo.[8-9]

Análogos de Profármacos HepDirect

Pese al progreso realizado al sintetizar profármacos de nucleósidos que prescindieran de la quinasa para su primera activación. Una nueva problemática era afrontada; la dependencia que presentan los profármacos a su escisión por enzimas esterasas, las cuales efectúan su rápida descomposición en la sangre y casi todos los tejidos del cuerpo.

Las esterasas consiguen interaccionar con el profármaco de nucleósido formando un intermediario monoácido y/o liberando directamente al nucleósido monofosfato (NMP). En ambos casos, la membrana celular resulta ser poco permeable a los compuestos formados y son fácilmente hidrolizados por esterasas más específicas al nucleósido correspondiente. La descomposición prematura del profármaco fuera de la célula diana disminuye la concentración intracelular del NMP y en consecuencia la producción del nucleósido activo trifosfato (NTP) ya que éste depende nuevamente de la activación lenta del nucleósido (*Figura 5*).[14]

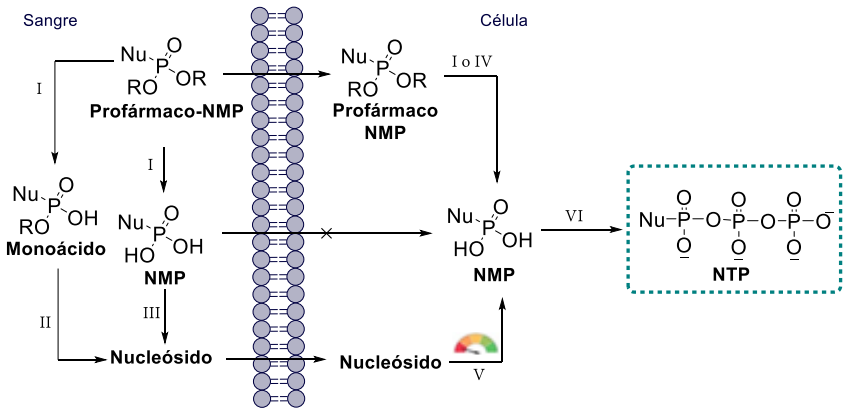


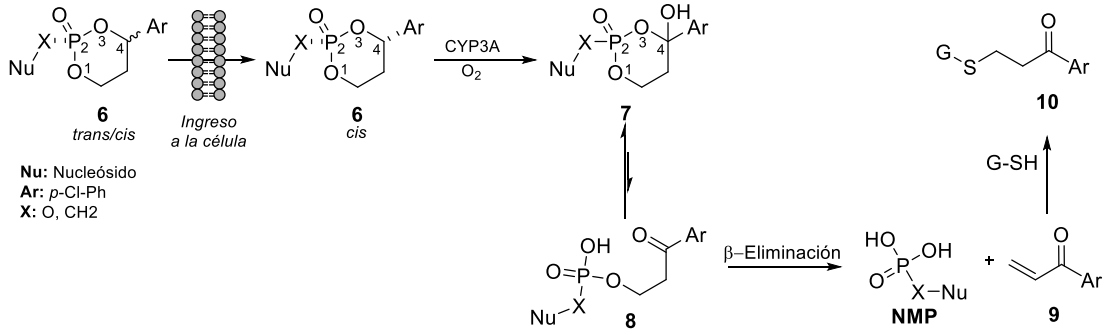
Figura 5. *Rutas de escisión posibles del profármaco de nucleótido protegido (NMP-profármaco). Enzimas que catalizan cada proceso; I) Esterasa, II) Fosfodiesterasa, III) Fosfatasa, IV) CYP3A, V) Nucleósido quinasa, VI) Nucleótido quinasa.*

En ese sentido, Erion y colaboradores reportaron en 2004 el diseño y síntesis de una nueva clase de profármacos a los que denominaron HepDirect. Los cuales son fosfatoésteres cíclicos 1,3-propanilo C4 aril sustituidos que presentan una predilección a la escisión oxidativa por enzimas pertenecientes al citocromo P_{450} (CYP_{450}); enzimas expresadas predominantemente en el hígado e intestino.

La afinidad de los profármacos HepDirect a enzimas de la subfamilia 3A del CYP_{450} resulta de interés biológico puesto que brinda un efecto de protección metabólica a los profármacos análogos HepDirect hasta su paso por hígado o intestino donde el profármaco es oxidado.

Estudios mecanísticos planteados por este grupo de investigación, sugieren que la liberación del NMP ocurre vía la oxidación mediada por el CYP3A en la posición bencilica del profármaco **6** al compuesto hidroxilado **7** el cual al encontrarse en equilibrio con su forma acíclica **8** favorece una reacción espontánea de β-eliminación que libera al NMP y a un subproducto cetoolefínico **9** (*Esquema 2*).

Sin embargo, observaron que al someter a ensayos biológicos a los diasteroisómeros del profármaco HepDirect **6**, la conversión del profármaco por acción del CYP3A al derivado hidroxilado **7** era dependiente de la estereoquímica relativa *cis* entre el grupo arilo en C4 y el nucleósido unido al átomo de fosforo (*Esquema 2*).



Esquema 2. *Mecanismo de escisión de profármacos HepDirect.*

Además, fue señalado que el equilibrio presente entre el compuesto hidroxilado **7** y el monoácido acíclico **8** se ve favorecido hacia el fosfato cíclico **7** promoviendo que la reacción de β-eliminación sea relativamente lenta. De esta

manera **7** puede emigrar de la célula y ser distribuido a otros tejidos afectados para llevar a cabo la liberación del NMP.

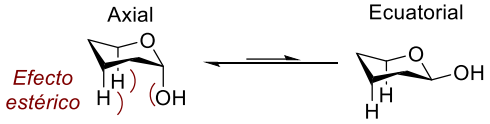
Adicionalmente se menciona que el metabolito arilvinilcetona **9** formado en la β-Eliminación es inactivado mediante una reacción de conjugación catalizada por la enzima glutatión transferasa generando al compuesto **10**, el cual puede ser depurado por el organismo sin generar algún efecto adverso (*Esquema 2*).

La estrategia mostrada por el grupo de Erion resulta ser una alternativa factible para el diseño y síntesis de nuevos profármacos. Debido a que la escisión de los profármacos HepDirect es dependiente de la oxidación por enzimas del CYP_{450}, su estabilidad se ve incrementada favoreciendo su distribución a otros tejidos afectados y sin producir metabolitos tóxicos.

El efecto anomérico en análogos de profármacos HepDirect

Las observaciones realizadas por el grupo de Erion sugieren que, el potencial biológico de los profármacos HepDirect se debe a la incorporación *cis* del grupo arilo en C4 que favorece la escisión oxidativa por el CYP3A. Sin embargo, aportaciones realizadas por nuestro grupo de investigación sobre el estudio conformacional y configuracional de fosfatos cíclicos de seis miembros proponen la influencia adicional de un efecto estereoelectrónico (efecto anomérico) en la escisión de análogos de profármacos HepDirect.

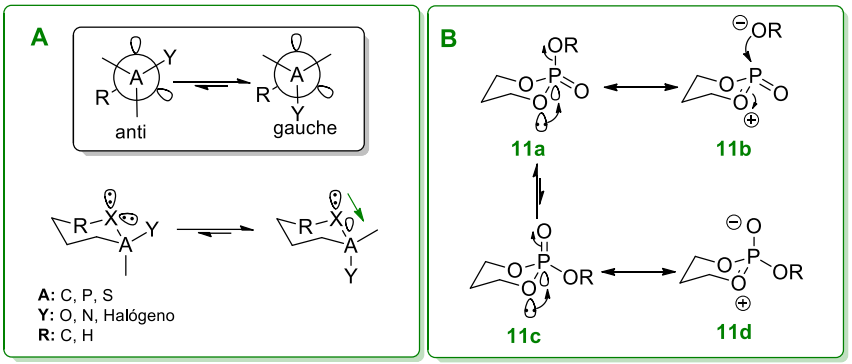
El efecto anomérico fue considerado en un principio como la tendencia de un sustituyente electronegativo unido al carbono anomérico a asumir la posición axial antes que la orientación ecuatorial en la conformación silla de anillos de piranosas de carbohidratos a pesar del efecto estérico que habría de desestabilizar dicha conformación (*Esquema 3*).[15]



Esquema 3. *Efecto anomérico en piranosas de carbohidratos.*

Sin embargo, este concepto fue generalizado debido a que su aplicación no se limita a los carbohidratos. Redefiniendo al "efecto anomérico" como a la preferencia de la conformación alternada *sinclinal* (gauche) sobre la

conformación *antiperiplanar* (anti) en los segmentos **R**-**X**-**A**-**Y**; donde **A** es un elemento de electronegatividad intermedia (p. ej.; C, P, S), **Y** muestra un átomo más electronegativo que **A** (p. ej.; O, N o halógeno), **X** denota un elemento con pares de e^- libres, y **R** representa a un C o H (*Esquema 4A*).[15,16]



Esquema 4. *Efecto anomérico generalizado (A) y efecto anomérico determinando la conformación de fosfatoésteres cíclicos de seis miembros (B).*

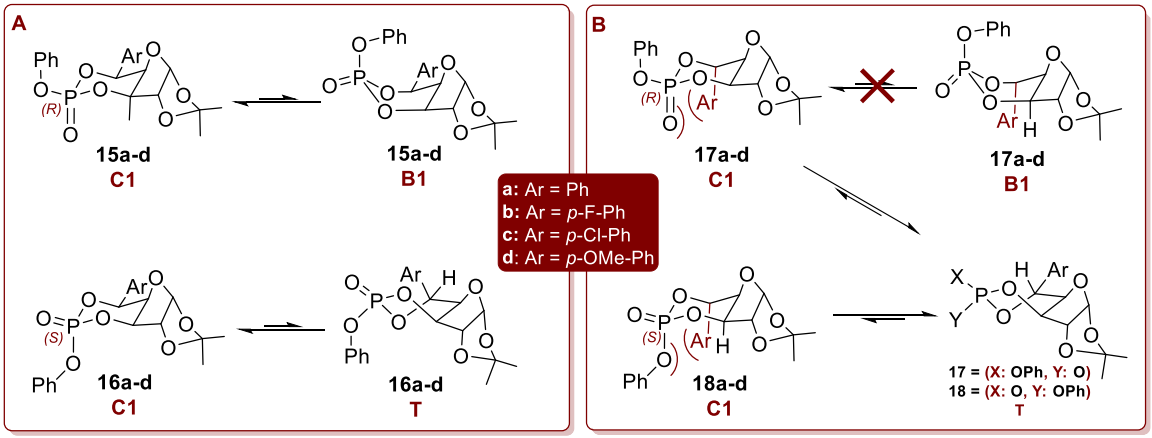
Estudios teóricos han enfatizado que la principal contribución a estas diferencias conformacionales consiste en la interacción estabilizadora de dos-electrones-dos-orbitales en estado fundamental en el confórmero *gauche*. El efecto estereoelectrónico (hiperconjugación) se presenta por la interacción del par electrónico no compartido del heteroátomo **X** y el orbital sigma de antienlace (σ*) del sustituyente orientado en la posición axial ($n_X \rightarrow \sigma^*_Y$).

De modo que el efecto anomérico es evidente en sistemas acíclicos y en sistemas heterocíclicos de seis miembros como son los fosfatoésteres. Donde el efecto estereoelectrónico ($n_{O3} \rightarrow \sigma^*_{P-OR}$) orienta al sustituyente unido a fósforo en posición axial (**11a**) permitiendo estabilizar la conformación silla. Aunque también se sugiere que el epímero **11c** presenta un efecto anomérico menor al realizar la hiperconjugación entre orbitales de no enlace O3 y π* ($n_{O3} \rightarrow \pi^*_{P=O}$), una opción viable debido la orientación de los orbitales que permiten se combinen de manera efectiva (Esquema 4B).[10-11]

En ese sentido nuestro grupo de investigación en 2009, se dieron a la tarea de estudiar a los modelos de fosfatos cíclicos 4-aril sustituidos derivados de D-xilofuranosa, con el objetivo principal de encontrar evidencia acerca de cómo la conformación y el efecto anomérico influye en el mecanismo de escisión en los profármacos HepDirect. Resultados muy interesantes fueron reportados

en este trabajo de los cuales destaca la asignación de la configuración de los estereocentros (P y C4) que fue determinada mediante análisis de RMN ^{1}H, ^{31}P con base en valores de constantes de acoplamientos vecinales $^{3}J_{H5\text{-}P}$ y estudios de difracción de rayos X.[17]

Asimismo, la determinación de los equilibrios conformacionales silla-bote existentes en los 1,3,2-dioxafosforinanos sintetizados. Estableciendo para los fosfatos **15a-d** una configuración en fosforo P_R y un equilibrio silla- bote (**C1**↔ **B1**). Mientras que a sus epímeros **16a-d** (P_S) presentan un equilibrio silla-bote torcido **C1**↔**T** (*Esquema 5a*). Relación que no comparten los diasteroisómeros **17a-d** y **18a-d** los cuales poseen el sustituyente arilo orientado en posición axial. Ambos epímeros en P (*R* y *S*) poseen un equilibrio conformacional **C1**↔**T**, favorecido hacia la conformación bote torcido que orienta a los sustituyentes voluminosos (fenóxido y Arilo) lo más alejados posible entre sí (*Esquema 5b*).

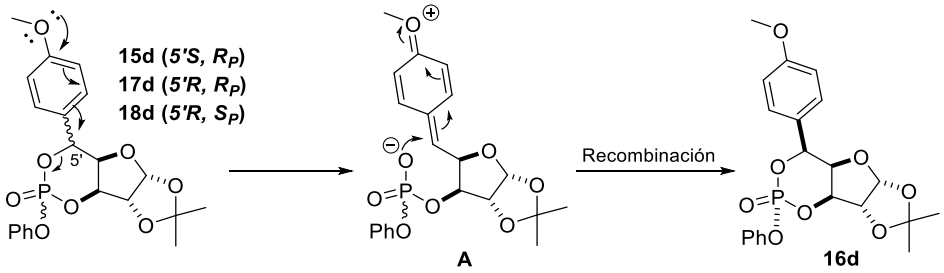


Esquema 5. *Equilibrios conformacionales silla no silla de los fosfoésteres cíclicos de seis miembros.*

Conjuntamente, otro hecho aún más interesante se presentó al llevar a cabo la síntesis de los fosfatos **15d**, **16d**, **17d** y **18d** los cuales presentan al sustituyente *p*-metoxifenil (un grupo electrodonador) en C5' (C4 del fosfato). Puesto que todos los fosfatoésteres esperados eran observados en RMN de ^{1}H y ^{31}P, pero al intentar purificar solo el fosfato cíclico **16d** era recuperado.

