

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Orgánica I**



**EL PROBLEMA DE LAS RESISTENCIAS EN EL SIDA:  
DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
UNA “SEGUNDA GENERACIÓN” DE DERIVADOS TSAO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

María Esther Lobatón Bravo

Bajo la dirección de las Doctoras:

María José Camarasa Ríos  
Sonsoles Velázquez Díaz

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1854-X**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I**

**EL PROBLEMA DE LAS RESISTENCIAS EN EL SIDA.**  
**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA**  
**DE UNA “SEGUNDA GENERACIÓN”**  
**DE DERIVADOS TSAO**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA ESTHER LOBATÓN BRAVO**

**Madrid, 2001**

A mis padres, mi hermana y a Jesús

con mucho cariño

Dña. MARÍA JOSÉ CAMARASA RÍUS Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Dña. MARÍA SONSOLES VELÁZQUEZ DÍAZ Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que el trabajo reflejado en la presente Memoria titulada “El problema de las resistencias en el sida. Diseño, síntesis y evaluación biológica de una “segunda generación” de derivados TSAO” ha sido realizado en el Departamento de Quimioterapia del Instituto de Química Médica (C.S.I.C) por Dña. María Esther Lobatón Bravo y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, junio de 2001

Fdo: María José Camarasa Ríus

Fdo: Sonsoles Velázquez Díaz

*Desde siempre, el gran sueño que ha inundado mi vida ha sido la realización de un trabajo serio de investigación dentro del mundo de la síntesis y el desarrollo de fármacos. Por esta razón siempre estaré eternamente agradecida a María José Camarasa, ya que ella me ha dado la oportunidad durante estos años de haber visto cumplido una gran parte de este sueño. Asimismo, quisiera agradecer tanto a la directora del Instituto de Química Médica que me acogió en mis inicios, la Dra. María Teresa García López como a la nueva directora del mismo, la Dra. Carmela Ochoa de Ocariz Herrero y al resto del personal del Instituto todo el apoyo y las facilidades concedidas para la realización del trabajo que se describe en la presente Memoria.*

*Quisiera agradecer, a la Dra. María José Camarasa y a la Dra. Sonsoles Velázquez, su apoyo durante todos estos años, su esfuerzo, el tiempo dedicado así como la formación científica que he adquirido gracias a su dedicación y seriedad en el trabajo realizado. Igualmente, a la Dra. Ana San-Félix por su cercanía, y comprensión en los momentos más difíciles y a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Pérez por su apoyo, sus grandes ideas y enseñanza en las nuevas metodologías aplicadas.*

*A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Pardo Gutiérrez del Cid, tutora de esta Tesis, por todas sus atenciones y facilidades.*

*A la empresa farmacéutica JANSSEN&CILAG, S.A. por la concesión del premio a jóvenes investigadores en la 9<sup>a</sup> convocatoria de premios para investigadores noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica y a los laboratorios del Dr. ESTEVE, S.A. por la concesión del premio a jóvenes investigadores en la 10<sup>a</sup> convocatoria de premios para investigadores noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica, trabajos que se encuentran reflejados en los capítulos 2 y 3 de la presente Memoria, respectivamente.*

*A M<sup>a</sup> Cruz Bonache, quisiera agradecerle su apoyo en el día a día, lo que ha hecho más fácil sobre todo estos últimos meses de escritura. Asimismo, a todos los compañeros del grupo: Sonia, mi actual compañera de laboratorio, Ana Isabel, Eva y Cristina así como a aquellos que ya no están trabajando aquí: Antonio y Vito. Asimismo, quiero agradecer a todos los compañeros del instituto su apoyo durante estos años, especialmente a Guillermo por su inagotable simpatía y buen humor y a Felipe las horas de ordenador compartidas.*

*A todos los que de una manera u otra han participado en la elaboración de esta Memoria:*

*A los Dres. Erik De Clercq y Jan Balzarini, por haber realizado la evaluación antiviral de todos los compuestos y los ensayos de metabolismo. Aunque especialmente quisiera agradecer su gran interés en la realización de los mismos.*

*Al Dr. Federico Gago y a Fátima Rodríguez por su colaboración en la realización de un modelo de interacción de los derivados TSAO.*

*A la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Jimeno, por su colaboración en la asignación de las estructuras. Asimismo, a Loli y Merche por su inestimable ayuda en la realización de los experimentos heteronucleares de RMN.*

*Todos ellos han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, y por ello quiero expresarles mi más sincero agradecimiento.*

*Finalmente, quisiera agradecer a mi familia su apoyo durante todos estos años, ya que sin él todo esto no hubiera sido posible. Asimismo quiero agradecer, especialmente, a Jesús, sus palabras de ánimo, su apoyo, comprensión y su inestimable ayuda día a día lo que ha hecho posible que el sueño de poder realizar y terminar con éxito mi Tesis Doctoral se haya hecho realidad.*

*A todos, MUCHAS GRACIAS de corazón.*

*M<sup>a</sup> Esther Lobatón*

## GENERALES

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>IE</b>	Inhibidor específico
<b>IEN</b>	Inhibidor específico nucleosídico
<b>IENN</b>	Inhibidor específico no nucleosídico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>TI</b>	Transcriptasa Inversa
<b>UNAIDS</b>	United Nations Programme on HIV/AIDS
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>VIF</b>	Virus de Inmunodeficiencia Felina
<b>VIS</b>	Virus de Inmunodeficiencia en Simios
<b>PFA</b>	foscarnet, ácido fosfonofórmico

## NUCLEOSIDOS

<b>ABC</b>	Abacavir
<b>AZT</b>	3'-Azido-3'-desoxitimidina
<b>2',3'-ddN</b>	2',3'-Didesoxinucleósidos
<b>ddC</b>	2',3'-Didesoxicitidina
<b>ddI</b>	2',3'-Didesoxiinosina
<b>dNTP</b>	Trifosfatos de desoxinucleósidos
<b>d4T</b>	2',3'-Didehidro-2',3'-didesoxitimidina
<b>TSAO-T</b>	[1-[2',5'-Di- <i>O</i> -( <i>terc</i> -butildimetilsilil)- <i>b</i> -D-ribofuranosil]timina]-3'- espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatol-2'',2''-dióxido
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	[1-[2',5'-Di- <i>O</i> -( <i>terc</i> -butildimetilsilil)- <i>b</i> -D-ribofuranosil]3- <i>N</i> - metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatol-2'',2''-dióxido

## DISOLVENTES Y REACTIVOS

<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhídrido acético
<b>CAN</b>	Nitrato cérico amónico
<b>CSI</b>	Clorosulfonil isocianato
<b>DBU</b>	Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno
<b>DMAP</b>	4- <i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>NMP</b>	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidinona
<b>TBDMSCI</b>	Cloruro de <i>terc</i> -butildimetilsililo
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano

## GRUPOS PROTECTORES

<b>Bn</b>	Bencilo
<b>Bz</b>	Benzoilo
<b>TBDMS</b>	<i>terc</i> -Butildimetilsililo

## TÉCNICAS

<b>CCTL</b>	Cromatografía circular centrífuga en capa fina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>IR</b>	Espectroscopia de infrarrojo
<b>UV</b>	Espectroscopia ultravioleta
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear

## UNIDADES Y MEDIDAS

<b>Tr</b>	Tiempo de retención (HPLC)
<b>PE</b>	Punto de ebullición (°C)
<b>PF</b>	Punto de fusión (°C)

## INDICE

	<u>págs</u>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
I.1. Introducción General .....	1
I.2. Antecedentes .....	11
I.2.1. Los derivados TSAO: Una familia particular de inhibidores de la TI de VIH-1 .....	11
I.2.2. El problema de las resistencias .....	14
I.3. Objetivos .....	19
<b>CAPÍTULO 1: Derivados TSAO modificados en la posición 4''</b>	
1. Derivados TSAO modificados en la posición 4'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido.....	23
1.1. Análogo desaminado de TSAO-T <b>1.1</b> .....	23
1.1.1. Evaluación Biológica del análogo desaminado <b>1.1</b> .....	26
1.1.1.1. Estudio de resistencias.....	27
1.2. Derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4''.....	30
1.2.1. Síntesis de derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4'' .....	30
1.2.2. Actividad antiviral.....	42
1.2.2.1. Estudios de estabilidad.....	45
<b>CAPÍTULO 2: Derivados TSAO sustituidos en la posición 3''</b>	
2. Derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido .....	51
2.1. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3''.....	52
2.1.1. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' mediante reacciones de alquilación.....	52
2.1.2. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' mediante reacciones de acoplamiento de Stille.....	55
2.1.2.1. Síntesis de los intermedios TSAO sustituidos en la posición 3'' con grupos halógeno.....	56
2.1.2.2. Reacciones de acoplamiento catalizadas por Paladio.....	57
2.2. Actividad Antiviral.....	69
<b>CAPÍTULO 3: Conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet]</b>	
3. Estrategia “doble fármaco”: conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet].....	73
3.1. Síntesis de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet].....	76
3.2. Actividad Antiviral.....	85
3.2.1. Estudios de estabilidad de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet].....	88
<b>CAPÍTULO 4: Modelo de interacción de los derivados TSAO</b>	

4. Modelo de interacción del TSAO-T con la Transcriptasa Inversa de VIH-1.....	93
4.1. Modelo preliminar de interacción del TSAO-T con la Transcriptasa Inversa de VIH-1.....	93
4.1.1. Modificaciones sobre el inhibidor TSAO-T.....	95
4.1.1.1. Síntesis de análogos de TSAO-T modificados en la posición 4 del anillo de timina.....	96
4.1.2. Modificaciones en la enzima.....	101
4.2. Nuevo modelo de interacción de los derivados TSAO con la TI de VIH-1.....	102
4.3. Mecanismo de inhibición de la TI por los derivados TSAO.....	105

## PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Preparación de los productos de partida.....	113
II.1.1. Derivados de azúcares.....	113
II.1.2. Derivados de nucleósidos.....	115
II.2. Síntesis de derivados TSAO modificados en la posición 4” del anillo de espiroaminoxatioldióxido.....	118
II.2.1. Síntesis del análogo desaminado de TSAO-T.....	118
II.2.2. Síntesis de derivados portadores de grupos carbonilo en la posición 4”.....	119
II.2.3. Síntesis de derivados portadores de grupos carbonilo en la posición 4” por reacciones con isocianatos.....	124
II.3. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3” del anillo de espiroaminoxatioldióxido.....	131
II.3.1. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3” y 4” mediante reacciones de alquilación.....	131
II.3.2. Síntesis de los intermedios TSAO sustituidos en la posición 3” con grupos halógenos.....	134
II.3.3. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3” por reacciones de acoplamiento de Stille.....	138
II.3.3.1. Síntesis de los reactivos de estaño no comerciales.....	138
II.3.3.2. Reacciones de acoplamiento catalizadas por Paladio.....	139
II.4. Síntesis de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet].....	146
II.4.1. Síntesis de reactivos de fósforo no comerciales.....	146
II.4.2. Conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet].....	148
II.5. Síntesis de análogos de TSAO-T modificados en la posición 4 del anillo de timina.....	152
II.6. Métodos Biológicos.....	155

CONCLUSIONES.....	159
-------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA.....	165
-------------------	-----

## I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es la epidemia que ha cerrado el siglo XX y, posiblemente, seguirá siendo uno de los retos más difíciles de la medicina hasta bien entrado el siglo XXI. Millones de hombres, mujeres y niños se enfrentan a un futuro dominado por una enfermedad fatal de graves consecuencias sociales, económicas y culturales.

Cuando hace dos décadas surgen los primeros casos de SIDA, nadie podía predecir como iba a evolucionar la epidemia y cual sería la manera de combatirla. En la actualidad sabemos por experiencia, que el SIDA puede devastar regiones enteras, destruir décadas de desarrollo, aumentar las diferencias entre naciones ricas y pobres, y arrastrar a grupos ya estigmatizados a los bordes de la marginalidad.

El SIDA se ha convertido en una epidemia mucho más grave y extensa de lo que predecían las estadísticas hace una década. De acuerdo con el informe titulado *La epidemia de SIDA: situación en diciembre de 2000*, dado a conocer por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup>, se estima que el número de personas que viven con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o con SIDA en el mundo alcanzó los 36.1 millones a finales del año 2000 (Figura I.1). Esto representa un aumento en más del 50% de los casos estimados por la OMS en 1991, según las estadísticas disponibles en aquel momento. Desgraciadamente, en algunos países del continente africano, el SIDA será responsable de la muerte de más de la mitad de los adultos.

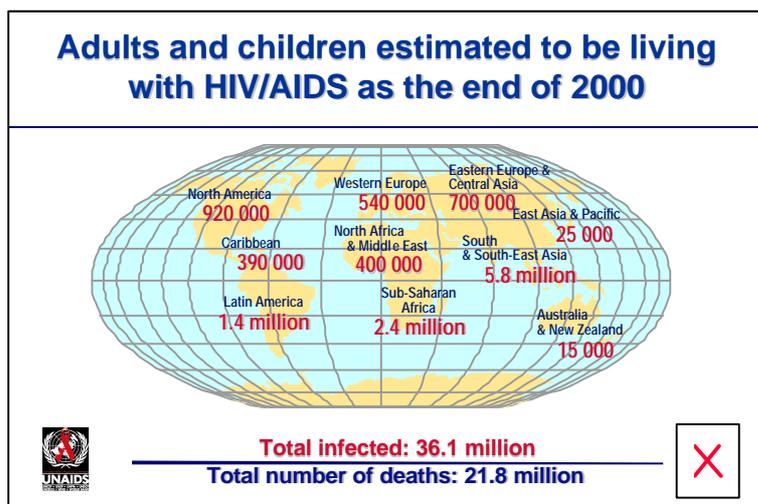


FIGURA I.1.– Número de casos acumulados de personas infectadas por VIH y fallecimientos por SIDA desde el comienzo de la epidemia hasta finales del 2000

Desde que se inició la epidemia, 22 millones de personas han fallecido a causa del SIDA, de las cuales 3 millones son niños. La pandemia está muy lejos de ser controlada; así, según el mencionado informe, en el curso del año 2000, se han infectado por el VIH unos 5,3 millones de personas en todo el mundo (Figura I.2).

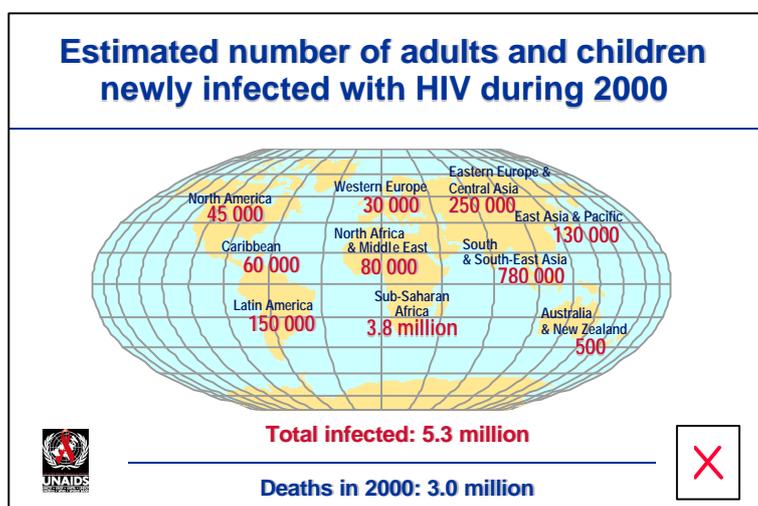


FIGURA I.2.– Número estimado de nuevas infecciones por VIH y fallecimientos por SIDA en el año 2000

En la actualidad, más del 95% de las personas infectadas por el VIH, viven en el mundo en desarrollo (Figura I.1), y es en estos países en los que se ha producido el 95% de todas las defunciones causadas por el SIDA hasta la fecha, sobre todo en adultos jóvenes que, en condiciones normales, se encontrarían en los años de máxima actividad productiva y reproductiva. Las múltiples repercusiones de estos fallecimientos están alcanzando

proporciones de crisis en algunas partes del mundo. Sea cual sea el patrón de medida utilizado (deterioro de la supervivencia infantil, descenso de la esperanza de vida, sobrecarga de los sistemas de asistencia sanitaria, aumento de la orfandad o reducción de los beneficios empresariales), nunca hasta ahora había planteado el SIDA una amenaza tan grande para el desarrollo.