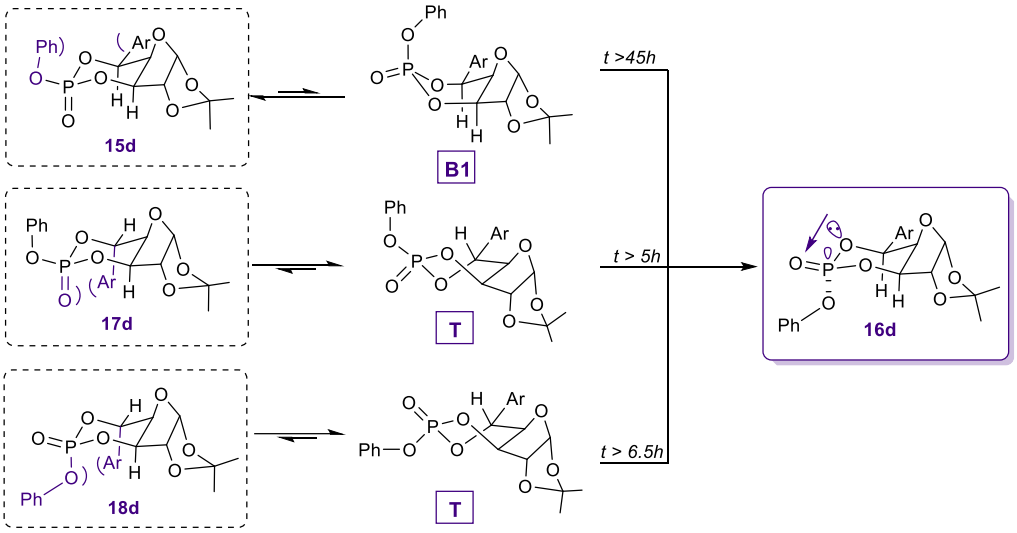
Este hecho se pudo explicar al proponer una conversión espontánea de los fosfatos **15d**, **17d** y **18d** al diasteroisómero **16d**. Dicha conversión involucraba necesariamente la ruptura del enlace C4-O3 en el anillo fosforinano para llevar a cabo la isomerización de los dos centros estereogénicos. Se sugirió que la transformación espontanea de **15d**, **17d** y **18d** presentaba un intermediario en

común **A**. Este intermediario surgía debido a la deslocalización del par electrónico del *p*-metoxifenilo, para recombinarse y generar al confórmero más estable **16d** (*Esquema 6*).



Esquema 6. *Mecanismo propuesto para la conversión de los fosfatos cíclicos* ***15d****,* ***17d*** *y* ***18d*** *en su isómero más estable* ***16d****.*

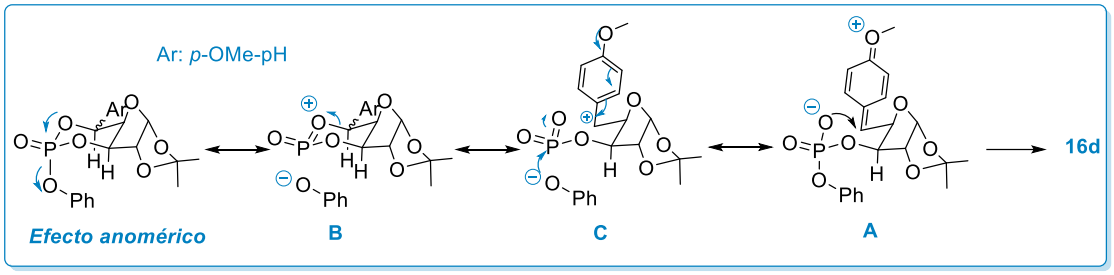
Como se mencionó anteriormente, el fosfato cíclico **16d** presenta una conformación silla **C1** estabilizado por el efecto anomérico presente ($n_{O3} \rightarrow \sigma^*_{P-OR}$). También orienta al grupo fenóxido en la posición axial asociado a la orientación ecuatorial del grupo arilo en C4 que reduce las interacciones estéricas considerablemente (*Esquema 7*).



Esquema 7. *Conversión espontanea de los fosfatoésteres* ***15d****,****17d*** *y* ***18d*** *a su respectivo isómero* ***16d****.*

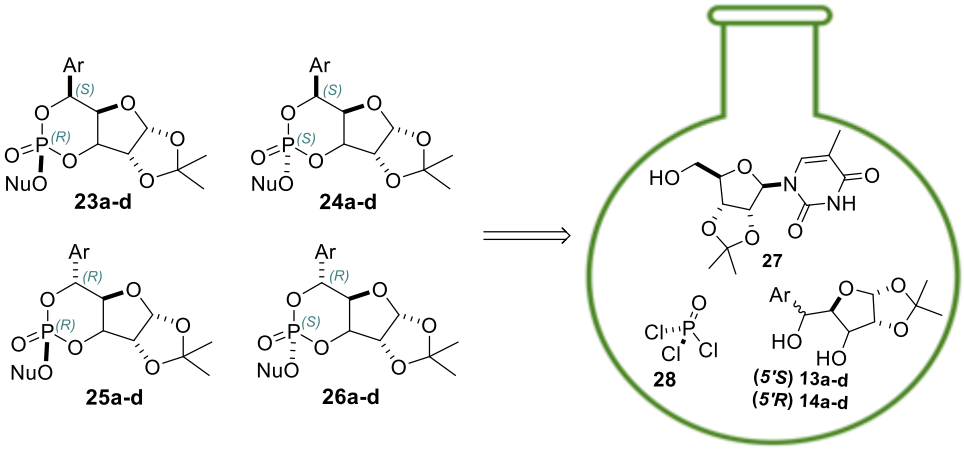
Al observar que las conformaciones de los fosfatos cíclicos eran determinantes en los tiempos de conversión a **16d**. Resultaba evidente que la deslocalización del par electrónico del oxígeno en el *p*-metoxifenilo no era el único efecto responsable de la isomerización en C4. Por consiguiente, se plantea que el efecto anomérico lleva a cabo un rol importante en la debilitación del enlace C4-O3 de los fosfatos **15d**, **17d** y **18d**.

Anteriormente, fue descrito que el efecto anomérico en fosfatos cíclicos de 6 miembros puede llevarse a cabo de dos maneras, por la interacción ($n_{O3} \rightarrow \sigma^*_{P-OR}$) o ($n_{O3} \rightarrow \pi^*_{P=O}$) (*ver Esquema 4*). Por consiguiente, la ruptura del enlace C4-O3 se ve favorecida por la contribución del mesómero **B** que conduce a la formación del carbocatión bencílico **C** el cual es estabilizado por resonancia. Por esta razón, era necesario plantear la formación de dichos mesómeros (**B**, **C**, **D**) para explicar la transformación de los diversos fosfatos cíclicos al intermediario común antes planteado **A** (*Esquema 8*).



Esquema 8. *Debilitamiento del enlace C4-O3 en los fosfatos cíclicos* ***15d****,* ***17d*** *y* ***18d*** *para la formación del mesómero* ***A*** *y posterior recombinación al isómero* ***16d****.*

Con estas observaciones nuestro grupo de investigación para 2010 enfocaba el estudio conformacional a los análogos de profármacos HepDirect al incorporar al modelo antes estudiado un sustituyente nucleósido (Nu) al átomo de fosforo en lugar del grupo fenóxido. Por lo que partiendo de la 5-metiluridina protegida **27** y mediante una reacción de tres componentes fueron sintetizaron a los análogos de profármacos HepDirect **23a-d** y **26a-d** (*Esquema 9*).[18]



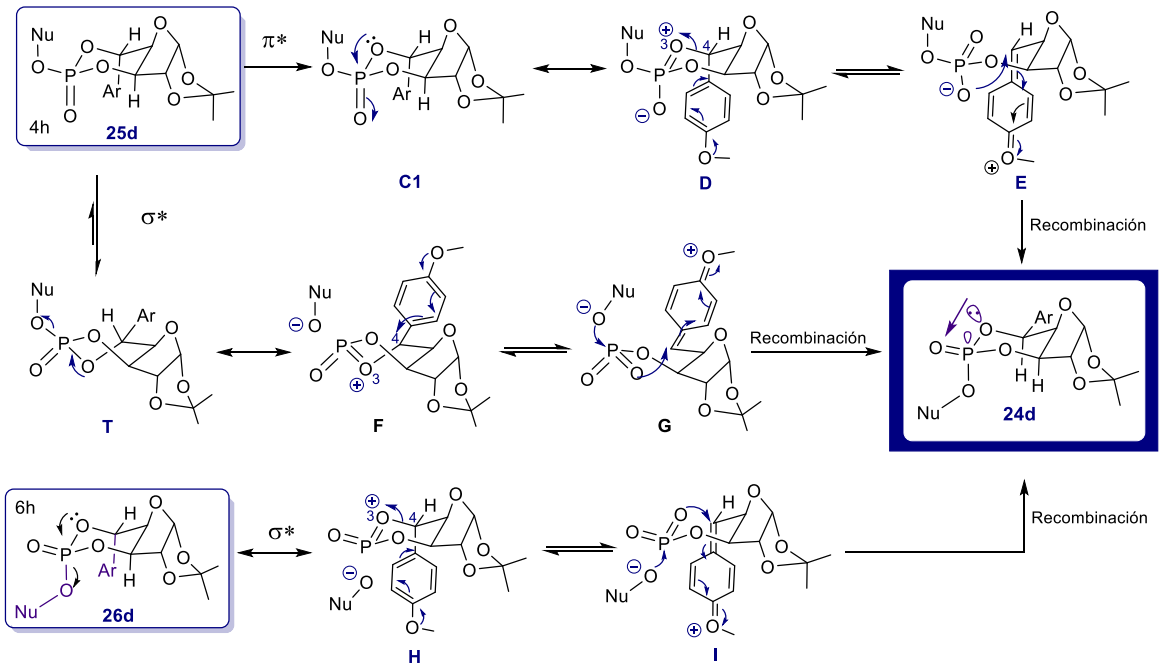
Esquema 9. *Ruta retrosintética para la obtención de análogos de profármacos HepDirect* ***23-26****.*

Aparentemente no ocurren cambios conformacionales significativos al cambiar el sustituyente fenóxido por el nucleósido **27.** Los mismos equilibrios

silla-bote determinados para los fosfatos cíclicos **15a-d** a **18a-d** son observados en los análogos de profármacos **23a-d** a **26a-d**.

De esta manera, al igual que los diasteroisómeros **15d-18d** cuyo sustituyente arilo en C4 era el *p*-metoxifenilo, se esperaba la conversión espontanea de los fosfatos cíclicos **25d** y **26d** al profármaco más estable **24d**. El cual orienta al arilo en posición ecuatorial y al grupo nucleósido axial; estabilizando su conformación por el efecto anomérico ($n_{O3} \rightarrow \sigma^*_{P-ONu}$) y la ausencia de interacciones estéricas presentes.

Al analizar los crudos de reacción ciertamente fue determinado que los isómeros **25d** y **26d** eran selectivamente transformados al diasteroisómero más estable **24d** en un tiempo de 4h y 6h respectivamente. A pesar que en **25d** dos centros estereogénicos son los que se isomerizan (P y C4) y en **26d** solo un centro es invertido (C4) la conversión de **25d** es más rápida; debido a que el proceso de isomerización sigue dos rutas; la σ* y la π* mientras **26d** solo se dirige vía la interacción σ* (*Esquema 10*).

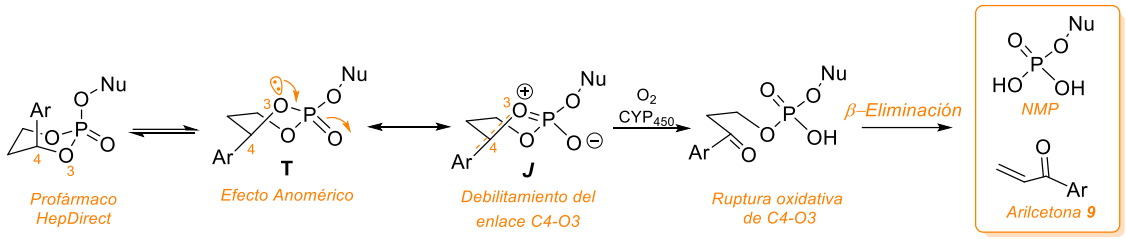


Esquema 10. *Isomerización espontánea de los fosfatoésteres* ***25d*** *y* ***26d*** *a* ***24d.***

Con estas evidencias, nuestro grupo de investigación demostró que la isomerización en C4 en los análogos de profármacos HepDirect ocurre a través de la ruptura selectiva del enlace C3-O4 en el fosfato cíclico. La cual es favorecida por la conformación y el efecto anomérico. La siguiente pregunta a

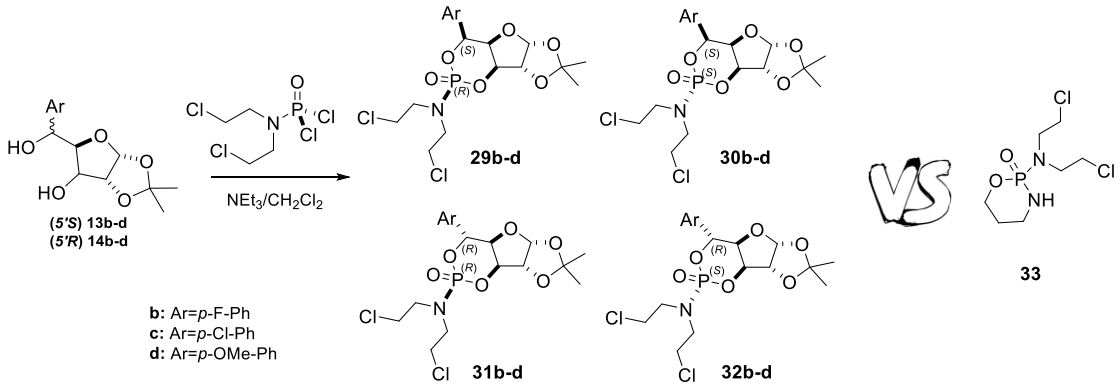
contestar era si dichas interacciones estereoelectrónicas tenían alguna influencia en el mecanismo de escisión de los profármacos HepDirect a nivel biológico.

Como anteriormente se ha mencionado, el mecanismo de escisión propuesto para los profármacos HepDirect involucra la oxidación selectiva del C4 por el CYP_{450} para la formación del hidroxilado **7**. Seguida de la ruptura del enlace C4-O3 para acceder al monoácido acíclico **8** (*Ver esquema 2*). Según lo planteado, la influencia del efecto anomérico yacería en el debilitamiento del enlace C4-O3 al formar al mesómero **J**, que favorece su ruptura al ser oxidado por el CYP_{450} y libera al NMP después de la β- eliminación (*Esquema 11*).[19]



Esquema 11. *Efecto anomérico propuesto en la escisión de profármacos HepDirect.*

A fin de comprobar dicha suposición en 2014 nuestro grupo se dio a la tarea de sintetizar a los análogos de 2-amino-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinanos derivados de la xilofuranosa **29b-d** a **32b-d** (*Esquema 12*). Con el fin de realizar el análisis conformacional correspondiente y evaluar su actividad mutagénica mediante ensayos biológicos.



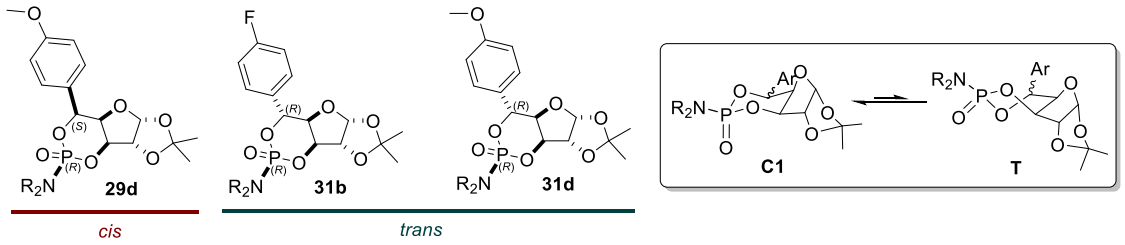
Esquema 12. *Síntesis de análogos de fosforamidatos* ***29-32****.*

De acuerdo al mecanismo de escisión propuesto, los análogos sintetizados liberarían como producto final un agente mostaza. El cual sería producto de la activación enzimática (CYP_{450}) o del efecto anomérico presente. Por esta razón los ensayos biológicos en presencia y ausencia de la activación

enzimática fueron empleados para conocer el potencial mutagénico de cada compuesto usando como mutagénico de cotejo a la ciclofosfamida **33**.