El SIDA es una epidemia que se encuentra todavía en fase emergente y el número de muertes que causa, aumenta año tras año, al tiempo que el número de personas que contraen la infección se incrementa en unas 16.000 al día.

Los aumentos iniciales espectaculares de la infección por VIH en países desarrollados se invirtieron con éxito hacia mediados y finales de los años ochenta gracias a las campañas de prevención. Pero durante el último decenio, la tasa de nuevas infecciones se ha mantenido estable en lugar de seguir bajando.

Ciertamente, la epidemia ya no está fuera de control en los países desarrollados, gracias a las nuevas combinaciones de medicamentos contra el VIH que continúan reduciendo de manera significativa, las defunciones a causa del SIDA.

Sin embargo, en países en desarrollo, especialmente África, Asia y países de Europa del Este, el crecimiento de la epidemia es alarmante. La epidemia anulará los valiosos avances que se habían conseguido, al recortar drásticamente la esperanza de vida. El efecto sobre la esperanza de vida es proporcional a la gravedad de la epidemia local. Así por ejemplo, en Botswana, en donde más del 25% de los adultos están infectados, los niños nacidos a comienzos de esta década tendrán una esperanza de vida que superará escasamente los 40 años. Si no hubiera intervenido el SIDA, su esperanza de vida podría haber alcanzado los 70 años.

En España, según datos del Centro Nacional de Epidemiología<sup>2</sup>, el número de casos de SIDA acumulados desde que comenzó la epidemia (1981) es de 58.091, de los cuales para el 54% de ellos se ha notificado ya su fallecimiento. El número de casos nuevos de SIDA ha disminuido más de un 60% en los últimos 6 años debido al conjunto de avances de la lucha contra el SIDA, tanto en la prevención como en la asistencia sanitaria. Asimismo, los nuevos tratamientos antiretrovirales han contribuido a disminuir la letalidad del SIDA. El mayor descenso se registró entre 1996 y 1997, mientras que en los últimos años la incidencia tiende a estabilizarse por encima de 2.500 casos nuevos anuales. En cualquier caso, el descenso en la incidencia del SIDA es un dato positivo que indica una mejoría importante en el pronóstico y calidad de vida de personas infectadas por el VIH.

El concepto SIDA, designa el estadio final de un cuadro de inmunodeficiencia profunda debida a la pérdida de una subpoblación de linfocitos T, los T-4, que deja al paciente a merced de numerosas infecciones oportunistas de origen bacteriano, protozooario, fúngico o viral<sup>3,4</sup>.

En la actualidad no existe cura para el SIDA ni un tratamiento eficaz de la enfermedad, y lo que es más grave, la terapia del SIDA se enfrenta al problema de la rápida aparición de cepas de virus resistentes en tratamientos tanto en monoterapia (hoy descartada en el tratamiento clínico de la enfermedad) como en terapias combinadas. Sin embargo, no todo es negativo, y como ya se ha apuntado en párrafos anteriores, la experiencia nos indica que la prevención y un tratamiento temprano de la infección da como resultado una menor incidencia en la infección por VIH, una menor letalidad del SIDA y una mejor calidad de vida de las personas infectadas.

El aislamiento del virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como agente etiológico del SIDA<sup>5,6</sup>, y su identificación (1984) como un miembro de la familia de los retrovirus, ha estimulado enormemente la búsqueda de agentes capaces de bloquear la replicación del virus y frenar así la enfermedad. Los retrovirus son así denominados porque en su ciclo replicativo, la información fluye del ARN al ADN, en una dirección inversa a la habitual. En este proceso está implicada la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI). Debido a su asociación única a retrovirus, la Transcriptasa Inversa es considerada uno de los objetivos más atractivos en el diseño de compuestos selectivos frente a retrovirus y, más concretamente, frente al VIH<sup>7,8</sup>.

La Transcriptasa Inversa del VIH cataliza la síntesis de ADN proviral a partir de ARN genómico del virus, ADN que una vez duplicado y circularizado se integra en los cromosomas de la célula huésped. Este proceso es exclusivo, y al mismo tiempo esencial, en el ciclo replicativo de los retrovirus y por tanto del VIH. Al estar la TI presente sólo en las células infectadas por el virus, la inhibición de dicha enzima supone un punto de ataque selectivo sobre la replicación del VIH<sup>9</sup>.

La TI de VIH-1, es una enzima multifuncional con actividades concertadas polimerasa e hidrolasa (RNasa H). Dicha enzima es un heterodímero formado por dos subunidades, una subunidad de 66 KDa y una subunidad de 51 KDa (denominadas p66 y p51, respectivamente). En la subunidad p66 residen las actividades polimerasa y RNasa H<sup>10-14</sup> mientras que la subunidad p51 actúa como soporte estructural de la subunidad p66, estabilizando la conformación activa de dicha subunidad facilitando así la unión del ADN a la misma.

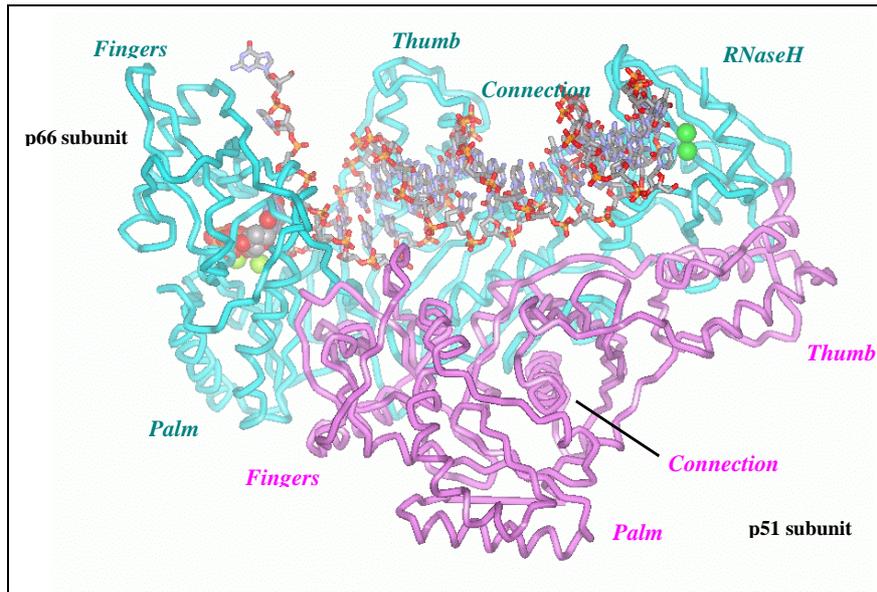


FIGURA I.3.— *Transcriptasa Inversa del VIH-1*

El dominio polimerasa de la subunidad p66 puede ser comparado anatómicamente con una mano derecha<sup>11-13,15</sup>, y está formado a su vez por cuatro subdominios, denominados dedos, palma, pulgar y conexión (Figura I.3). El centro activo, (sitio de unión del sustrato) de esta subunidad, localizado en el dominio de la palma, está formado por una tríada catalítica de residuos de ácido aspártico (Asp 110, Asp 185, Asp 186)<sup>11-13,15</sup>. Se ha propuesto que al menos dos iones  $Mg^{2+}$  asisten al proceso de polimerización, coordinándose con los carboxilos de los restos de Asp del centro activo<sup>15,16</sup> (Figura I.4).

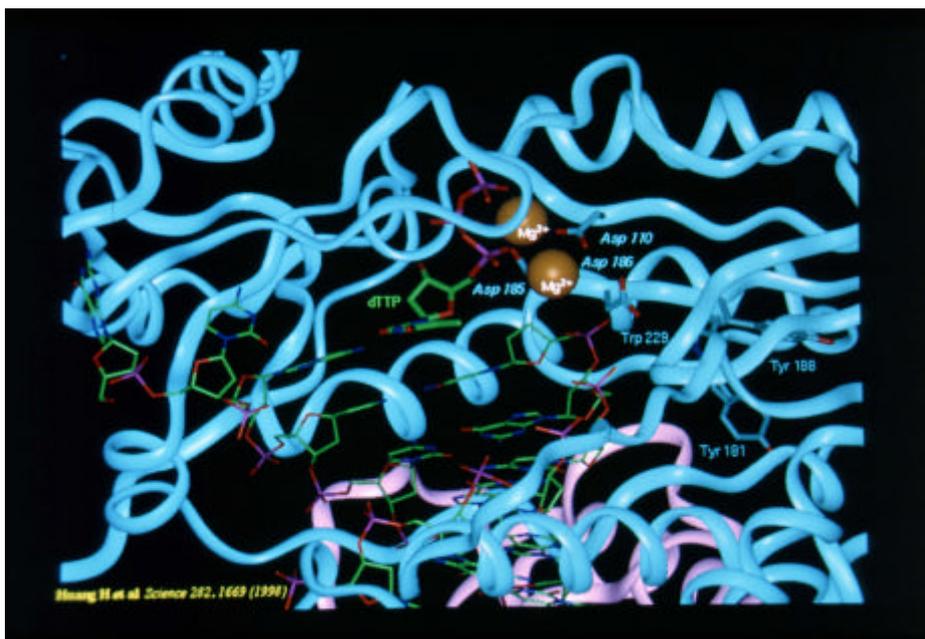


FIGURA I.4.— *Centro catalítico de la Transcriptasa Inversa del VIH-1*

Todos los fármacos aprobados para el tratamiento clínico del SIDA, actúan inhibiendo la TI del VIH, a excepción de los inhibidores de proteasa del VIH: saquinavir (**1**), indinavir (**2**), ritonavir (**3**) y nelfinavir (**4**) (Figura I.5) aprobados para su uso en terapias combinadas<sup>17</sup>.

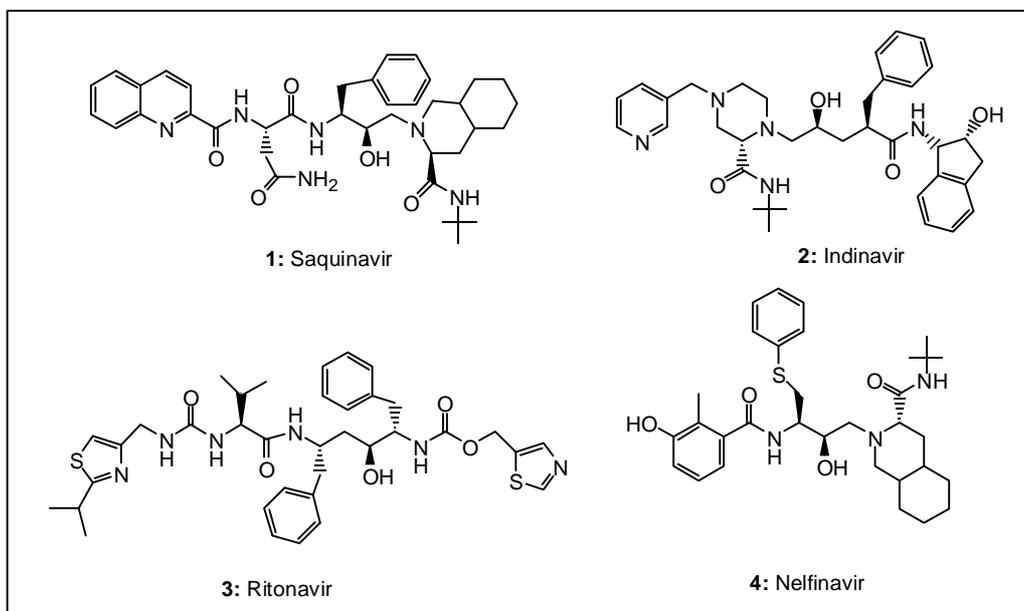


FIGURA I.5.– Inhibidores de proteasa de VIH aprobados en clínica.

Se han descrito numerosos inhibidores de la TI de VIH<sup>18-21</sup>, entre los que caben destacar cuatro grandes grupos.

**1.– 2',3'-Didesoxinucleósidos (2',3'-ddN).** A este grupo pertenecen seis de los trece fármacos aprobados para uso clínico en el tratamiento del SIDA (Figura I.6), la 3'-azido-3'-desoxitimidina ó zidovudina (AZT, **5**) empleada desde 1987, la 2',3'-didesoxicitidina o zalcitabina (ddC, **6**), la 2',3'-didesoxiinosina o didanosina (ddI, **7**) y la 2',3'-didehidro-2',3'-didesoxitimidina o estavudina (D4T, **8**) aprobados como terapia alternativa en pacientes que desarrollan resistencias o no toleran el AZT, la 2'-desoxi-3'-tiacitidina o lamivudina (3TC, **9**) y por último, el recientemente aprobado (1*S*,4*R*)-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9-*H*-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol o abacavir (ABC, **10**)<sup>22-26</sup>.

Para ejercer su acción antiviral, los 2',3'-ddN necesitan ser fosforilados en tres etapas sucesivas por acción de las quinasas celulares a sus correspondientes 5'-trifosfatos (ddNTPs). Los 2',3'-ddNTPs actúan como inhibidores competitivos del sustrato natural de la enzima (trifosfatos de desoxinucleósidos, dNTPs)<sup>20</sup>. Además, los 2',3'-ddNTP se comportan como sustratos alternativos, de modo que al ser incorporados a la cadena del ADN en formación y al

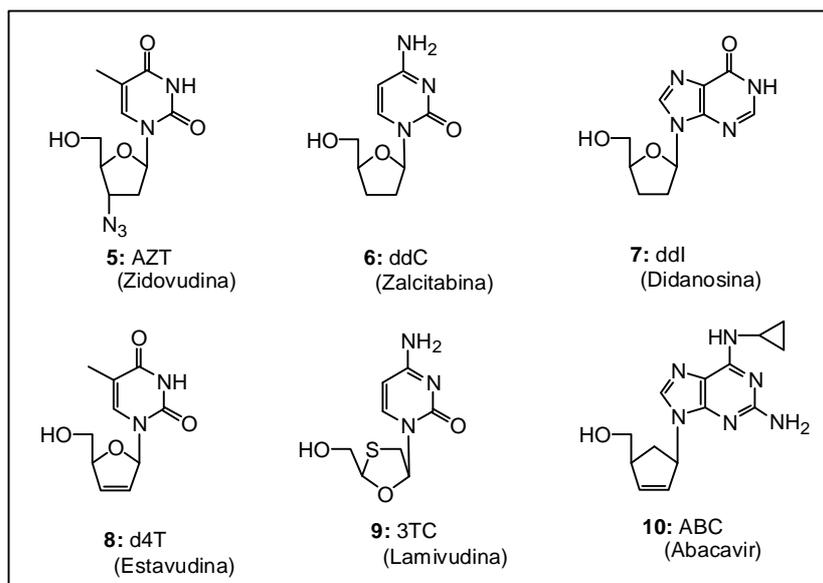


FIGURA I.6.– 2',3'-Didesoxinucleósidos aprobados para el tratamiento del SIDA

carecer del 3'-OH necesario para la elongación, actúan como terminadores de cadena, inhibiendo así la síntesis del ADN proviral<sup>27</sup>.

Los 2',3'-ddN no discriminan en su acción antiviral entre el VIH tipo 1 (VIH-1) y otros retrovirus como el VIH tipo 2 (VIH-2), el VIS (virus de inmunodeficiencia en simios), o el VIF (virus de inmunodeficiencia felina). El VIH-2 es el virus responsable del SIDA en la zona de Costa de Marfil y países limítrofes y es menos virulento e infeccioso que el VIH-1. Ambos virus difieren en su secuencia genómica, propiedades antigénicas y tamaño de sus proteínas<sup>28</sup>.

Mediante el empleo de estos fármacos se ha conseguido ralentizar el curso de la enfermedad, alargando y mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, los 2',3'-ddN poseen una elevada toxicidad con graves efectos secundarios<sup>24,29</sup>, debido en parte a su interacción con las ADN polimerasa celulares, y además inducen la aparición de cepas de virus resistentes en tratamientos prolongados<sup>21,30-32</sup>.

**2.- Fosfonatos de nucleósidos acíclicos (PAN).** A este grupo pertenecen el adefovir (PMEA, **11**), el aproprevir (PMPA, **13**), y sus profármacos bis(POM)PMEA (**12**) y bis(POC)PMEA (**14**), utilizados en clínica<sup>33</sup>. (Figura I.7). En este tipo de compuestos el azúcar del nucleósido está sustituido por un grupo alifático de 2-hidroxietilo (PMEA) o 2-hidroxipropilo (PMPA) funcionalizados con un grupo metilo como análogo del grupo

fosfato. Los PAN son resistentes a la degradación catabólica, lo que hace que la vida media de estos compuestos sea superior a la de otros derivados nucleosídicos utilizados en clínica<sup>32</sup>. Este tipo de compuestos no solo no discriminan en su acción antiviral entre VIH tipo 1 y otros retrovirus (VIH-2, VIS, VIF), sino que inhiben la replicación de diversos virus DNA tales como virus herpes, adenavirus, hepadnavirus, etc. lo que los convierte en compuestos de amplio espectro antiviral. Los PAN son fosforilados, en dos etapas, por acción de la 5-fosforil-1-pirofosfato sintetasa celular a los correspondientes difosfatos y como tales inhiben la TI, actuando asimismo como terminadores de cadena, al incorporarse a la cadena de ADN en formación<sup>32,33</sup>. Los PAN inducen asimismo, la aparición de cepas de virus resistentes<sup>34</sup>.

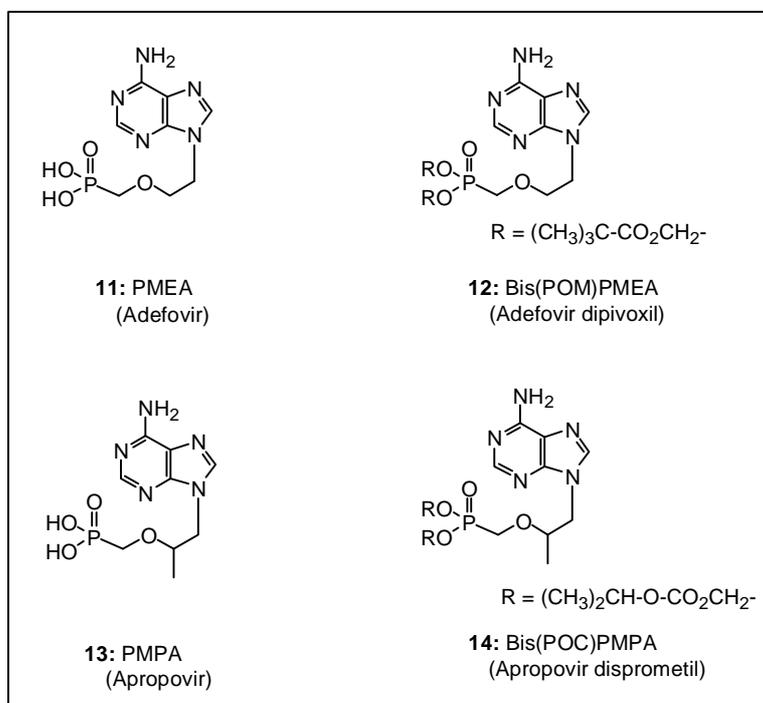


FIGURA I.7.– Fosfonatos de nucleósidos acíclicos

**3.– Foscarnet (ácido fosfonofórmico, PFA).** Es un inhibidor de la TI análogo al pirofosfato que posee un grupo fosfonato unido al carbono carboxílico del ácido fórmico (Figura I.8). El PFA (**15**) ejerce su acción inhibitoria de la TI de VIH interaccionando en el sitio de unión del pirofosfato, muy próximo aunque distinto al sitio de unión del sustrato. El foscarnet es un inhibidor no competitivo de la TI de VIH respecto a los sustratos naturales y incompetitivo respecto al molde/cebador (template/primer)<sup>32a,34</sup>.

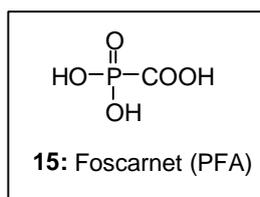


FIGURA I.8.— Estructura de Foscarnet

Asimismo, el PFA muestra actividad frente a virus herpes simplex y frente a citomegalovirus, lo que le convierte en un antiviral de amplio espectro. En su forma de sal sódica, está aprobado para uso clínico en el tratamiento de retinitis causadas por citomegalovirus en pacientes enfermos de SIDA y para infecciones por herpes resistentes al aciclovir en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo el PFA, debido a su naturaleza polianiónica, atraviesa muy mal la membrana celular, por lo que este compuesto ha de ser administrado a dosis muy altas, lo que se traduce en una toxicidad muy elevada para los pacientes, factor limitante de su uso clínico. Asimismo, al igual que el resto de inhibidores de la replicación del VIH induce la aparición de cepas de virus resistentes<sup>32a,34,35</sup>.

**4.- Inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN) del VIH-1.** Desde 1990 y como resultado de amplios programas de screening, se han descrito más de 30 familias de compuestos que son inhibidores potentes y altamente específicos de la Transcriptasa Inversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)<sup>31b,36-38</sup>. Dichos compuestos, a diferencia de los 2',3'-ddN, no afectan a la TI del VIH-2 o a otras ADN polimerasas<sup>36</sup>.

Algunos de estos compuestos tales como la Nevirapina (BI-RG-587, **16**), el BHAP (Delavirdina, **17**) y la Benzoxazinona (Efavirenz, **18**) están aprobados para el tratamiento clínico del SIDA<sup>20</sup> en terapias combinadas con ddN y/o inhibidores de proteasa<sup>20,31b,37</sup>. Otros se encuentran en fases clínicas avanzadas como el  $\alpha$ -APA (Lovirida, **10**), la Tioacarboxanilida (UC-781, **20**), el derivado de la familia HEPT (MKC-442, **21**), la Quinoxalina (HBY 097, **22**) y el 8-Cloro-TIBO (Tivarapina, **23**) (Figura I.9).

En los últimos años se han descrito las estructuras cristalográficas tanto de la apoenzima<sup>38,39,40</sup> como de la enzima formando complejos con distintos inhibidores no-nucleosídicos<sup>14,41</sup>. Estas estructuras han revelado cómo se forma el sitio de unión para los IENN y las sutiles pero importantes diferencias en su geometría dependiendo de la naturaleza del inhibidor.

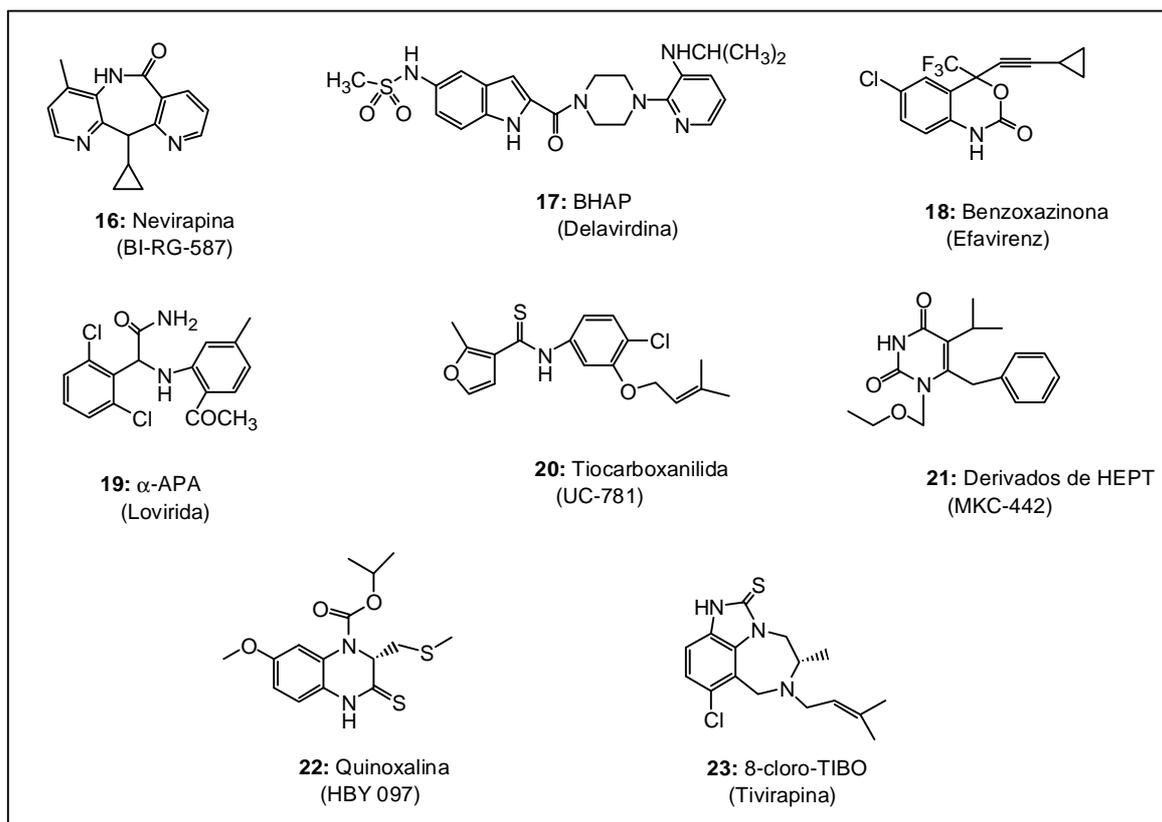


FIGURA I.9.– Inhibidores específicos de la TI de VIH-1 aprobados para el tratamiento del SIDA o en fases clínicas avanzadas

El sitio de unión de los IENN es un bolsillo hidrófobo, flexible y próximo, aunque distinto al centro catalítico de la enzima. Este bolsillo no existe como tal cuando el inhibidor no está interaccionando con la enzima. La flexibilidad y tamaño de este bolsillo permite que compuestos estructuralmente tan diferentes ejerzan un mismo tipo de inhibición, una inhibición de tipo alostérico<sup>14,20,41</sup>.

Estudios tanto estructurales<sup>42</sup> como cinéticos<sup>16</sup> revelaron que la unión de los IENN a la TI hace que la hebra molde/cebador (template/primer) se recolque en la proteína dando lugar a un distanciamiento de aproximadamente 2 Å entre el canal de unión y el sitio activo. Esto provoca una marcada disminución de la actividad enzimática. Por tanto, los inhibidores específicos inhiben la TI de VIH-1 debido a la distorsión del sitio activo en el dominio polimerasa.

Los IENN se caracterizan por su baja toxicidad, su alta hidrofobicidad y su elevada potencia antiviral, lo que les convierte en atractivos agentes anti-SIDA. Sin embargo, al igual que los ddN inducen el rápido desarrollo de cepas de virus resistentes<sup>34</sup>.

## I.2. ANTECEDENTES

### I.2.1. Los derivados TSAO: una familia particular de inhibidores de la TI de VIH-1

Dentro del grupo de los IENN de la TI de VIH-1 los derivados TSAO representan una familia peculiar y única de compuestos descubierta en nuestro laboratorio en el año 1992<sup>43,44</sup> en colaboración con el grupo de los Dres. Jan Balzarini y Eric De Clercq del Rega Institute de la Universidad de Lovaina (Bélgica). El prototipo de esta familia de inhibidores es el derivado de timina denominado TSAO-T (**24**) (Figura I.10)<sup>43b</sup>. Los derivados TSAO, a pesar de su naturaleza nucleosídica, inhiben de un modo potente y selectivo a la TI de VIH-1, siendo inhibidores reversibles no competitivos respecto al sustrato natural. En este sentido se comportan igual que los IENN<sup>44-47</sup>, uniéndose al mismo bolsillo hidrófobo. También, al igual que los IENN, resultan inactivos frente a otros retrovirus (VIH-2, VIS, VIF) o frente a virus ADN o ARN.

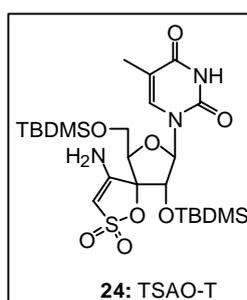


FIGURA I.10.– Estructura de TSAO-T (**24**)

Sin embargo, los derivados TSAO muestran notables diferencias respecto a los demás IENN en su comportamiento frente a la TI, lo que les convierte en una familia de compuestos muy particular.

Para ejercer su acción antiviral los derivados TSAO tienen que cumplir unos requisitos estructurales muy estrictos en lo que se refiere a la naturaleza del resto de azúcar, como son la presencia simultánea del anillo de espiro 5-(4-amino-1,2-oxatíol-2,2-dióxido) en la posición



Como ya se ha mencionado, un grave inconveniente que presentan tanto los 2',3'-ddN como los IENN, es la aparición de cepas de virus resistentes. Se ha observado igualmente la rápida aparición de cepas de virus TSAO-resistentes. Así, cuando se seleccionaron, en cultivo celular, cepas de virus resistentes a distintos derivados TSAO (al menos siete derivados) en todos los casos se aisló una única cepa viral que presenta una única mutación (lo cual es muy inusual) a nivel del codon que codifica para la posición 138 (GAG AAG) que pasa de glutámico (Glu) en la cepa salvaje a lisina (Lys) en la cepa TSAO-resistente<sup>50,56,57</sup>. No se observó ningún otro cambio de aminoácidos en las posiciones descritas como mutantes en las cepas resistentes a otros inhibidores específicos<sup>36,58-61</sup>. La cepa TSAO-resistente es inhibida por la práctica totalidad de los demás IENN.

El resto de Glu-138 en la estructura tridimensional de la enzima a nivel de la subunidad p66, subunidad que contiene el centro activo, se encuentra muy alejado del resto de los aminoácidos implicados en resistencias frente a los inhibidores específicos (ver Figura I.12 extremo superior izda.). Sin embargo, dicho aminoácido a nivel de la subunidad p51 (representado como GluB138 en la figura) forma parte del bolsillo donde interaccionan los IENN. Estudios de mutagénesis dirigida han llevado a la conclusión de que el Glu 138 es importante a nivel de la subunidad p51 y no de la p66 para la interacción de los derivados TSAO con la enzima<sup>56</sup>, siendo el primer caso y hasta el momento el único, para el que se ha demostrado la importancia de la subunidad p51 para la interacción enzima-inhibidor, hecho que ha servido para una mejor caracterización del bolsillo donde se unen los distintos inhibidores específicos<sup>13,38c,40</sup>.

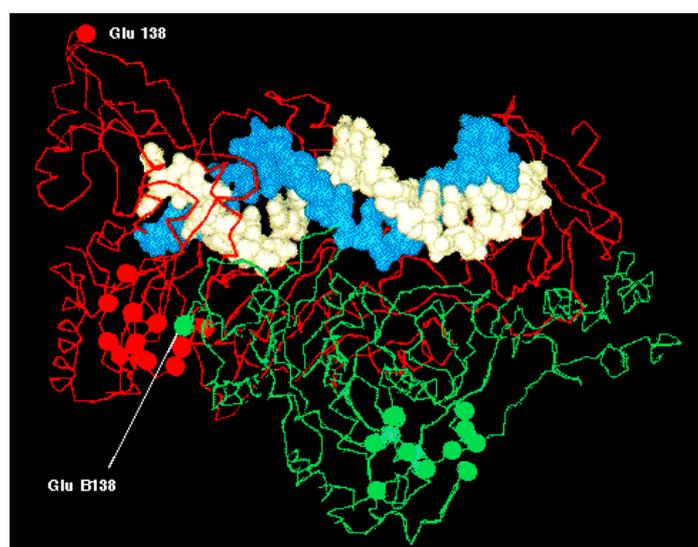


FIGURA I.12.– Localización estructural del Glu-138 en las subunidades p66 (en rojo) y p51 (en verde) de la TI de VIH-1

Los resultados de los ensayos biológicos junto con los obtenidos de los estudios de resistencias y mutagénesis dirigida nos llevaron a postular una interacción entre el grupo 4''-NH<sub>2</sub> del anillo de espiroaminoxatioldióxido de las moléculas TSAO y el Glu de la posición 138 de la subunidad p51 de la enzima<sup>50,56,57</sup>.