En dicho trabajo fue reportado que los fosforamidatos que presentaron actividad mutagénica en presencia de actividad enzimática, comparable y en algunos casos mayor que la ciclofosfamida fueron los compuestos **29d**, **31b** y **31d**. Sin embargo, datos interesantes fueron mostrados por el análogo HepDirect **29d** el cual no solo mostraba una mayor actividad mutagénica que **33** a menores concentraciones, sino que mostraba ese mismo comportamiento aun sin la presencia de activación enzimática.

Al analizar las estructuras de dichos heterociclos fue destacable que todas mostraban un equilibrio conformacional **C1↔T** (con una conformación silla dominante) y una configuración en fósforo R_P. De acuerdo a lo planteado por el grupo de Erion; la escisión de los profármacos es dependiente en gran medida de la relación *cis* entre los sustituyentes en C4 y en fosforo. Lo cual concuerda para el compuesto **29d** pero no para **31b** ni **31d** que guardan una relación *trans* entre sus sustituyentes y también presentaron una actividad mutagénica comparable a la de **33**. (*Esquema 13*).



Esquema 13. *Análogos que presentan actividad mutagénica.*

En consecuencia, al análisis conformacional y configuracional realizado nuestro grupo de investigación revela que el equilibrio **C1↔T** presentado en los análogos de profármacos HepDirect sintetizados, permite la escisión del enlace C4-O3 a causa no solo de la acción del CYP_{450} sino también al debilitamiento del enlace causado por el efecto anomérico.

Asignación de la configuración del átomo de Fósforo (P) en fosfatos cíclicos de 6 miembros.

Ha sido demostrado que la actividad biológica de fosfatos cíclicos de seis miembros depende de la conformación y la configuración del átomo de fósforo. Por lo cual, la correcta asignación de la configuración absoluta del átomo de P resulta de vital importancia al sintetizar profármacos cíclicos.

Una de las mejores formas de monitorizar los equilibrios conformacionales específicos es mediante el análisis de la estereoespecificidad bien conocida entre el valor de constante de acoplamiento vecinal $^{3}J_{H\text{-}P}$ y su ángulo diédrico.[20]

En el presente trabajo la asignación del átomo de P en fosfatos cíclicos de 6 miembros se llevó a cabo mediante el uso del criterio de Gorenstein y apoyados en estudios de difracción de rayos X previamente realizados por nuestro grupo de investigación.

El criterio de Gorenstein es un criterio utilizado para la asignación de la configuración absoluta del átomo de P con base al desplazamiento químico de las señales correspondientes a los epímeros en RMN ^{31}P. Desplazando a campo alto a los fosfatoésteres que orientan al sustituyente OR en posición axial **L** (conformación gauche) asignando una configuración S_P y a campo bajo el fosfato cíclico que orienta al grupo OR en posición ecuatorial **K** (conformación anti) con una configuración absoluta R_P. Cabe destacar que esta asignación es aplicable a fosfatoésteres cíclicos que presentan una conformación predominante silla (*Figura 6*).[21]

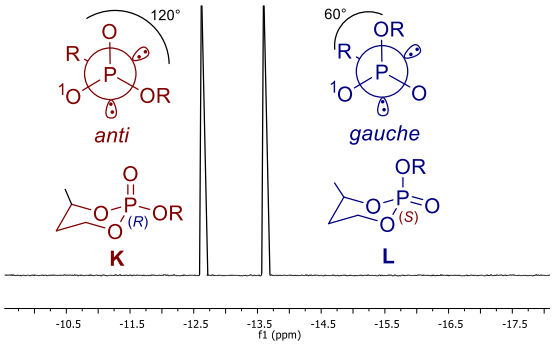


Figura 6. *Desplazamiento de las señales en RMN ^{31}P en base a la conformación anti o gauche.*

OBJETIVOS

Con base en los antecedentes presentados, nos planteamos la síntesis de los análogos de profármacos de HepDirect derivados de D-xilofuranosa. Con la finalidad de ofrecer nuevos ejemplos de potenciales profármacos para el tratamiento de enfermedades virales.

Objetivo General

- Sintetizar análogos de profármacos HepDirect **41-46** procedentes del antiviral estavudina **5** y 3'-deoxitimidina **4** acoplados a derivados de xilofuranosas.

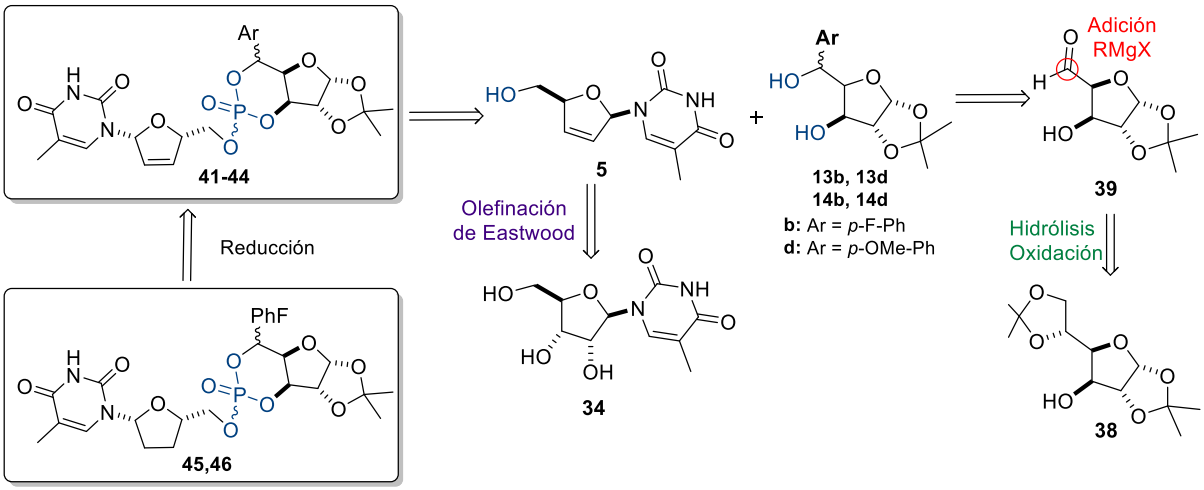
Objetivos Particulares

- Sintetizar a los precursores estavudina **5** y 3'-deoxitimidina **4** a partir de la 5MU **37**.
- Llevar a cabo el acoplamiento de tres componentes que conduzca a la formación de análogos de profármacos HepDirect.
- Realizar la caracterización por RMN ^{1}H, ^{13}C y ^{31}P de los profármacos obtenidos.
- Asignar de la configuración del átomo de fósforo en los heterociclos formados.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Propuesta retrosintética de análogos de profármacos HepDirect 41 a 44

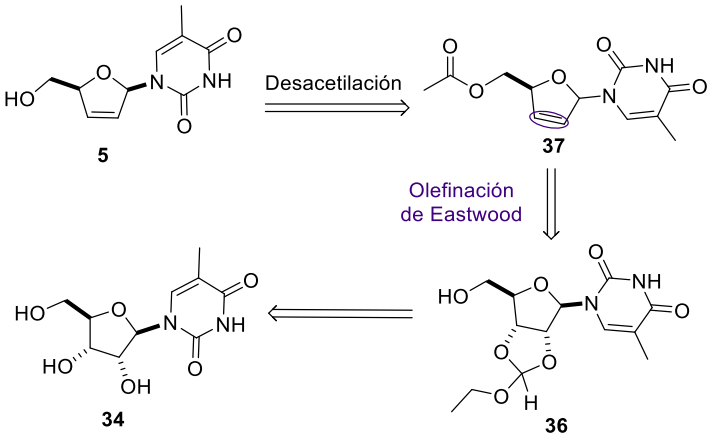
Los análogos de profármacos HepDirect **41-44** se obtendrán a partir del acoplamiento de los precursores estavudina **5** y los 1,3-diol **13** y **14**. Por su parte, la estavudina **5** se sintetizará a partir del nucleósido comercial 5-metiluridina **34** empleando una olefinación de Eastwood. Mientras que, la síntesis de los 1,3-dioles **13** y **14** se logrará a partir de la diacetona-D-glucosa **38** haciendo uso del protocolo secuencial de hidrólisis, oxidación y adición nucleofílica de un reactivo de Grignard. Adicionalmente se plantea la obtención de los análogos **45** y **46** a partir de la reducción del doble enlace de los profármacos con el sustituyente arilo *p*-fluorofenilo (*Esquema 14*).



Esquema 14. *Plan retrosintético para la preparación de análogos de profármacos HepDirect* ***44-46****.*

Propuesta de retrosíntesis del precursor 2',3'-Didehidro-3'-desoxitimidina (d4T)

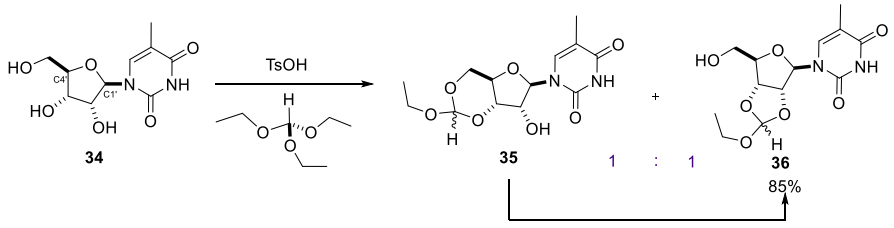
Para la síntesis del precursor estavudina (2',3'-didehidro-3'-desoxitimidina) **5**, se plantea la siguiente ruta retrosintética; la estavudina **5** provendría de la desacetilación del intermediario **37**, el cual a su vez se obtendría de la olefinación de Eastwood sobre el ortoéster **36** sintetizado a partir del nucleósido comercial 5-metiluridina **34** (5MU) (*Esquema 15*).



Esquema 15. *Plan retrosintético para la síntesis de la estavudina mediante la eliminación de Eastwood.*

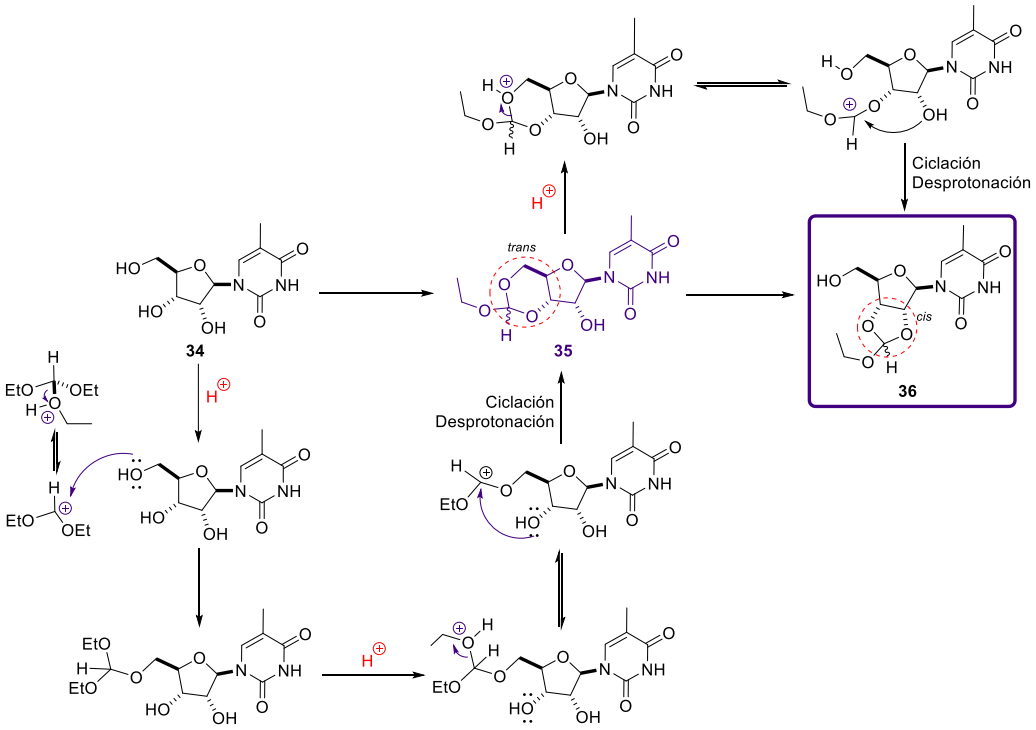
Síntesis del precursor 2',3'-Didehidro-3'-desoxitimidina (d4T)

Partiendo de la 5MU **34** la cual presenta una estereoquímica en C1' y C4' y la nucleobase equivalentes a la estavudina. Nos propusimos la obtención del ortoéster **36**. Haciendo reaccionar a la 5MU con trazas de ácido p-toluensulfónico y ortoformiato de etilo como reactivo y disolvente a temperatura ambiente (t.a.). Observamos la formación de una mezcla de los isómeros correspondientes **35** y **36** en una relación 1:1 según el análisis del espectro de RMN ^{1}H. Sin embargo, observamos la conversión del ortoéster **35** a **36** al dejar el crudo de reacción a temperatura ambiente durante aproximadamente 72 h. Obteniendo al ortoéster **36** en un rendimiento del 85% después de la purificación (*Esquema 16*).



Esquema 16. *Formación de los isómeros constitucionales **35** y **36**.*

La formación de ambos isómeros se debe a la diferencia de velocidad de reacción entre un alcohol primario y uno secundario. El alcohol primario presente en C5' reacciona más rápido como nucleófilo que los alcoholes secundarios C3' y C3'. La ciclación con el hidroxilo en C3' da paso a la formación del producto cinético **35**, mismo que, al retirar el exceso de trietil ortoformiato y debido a la presencia de ácido en el medio se puede transformar al producto termodinámico **36**. El cual resulta ser el compuesto más estable debido a la orientación *cis* de los oxígenos en C2' y C3' (*Esquema 17*).



Esquema 17. *Formación del isómero* ***35*** *y su correspondiente transformación al ortoéster* ***36****.*

Estos resultados fueron comprobados mediante estudios de resonancia magnética nuclear de ^{1}H y ^{13}C. Donde se pudo verificar la presencia de una mezcla de epímeros correspondiente a **36**. Observando en el espectro de RMN ^{1}H la incorporación de las señales correspondientes a los hidrógenos H7' y H8' del grupo etilo del ortoéster; con una multiplicidad de *c* y un *t* respectivamente, las cuales se acoplan entre sí a tres enlaces con una constante de acoplamiento *J* = 7.0 Hz. Además, se observa la señal *s* perteneciente al H6' del ortoéster (*Figura 7*).