Además, a partir de los mencionados estudios de resistencia cruzada y mutagénesis dirigida, se ha podido establecer que existen otros aminoácidos a nivel de la subunidad p66 cuya mutación confiere resistencia a los derivados TSAO tales como Val 106 (Val Ala), Tyr 181 (Tyr Cys) y Tyr 188 (Tyr Cys o His), aminoácidos implicados en fenómenos de resistencias a otros IENN. Estos datos sugieren que estos aminoácidos de la subunidad p66 podrían ser importantes para la interacción TSAO-TI<sup>44,56,57,62</sup>. Por tanto, parecen ser necesarias interacciones en ambas subunidades de la Transcriptasa Inversa para la interacción de los derivados TSAO. Este es otro de los hechos que avalan la peculiaridad de esta familia de inhibidores de la TI, los derivados TSAO son las únicas moléculas conocidas que interaccionan en ambas subunidades de la TI de VIH-1.

Estudios recientes realizados en 1998 por Pandey y col.<sup>63</sup> y por nuestro grupo de trabajo en el año 2000<sup>64</sup>, ayudan en parte a comprender el particular comportamiento de los derivados TSAO. En dichos estudios se propone que la interacción de los derivados TSAO con la TI provoca una desestabilización del heterodímero p66/p51 de la enzima lo que conlleva una inactivación parcial de la misma y una pérdida de afinidad por el ADN viral.

Por tanto a la vista de todo lo expuesto hasta este punto, se puede postular que los derivados TSAO ejercen un modo particular de inhibición sobre la TI, posiblemente interaccionando en la interfaz de las dos subunidades (p66/p51) de la enzima, provocando una desestabilización del heterodímero.

### **I.2.2. El problema de las resistencias**

La aparición de cepas de virus resistentes y la necesidad de tratamientos prolongados (de por vida) son las principales causas del fracaso de la terapia antiretroviral. Los estudios y caracterización de las cepas resistentes junto con los estudios cristalográficos enzima-inhibidor (en algunos casos), han permitido la identificación de las mutaciones responsables de las resistencias, así como su localización en el contexto tridimensional<sup>31,65,66</sup>. Todas las mutaciones que confieren resistencia tanto a los 2',3'-ddN como a los inhibidores específicos están localizadas en la subunidad p66 de la enzima excepto la mutación 138 (Glu Lys) que

confiere resistencia a los derivados TSAO, situada en la subunidad p51<sup>56</sup> (Figura I.13). Las mutaciones responsables de las resistencias a los ddN están localizadas próximas al sitio de unión del sustrato. Las mutaciones responsables de las resistencias a los inhibidores específicos están agrupadas en el bolsillo hidrófobo que es su sitio de unión<sup>20,34</sup>.

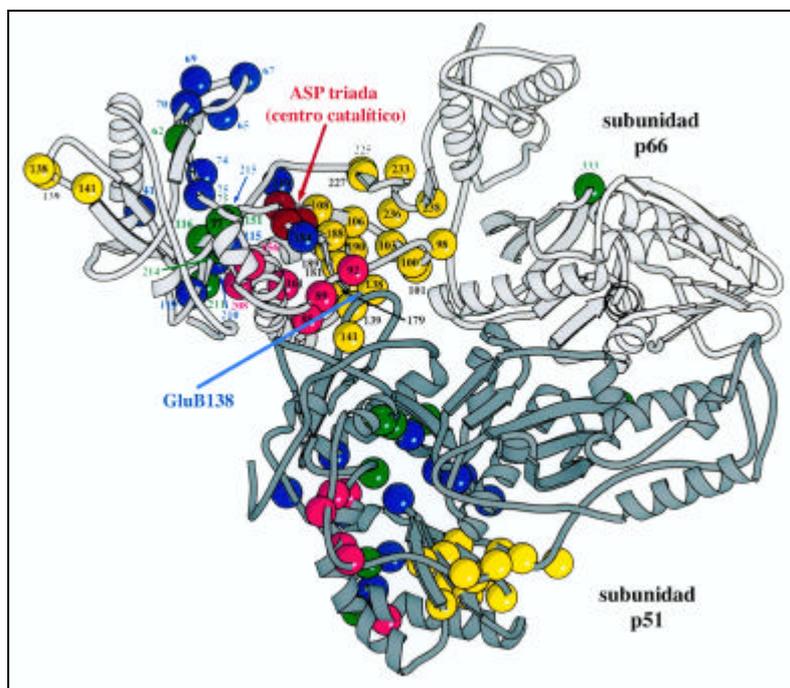


FIGURA I.13.— Localización estructural en el heterodímero p66/p51 de las mutaciones asociadas con las resistencias a los distintos tipos de inhibidores de la TI. En azul, las mutaciones resistentes a ddN y PAN. En magenta, las mutaciones responsables de la resistencia a foscarnet. En amarillo, las mutaciones responsables de las resistencias a los IENN

Comparado con la rápida aparición (semanas o meses) de cepas virales resistentes a los diferentes fármacos empleados en monoterapias, el virus se puede suprimir durante largos periodos de tiempo (meses o incluso años) cuando se utilizan terapias combinadas (politerapias) en lo que hoy se conoce como terapia antiretroviral de alta eficacia (HAART). La eficacia de la politerapia en el tratamiento del SIDA reside en su capacidad de frenar los mecanismos de resistencia genética del virus<sup>67,68</sup>. Debido al bajo grado de “fidelidad” de la transcriptasa inversa de VIH, aparecen espontáneamente numerosas mutaciones durante el proceso de replicación del virus. Esta hipervariabilidad del VIH favorece la aparición de variantes que son resistentes a los compuestos anti-retrovirales utilizados.

La reducción en la carga viral, conseguida en pacientes tratados en fases tempranas de la enfermedad con politerapia, hace que la enfermedad no progrese, ya que implica un menor

número de linfocitos T infectados y permite, por tanto, una recuperación del sistema inmune<sup>69,70</sup>.

Por tanto, hoy en día es evidente que, al igual que en la quimioterapia del cáncer y de algunas enfermedades bacterianas, la estrategia a seguir en la lucha contra el SIDA es la terapia combinada<sup>65,66</sup>. Una combinación racional de fármacos puede dar lugar, por un lado a una menor toxicidad, ya que se emplean concentraciones inferiores de los fármacos que las empleadas individualmente, por otro a la prevención o retraso en la aparición de resistencias y por último puede aumentar la eficacia de los agentes terapéuticos debido a efectos sinérgicos o al menos aditivos<sup>34</sup>.

Sin embargo, el empleo de terapias combinadas no está exento de problemas. El primero de ellos es que a pesar de que en muchos casos la carga viral es indetectable, el virus “se esconde” en ciertos reservorios del organismo (linfocitos CD4<sup>+</sup>, macrófagos, células dendríticas, vasos linfáticos, etc.), donde está a salvo de la acción de los fármacos antiretrovirales, manteniendo su capacidad de replicarse y por tanto de mutar y desarrollar resistencias frente a dichos fármacos.

Además, no siempre la combinación de fármacos da lugar a beneficios terapéuticos. Existen numerosos ejemplos que muestran el efecto antagonista, el aumento de toxicidad, la interferencia metabólica o incluso una aceleración en el desarrollo de resistencias, cuando se combinan ciertos fármacos<sup>34</sup>. Por tanto, la elección y combinación de fármacos debe hacerse de un modo racional.

Otro de los problemas de la terapia combinada surge a la hora de decidir cual es el cóctel de fármacos más adecuado. A medida que aumenta el número de compuestos aprobados para el tratamiento del SIDA, aumentan las posibilidades de combinación y, por tanto se hace más difícil elegir la mejor combinación (con los trece fármacos aprobados actualmente son posibles 165 combinaciones triples diferentes)<sup>34</sup>.

Los estudios de resistencia cruzada, utilizando el arsenal de compuestos anti-SIDA hoy disponibles, y la caracterización de cepas mutadas, aportan una información muy valiosa para el diseño de estas terapias combinadas.

La elección de la combinación de fármacos anti-VIH se realiza, de un modo racional, siguiendo distintas aproximaciones<sup>65,66,71-73</sup>. (i) La combinación de compuestos que se unen a distintos sitios de la misma proteína viral, por ejemplo, dentro de los inhibidores de la TI, se combinan análogos de 2',3'-ddN con inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN). (ii) La combinación de compuestos que actúan sobre enzimas implicadas a diferentes niveles del

ciclo replicativo del virus, como por ejemplo, la combinación de inhibidores de Transcriptasa Inversa e inhibidores de Proteasa. (iii) Se han diseñado terapias combinadas que incluyen compuestos que actúan sobre un mismo punto de la enzima pero que presentan un perfil de sensibilidad/resistencias complementario.

Llegado este punto, me gustaría destacar que la terapia anti-SIDA está resultando especialmente difícil, ya que a pesar de las terapias combinadas el virus es realmente “inteligente” y utiliza todos sus mecanismos para escapar de los efectos de las mismas. Así, existen estudios *in vitro* que demuestran cómo el virus puede seleccionar mutaciones alternativas cuando se le somete a la presión de p.ej. dos compuestos con un perfil complementario de resistencias<sup>34,61</sup>. Por ejemplo, por mencionar aquellas terapias que incluyen a los derivados TSAO, la combinación de dos IENN [TSAO-m<sup>3</sup>T que selecciona la mutación Glu138Lys y BHAP (Figura I.14) que selecciona la mutación Leu100Ile en la TI en monoterapia] dio lugar a la formación de cepas virales resistentes, cepas que al ser caracterizadas no presentaron mutaciones ni en la posición 138 ni en la posición 100<sup>41,56</sup>, sino en la posición 181 (Tyr Cys)<sup>59,74</sup>. Esta cepa es resistente a la mayoría de los IENN descritos<sup>27,74</sup>.

Uno de los pocos inhibidores que mantienen casi inalterada su potencia frente a la cepa mutada 181Cys es el UC42 (**26**) (Figura I.14), desarrollado por la compañía UNIROYAL. Este compuesto es activo frente a cepas que no son inhibidas por los derivados TSAO (Val106 Ala, Tyr181 Cys, Tyr188 Cys, Glu138 Lys), y a su vez los derivados TSAO mantienen una marcada actividad frente a las cepas resistentes a UC42 (Leu100 Ile, Lys103 Asn). Es decir, UC42 y TSAO-T presentan un perfil de sensibilidad/resistencias complementario. Así, se ha visto que cuando ambos inhibidores se combinan en cultivo celular<sup>75</sup>, se evita la aparición de cepas virales resistentes, tras 37 días de ensayo. Incluso tras eliminar los compuestos del cultivo celular no se detectó la formación de partículas virales. Este mismo resultado se observó en la triple combinación de TSAO-T, UC42 y BHAP, que permitió, además, el empleo de concentraciones de compuestos aún más bajas<sup>75</sup>.

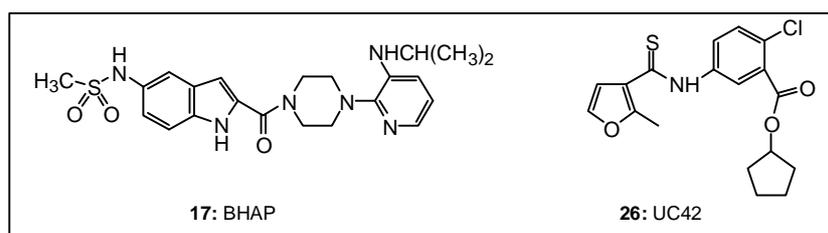


FIGURA I.14.– Estructuras de BHAP (**17**) y UC42 (**26**)

Estos resultados apoyan la idea de que una combinación racional de inhibidores específicos con un perfil complementario de sensibilidad/resistencia, puede ser una estrategia útil para retrasar o evitar la aparición de resistencias y hace a los derivados TSAO unos candidatos muy atractivos para el diseño de terapias combinadas de 2 o más compuestos.

El éxito o el fracaso de la terapia anti-SIDA viene determinado por la interrelación de tres factores, como son el virus, el tratamiento y el enfermo. Esto hace que sea inmensamente complicado predecir el resultado de un tratamiento y hacer extensible a otros pacientes aquel tratamiento que tuvo éxito con un paciente determinado.

Los avances de la comunidad científica en el conocimiento, prevención y lucha contra el SIDA han sido espectaculares, sin embargo, quedan todavía muchas metas por alcanzar. La aparición de una tercera cepa de VIH<sup>76</sup>, no detectable por los métodos de detección empleados en la actualidad, ha complicado el panorama y ha puesto de manifiesto la importancia de seguir investigando en este campo. Asimismo, se ha demostrado la transmisión de cepas de virus resistentes<sup>77</sup> a los fármacos que se emplean en clínica. Esto indica que el “armamentarium” actual del que disponemos no es suficiente para controlar la replicación viral y luchar así contra la enfermedad, por tanto, es necesario el diseño de fármacos efectivos en nuestra lucha contra el SIDA.

A la vista de todo lo expuesto, consideramos que los derivados TSAO constituyen un herramienta útil para el mejor conocimiento de la TI de VIH-1 y su inhibición.

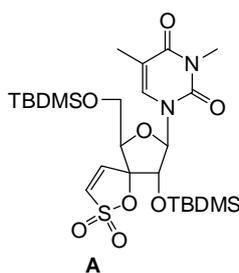
En resumen, son varios los hechos que avalan la peculiaridad de los derivados TSAO respecto al resto de los inhibidores específicos de la Transcriptasa Inversa de VIH-1. En primer lugar, su estructura de nucleósido, aunque altamente modificado. En segundo lugar, su comportamiento frente a la selección de cepas resistentes puesto que en todos los casos seleccionan una única mutación (Glu138Lys) que, además, no se ha descrito para otros inhibidores específicos. Y en tercer lugar, su interacción con la subunidad p51 y su posible mecanismo de desestabilización del heterodímero.

En la presente Memoria, se han abordado diferentes modificaciones estructurales en esta familia de compuestos, con el fin de profundizar en el conocimiento del modo de interacción de los derivados TSAO con la Transcriptasa Inversa y obtener una “segunda generación” de derivados TSAO, capaces de interaccionar con las cepas TSAO-resistentes y retrasar y/o evitar la aparición de cepas de virus resistentes.

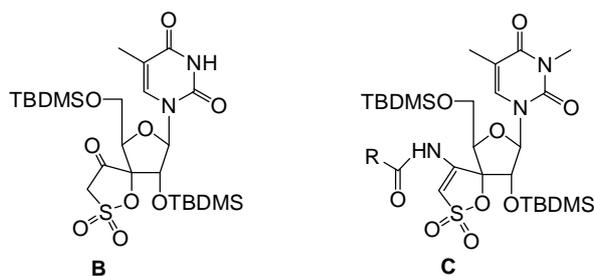
### I.3. OBJETIVOS

El objetivo global del trabajo que se refleja en esta Memoria es la obtención de derivados TSAO de “segunda generación” con un perfil de actividad/resistencias diferente al de los derivados TSAO de “primera generación” y que además pudieran de algún modo retrasar y/o evitar la aparición de cepas de virus resistentes. Si se alcanzara dicho objetivo, estos nuevos derivados TSAO podrían ser de utilidad en el diseño de terapias combinadas.

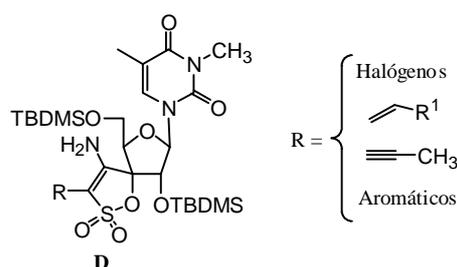
Para alcanzar dicho objetivo en primer lugar nos propusimos estudiar la importancia en la actividad antiviral de la interacción entre el grupo amino de la posición 4” del anillo de espiroaminoxatioldióxido de las moléculas TSAO y el grupo ácido del glutámico de la posición 138 de la Transcriptasa Inversa de VIH-1 (como se ha mencionado una mutación en dicho aminoácido da lugar a resistencias a los derivados TSAO). Para ello nos propusimos la preparación del análogo TSAO, de fórmula **A**, en el que se ha eliminado el grupo amino del espiroanillo. La obtención de este compuesto nos permitiría, además estudiar si la ausencia de dicho amino en la molécula TSAO daría lugar a un perfil de resistencias diferente.