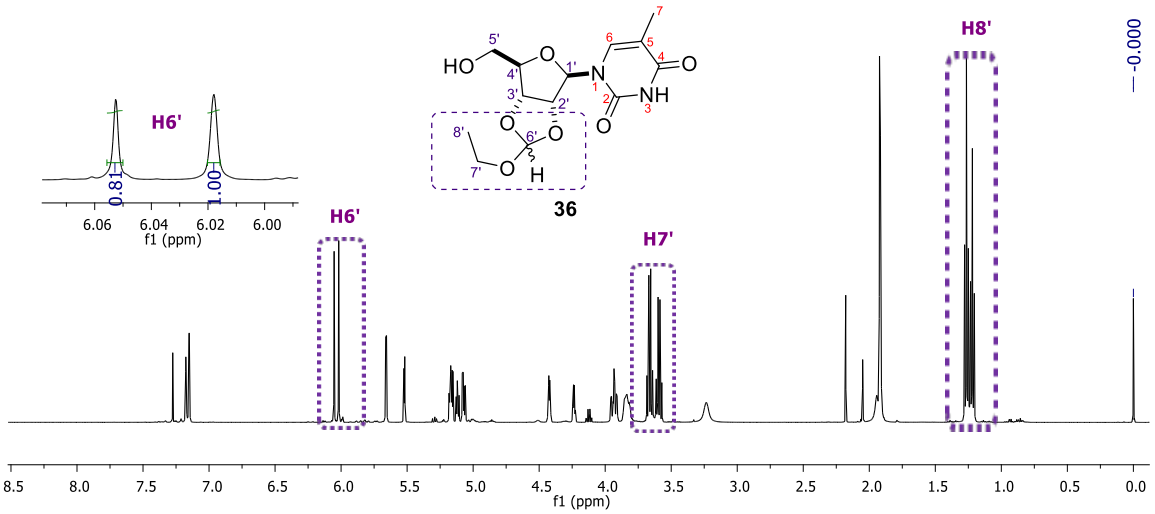


Figura 7. *Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del ortoéster* ***36****.*

Asimismo, en el espectro de RMN ^{13}C (*Figura 8*) se localizan las señales correspondientes al grupo etilo del ortoéster; el C8' (14.9 ppm) y las señales del CH_2 del C7' (60.5 ppm, 61.5 ppm). Adicionalmente, se observó la aparición de la señal correspondiente al C6' (117.3 ppm, 118.5 ppm) presente en el ortoéster cíclico.

Debido a la presencia de señales similares en los espectros de ambos isómeros **35** y **36** fue necesario corroborar que el ortoéster formado **36** correspondía al de cinco miembros. Ya que solo éste isómero nos proporcionaría la formación del doble enlace entre C2' y C3' presente en la estavudina. Por lo cual se llevaron a cabo análisis de espectroscopia de dos dimensiones para confirmar la presencia del ortoéster cíclico de 5 miembros **36**.

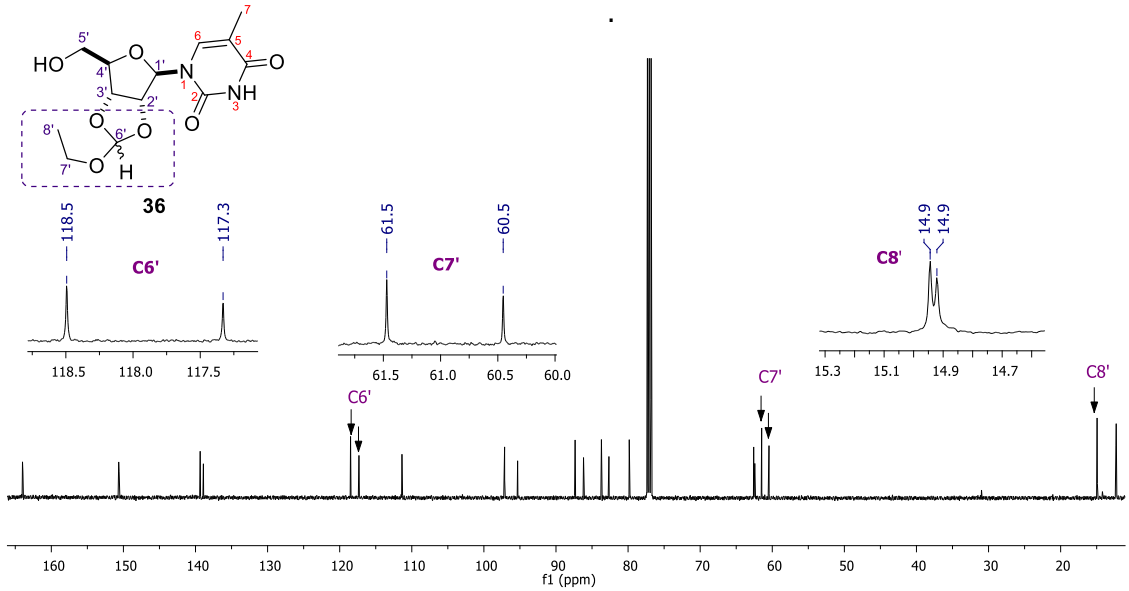


Figura 8. *Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de la mezcla diastoisomerica de* ***36****.*

Primero, se realizaron las asignaciones de todas las señales de RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de **36** mediante los análisis de RMN de dos dimensiones COSY y HSQC. El experimento COSY nos aporta la información necesaria para la asignación de las señales de H que interaccionan entre sí a tres enlaces. Mientras que el análisis de HSQC nos ofrece información acerca de las correlaciones entre los núcleos de C-H que están separados a un enlace. Es decir, nos permite relacionar las señales de cada hidrogeno con su correspondiente señal de carbono en **36**.

Posteriormente, se pudo llevar a cabo el análisis del HMBC el cual nos permite detectar las correlaciones entre los átomos C-H en rangos más largos: de tres enlaces y cuatro cuando se trata de sistemas aromáticos. Esta herramienta nos fue útil para observar las interacciones (C6' con H2' y C2' con H6'). Esta información nos permitió confirmar que los compuestos obtenidos (epímeros en C6') **36** indudablemente son aquellos que poseen al ortoéster cíclico de 5 miembros.

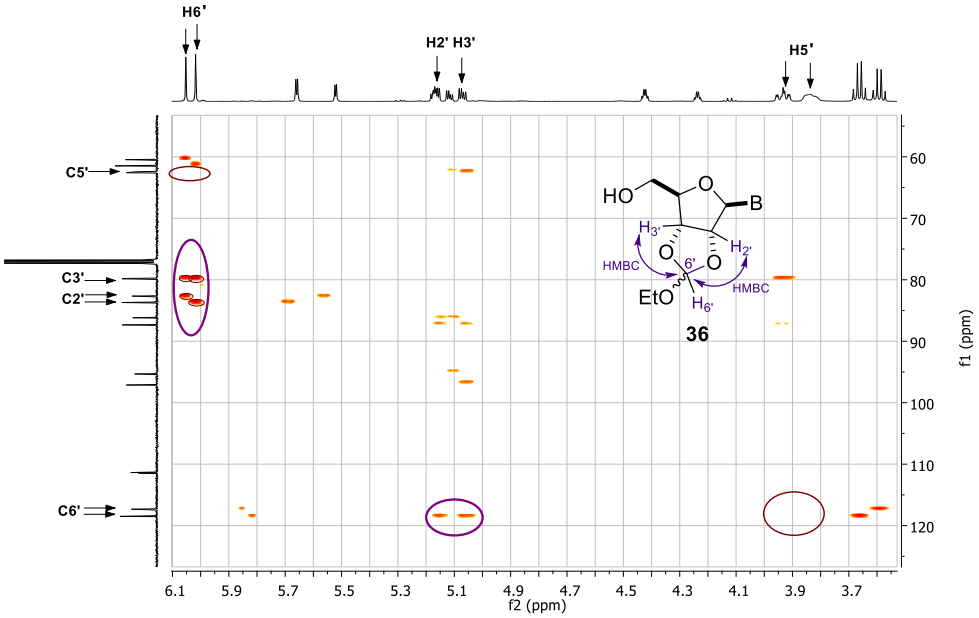


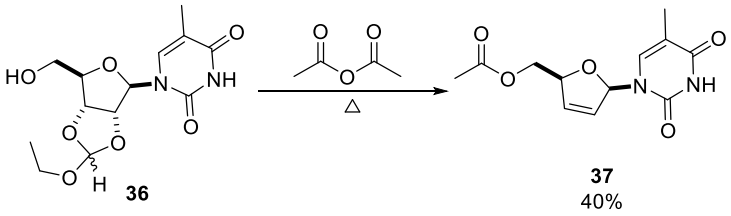
Figura 9. *Análisis de HMBC del ortoéster **36**. Se observan las interacciones a tres enlaces del C6' con los hidrógenos H2', H3', y la ausencia de la interacción con H5'. Asimismo, se muestran las interacciones del H6' con C2' y C3' y la ausencia de interacción del C5' con H6'.*

El espectro de HMBC nos muestra las correlaciones entre: los C6' (117.3 ppm, 118.5 ppm) con los H2' (5.15- 5.18 ppm respectivamente) y entre los C2' (82.7 ppm, 83.7 ppm) con los H6' (6.05 ppm, 6.02 ppm) de ambos epímeros. Es

preciso señalar que no se observaron las interacciones entre los H5' (3.81-3.85 ppm, 3.91-3.96 ppm) con los C6' ni de los C5' (62.4 ppm, 62.6 ppm) con los H6' que estarían interaccionando en **35** (*Figura 9*). La interacción entre C3' (79.7 ppm, 79.84 ppm) con H6' y C6' con H3' (5.06-5.08 ppm, 5.11-5.13 ppm) si fue observada pero no fue relevante para este análisis debido a que estaría presente en ambos isómeros **35** y **36**.

Una vez determinada la estructura del ortoéster **36** fue sometido a la reacción de olefinación de Eastwood. La cual consiste en la conversión de 1,2-dioles en sus correspondientes olefinas; a través de la descomposición térmica de un ortoéster cíclico de cinco miembros generado del diol vecinal en presencia de ácido acético.

Por lo cual llevamos a cabo una adaptación de este método, hicimos reaccionar al ortoéster **36** con anhídrido acético en condiciones de reflujo durante 3 h. Observamos la formación del producto de eliminación **37** en un rendimiento del 40%, después de la purificación por columna cromatografíca (*Esquema 18*).



Esquema 18. *Reacción de eliminación de Eastwood.*

La estructura del compuesto monoacetilado **37** se corroboró mediante análisis de RMN de ^{1}H. Observando la presencia de la señal del metilo perteneciente al grupo acetilo en 2.10 ppm que integra para los 3H. De la misma forma se observa a las señales de los hidrógenos en C5' como un *dd* para cada uno, desplazados a campo bajo (de 4.30 a 4.40 ppm), comparado con las señales de la materia prima, debido al efecto de desprotección producido por el grupo acetilo en dicha posición. Conjuntamente, se encuentran las señales pertenecientes a los hidrógenos vinílicos; H2' (6.28 ppm) y H3' (5.90 ppm), como un *dt* y un *ddd* respectivamente con una J = 6.0 Hz lo cual nos confirma la formación del doble enlace en C2'-C3' (*Figura 10*).

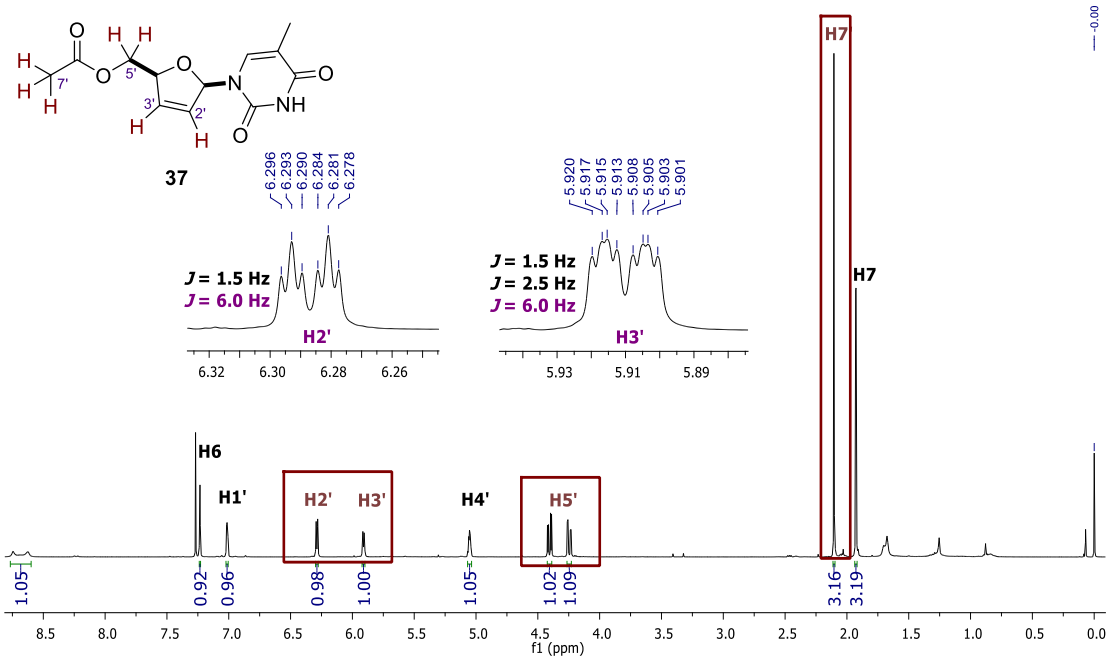


Figura 10. *Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la olefina* ***37****.*

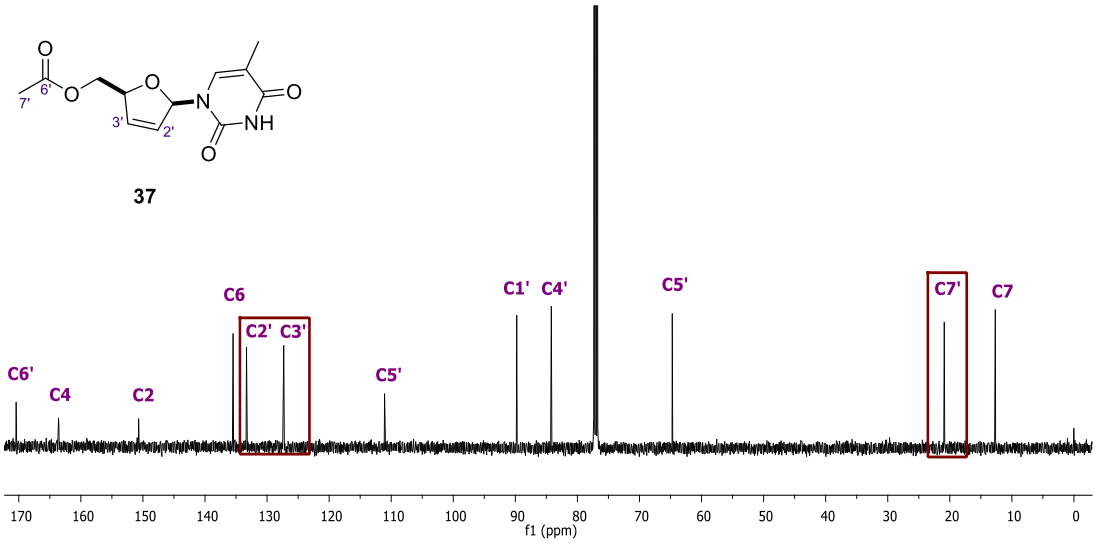
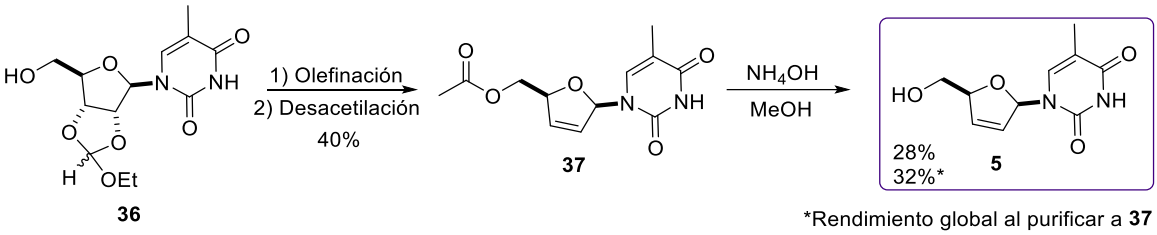


Figura 11. *Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de* ***37****.*

En el espectro de RMN de ^{13}C de la olefina **37** se observa las señales pertenecientes al doble enlace C3' (127.3 ppm), C2' (133.3 ppm) y la señal del C de carbonilo a 170.4 ppm en la zona distintiva de carbonilos de aldehídos y/o cetonas (*Figura 11*).

Siguiendo la ruta sintética propuesta, se dispuso a llevar a cabo la desacetilación del compuesto **37**. Se hizo reaccionar con una solución saturada de hidróxido de amonio en metanol. Obtuvimos a la estavudina **5** como un sólido blanco en un rendimiento del 80%. Es importante mencionar que la reacción de

desacetilación se puede llevar a cabo sin purificar a partir del crudo obtenido de la reacción de olefinación. Al evaporar el anhídrido acético, realizar extracciones con diclorometano y hacer reaccionar al crudo con la solución de hidróxido de amonio. Obteniendo así a la estavudina en un 28% de rendimiento a partir del ortoéster **36** (*Esquema 19*).



Esquema 24. *Desacetilación del compuesto* ***37****.*

Estos resultados fueron corroborados mediante estudios de RMN ^{1}H en el cual se puede observar la desaparición de las señales correspondientes al acetilo en 2.10 ppm además del desplazamiento de las señales a campo bajo de los H5' de 4.30 ppm a 3.65 ppm debido a la remoción del grupo acetilo (*Figura 12*).

De la misma forma el espectro de RMN de ^{13}C nos muestra el desvanecimiento de las señales correspondientes al grupo acetilo; el carbono del CH_3 a 20.9 ppm, así como señal del carbono del carbonilo a 170.4 ppm (*Figura 13*).

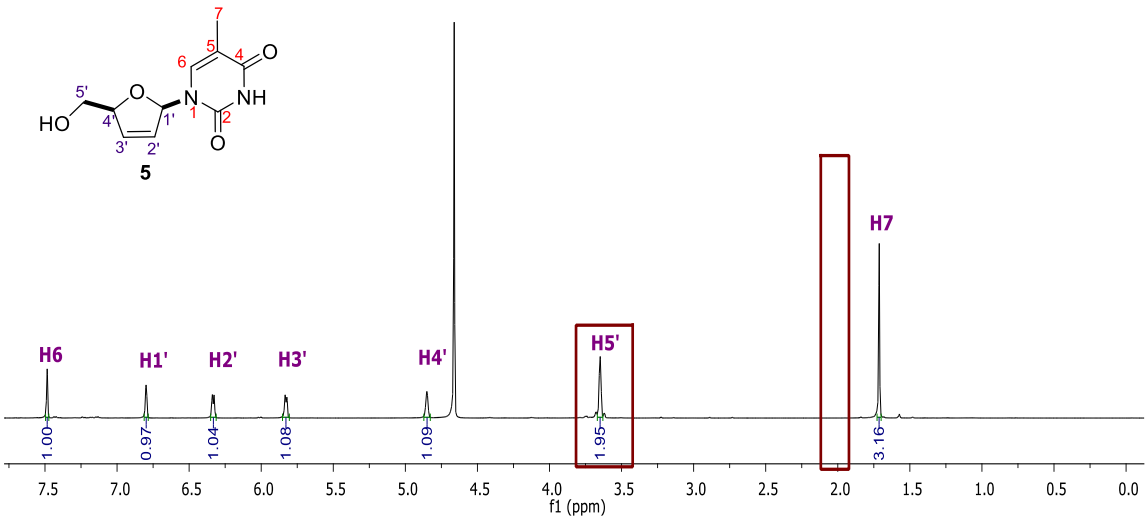


Figura 12. *Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, D_2O) de la estavudina* ***5.***

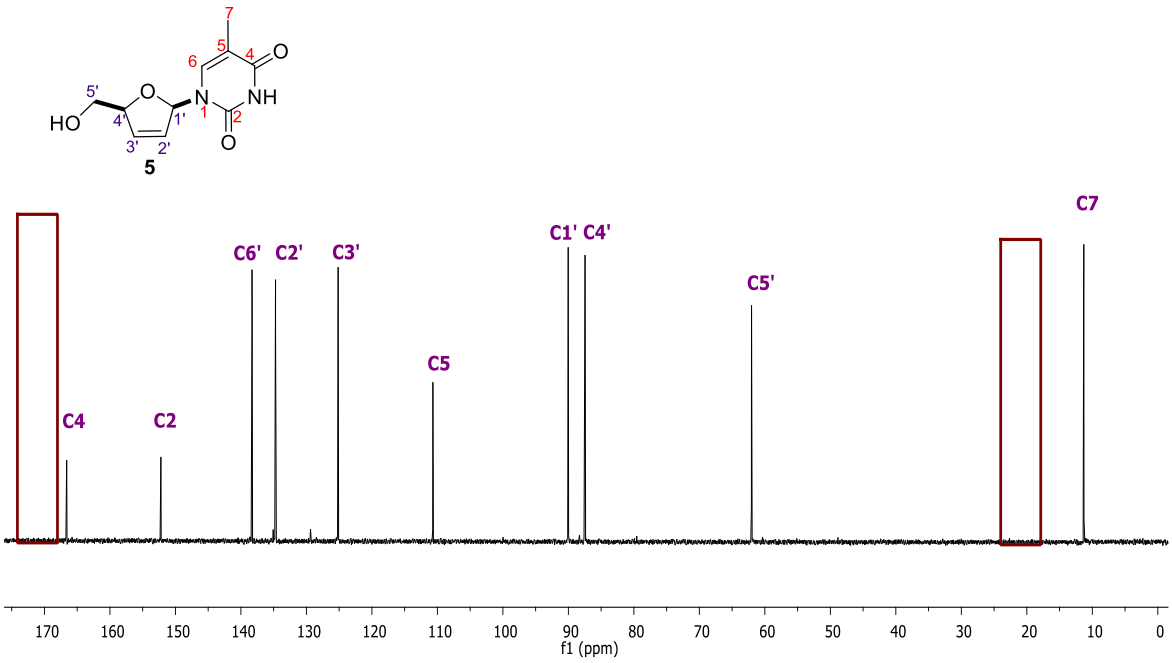
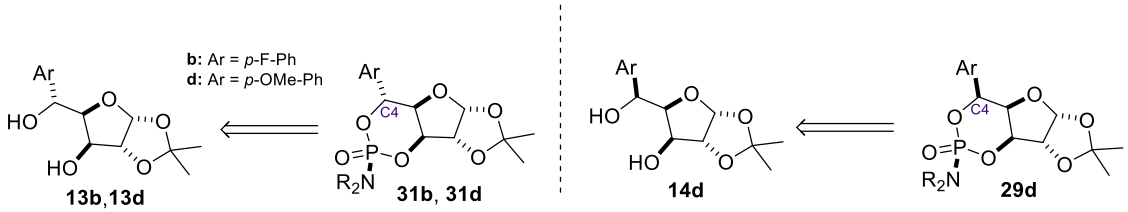


Figura 13. *Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) de la estavudina* ***5.***

Síntesis de los 1,3-dioles 13 y 14 precursores de fosfatos análogos de profármacos HepDirect.

Orientados por los trabajos reportados por nuestro grupo de investigación en 2014, donde se demostró que la actividad mutagénica de análogos de profármacos HepDirect **29b-d** a **32b-d** es dependiente de la conformación y de la estereoquímica en el átomo de fosforo P (R_p) y en C4.

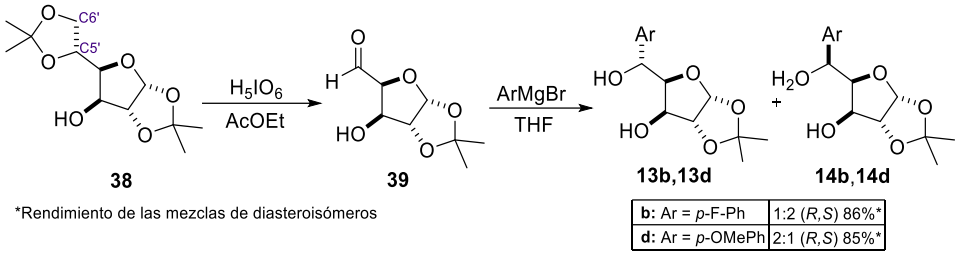
Reportamos que los 1,3,2-dioxafosforinanos **29d**, **31b** y **31d** provenientes del acoplamiento de los 1,3-dioles **13b**, **13d** y **14d** presentaron actividad mutagénica considerablemente mayor respecto a los demás diasteroisómeros sintetizados y al control positivo la ciclofosfamida **33** (*Esquema 20*). Con esto en mente, planteamos la síntesis de los 1,3-dioles **13** y **14** como precursores de los fosfatos análogos de profármacos HepDirect **41-44**, pensando en una futura aplicación en ensayos biológicos para probar su actividad mutagénica.



Esquema 20. *Análogos de la ciclofosfamida procedentes de los 1,3-dioles* ***13d,13b, 14b*** *y* ***14d*** *y que poseen mayor actividad que la ciclofosfamida* ***33.***

Los 1,3-dioles **13** y **14** fueron sintetizados por medio de la metodología reportada por nuestro grupo de investigación; la cual consiste en la aplicación de un protocolo secuencial de hidrólisis, oxidación y adición de un reactivo de Grignard sobre la Diaceton-D glucosa **38** (DAG).

La hidrólisis y deshomologación del 5',6'-isopropiliden de la DAG se lleva a cabo a partir de la reacción de **38** con H_5IO_6 para formar al aldehído **39**. El cual mediante una adición nucleofílica por parte del reactivo de Grignard al carbonilo, genera a la mezcla de epímeros en C5' **13** y **14** en buenos rendimientos. Las mezclas de epímeros fueron separadas por cromatografía en columna utilizando un sistema AcOEt: hexano en una relación 1:3 (*Esquema 21*).

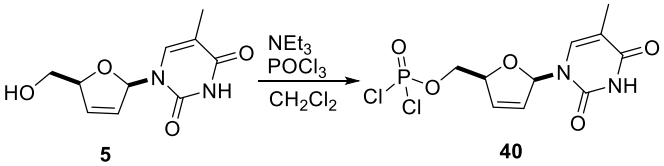


Esquema 21. *Obtención de los 1,3-dioles **13** y **14**.*

Una vez sintetizados todos los precursores llevamos a cabo las reacciones de acoplamiento de tres componentes para la síntesis de los profármacos análogos HepDirect **41- 44**.

Síntesis de análogos de profármacos HepDirect 41- 44.

La síntesis de los fosfatoésteres cíclicos de 6 miembros **41- 44** análogos de profármacos HepDirect se llevó a cabo a partir de la reacción de fosforilación sobre el precursor estavudina **5**. Utilizamos como agente fosforilante al oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) y como base a la trietil amina en CH_2Cl_2 anhidro. La mezcla de reacción se conservó en agitación a t.a. observando la formación del compuesto **40** en un periodo de 2 h (*Esquema 22*).

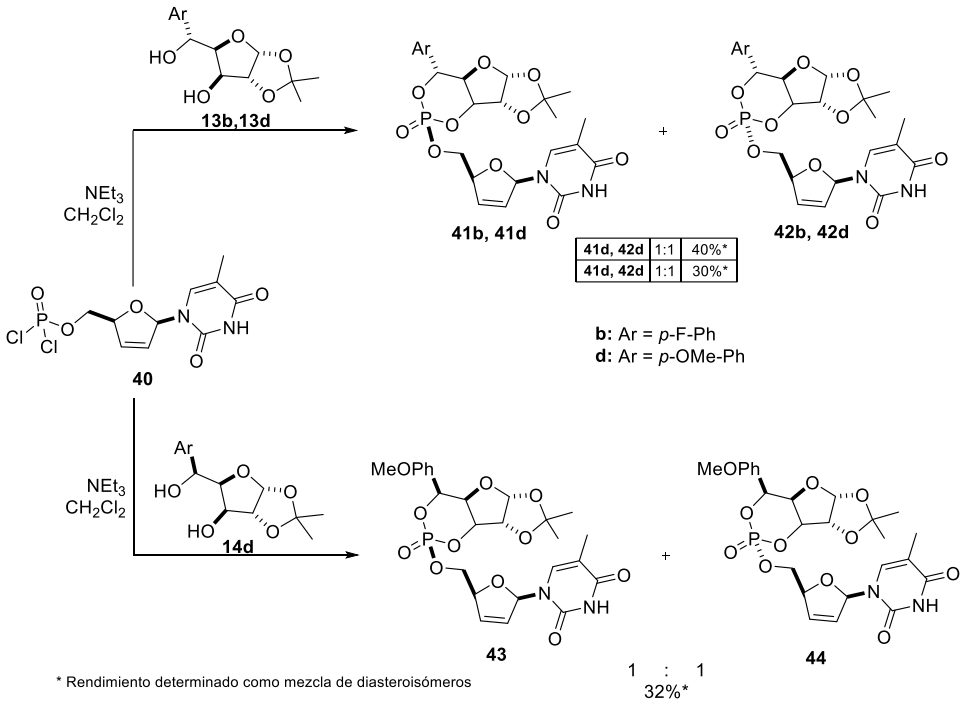


Esquema 22. *Fosforilación de la estavudina **5**.*

Una vez verificado la formación de **40** por RMN ^1H, se procedió a realizar el acoplamiento con los respectivos 1,3-dioles **13b, 13d** o **14d** que presentan

una configuración adecuada en C5'. Para este fin se preparó una solución del correspondiente diol y trietilamina en CH_2Cl_2 anhidro.

La formación de los profármacos HepDirect **41- 44** se verificó por CCF. Los epímeros en P con el grupo *p*-F-Ph en C4 **41b** y **42b** se obtuvieron en un rendimiento moderado del 40% en una relación 1:1 después de la purificación por cromatografía en columna. Mientras que los diasteroisómeros con el sustituyente *p*-OMe-Ph **41d**, **42d**, **43** y **44** se presentaron en rendimientos menores (≈30%). Además, estos últimos no pudieron ser separados mediante técnicas cromatografícas (*Esquema 23*).



Esquema 23. *Acoplamiento de* ***40*** *con los 1,3-dioles* ***13b***, ***13d*** *y* ***14d*** *para la formación de los análogos de profármacos HepDirect* ***41-44***.

A manera representativa, se muestran los espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C y ^{31}P del fosfato cíclico **41b**, se observa la incorporación de las señales correspondientes a los hidrógenos del fragmento nucleosídico (estavudina). Con un desplazamiento a campo bajo de los H5' (4.35 ppm) debido a su unión al fosfato cíclico. De igual manera se observa la incorporación de las señales del fragmento del carbohidrato, destacando la presencia de los H5a que aparecen a campo bajo con respeto a las señales del diol **13b** (*Figura 14*).