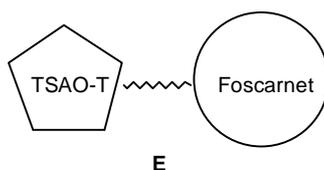
Por otra parte, nos planteamos la obtención de derivados TSAO que pudieran mostrar actividad frente a las cepas de virus TSAO-resistentes (Glu138Lys). Para ello diseñamos compuestos de fórmulas **B** y **C** portadores en la posición 4” de grupos carbonilo que podrían interaccionar con el grupo amino de la Lys de la posición 138 de la cepas TSAO-resistentes. En el primer capítulo se recogen los resultados de síntesis y evaluación de dichos compuestos (**A**, **B** y **C**).



En el segundo capítulo, se ha abordado una aproximación diferente consistente en la obtención de derivados TSAO que pudieran dar lugar a interacciones adicionales con la TI de VIH-1. Para ello se han diseñado y sintetizado compuestos de fórmula general **D**, en los que se ha mantenido el grupo 4''-amino del anillo de espiroaminoxatiolide, para interactuar con el Glu-138, y se ha sustituido la posición contigua (3'') con grupos de distinta naturaleza que pudieran interactuar con aminoácidos de la TI de VIH-1 próximos a dicho Glu-138. Este tipo de compuestos podría retrasar y/o evitar la aparición de cepas de virus TSAO-resistentes, ya que al haber más puntos de interacción con la enzima (TI) puede que al virus le resulte más difícil mutar.



En el tercer capítulo, se describe la preparación de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] de fórmula general **E**, que podrían representar una aproximación alternativa a la terapia combinada frente al virus del SIDA. Los compuestos diseñados combinan en su estructura una molécula TSAO con una molécula de foscarnet unidas mediante un enlace covalente lábil (tipo éster) que podría ser metabolizado intracelularmente.

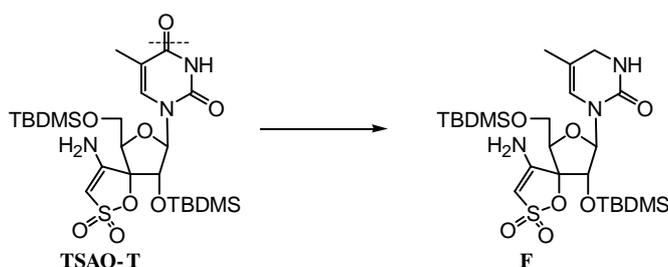


Estudios previos de combinación “*in vitro*” de los derivados TSAO con foscarnet mostraron un efecto aditivo entre ambos inhibidores y un retraso en la aparición de cepas

virales resistentes. Sin embargo, el foscarnet, compuesto de naturaleza polianiónica a pH fisiológico, presenta problemas de permeabilidad a través de la membrana celular que se traducen en bajas concentraciones intracelulares de este fármaco en las células infectadas por el virus.

Con el diseño y síntesis de este tipo de “conjugados” pretendemos explorar: (i) si la elevada lipofilia del derivado TSAO podría ayudar a “transportar” el foscarnet dentro de la célula, (ii) si una vez dentro, el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] sería metabolizado liberando ambos inhibidores y, (iii) estudiar el efecto que tendría en la actividad antiviral la liberación de mayores concentraciones intracelulares de foscarnet.

Al inicio del trabajo de la presente tesis doctoral disponíamos de un modelo preliminar de interacción entre los derivados TSAO y la TI de VIH-1. En dicho modelo existe una interacción desfavorable entre el oxígeno de la posición 4 del anillo de timina del TSAO-T y el carbonilo del esqueleto carbonado de la His-A235 de la enzima. Se podría razonar que la eliminación de dicho oxígeno de la timina del TSAO-T debería dar lugar a una molécula de mayor afinidad por la enzima al desaparecer la interacción desfavorable, lo que debería traducirse en un aumento de la actividad de la misma respecto al prototipo TSAO-T. Con el fin de comprobar esta hipótesis y validar el modelo, nos planteamos la preparación del derivado TSAO de fórmula **F** carente de dicho oxígeno en la posición 4 del anillo de timina.



En el cuarto capítulo se describe la síntesis de este derivado, su evaluación biológica y la traducción de estos resultados en el modelo de interacción.

Paralelamente a la síntesis se ha llevado a cabo la evaluación frente a VIH de los compuestos preparados. Los datos de dichas evaluaciones están recogidos en el apartado de actividad antiviral correspondiente en cada capítulo. El análisis de los resultados obtenidos nos ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de interacción de los derivados TSAO con la TI.



## 1. DERIVADOS TSAO MODIFICADOS EN LA POSICIÓN 4'' DEL ANILLO DE ESPIROOXATIOLDIÓXIDO

En el presente capítulo se describe la síntesis de análogos TSAO modificados en la posición 4'' del anillo de espirooxatioldióxido (**1.1**, **1.2**, **I**). Con la preparación de estos compuestos se pretende la obtención de derivados TSAO de “segunda generación” con un perfil de actividad/resistencias diferente a los derivados TSAO de primera generación.

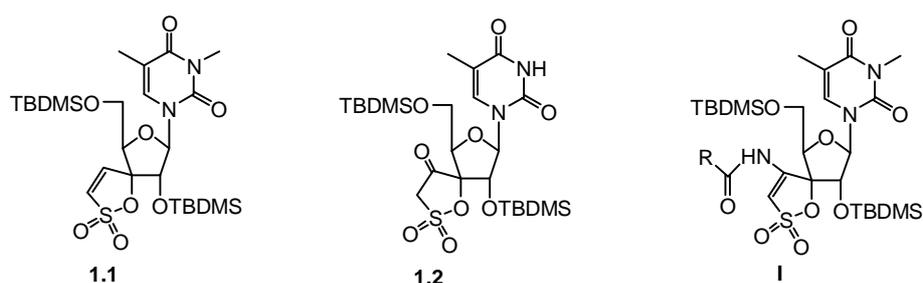


FIGURA 1.1.– Derivados TSAO modificados en la posición 4''

### 1.1. Análogo desaminado de TSAO-m<sup>3</sup>T

Como se ha comentado en la introducción, los estudios de resistencias, mutagénesis dirigida y ensayos biológicos apuntaban a la existencia de una interacción específica entre el amino de la posición 4'' del espiroanillo de las moléculas TSAO y el grupo ácido del glutámico de la posición 138 de la subunidad de la enzima.

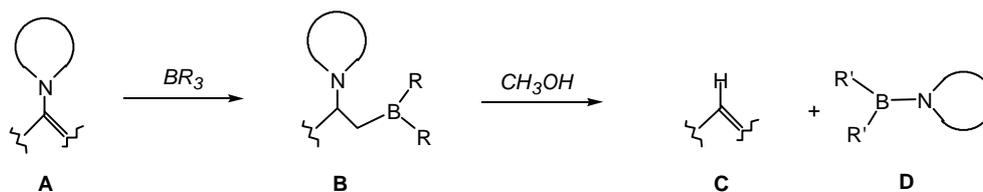
Basándonos en esta hipótesis y con el fin de estudiar la importancia de dicha interacción en la actividad antiviral, en primer lugar nos planteamos la preparación del derivado **1.1** (Figura 1.1), en el que se ha sustituido el grupo amino por un hidrógeno. Con la preparación de este compuesto pretendemos estudiar además si la ausencia de dicho grupo amino en esta molécula daría lugar a un perfil de resistencias diferente.

La síntesis de la molécula objetivo se llevó a cabo mediante desaminación reductiva.

El proceso de desaminación reductiva (sustitución de grupos amino por hidrógeno) en síntesis orgánica ha sido ampliamente estudiado tanto en sistemas aromáticos<sup>78</sup> como alifáticos<sup>79</sup> y en menor medida en enaminas<sup>80</sup>. Entre las numerosas aproximaciones descritas en la bibliografía para este tipo de reacciones<sup>79-80</sup>, pusimos especial atención en la selección de aquellos métodos que empleasen condiciones suaves de reacción compatibles con los grupos TBDMS de las posiciones 2' y 5' del azúcar que son cruciales para la actividad antiviral.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio<sup>81</sup> indican que el anillo de espiroaminoxatioldióxido de los derivados TSAO se encuentra preferentemente en forma de enamina. Aunque la reactividad de enaminas terciarias cíclicas ha sido ampliamente estudiada, los precedentes bibliográficos de reactividad de enaminas primarias, que es el tipo de sistema enamínico presente en el anillo de  $\gamma$ -sultona de los derivados TSAO, son muy escasos<sup>82</sup>. A pesar de la peculiaridad del sistema enamínico primario de la molécula TSAO, para la preparación del derivado **1.1** propuesto, primeramente elegimos las condiciones de hidrogenolisis de enaminas mediante reacciones de hidroboreación-eliminación<sup>80b,83,84</sup>.

El método consiste (Esquema 1.1) en la adición del borano al doble enlace de la enamina (**A**) seguido de metanolisis del organoborano intermedio así formado (**B**) para dar el alqueno (**C**) y el organoborano correspondiente (**D**).



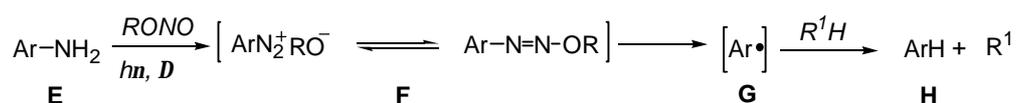
ESQUEMA 1.1.– Esquema general de hidrogenolisis de enaminas

Sin embargo, el tratamiento de TSAO- $m^3T$  (**25**) con diferentes boranos [borano de dimetilsulfuro ( $BH_3-Me_2S$ ), 9-borabicyclononano (9-BBN) o diborano ( $B_2H_6$ )] en THF seco seguido de la adición de un equivalente de metanol resultaron infructuosos recuperándose el producto de partida inalterado.

Ya que el grupo amino del anillo de espiroaminoxatioldióxido presenta fundamentalmente un carácter  $sp^2$ ,<sup>81</sup> seguidamente, exploramos la metodología de hidrogenolisis de aminas aromáticas primarias.

Uno de los métodos más generales de sustitución de un grupo amino aromático primario por hidrógeno es la reducción de las sales de diazonio<sup>85,86</sup> preparadas por diazotación de la amina con sales de nitritos y medios ácidos. Sin embargo, estas condiciones no son compatibles con los grupos TBDMS presentes en la molécula TSAO. Además, experimentos previos realizados en nuestro laboratorio indican que el grupo amino del espiroanillo se hidroliza en medio ácido al correspondiente carbonilo<sup>87</sup>.

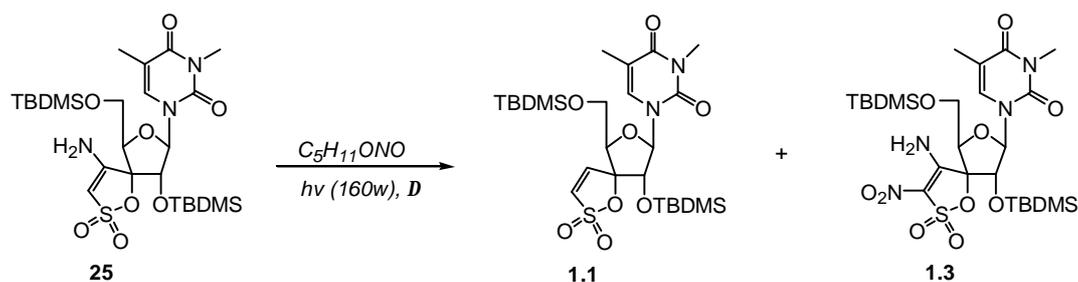
Una alternativa atractiva a los procedimientos convencionales de diazotación, que utiliza condiciones muy suaves de reacción, es la diazotación/desaminación radicalica de aminas aromáticas<sup>88</sup> en presencia de nitritos de alquilo, como agente nitrosante, y disolventes donadores de átomos de hidrógeno (Esquema 1.2).



ESQUEMA 1.2.– Esquema general de desaminación reductiva

La desaminación transcurre en un solo paso de reacción mediante la homólisis fotolítica de intermedios de sales de diazonio (**F**) para dar lugar a la formación de radicales arílicos (**G**) seguido de abstracción, por parte de éstos, de átomos de hidrógeno, generalmente del disolvente. Esta metodología ha sido bastante explorada por Nair y col.<sup>89,90</sup> para la desaminación de aminas aromáticas de nucleósidos de purinas.

Así siguiendo este procedimiento, el tratamiento de TSAO- $m^3$ T (**25**) (Esquema 1.3) con nitrito de pentilo en THF seco a reflujo en presencia de luz dio lugar al derivado desaminado **1.1**, con bajo rendimiento (15%). En la reacción se aisló además el producto resultante de la nitración en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido **1.3** (29%) junto con productos de descomposición que no fueron identificados.



ESQUEMA 1.3.– Síntesis del análogo desaminado de TSAO- $m^3T$  (**1.1**)

Todos los intentos de optimización de esta reacción utilizando otros nitritos de alquilo (nitrito de isoamilo o nitrito de *tert*-butilo)<sup>91,92</sup> así como otros agentes donadores de hidrógeno como etanol, o hidruro de tributilestano ( $\text{Bu}_3\text{SnH}$ ) no condujeron a mejores rendimientos del producto desaminado.

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del derivado **1.1** se observó la desaparición del grupo 4''- $\text{NH}_2$  a 6.47 ppm, y la aparición de dos nuevos dobletes a 7.23 y 7.44 ppm ( $J_{\text{H}3'',\text{H}4''} = 6.5$  Hz) que se asignaron a los nuevos protones vinílicos de la posición 4'' y 3'' del anillo de espiro. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN, mostraron el desplazamiento a campo alto del carbono C-4'', así como el desplazamiento a campo bajo del carbono C-3''.

En cuanto a la estructura del derivado nitrado en la posición 3'' del anillo **1.3**, en su espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observó la desaparición de la señal correspondiente al protón H-3'' a  $\delta = 5.76$  ppm. Además, en este derivado se observó un desdoblamiento de la señal correspondiente al grupo 4''- $\text{NH}_2$ , ya que los protones de este grupo ahora no son equivalentes debido al efecto del grupo nitro contiguo<sup>93</sup>, y aparecen como dos singletes anchos a 8.92 y 9.33 ppm.

Finalmente, los datos de espectrometría de masas de ambos compuestos confirmaron las estructuras propuestas.

### 1.1.1. Evaluación biológica del análogo desaminado 1.1

Los derivados **1.1** y **1.3** fueron evaluados como agentes antivirales frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), en cultivo celular empleando líneas celulares CEM/0 y MT-4, por el equipo de los doctores Jan Balzarini y Erik De Clercq del "Rega Institute for Medical Research" de la Universidad Católica de Lovaina.

La determinación de la actividad antiviral ha estado basada en la inhibición del efecto citopático inducido por el virus en células MT-4, y en la inhibición o formación de sincitios o células gigantes en el caso de células CEM/0 siguiendo procedimientos descritos<sup>94</sup>. En ambos casos, la actividad antiviral se expresa como CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50. Paralelamente, se ha evaluado la toxicidad de los compuestos en ambas líneas celulares, que se expresa como CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.

Los resultados obtenidos de dicha evaluación antiviral se recogen en la Tabla 1.1, en la que se definen los parámetros utilizados para la determinación de las actividades y toxicidades.