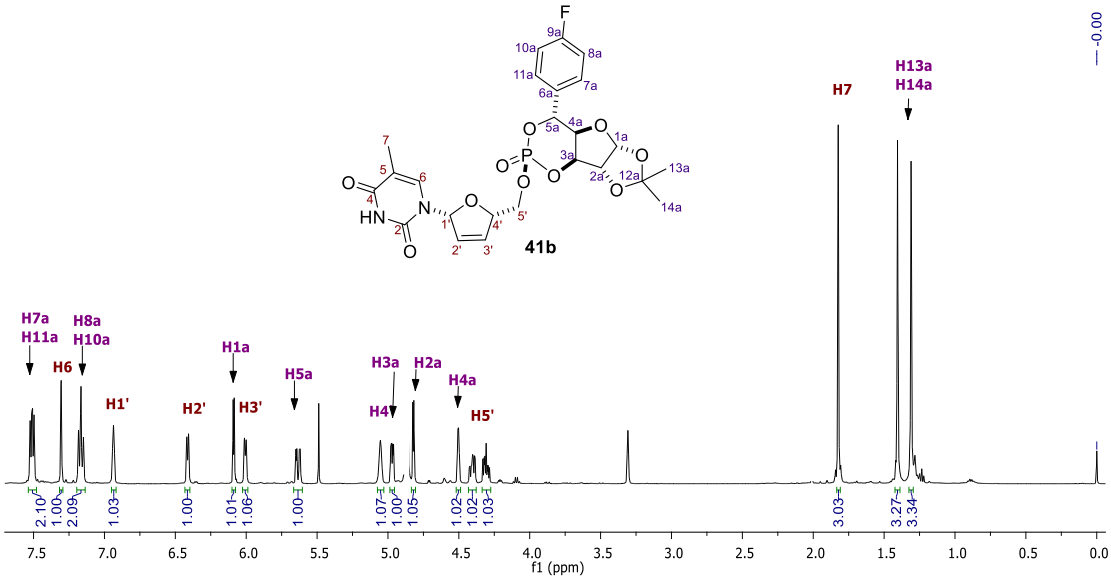


Figura 14. *Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) del epímero* ***41b****.*

En el espectro de RMN de ^{13}C (*Figura 15*) se observan las señales características de ambos fragmentos (xilofuranosa y nucleósido) asignadas mediante los análisis de RMN de dos dimensiones COSY y HSQC. De la misma manera se observan los acoplamientos de los carbonos del anillo aromático; C7a/C11a (115.5 ppm, *J* = 8.7 Hz), C8a/C10a (127.8 ppm, *J* = 21.2 Hz) y C9a (163.0 ppm, *J* = 246.2 Hz) con el átomo de Flúor (F). Así como los acoplamientos de los átomos de carbono al átomo de P los cuales se encuentran resumidos en la *Tabla 1*.

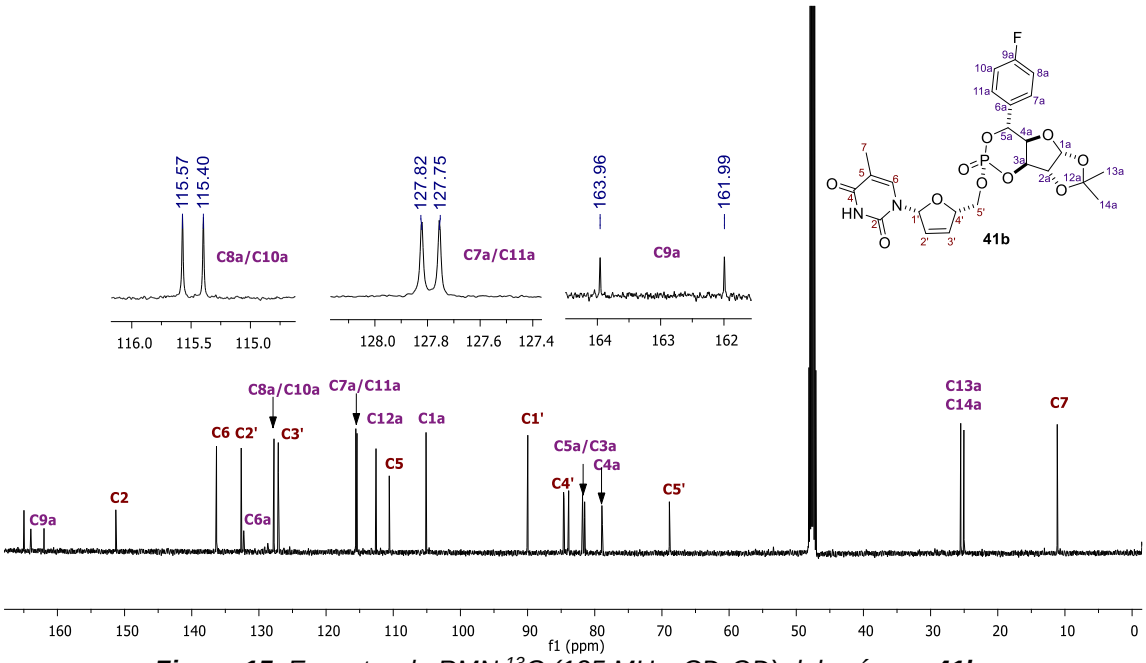


Figura 15. *Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) del epímero* ***41b****.*

Los datos específicos de desplazamientos químicos en RMN ^{1}H y ^{31}P de los análogos de profármacos HepDirect **41- 44** en conjunto con los valores de constantes de acoplamiento vecinales más relevantes se encuentran resumidos en la *Tabla 1*. Los cuales nos brindaron la información necesaria para determinar los equilibrios conformacionales presentes y la correspondiente asignación de la configuración del átomo de P en los profármacos sintetizados.

Tabla 1. Desplazamientos químicos (^{1}H y ^{31}P) y valores de constantes de acoplamiento ($^{3}J_{H-P}$ y J_{C-P})de los análogos de profármacos HepDirect 41-44.

Prof. HepDirect	δ (ppm)			$^{3}J_{H-P}$ (Hz)		J_{C-P} (Hz)				^{31}P	Conf.
	δ H_{1a}	δ H_{3a}	δ H_{5a}	$^{3}J_{H5-P}$	$^{3}J_{H3-P}$	$^{2}J_{C5a-P}$	$^{2}J_{C5'-P}$	$^{3}J_{C4a-P}$	$^{3}J_{C4'-P}$	δ (ppm)	abs. P
41b[a]	6.06[a]	4.91[a]	5.48[a]	10.8[a]	5.7[a]	6.0[a]	6.0[a]	6.7[a]	9.7[a]	-6.7[a]	*R*
42b[a]	6.13[a]	4.84[a]	5.57[a]	10.5[a]	3.7[a]	6.0[a]	5.2[a]	5.25[a]	6.7[a]	-5.8[a]	*S*
43*	5.98*	5.00*	5.76*	<1*	<1*	-	-	-	-	-6.9*	*R*
44*	6.01*	4.82*	5.52*	<1*	<1*	-	-	-	-	-9.5*	*S*

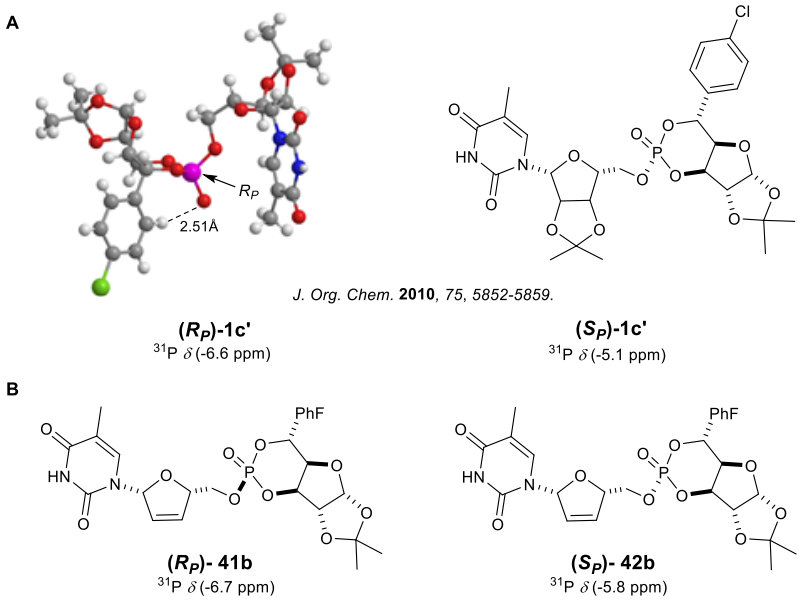
**Datos extraídos del crudo de reacción RMN (500 Hz, $CDCl_3$)*
[a] Espectros de RMN (300 MHz, $CDCl_3$)

Los datos observados por RMN de ^{1}H, muestran valores de $^{3}J_{H5-P}$ en **41b** y **42b** de $^{3}J_{H5-P}$ = 10.8 Hz y $^{3}J_{H5-P}$ = 10.5 Hz respectivamente. Estos valores indican que el grupo arilo en C4 se encuentra orientado en una posición pseudo-axial en el anillo dioxafosforinano favoreciendo la presencia de una conformación no silla.

Basados en estudios previamente realizados por nuestro grupo de investigación[16] se sugiere la presencia de un equilibrio equimolar **C1**↔ **T**. Esta afirmación se fundamenta en estudios de difracción de rayos X de compuestos análogos donde se pudo observar una conformación silla que orienta al grupo arilo en posición axial. La conformación silla es estabilizada por la interacción de un puente de hidrógeno no convencional entre el oxígeno del fosforilo (P=O) y un H de la posición orto del arilo.

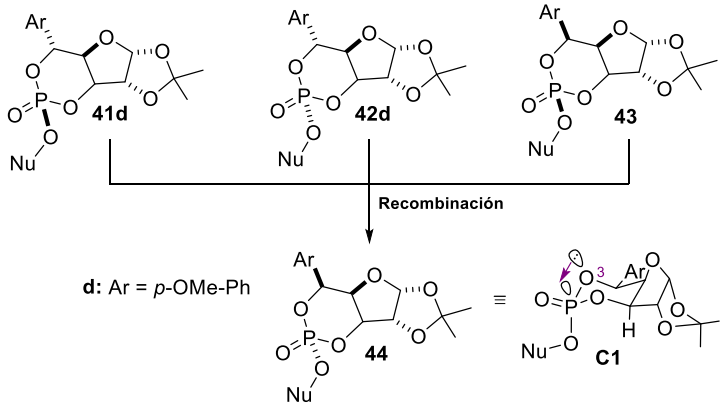
Basados en ese mismo estudio se asignó la configuración absoluta del átomo de fósforo. El compuesto **41b** que presenta un desplazamiento químico a campo alto (-6.7 ppm) respecto a su isómero **42b** (-5.8 ppm) se le asignó una configuración R_P. Por tanto, al isómero **42b** se le asignó una configuración S_P en contraste al principio de Gorenstein[19] el cual no puede ser utilizado debido a que

equilibrio conformacional, como ya se mencionó un equilibrio conformacional equimolar **C1**↔**T** (*Esquema 24*).



Esquema 24. *Asignación de la configuración absoluta del P en los fosfatoésteres sintetizados* ***41b*** *y* ***42b*** *(B), basados en la estructura de rayos X de* ***R$_P$-1c'*** *(A).*

En el caso de los análogos de profármacos **41d**, **42d** y **43** que presentan en C4 del fosforinano un grupo electrodonador (*p*-OMe-Ph) se observó la isomerización espontánea en los átomos de fósforo y C4 del anillo de fosforinano a fin de transformarse al fosfato cíclico más estable **44**. El cual debe su alta estabilidad, como se explicó en los antecedentes, al efecto anomérico ($n_{O3} \rightarrow \sigma^*_{P-ONu}$) el cual se ve favorecido por la orientación del sustituyente ONu en posición axial. En adición a esto, la posición ecuatorial del grupo arilo le brinda mayor estabilidad al disminuir las interacciones estéricas (*Esquema 25*). La isomerización de **41d** y **42d** a **44** fue del 100%, sin embargo la isomerización de **43** a **44** fue apenas del 63% sin lograr purificar totalmente al compuesto **44**.



Esquema 25. *Conversión espontánea de los profármacos* ***41d****,* ***42d*** *y* ***43*** *a su isómero* ***44.***

Estas observaciones se llevaron a cabo al analizar los valores de constante de acoplamiento vecinales H-P ($^{3}J_{H\text{-}P}$) de los hidrógenos pertenecientes al anillo de fosforinano (H_{5a}, H_{3a}) así como de los desplazamientos químicos mostrados en el espectro de RMN ^{1}H de los crudos de reacción (*Figura 16*).

Los fosfatoésteres **43** y **44** se estudiaron al analizar el crudo de reaccion por RMN ^{1}H, donde observamos a las señales correspondientes a H5a como dos simples a 5.78ppm y 5.52ppm respectivamente. El valor de la constante de acoplamiento $^{3}J_{H5a\text{-}P}$ <1Hz nos indica que el ángulo diedral entre H5a y el átomo de P es de cerca de 90°, por lo tanto, H5a se encuentra orientado en posición axial mientras que el grupo arilo en posición ecuatorial. De igual manera para H3a cuya constante $^{3}J_{H3a\text{-}P}$ <1 confirma su orientación axial en la conformación **C1** (Ver Tabla 1).

La preferencia por una conformación silla en **43** y **44** permite asignar la configuración del átomo de fósforo por medio del criterio de Gorenstein. Por esta razón, el compuesto **43** que presenta un desplazamiento en RMN ^{31}P a campo bajo en (-6.9 ppm) se le asignó una configuración R_P, y para su P-epímero **44** que presenta desplazamiento a campo alto (-9.5 ppm) se le asignó una configuración S_P.

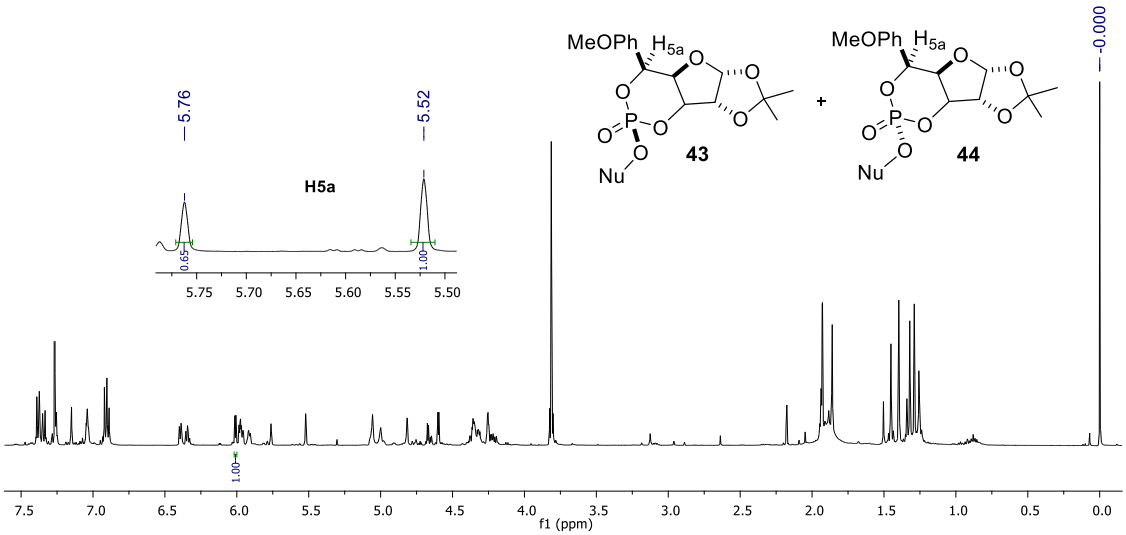
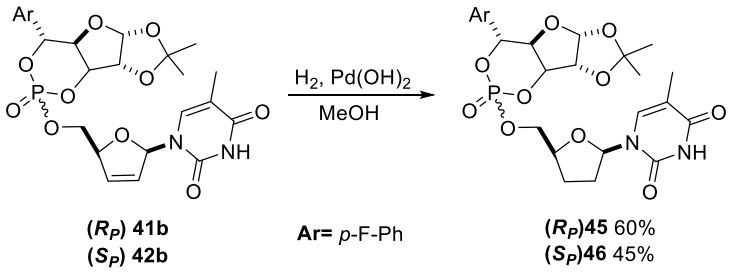


Figura 16. *Espectros de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) para la mezcla de epímeros **43** y **44**.*

Reducción del doble enlace en C2'-C3' de los análogos de profármacos HepDirect 41b y 42b

Con el propósito de brindar más ejemplos de potenciales análogos de profármacos HepDirect derivados del nucleósidos. Nos dimos a la tarea de sintetizar a los fosfatoésteres **45** y **46** los cuales son profármacos derivados del nucleósido 3'-deoxitimidina mediante la reducción del doble enlace presente en la estavudina de los compuestos **41b** y **42b**.

Para la síntesis de los profármacos **45** y **46** se llevó a cabo una reacción de hidrogenación catalítica selectiva, teniendo extremo cuidado ya que la reacción de desbencilación también es posible. Los compuestos **41b** y **42b** se hicieron reaccionar con $Pd(OH)_2/C$ en una atmosfera de H_2 a 100 psi. Se obtuvieron a los fosfatoésteres **45** y **46** en rendimientos moderados del 60% y 45% respectivamente (*Esquema 26*).



Esquema 26. *Síntesis de los profármacos **44** y **45**.*

La obtención de los compuestos **45** y **46** fue corroborada mediante análisis de RMN ^1H observando el desplazamiento químico de las señales de los hidrógenos que formaban parte del doble enlace H2' (6.01 ppm) y H3' (6.41 ppm) a campo bajo aproximadamente a 2.2-2.5 ppm debido a la incorporación de los átomos de hidrogeno en dichas posiciones (*Figura 17*).

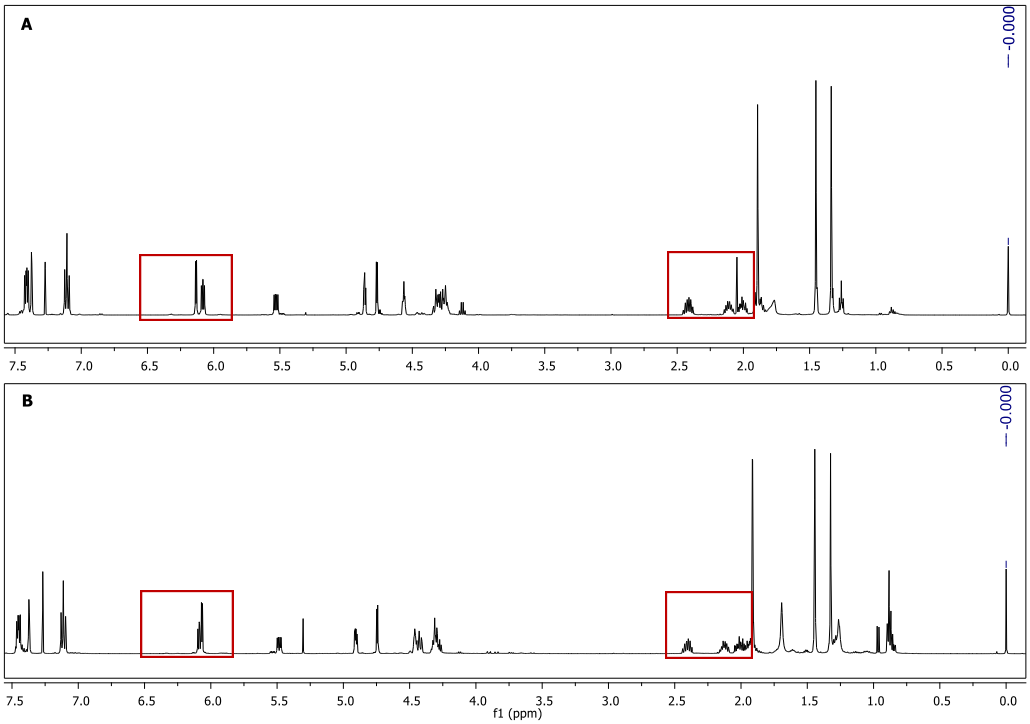


***Figura 16**. Espectros de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$ de los compuestos **45**(A) y **46** (B).*

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló la síntesis de los análogos de profármacos HepDirect **41-44** derivados del nucleósido estavudina (d4T) mediante una reacción de acoplamiento de tres componentes.

Además, se llevó a cabo la síntesis de análogos de profármacos derivados de la 3-deoxitimidina a partir de la reducción de los profármacos **41b** y **42b.** Asimismo, se realizó la caracterización de los diferentes compuestos mediante RMN ^{1}H, ^{13}C y ^{13}P. Haciendo uso de los análisis de RMN de dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC.

Los efectos estéricos, configuracionales y estereoelectrónicos (efecto anomérico) dirigen la preferencia conformacional de los análogos de profármacos HepDirect sintetizados. En los compuestos **41b**, **42b** (configuración *R* en C5') presentan un equilibrio conformacional equimolar silla-bote torcido (**C1**↔**T**). Los compuestos **43** y **44** con configuración *S* en C5' presenta un equilibrio conformacional preferencialmente silla **C1**.

Efectos estereoelectrónicos, conformación, efectos electrónicos (resonancia) y la estereoquímica en los átomos de fósforo y en C5 determinan la conversión espontánea de los compuestos **41d** y **42d** a su isómero más estable de los análogos de profármacos HepDirect **44.**

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Generalidades

Las reacciones efectuadas para la síntesis de los diversos compuestos descritos en este trabajo se realizaron bajo una atmosfera inerte de Argón. Además, se emplearon disolventes sometidos a condiciones estándar de deshidratación con agentes desecantes como; hidruro de calcio o sodio metálico según corresponda y en casos particulares se utilizaron solventes grado reactivo.

Todas las transformaciones se llevaron a cabo en campana de extracción, fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF); haciendo uso de la lámpara de uv y de reveladores cromatográficos como p-anisaldehído y molibdato de amonio.

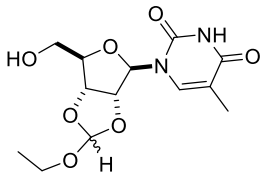
Las extracciones de los productos obtenidos se realizaron utilizando acetato de etilo y/o diclorometano destilados bajo condiciones establecidas. Los crudos de reacción fueron concentrados bajo presión reducida y purificados empleando técnicas de cromatografía en columna y en placa preparativa. Empleando como fase móvil diversas mezclas de disolvente AcOEt: Hexano y como fase estacionaria gel de sílice.

Finalmente, los compuestos fueron caracterizados por estudios de RMN de ^{1}H, ^{13}C y ^{31}P en equipos de espectrometría de 300 y 500 MHz. Empleando tetrametil silano (TMS) como referencia en ambos equipos y usando como disolventes: $CDCl_3$, CD_3OD y D_2O, dependiendo de la solubilidad de cada compuesto.

Adicionalmente, se llevaron a cabo el uso de experimentos bidimensionales como; HSQC, COSY y HMBC. Para la asignación total de las señales de ^{1}H, ^{13}C en compuestos sintetizados.

Síntesis de la estavudina aplicando el método de olefinación de Eastwood[22]:

Preparación del *2',3'-O-(etoxi) metileno-5-metiluridina (36):*



36

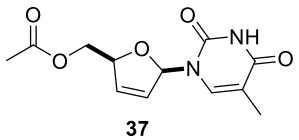
En un matraz de 250 mL provisto de una barra magnética, se prepara una solución de 5-metiluridina **1** (5.0 g, 19.0 mmol) en trietil ortoformiato (12.5 mL, 0.12 mol). Posteriormente se le adiciona ácido p-toluensulfónico en porciones catalícas (10.0 mg, 0.06 mmol). La mezcla de reacción se coloca en agitación a t.a. durante 16 horas. Seguido de esto, se evapora el exceso de trietil ortoformiato mediante destilación a presión reducida.

El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de disolventes Hexano: AcOEt en una proporción 2:1. Obteniendo así al ortoéster de 6 miembros **35** y al ortoéster de 5 miembros **36** en una relación 1:1.

Sin embargo, fue observado mediante CCF la conversión del ortoéster **35** al ortoéster de 5 miembros **36**, la cual era muy lenta. Por lo que. al retirar el exceso de ortoformiato, el crudo de reacción fue mantenido a t.a. por cerca de 72 h y después purificado bajo las mismas condiciones antes descritas. Obteniendo así al compuesto **36** como un líquido viscoso incoloro en un rendimiento final del 85%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.91 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 1.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.59 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.66 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.81-3.85 (m, 2H), 3.91-3.96 (m, 2H), 4.24 (c, *J* = 3.5, 3.0 Hz, 1H), 4.42 (c, *J* = 4.0, 3.0 Hz, 1H), 5.07 (dd, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 1H), 5.12 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 1H), 5.15-5.18 (m, 2H), 5.52 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.66 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H); **^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ** 12.3, 12.3, 14.9, 14.9, 60.5, 61.5, 62.4, 62.6, 79.8, 79.8, 82.7, 83.7, 86.2, 87.3, 95.3, 97.1, 111.4, 111.5, 117.3, 118.5, 138.9, 139.3, 150.6, 150.6, 163.9, 164.0.

Olefinación de Eastwood para la obtención del *5'-O-(acetil)-3'-deoxi-2'-timidina (37):*

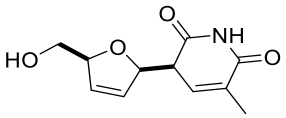


37

En un sistema de reflujo se dispone una solución del ortoéster **3** (2.0 g, 6.0 mmol) en anhídrido acético grado reactivo (20 mL, 0.21 mol) bajo una atmósfera de Argón. La mezcla de reacción se lleva a temperatura de reflujo durante 3 horas con agitación vigorosa. Posteriormente el sistema se templa y se evapora el anhídrido acético haciendo uso de una bomba de alto vacío. Al crudo obtenido se le adiciona una solución saturada de bicarbonato de sodio (1.5 mL) y se realizan extracciones con CH_2Cl_2 (4 x 10 mL). La fase orgánica se trata con Na_2SO_4 y se concentra mediante presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna con un sistema Hexano: AcOEt en una relación 2:1. Obteniendo al compuesto monoacetilado **37** como un sólido blanco con un punto de fusión de 178 °C en un 40% de rendimiento.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.25 (dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 12.5, 4.0 Hz, 1H), 5.04-5.07 (m, 1H), 5.91 (ddd *J* = 6.0, 2.5, 1.2 Hz, 1H), 6.29 (dt *J* = 6.0, 1.5 Hz, 1H), 7.0-7.02 (m, 1H), 7.2 (d *J* = 1.0 Hz, 1H); **^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)** δ 12.7, 20.9, 64.7, 84.2, 89.8, 111.0, 127.3, 133.3, 135.5, 150.7, 163.6,170.42.

Desacetilación para la obtención de retroviral *estavudina d4T (5):*

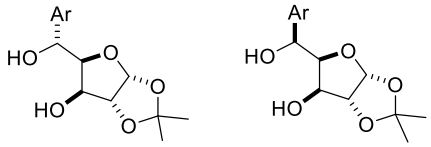


5

El compuesto acetilado **37** (1.0 g, 3.76 mmol) se disuelve en una solución saturada de NH_4OH en metanol (8 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Seguido de esto, se evapora el disolvente a presión reducida. El concentrado se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla AcOEt: Hexano en una proporción 2:1 obteniendo a la estavudina (**5**, d4T) como un sólido blanco en un rendimiento del 65%. Con un punto de fusión de 163° C.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ 1.71 (s, 3H), 3.64-3.65 (m, 2H), 4.85 (s, 1H), 5.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 7.48 (s, 1H); **^{13}C NMR (125 MHz, D_2O)** δ 11.3, 62.0, 87.4, 90.0, 110.7, 125.2, 134.7, 138.3, 152.22, 166.6.

Procedimiento general para la obtención de los dioles precursores 13 y 14d:



13b: Ar = *p*-F-Ph
13d: Ar = *p*-OMe-Ph

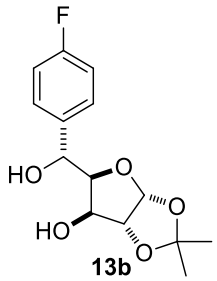
14b: Ar = *p*-F-Ph
14d: Ar = *p*-OMe-Ph

Para la síntesis de los 1,3-diol **13** y **14** se emplea un protocolo secuencial de hidrolisis-oxidación y adición nucleofílica de un reactivo de Grignard.

A una solución de ácido peryódico (5.25 g, 23.0 mmol) en AcOEt anhidro (20 mL) bajo una atmosfera de Argón a 0° C; se adiciona vía cánula una solución de diacetona-D-glucosa **38** (5.0 g, 19.0 mmol) disuelta en AcOEt (50 mL). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se dispone a agitación vigorosa durante 2 horas. A continuación se adiciona una solución saturada de Na_2CO_3 (10 mL) y se realizan extracciones con AcOEt. La fase orgánica es tratada con Na_2SO_4 y concentrada mediante presión reducida.

El crudo de reacción correspondiente al aldehido **39**, se disuelve en 25 mL de THF anhidro bajo una atmósfera de Argón y se lleva a una temperatura de 0° C. Posteriormente se adiciona el correspondiente reactivo de Grignard; bromuro de 4-fluoro o metoxi fenil magnesio (48.0 mmol). Después de 4 horas de reacción, la mezcla se neutraliza con una solución saturada de NH_4Cl. Posteriormente se extrae utilizando CH_2Cl_2 (1 x 10 mL) y AcOEt (4 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se concentra mediante presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla Hexano: AcOEt en una proporción 3:1. Obteniendo a los correspondientes epímeros **13** y **14d** en rendimientos moderados del 30-60%.

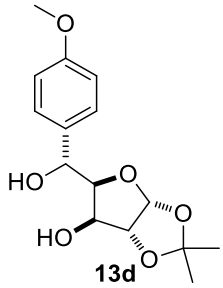
(5R)-1,2-O-Isopropiliden-5-(4-fluorofenil)-α-D-xilofuranosa (13b):



13b

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.30 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 4.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.16 (s, 1H), 4.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.06-7.10 (m, 2H), 7.41-7.44 (m, 2H); **^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)** δ 26.1, 26.2, 72.8, 75.3, 82.1, 85.1, 105.0, 111.8, 115.5 (d, *J* = 21.2 Hz), 128.7 (d, *J* = 9.1 Hz), 135.0, 161.3 (d, *J* = 245.9 Hz). Aceite incoloro, 30% de rendimiento. $[\alpha]_D^{25}$ =-21.5 (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

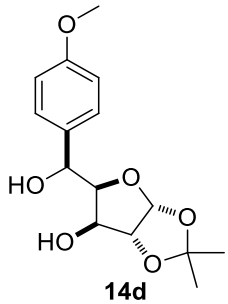
(5R)-1,2-O- Isopropiliden -5-(4-metoxifenil)-α-D-xilofuranosa (13d):



13d

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3) δ 1.25 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.10 (dd, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 4.18 (s, 1H), 4.42 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl3)** δ 25.9, 26.5, 55.1, 72.4, 75.0, 82.2, 84.9, 104.7, 111.5, 113.9, 127.3, 131.9, 159.2. Aceite incoloro, rendimiento del 57 %. $[\alpha]_D^{25}$ =-22.6 (c = 1.0, $CHCl_3$).