**TABLA 1.1**

Actividad antiviral frente a VIH-1 en células MT-4 y CEM de los derivados TSAO **1.1** y **1.3**

Compuesto	CE <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>				CC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
	MT-4		CEM		MT-4	CEM
	VIH-1	VIH-2	VIH-1	VIH-2		
<b>1.1</b>	0.53 ± 0.40	> 250	0.15 ± 0.09	> 50	164 ± 77	> 250
<b>1.3</b>	5.99 ± 1.23	9.82 ± 6.76	7.0 ± 4.2	≥ 10	14.0 ± 5.0	15.0 ± 3.7
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	0.06 ± 0.09	> 250	0.04 ± 0.01	> 250	230 ± 7.3	--

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH.

<sup>b</sup>Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento del 50% de las células no infectadas

Según se observa en la tabla, el derivado **1.1** mostró una actividad significativa frente a la replicación de VIH-1 (CE<sub>50</sub> = 0.53 μM), si bien, ésta fue un orden de magnitud inferior a la del compuesto prototipo TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) (CE<sub>50</sub> = 0.06 μM) portador del grupo amino en la posición 4'' del espiroanillo. Además, y al igual que otros compuestos TSAO, el derivado desaminado **1.1** no mostró actividad frente a la replicación de VIH-2 por lo que se trata de un compuesto específico frente a la replicación de VIH-1. En lo que respecta al derivado **1.3** portador de un grupo nitro en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido, éste mostró una actividad frente a la replicación de VIH-1 dos órdenes de magnitud inferior a la de TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**).

#### **1.1.1.1. Estudio de resistencias**

La obtención y caracterización de cepas de VIH-1 resistentes a la acción de los distintos inhibidores, así como los estudios de resistencia cruzada utilizando este arsenal de compuestos, ha sido ampliamente utilizada como herramienta eficaz para un mejor

conocimiento de la interacción de las distintas familias de inhibidores con la TI de VIH-1 así como para el diseño de terapias combinadas.

A la vista de la actividad y especificidad frente a la replicación de VIH-1 mostrada por el derivado desaminado **1.1** consideramos interesante la selección de cepas de virus resistentes frente a este derivado. La caracterización posterior de estas cepas nos permitiría estudiar si aparece la mutación característica de los derivados TSAO (Glu138Lys) o si el compuesto presenta un perfil de resistencias diferente al carecer del grupo 4''-NH<sub>2</sub> del anillo de espirooxatioldióxido.

Así, tras tres cultivos sucesivos de células CEM infectadas por VIH-1 y en presencia del compuesto **1.1**, se observó la aparición de cepas virales resistentes a este compuesto. Esta cepa VIH resistente a **1.1** fue evaluada frente a distintas familias de inhibidores (2',3'-ddN, IENN, derivados TSAO), tal y como se refleja en la Tabla 1.2. Los resultados obtenidos indican que la cepa resistente a **1.1** es sensible a la inhibición de 2',3'-ddN, IENN y, lo que es más interesante, a los derivados TSAO. Por tanto dicha cepa resistente no muestra resistencia cruzada frente a los demás inhibidores.

**TABLA 1.2**

Actividad antiviral frente a la cepa salvaje de VIH-1 y frente a las cepas de VIH-1 resistentes al derivado desaminado **1.1** de distintos inhibidores de la TI de VIH

Compuesto	CE <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	VIH-1	VIH-1 resistente a <b>1.1</b>
<b>AZT</b>	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.003
<b>3TC</b>	0.010 ± 0.0	0.024 ± 0.012
<b>Nevirapina</b>	0.032 ± 0.029	0.013 ± 0.004
<b>Delavirdina</b>	0.008 ± 0.007	0.024 ± 0.012
<b>Efavirenz</b>	0.003 ± 0.002	0.0007 ± 0.00002
<b>Emirivina</b>	0.0021 ± 0.0016	0.01 ± 0.0
<b>Quinoxalina HBY97</b>	0.001 ± 0.0004	0.0035 ± 0.0007
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	0.035 ± 0.019	0.13 ± 0.06
<b>TSAO-triazol<sup>53b</sup></b>	0.08 ± 0.0	0.12 ± 0.012
<b>1.1</b>	0.15 ± 0.09	> 50

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH en células CEM.

El paso siguiente a la obtención de cepas resistentes es su secuenciación con el fin de determinar que aminoácido(s) es(son) los responsables del fenómeno de resistencia. Sin embargo, cuando se secuenció la porción del gen que rutinariamente se analiza para detectar

mutaciones en la TI de la cepa **1.1** resistente, no se pudo detectar ninguna mutación, lo que resulta sorprendente en comparación con otros derivados TSAO u otros IENN. Este hecho podría tener dos explicaciones:

- a) El derivado **1.1** no actúa a nivel de la TI y por ello no se detectan mutaciones en el gen que codifica esta enzima.
- b) El derivado **1.1** interacciona con la TI de un modo diferente a los IENN, y a los derivados TSAO de modo que las cepas resistentes no muestran mutaciones en la fracción genómica que se secuencía normalmente.

Para abordar la primera de estas hipótesis se llevó a cabo la evaluación directa del compuesto **1.1** frente a la TI de VIH-1. En este ensayo el derivado **1.1** muestra actividad ( $CI_{50} = 3.32 \mu M$ ) comparable a la de otros inhibidores como el TSAO- $m^3T$  ( $CI_{50} = 2.23 \mu M$ ) lo que descarta la primera de las hipótesis ya que **1.1** es inhibidor de la TI. Por otro lado, el hecho de que las cepas resistentes a **1.1** no muestren resistencia cruzada frente a los demás inhibidores (IENN y TSAO) parece apoyar la segunda hipótesis. Para determinar si el punto de interacción de **1.1** es diferente al de los IENN y TSAO actualmente se está llevando a cabo la secuenciación del gen completo de la TI, incluido el dominio de Ribonucleasa H.

A la vista de todo lo expuesto hasta el momento, se puede concluir que hemos sintetizado la primera molécula TSAO que carece del grupo amino en el anillo de espirooxatioldióxido, y que ésta muestra un espectro de resistencias muy peculiar. Este derivado mantiene la especificidad frente a VIH-1 característica de los IENN, pero no selecciona ninguna de las mutaciones descritas como resistentes a los IENN localizadas en el bolsillo de unión de éstos, ni tampoco la mutación 138-Lys característica de las cepas TSAO-resistentes. Por tanto, la eliminación del grupo amino de la posición 4'' ha conducido a un nuevo tipo de molécula con especificidad VIH-1, que probablemente actúa por un mecanismo de acción distinto a los IENN clásicos descritos hasta el momento.

Con el fin de profundizar en su mecanismo de acción, en la actualidad estamos trabajando en la búsqueda de métodos sintéticos alternativos que nos permitan obtener este derivado con mejores rendimientos.

## 1.2. Derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4''

Siguiendo con el objetivo inicial propuesto de obtención de derivados TSAO de “segunda generación” nos planteamos la preparación del análogo de TSAO-T **1.2** (Figura 1.2) en el que el grupo amino de la posición 4'' del espiroanillo se ha sustituido por un grupo ceto capaz de interactuar con el grupo amino de la Lys-138 de las cepas TSAO-resistentes.

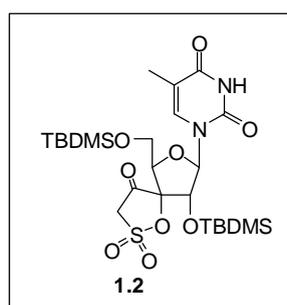
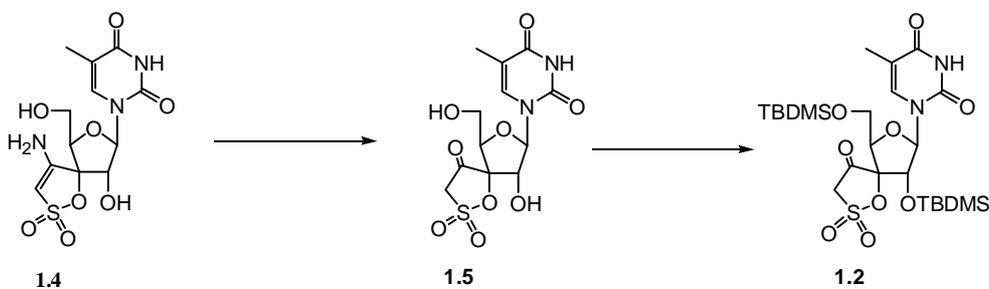


FIGURA 1.2

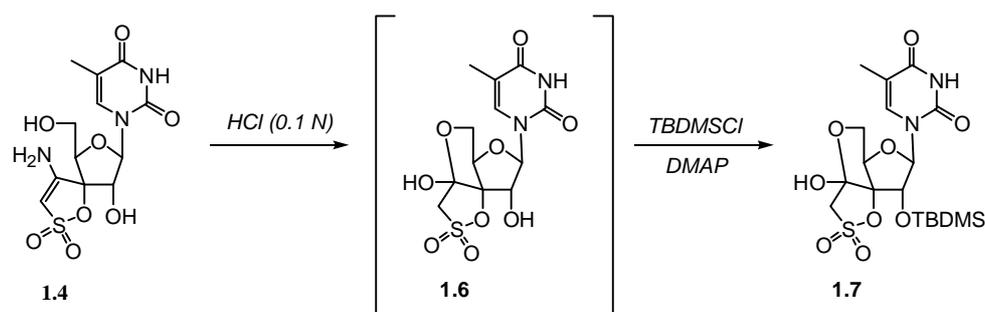
### 1.2.1. Síntesis de derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4''

Para la síntesis de la molécula objetivo **1.2** diseñamos la estrategia sintética, que se refleja en el Esquema 1.4, basada en reacciones clásicas de hidrólisis de enaminas<sup>95</sup>. Ya que estas reacciones requieren la utilización de medios ácidos incompatibles con los grupos TBDMS de la molécula TSAO, como producto de partida se utilizó el derivado **1.4** desprotegido en las posiciones 2' y 5' del anillo de ribofuranosa<sup>48</sup>. Así, la estrategia sintética consistiría en la formación del cetoderivado **1.5** y posterior sililación de los grupos hidroxilo libres de las posiciones 2' y 5' del azúcar.



ESQUEMA 1.4.– Estrategia sintética para la síntesis de **1.2**

Sin embargo, el tratamiento de **1.4** (Esquema 1.5) con HCl 0.1N en metanol a 0°C y sililación posterior del bruto de reacción con TBDMSCI/DMAP en acetonitrilo seco no condujo a la molécula objetivo esperada **1.2**, sino que en su lugar se aisló el derivado hemiacetálico cíclico monosililado en la posición 2' del azúcar **1.7** con un 71% de rendimiento.



ESQUEMA 1.5.– Síntesis del derivado de TSAO-T 1.7

El posterior aislamiento e identificación del intermedio **1.6** obtenido en la primera etapa de reacción indica que la condensación intramolecular entre el grupo carbonilo de la posición 4'' del espiroanillo y el hidroxilo de la posición 5' del anillo de ribofuranosa se produce ya en el primer paso de reacción.

La asignación estructural inequívoca del compuesto **1.7** requirió la utilización de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mono- y bidimensionales (1D y 2D), experimentos NOE así como espectrometría de masas. En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (ver parte experimental, pág 120) se observó la desaparición de las señales asignadas a los protones H-3'' y NH<sub>2</sub>-4'' del anillo de espiro y así como las correspondientes a los hidroxilos de las posiciones 2' y 5' del anillo de ribofuranosa. Asimismo, se observó la aparición de un nuevo sistema AB centrado a 3.9 ppm con una constante de acoplamiento geminal de 13.9 Hz correspondiente a los protones del grupo CH<sub>2</sub> de la posición 3'', y la aparición de una nueva señal ancha que intercambiaba con D<sub>2</sub>O a 7.44 ppm que se asignó al nuevo OH hemiacetálico de la molécula. El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de **1.7** mostró el desplazamiento a campo alto de las señales correspondientes a los carbonos C-3'' y C-4'' que aparecieron a  $\delta = 56.08$  y 98.17 ppm, respectivamente.

La asignación de los carbonos protonados se llevó a cabo utilizando experimentos HMQC<sup>96</sup> que correlacionan protones y carbonos unidos directamente. Los carbonos cuaternarios se asignaron mediante experimentos HMBC<sup>96</sup> que correlacionan carbonos y

protones que están acoplados escalarmente a dos y tres enlaces. El experimento bidimensional HMBC fue en nuestro caso determinante para la asignación estructural del compuesto **1.7**. En dicho experimento se observaron correlaciones a 3 enlaces entre los protones H-5' ( $\delta = 4.15$  y  $4.20$  ppm) y el C-4'' ( $\delta = 98.17$  ppm) sólo compatibles con la estructura hemiacetálica.

La configuración absoluta del nuevo centro estereogénico presente en la posición 4'' del derivado **1.7**, se realizó de manera inequívoca mediante experimentos NOE (Figura 1.3). Así, la irradiación de la señal a 7.44 ppm, correspondiente al grupo hidroxilo libre de la posición 4'' del anillo de espiro, indujo NOE sobre los protones H-2' y uno de los protones H-3'', lo que indica que se encuentra en la cara "superior" del anillo de ribosa, y por tanto su configuración es S.

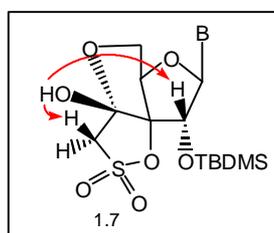


FIGURA 1.3.– Determinación de la configuración del C-4'' mediante experimentos NOE

Finalmente, los datos de espectrometría de masas corroboraron la estructura propuesta para **1.7**.

Dada la imposibilidad de acceder al 4''-cetoderivado disililado en las posiciones 2' y 5' del azúcar, nos planteamos la preparación de análogos TSAO de fórmula general **I** (Figura 1.4), portadores en el amino de la posición 4'' de grupos carbonilo de distinta naturaleza, que pudieran interactuar con el grupo amino de la Lys-138 de la cepa TSAO-resistente.

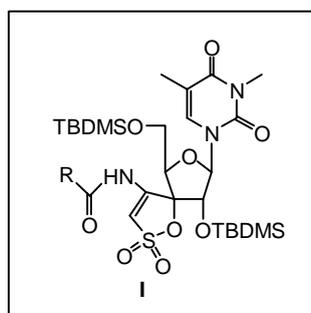
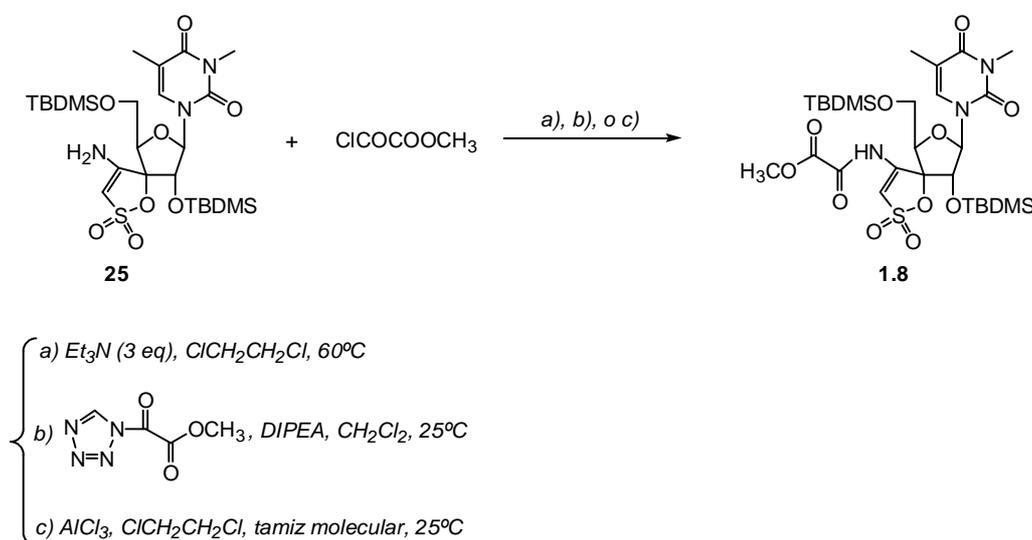


FIGURA 1.4

La síntesis de los compuestos objetivo se llevó a cabo mediante reacciones de acilación<sup>97</sup> sobre el grupo amino de la posición 4'' del anillo de espirooxatioldióxido. El tratamiento de **25** con cloruro de metiloxalilo (Esquema 1.6) en presencia de 3 equivalentes de Et<sub>3</sub>N, en 1,2-dicloroetano seco, condujo al *N*-acilespiroderivado **1.8** en un 35% de rendimiento. En esta reacción se utiliza un exceso de Et<sub>3</sub>N con el fin de catalizar la reacción de acilación así como evitar problemas de desprotección del grupo TBDMS de la posición 5'.