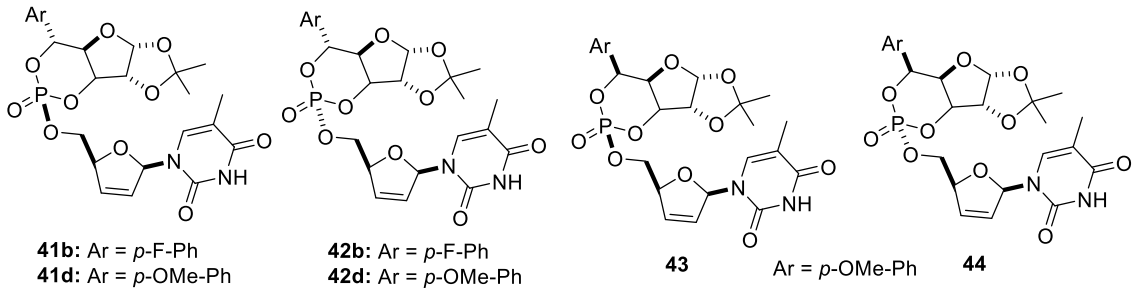
***(5S)-1, 2-O-Isopropiliden-5-(4-metoxifenil)-α-D-xilofuranosa (14d)*:**



14d

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.31 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 2.77 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.21 (d, *J* = 4.5 HZ, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.09 (dd, *J* = 4.2, 2.7 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 4.8, 2.7 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.00 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); **^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)** δ 26.2, 26.8, 55.3, 72.3, 76.1, 82.6, 85.4, 105.0, 112.0, 114.0, 128.1, 132.2, 159.6. Sólido blanco en un rendimiento del 29%; Pf= 188 º C y $[\alpha]_D^{25}$ =+10.6 (c = 1, $CHCl_3$).

Procedimiento general para la obtención de análogos de profármacos HepDirect 41-44.



41b: Ar = *p*-F-Ph
41d: Ar = *p*-OMe-Ph

42b: Ar = *p*-F-Ph
42d: Ar = *p*-OMe-Ph

43

Ar = *p*-OMe-Ph **44**

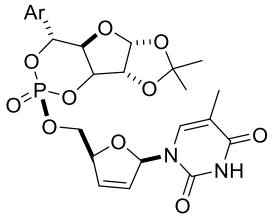
A una solución de estavudina **5** (200 mg, 0. 89 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le adiciona trietilamina (2.23 mmol). Posteriormente el sistema es enfriado a 0 ° C, para la adición pausada del agente fosforilante oxicloruro de fosforo (0.1 mL, 1.07 mmol). La mezcla presenta la formación de sólidos y un cambio en la coloración a una tonalidad naranja. Ocurridos 15 minutos, la reacción se lleva a t.a. y se monitorea por CCF cada 30 minutos hasta observar el consumo de la materia prima.

Mientras tanto en un matraz diferente se prepara una solución del diol precursor correspondiente **13** u **14d** (0.271 g, 0.892 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (1.5 mL). A dicha solución se le adiciona trietilamina (0.313 mL, 2.23 mmol) y consecutivamente el sistema es enfriado a 0 °C para la adición de la solución del compuesto **40**.

Al adicionar el diol, la mezcla de reacción se templa y se deja en agitación durante 4h. Seguido de esto, el disolvente se evapora, los sólidos del clorohidrato formado, se filtran y se lavan con AcOEt. La fase liquida se concentra mediante presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano; 2:1) obteniendo a los fosfatos de 6 miembros **41-44** como mezclas de diasteroisómeros en rendimientos moderados a bajos.

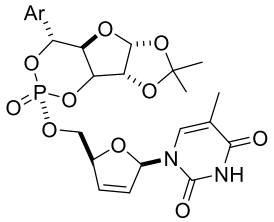
La mezcla de diasteroisómeros de **41b** y **42b** se puede separar mediante purificación en placa preparativa soportada en vidrio (20 x 20 cm), utilizando como eluyente AcOEt. La placa se corre hasta observar la separación de los diasteroisómeros, con ayuda de la lámpara de uv. Posteriormente, se recupera la sílice de la placa que contiene a los productos separados y se filtra a un matraz, lavándola con una mezcla de disolventes AcOEt: Metanol en una

relación 4:1. El filtrado se concentra mediante presión reducida obteniendo así a los diasteroisómeros puros **41b-42b**.



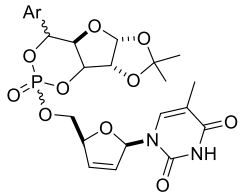
41b: Ar = *p*-F-Ph

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.33 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 4.29-4.40 (m, 2H), 4.42-4.45 (m, 1H), 4.74 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.91 (dd, *J* = 5.7, 3.3 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 5.48 (dd, *J* = 10.8, 3.9 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.06 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.33-6-35 (m, 1H), 7.00-7.02 (m, 1H), 7.09-7.15 (m, 2H), 7.18 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.43-7.48 (m,2 H); **^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)** δ 12.5, 26.3, 26.7, 68.8 (d, *J* = 6 Hz,), 79.9 (d, *J* = 6.7 Hz), 81.2 (d, *J* = 6.0 Hz), 81.3 (d, *J* = 5.2 Hz), 83.9 (d, *J* = 9.7 Hz), 84.5 (d, *J* = 6.7 Hz), 90.0, 105.3, 111.5, 113.0, 116.2 (d, *J* = 21.7 Hz), 127.5 (d, *J* = 8.2 Hz), 128.1, 132.0 (dd, *J* = 6.0, 3.0 Hz), 132.5, 135.4, 150.9, 163.0, (d, *J* = 246.7 Hz), 163.9; **^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$)** δ -6.7. Sólido blanco; Pf= 118 °C y $[\alpha]_D^{25}$ = + 26.4 (c = 0.5, CH_3OH).



42b: Ar = *p*-F-Ph

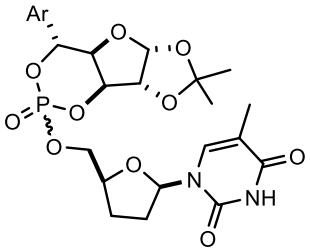
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.34 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.86 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 4.20-4.26 (m, 2H), 4.53-4.56 (m, 1H), 4.73 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.83 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 5.55 (dd, *J* = 10.5, 4.2 Hz, 1H), 5.94-5.97 (m, 1H), 6.12 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.31-6.34 (m, 1H), 7.01-7.03 (m, 1H), 7.08-7.14 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 1.5 Hz,1H), 7.38-7.42 (m, 2H); **^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)** δ 12.2, 26.3, 26.9, 68.4 (d, *J* = 5.2 Hz), 79.3 (d, *J* = 5.2 Hz), 80.4 (d, *J* = 6.0 Hz), 81.8 (d, *J* = 6.0 Hz), 84.0 (d, *J* = 10.5 Hz), 84.5 (d, *J* = 6.7 Hz), 89.9, 105.3, 111.5, 113.0, 116.0, 116.3, 128.0, 128.2 (d, *J* = 9 Hz), 131.9, 132.6, 135.6, 150.9, 161.5, 163.8, 164.8; **^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$)** δ -5.8. Sólido blanco; Pf = 112 °C.



42d, 43*
Ar= *p*-OMe-Ph
*RMN del crudo de reacción.

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3Cl_3) δ 1.32 (s, 5.1H), 1.44 (s, 3H), 1.45 (s,2.1 H), 1.86 (s, 2.1H), 1.88 (s, 3H), 4.28-4.33 (m, 1.4H), 4.34-4.36 (m, 2H), 4.37-4.38 (m, 0.6 H) 4.42-4.43 (m, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 0.6H), 4.72 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.90 (dd, *J* = 6.0, 3.0 Hz, 1H), 5.00 (s,0.7H), 5.03 (s,0.7H), 5.05 (s, 1H), 5.47 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 1H), 5.76 (s, 0.7H), 5.91-5.93 (m, 1.7H), 5.97 (d *J* = 3.5 Hz, 0.7H), 6,02 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.33-6.36 (m, 1.7H), 6.89-6.95 (m, 3.5H), 6,99 (m, 1H), 7.03 (m, 0.7H), 7.19 (s, 1H), 7.25 (s, 0.7H), 7.33-7.38 (3.5H). ; **^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$)** δ -6.9, -9.5

Reducción del doble enlace C2'-C3' de la estavudina en los profármacos sintetizados 41b y 42b:

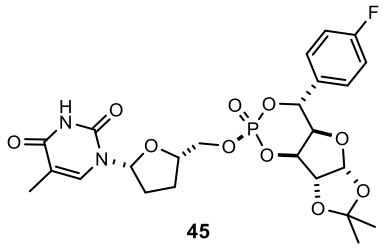


Ar = *p*-F-Ph

(R_P) 45
(S_P) 46

A una solución del profármaco **41b** o **42b** (100 mg, 0.19 mmol) en metanol grado reactivo (2mL), se le adiciona el catalizador de $Pd(OH)_2$ en una relación del 10% en peso. Seguido de esto la mezcla se dispone en un reactor, se purga, se sella y se carga a presión de H_2 (aproximadamente 100 psi) dejando en agitación vigorosa durante 2.0 h; permitiendo la obtención de los fosfatos cíclicos reducidos **45** y **46.**

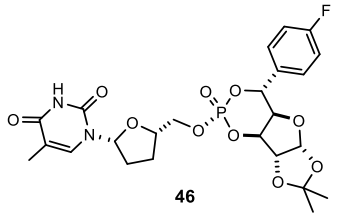
Posteriormente abre el contenedor con sumo cuidado liberando el H2 remanente en el reactor. La mezcla de reacción se filtra por un sistema de celite y sílice para eliminar el catalizador restante, lavando con AcOEt. La fase liquida se concentra a presión reducida; logrando la obtención de los profármacos como solidos amorfos blancos en rendimientos moderados que van del 50 al 60%.



45

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.32 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.91 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 1.92-2.03 (m, 2H), 2.08-2.16 (m, 1H), 2.37-2.44 (m, 1H), 4.27-4.32 (m, 2H), 4.40-4.47 (m, 2H), 4.74 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.90 (dd, *J* = 3.0, 5.5 Hz, 1H), 5.47 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H), 6.06-6.09 (m, 2H), 7.09-7.13 (m, 2H), 7.37 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.43-7.46 (m,2H), 8.61 (s, 1H).; **^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)** δ 12.55, 25.52, 26.26, 26.75, 31.68, 69.39 (d, *J* = 6.25 Hz), 78.26 (d, *J* = 6.3 Hz), 80.20 (d, *J* = 6.3 Hz), 81.09 (d, *J* = 6.3 Hz), 81.38 (d, *J* = 5.0 Hz), 83.86 (d, *J* = 10.0 Hz), 85.98, 105.30, 110.98, 113.02, 116.03, 116.20, 127.55 (d, *J* = 8.8 Hz), 131.99, 135.27,

150.24, 161.96, 163.59, 163.94. ; **^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$)** δ -7.2. Solido blanco; Pf = 102° C y $[\alpha]_D^{25}$ = + 46.0 (c = 0.5, MeOH).



46

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.34 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.84-1.87 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 1.98-2.04 (m, 1H), 2.07-2.14 (m, 1H), 2.38-2.45 (m, 1H), 4.23-4.32 (m, 3H), 4.55-4.57 (m, 1H), 4.76 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.86 (t, *J* = 4.0, 3.5 Hz, 1H), 6.08 (dd, *J* = 6.5, 5.0 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 9.5, 5.0 Hz, 1H), 7.09-7.12 (m, 2H), 7.37 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.4-7.42 (m,2H);**^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)** δ 12.5, 25.6, 26.3, 26.8, 31.6, 69.2 (d, *J* = 5.0 Hz), 78.2 (d, *J* = 6.3 Hz), 79.8 (d, *J* = 5.0 Hz), 80.2 (d, *J* = 5.0 Hz), 81.7 (d, *J* = 6.3 Hz), 83.9 (d, *J* = 10.0 Hz), 86.3, 105.4, 110.9, 113.0, 115.9, 116.0, 128.0 (d, *J* = 7.5 Hz), 132.0, 135.4, 150.3,162.0, 163.7, 164.0;**^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$)** δ -5.9.

Solido blanco; Pf = 99 ° C y $[\alpha]_D^{25}$ = + 59.4 (c =, $CHCl_3$).

REFERENCIAS

[1] Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H. Compendio esencial de química farmacéutica. Reverte **1983**, p. 21.

[2] Chertorivski-Woldenberg, S.; Kuri-Morales, P. A.; Fajardo-Dolci, G. E.; Rosette-Valencia, I.; González-Roldán, J. F. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica del VIH – SIDA, **2012**, 9-12.

[3] Jean-Pierre,S. *The Journal of Infectious Diseases* **1995**;*171(Suppl2)*, S88-S92.

[4] Waller D. G.; Sampson A. P. *Medical Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier: Reino Unido (**2017**).

[5] Zhan, P.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Liu, X. *J. Med. Chem*. **2016**, *59*, 2849−2878.

[6] Codina, C; Martín, M. T; Ibarra, O. *Libro de farmacia hospitalaria.* Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria: **2002**, p. 1493-1516.

[7] Clive, D. L. J.; Wickens, P. L.; Sgarbi, P. W. M. *J. Org. Chem*. **1996**, *61*, 7426-7437.

[8] Balzarini, J.; Karlsson, A.; Aquaro, S.; Perno, C.-F.; Cahardi, D.; Naesens, L.; De Clercq, E.; MaGuigan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 7295-7299.

[9] Lin, T. S.; Schinazi, R. F.; Prusoff, W. H. *Biochemical Pharmacology*, **1987**, *36*, 2713-2718.

[10] Tortolani, D. R.; Russell, J. R.; Whiterock, V. J.; Hitchcock M. J. M.; Ghazzouli, I.; Martin, J. C.; Mamsuri, M. M. Starret Jr., J. E. *Journal of PharmaceutiCel Sciences.* **1994**, *83*, 339-343.

[11] Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 189-198.

[12] Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; J Balzarini.*J. Med. Chem*. **2018**, *61*, 2211−2226.

[13] Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154−9218.

[14] Erion, M. D.; Reddy, K. R.; Boyer, S. H.; Matelich, M. C.; Gómez-Galeno, J.; Lemus, R. H.; Ugarkar, B. G.; Colby, T. J.; Schanzer, J.; van Poelje, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.

[15] Juaristi, E.; Cuevas, G. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5019-5087.

[16] Gorenstein, D. G. *Chem. Rev*. **1987**, *87*, 1047.

[17] Cruz-Gregorio, S.; Rodriguez-Palacios, V.; Höpfl,H.; Quintero, L.; Sartillo-Piscil, F. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 197-205.

[18] Quintero, L.; Sanchez-Vazquez, M.; Cruz-Gregorio, S; Sartillo-Piscil, F. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5852–5859.

[19] Sartillo-Piscil, F., Quintero, L., Cruz-Gregorio, S., & Espinosa-Aguirre, J; Elinos-Baez, C. M.; Höpfl, H; Serrano, A. *J. Org Chem.* **2014**, 79, 9647-9654.

[20] Sartillo-Piscil, F.; Sanchez, M.; Cruz-Gregorio, S.; Quintero, L. *Tetrahedron* **2004,** *60*, 3001–3008.

[21] Gorenstein, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2254-2258.

[22] Hiroshi, S.; Irie, Y.; Shirae, H.; Yokozeki, K.; Yasuda, N. *J. Org. Chem*. **1988**, *53*, 5170-5173.