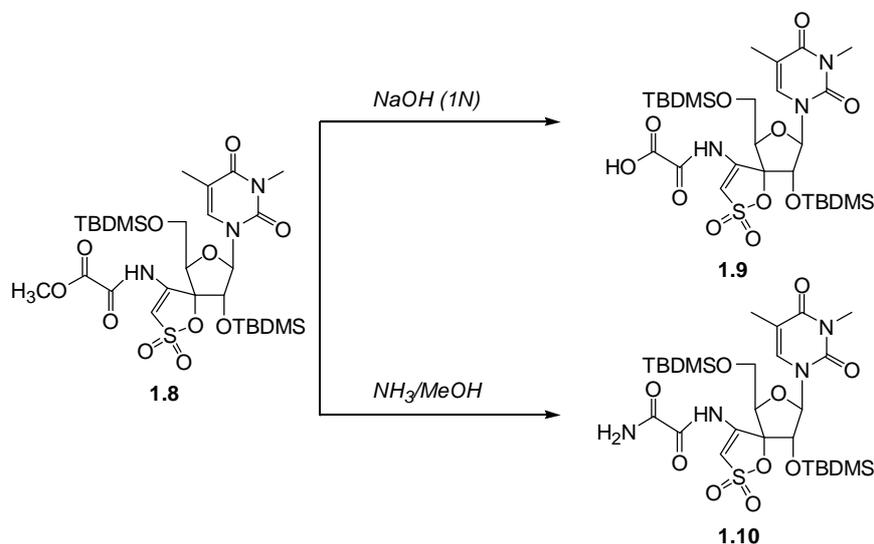
Con el fin de optimizar esta reacción se exploraron diferentes condiciones de acilación. La reacción de **25** con cloruro de metiloxalilo en presencia de otras bases como carbonato de cesio y piridina en acetonitrilo seco, condujo al derivado **1.8** con menores rendimientos (26%). Por otro lado, se varió la naturaleza del agente acilante, sin embargo, el tratamiento de **25** con tetrazol-1-il-oxalato de metilo<sup>98</sup>, generado “*in situ*” a partir de tetrazol y cloruro de metiloxalilo, en presencia de diisopropiletilamina (DIPEA) dio lugar al *N*-acilderivado **1.8** con un 25% de rendimiento. Finalmente, el tratamiento de **25** con cloruro de metiloxalilo en presencia de AlCl<sub>3</sub> y tamiz molecular 4 Å (como captador del HCl que se genera en la reacción) condujo al derivado **1.8** con un rendimiento del 66% (2 veces superior al inicial). En esta reacción no se detectó la formación de derivados acilados en la posición 3'' del anillo de espirooxatioldióxido.



ESQUEMA 1.6.– Síntesis del 4''-metoxalilderivado **1.8**

Una vez optimizada la reacción, se utilizó el *N*-metoxalilderivado **1.8** como producto de partida para la preparación de los compuestos **1.9** y **1.10**, portadores de un grupo ácido y

un grupo amida, respectivamente en el espiroanillo. Así, la reacción de saponificación de **1.8** con NaOH 1N (Esquema 1.7) condujo al *N*-oxaloderivado **1.9** con buenos rendimientos (75%). Asimismo, el tratamiento de **1.8** con una solución de NH<sub>3</sub>/MeOH permitió acceder al *N*-oxamoiderivado **1.10** (54%).



ESQUEMA 1.7.– Síntesis de los *N*-acilderivados **1.9** y **1.10**

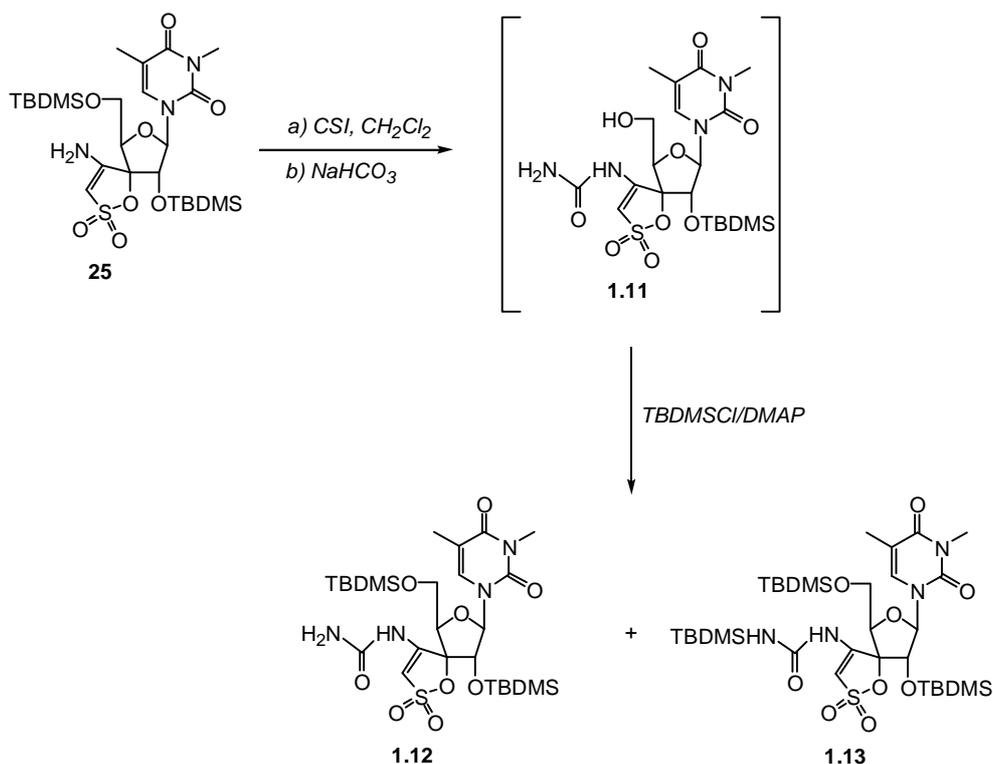
La determinación estructural de los *N*-oxalilderivados **1.8-1.10** se realizó en base a sus datos analíticos y espectroscópicos. En los espectros de <sup>1</sup>H RMN (Tabla 1.3) se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo 4''-NH<sub>2</sub> a 6.47 ppm y la aparición de una nueva señal ancha a 10.6 ppm que se asignó al nuevo NH de la amida. Asimismo, se observó un desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al protón H-3'' ( $\Delta\delta = 2.01$ - $2.03$  ppm). Los espectros de <sup>13</sup>C RMN (Tabla 1.4) mostraron la aparición de dos nuevas señales en la zona 155-168 ppm que se asignaron a los dos nuevos carbonilos del agrupamiento -NH-CO-COR. Asimismo, los espectros de <sup>13</sup>C RMN mostraron un desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes al C-3'' ( $\Delta\delta = 15$  ppm) con respecto a las mismas señales en el compuesto de partida **25**.

Cuando los espiro-nucleósidos **1.8**, **1.9** y **1.10** se ensayaron frente al virus del SIDA, éstos mostraron actividades significativas a concentraciones no tóxicas, como se verá en el apartado correspondiente a la evaluación biológica. Además, cabe destacar que el compuesto **1.9** portador de un grupo ácido resultó activo frente a las cepas virales TSAO-resistentes

(Lys-138), siendo el primer ejemplo de derivado TSAO de “segunda generación” con actividad frente a dichas cepas mutadas.

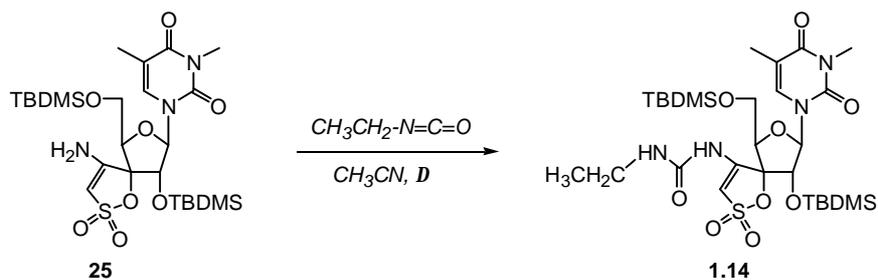
Seguidamente, nos planteamos la preparación de 4''-ureidoderivados de TSAO-m<sup>3</sup>T (análogos TSAO sustituidos con un solo carbonilo sobre el 4''-NH<sub>2</sub> del anillo de aminooxatioldióxido). La preparación de este tipo de compuestos nos permitiría determinar el número de carbonilos sobre el 4''-NH<sub>2</sub> necesarios para la actividad.

El tratamiento de **25** con clorosulfonilisocianato<sup>99</sup> (CSI) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (Esquema 1.8) seguido de hidrólisis básica (NaHCO<sub>3</sub>) condujo al ureidoderivado **1.11** desprotegido en la posición 5' del azúcar. La sililación de **1.11** con TBDMSCI/DMAP condujo al producto disililado **1.12**, con un 40% de rendimiento, junto con el producto de sililación sobre el amino **1.13** con un 35% de rendimiento.



ESQUEMA 1.8.– Síntesis de los ureidoderivados **1.12** y **1.13**

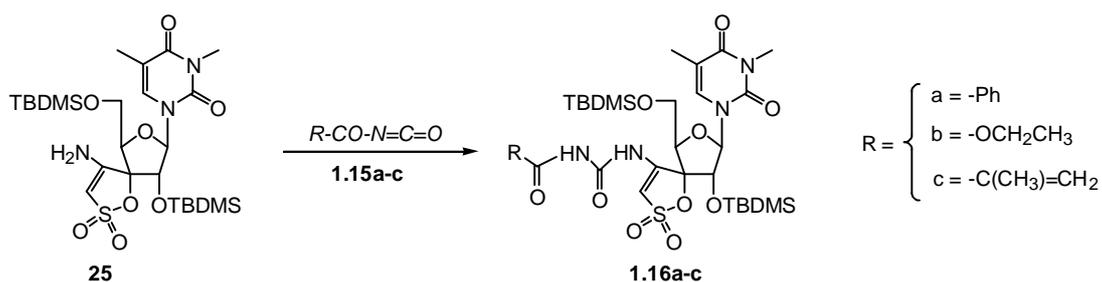
La reacción de **25** con exceso de isocianato de etilo en acetonitrilo a reflujo (Esquema 1.9) condujo al etilureidoderivado **1.14** con un 50% de rendimiento.

ESQUEMA 1.9.– Síntesis del etilureidoderivado **1.14**

Cuando los ureidoderivados **1.12-1.14** se ensayaron frente al VIH, todos ellos resultaron inactivos a concentraciones no tóxicas. La falta de actividad de estos espironucleósidos parece indicar que son necesarios ambos carbonilos o que el segundo carbonilo debe ejercer un papel importante en la interacción de los derivados TSAO con la enzima.

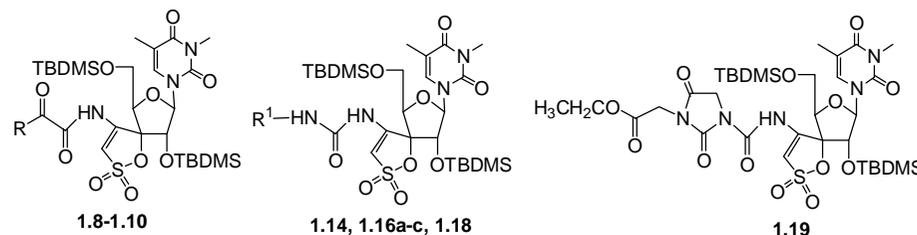
Dada la falta de actividad de los compuestos **1.12-1.14** procedimos a la preparación de compuestos con dos carbonilos sobre el grupo 4''-NH<sub>2</sub> pero en este caso no contiguos sino separados por un espaciador de uno o dos eslabones entre ambos.

La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo por reacción de **25** con acilisocianatos diferentemente sustituidos. Así, la reacción de **25** con los acilisocianatos **1.15a-c** (Esquema 1.10), en acetonitrilo seco a reflujo, condujo a los ureidoderivados **1.16a-c** con buenos rendimientos [**1.16a** (90%), **1.16b** (80%) y **1.16c** (75%)].

ESQUEMA 1.10.– Síntesis de los 4''acilureidoderivados **1.16a-c**

La identificación de las estructuras de los 4''-ureidoderivados **1.12**, **1.13**, **1.14** y **1.16a-c** se realizó a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos.

**TABLA 1.3.**– Datos más significativos de  $^1\text{H}$ -RMN de los derivados TSAO modificados en la posición 4". Desplazamientos químicos ( $\delta$ ), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) registrados en  $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$  a 300 MHz



Compuesto	R	R <sup>1</sup>	H-1' ( <i>J</i> <sub>1',2'</sub> )	H-2'	H-4' ( <i>J</i> <sub>4',5'a'</sub> , <i>J</i> <sub>4',5'b'</sub> )	H-5' ( <i>J</i> <sub>5'a,5'b'</sub> )	NHa	NHb	H-3''
<b>1.8</b>	OCH <sub>3</sub>	–	6.07 d (8.0)	4.97	4.48 t (2.3, 2.2)	4.01 dd, 4.11 dd (13.0)	10.60	–	7.77
<b>1.9</b>	OH	–	6.05 d (8.0)	4.98	4.44 t (3.2, 3.3)	4.01 dd, 4.20 dd (12.0)	10.79	–	7.79
<b>1.10</b>	NH <sub>2</sub>	–	6.25 d (8.3)	4.72	4.43 dd (2.2, 3.7)	4.10 dd, 4.31 dd (12.9)	10.65	–	7.78
<b>1.12</b>	–	H	5.54 d (6.6)	5.06	4.17 dd (6.7, 4.3)	3.89 dd, 4.06 dd (12.9)	9.05	6.09	7.12
<b>1.13</b>	–	TBDMS	5.57 d (6.7)	5.07	4.30 t (4.9, 4.5)	3.95 dd, 4.10 dd (12.0)	9.05	6.13	7.13
<b>1.14</b>	–	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5.50 d (6.6)	5.04	4.18 dd (6.7, 4.5)	3.88 dd, 4.06 dd (11.9)	8.87	6.18	7.12
<b>1.16a</b>	–	-COPh	6.08 d (7.8)	4.97	4.41 dd (4.7, 6.3)	4.06 dd, 4.21 dd (10.9)	11.40	10.6	7.45
<b>1.16b</b>	–	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6.03 d (7.8)	4.87	4.38 dd (4.8, 6.3)	4.01 dd, 4.15 dd (12.2)	10.01	10.52	7.36
<b>1.16c</b>	–	-COC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub>	6.03 d (7.8)	4.83	4.36 dd (4.8, 6.4)	3.97 dd, 4.11 dd (12.2)	10.17	11.24	7.35
<b>1.18</b>	–	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5.53 d (6.5)	5.07	(4.84-4.40) dd (7.0, nd)	3.92 dd, 4.35 m (11.9)	9.30	6.53	7.13
<b>1.19</b>	–	–	6.02 d (7.8)	4.84	4.44 dd (5.0, 5.7)	4.03 dd, 4.10 dd (12.35.0)	10.25	–	7.43

**TABLA 1.4.**– Datos más significativos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados TSAO sustituidos en la posición 4".  
Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) registrados en  $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$  a 300 MHz

Compuesto	NHCONH	C-1'	C-2'	C-2	C-4''	C-3''	C-4'	C-3'	OTROS
<b>1.8</b>	–	88.92	73.78	151.12	139.43	110.26	83.23	92.43	159.12, 155.59 (NHCOCO, NHCOCO)
<b>1.9</b>	–	87.42	74.84	152.17	140.61	111.34	86.41	94.53	162.05, 167.15 (NHCOCO, NHCOCO)
<b>1.10</b>	–	86.95	74.98	152.19	140.56	110.71	84.69	94.49	160.81, 160.58 (NHCOCO, NHCOCO)
<b>1.12</b>	154.50	96.31	73.74	152.53	145.58	100.60	84.48	89.23	–
<b>1.13</b>	154.54	95.12	73.59	152.43	144.35	100.85	84.73	89.86	–
<b>1.14</b>	153.67	96.45	73.55	152.34	145.41	100.06	84.38	89.25	–
<b>1.16a</b>	151.26	89.26	74.54	152.04	142.50	107.41	85.18	92.14	170.52 (COPh)
<b>1.16b</b>	150.50	91.83	74.56	151.97	142.48	106.61	85.09	89.19	156.18 (CO <sub>2</sub> Et)
<b>1.16c</b>	152.02	88.88	74.63	151.19	142.42	107.21	85.12	91.92	171.42 [COC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub> ]
<b>1.18</b>	153.95	97.44	73.50	152.52	145.51	100.67	84.45	89.21	170.42 (CO <sub>2</sub> Et)
<b>1.19</b>	167.50	89.34	74.70	151.96	142.38	107.23	85.01	91.37	156.54 (NCON), 148.30 (CH <sub>2</sub> CON), 167.09 (CO <sub>2</sub> Et)

En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN (Tabla 1.3), se observó la desaparición de la señal a 6.47 ppm correspondiente al grupo 4''- $\text{NH}_2$  y la aparición de dos nuevas señales anchas que intercambiaban con  $\text{D}_2\text{O}$  correspondientes a los nuevos grupos NH ( $\delta = 9.05\text{-}11.40$  ppm para el NH más próximo al anillo de espiro y  $\delta = 6.09\text{-}11.24$  ppm para el NH más alejado). La asignación inequívoca de cada uno de estos protones se realizó mediante experimentos bidimensionales heteronucleares HMBC. En estos experimentos (Figura 1.5) se observaron correlaciones a dos y tres enlaces entre el grupo NH unido directamente al C-4'' ( $\text{NH}_a$ ) y los carbonos C-4'', C-3'' y C-3', correlaciones que no se observaban para el otro grupo NH de la urea ( $\text{NH}_b$ ).

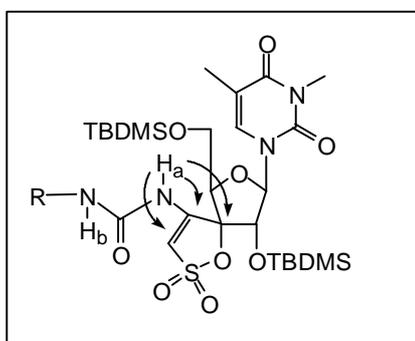


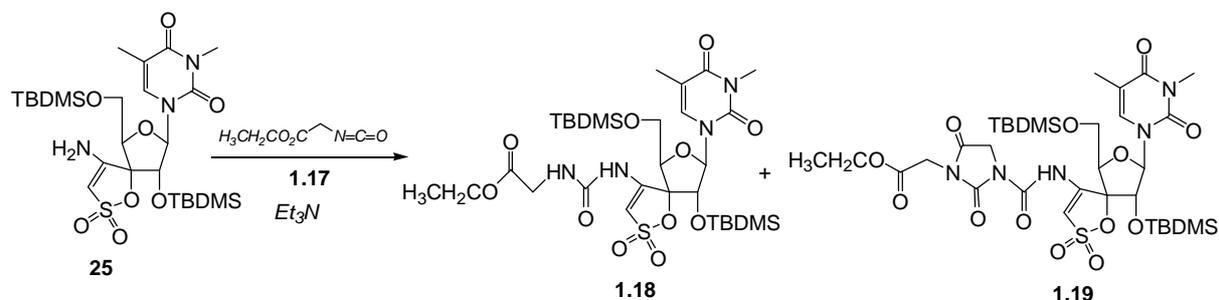
FIGURA 1.5.– Correlaciones de H y C más relevantes del grupo  $\text{NH}_a$  de los ureidoderivados **1.12-1.14** y **1.16a-c**

En los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (Tabla 1.4) se observó la aparición de una nueva señal a 151.26-154.54 ppm que se asignó al carbonilo del agrupamiento urea. Asimismo, los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN mostraron un desplazamiento a campo alto de las señales correspondientes al C-4'' ( $\Delta\delta = 12\text{-}13$  ppm) y por el contrario un desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al C-3'' ( $\Delta\delta = 24\text{-}25$  ppm) con respecto a las mismas señales del compuesto de partida **25**, al igual que había ocurrido en los espectros de los oxalildrivados **1.8**, **1.9** y **1.10**.

Cuando **25** se trató con isocianato de acetato de etilo (**1.17**), a fin de obtener el derivado TSAO portador de dos carbonilos separados por un puente de dos eslabones, empleando una metodología similar a la descrita para la síntesis de **1.16a-c**, no se obtuvo el producto de acilación esperado, recuperándose el producto de partida inalterado incluso tras largos tiempos de reacción.

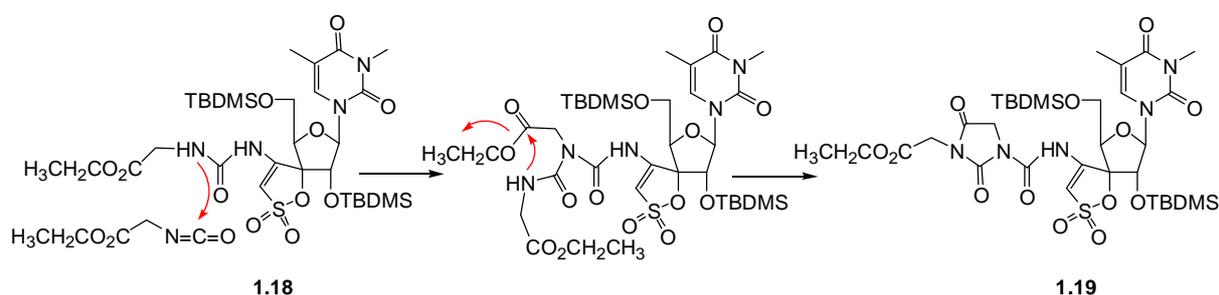
Existen ejemplos en la bibliografía<sup>100</sup> de síntesis de ureas a partir de aminas poco reactivas e isocianatos en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$ . Sin embargo, cuando **25** se trató con el isocianato **1.17**, en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  en acetonitrilo seco a reflujo, nuevamente se recuperó el

producto de partida inalterado. Cuando esta misma reacción se llevó a cabo calentando en tubo cerrado a 100°C se obtuvo el 4''-ureidoderivado **1.18** con un 52% de rendimiento junto con el derivado cíclico **1.19** con un 30% de rendimiento (Esquema 1.11).



ESQUEMA 1.11.- Síntesis de los derivados **1.18** y **1.19**

La formación del derivado **1.19** portador de un anillo de dioximidazolidino, podría explicarse mediante el ataque del producto inicialmente formado **1.18** sobre una segunda molécula del isocyanato **1.17** y ciclación posterior para dar **1.19** (Esquema 1.12).



ESQUEMA 1.12.- Formación del derivado **1.19**

La asignación estructural del ureido derivado **1.18** se llevó a cabo de manera similar a la descrita para la asignación estructural de los ureido derivados **1.12-1.14** y **1.16a-c**, comentados anteriormente. En cuanto a la asignación estructural del imidazolidín derivado **1.19** obtenido como producto secundario en la reacción, su asignación no fue obvia, y requirió la utilización de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mono- y bidimensionales (1D y 2D) y espectrometría de masas.

En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Tabla 1.3) se observó la desaparición de una de las señales correspondientes a uno de los NH del agrupamiento urea respecto al espectro del ureido derivado **1.18** anteriormente comentado. Además, se observó respecto a este derivado,

la aparición de un sistema AB adicional centrado a  $\delta = 4.60$  ppm ( $J = 17.6$  Hz) correspondiente a un grupo metileno adicional en la molécula. Asimismo, una comparación de los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (Tabla 1.5) del ureido derivado **1.18** y del derivado cíclico **1.19** permitió observar la aparición adicional de señales correspondientes a dos carbonos cuaternarios así como la señal correspondiente a un nuevo carbono protonado con multiplicidad de metileno.

En el experimento de HMBC (Figura 1.6) se observaron correlaciones a dos y tres enlaces entre la señal correspondiente al protón NH ( $\delta = 10.25$  ppm) y los carbonos C-4'' ( $\delta = 142.38$  ppm) y C-3'' ( $\delta = 107.23$  ppm) lo que indicaba que el grupo NH estaba unido directamente al anillo de espiro. Además, se observaron correlaciones a dos y tres enlaces entre los protones de los grupos metileno ( $\delta = 4.44$  y  $4.60$  ppm) y los carbonos cuaternarios que se reflejan en la Figura 1.6. Los datos de espectrometría de masas [MS (ES-)  $m/z$  814.5 (M-1)] corroboraron la estructura propuesta.

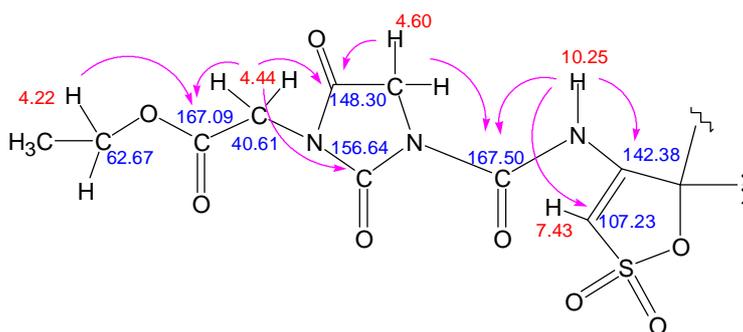
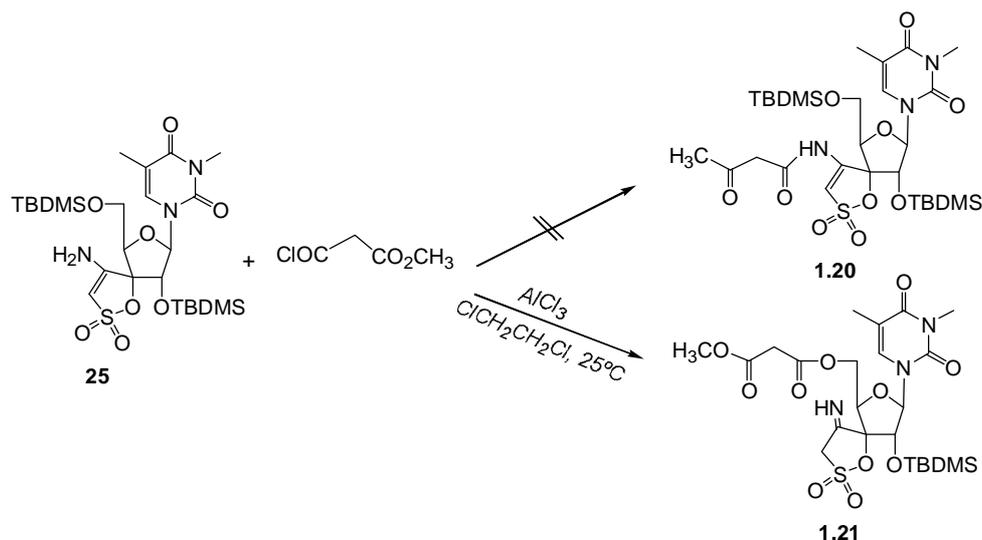


FIGURA 1.6.– Datos espectroscópicos más relevantes para el sustituyente de la posición 4'' del anillo de espiro en el derivado **1.19**. Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  RMN en rojo, desplazamiento de  $^{13}\text{C}$  en azul y las correlaciones de H y C en rosa

Finalmente, el tratamiento de **25** con cloruro de metoxicarbonil acetilo, a fin de obtener un análogo TSAO con dos carbonilos sobre el 4''-NH<sub>2</sub> separados mediante un metileno, tanto en medio básico como en presencia de AlCl<sub>3</sub> (Esquema 1.13) no condujo al *N*-acilderivado esperado **1.20**, recuperándose el producto de partida inalterado. Cuando se intentaron forzar las condiciones añadiendo más equivalentes del cloruro de ácido y de AlCl<sub>3</sub> se obtuvo el 5'-*O*-acilderivado **1.21** (40%).

ESQUEMA 1.13.– Síntesis del O-acilderivado **1.21**

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del derivado **1.21** (ver parte experimental) se observó la presencia de un único grupo TBDMS así como la desaparición de las señales correspondientes al protón vinílico H-3'' y al grupo 4''-NH<sub>2</sub>. Asimismo, se observó la presencia de dos nuevos sistemas AB centrados a  $\delta = 3.50$  ppm y a 4.30 ppm correspondientes a dos grupos metileno y la aparición de un nuevo singlete ancho a 8.76 ppm que intercambiaba lentamente con D<sub>2</sub>O que se asignó como el NH imínico del espiroanillo. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN aparecen tres nuevas señales a 166.04, 166.11 y a 167.91 ppm, que se asignaron mediante experimentos de HMBC a los dos nuevos grupos carbonilos y al carbono de la imina respectivamente. Asimismo, aparecen dos señales a 42.13 y 53.23 ppm correspondientes a los nuevos grupos metilénicos del derivado **1.21**.

### 1.2.2 Actividad antiviral

Los derivados TSAO descritos en el presente apartado fueron evaluados frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando líneas celulares CEM/0 y MT-4, por el equipo de los doctores Jan Balzarini y Erik De Clercq en el "Rega Institute for Medical Research" de la Universidad Católica de Lovaina de forma análoga a la mencionada en el apartado 1.1.1 del presente capítulo.

En la Tabla 1.5 se recogen los resultados obtenidos de dicha evaluación antiviral en la que se definen los parámetros utilizados para determinar actividades y toxicidades.

Los compuestos ensayados son análogos TSAO modificados en la posición 4'' del anillo de espirooxatioldióxido. Así, se han ensayado hemiacetales cíclicos (**1.6** y **1.7**), 4''-*N*-oxalilderivados (**1.8-1.10**) y 4''-ureidoderivados tanto sin sustituir (**1.12**) como sustituidos con grupos TBDMS (**1.13**), alquilo (**1.14**), acilo (**1.16a-c**) y alquiléster (**1.18**). Asimismo, se ha ensayado el ureidoderivado portador de un anillo de dioximidazolidino (**1.19**).

Según se observa en la Tabla 1.5 los hemiacetales cíclicos **1.6** y **1.7** resultaron inactivos. Los 4''-*N*-oxalilderivados **1.8-1.10** mostraron actividades significativas frente a la replicación de VIH-1 a concentraciones no citotóxicas. El compuesto portador de un grupo amida (**1.10**) fue el más activo de esta serie mostrando una actividad ligeramente superior a la del compuesto prototipo TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) [CE<sub>50</sub> (CEM) = 0.028 vs 0.04 μM]. El derivado portador de un grupo éster (**1.8**) mostró actividad comparable a la del prototipo mientras que para el derivado **1.9** (portador de un grupo ácido) esta actividad fue un orden de magnitud inferior. Ninguno de los oxalilderivados mostró actividad frente a la replicación de VIH-2.

TABLA 1.5

Actividad antiviral frente a VIH en células MT-4 y CEM de derivados TSAO modificados en la posición 4''

Compuesto	CE <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>				CC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	
	MT-4		CEM		MT-4	CEM
	VIH-1	VIH-2	VIH-1	VIH-2		
<b>1.6</b>	> 50	> 50	> 50	> 50	>250	> 250
<b>1.7</b>	> 50	> 50	> 50	> 50	> 250	> 250
<b>1.8</b>	0.08 ± 0.06	> 4	0.06 ± 0.02	> 4	10.3 ± 2.6	5.57 ± 2.21
<b>1.9</b>	1.31 ± 0.45	> 10	0.23 ± 0.04	> 50	31.1 ± 20.4	50.1 ± 9.4
<b>1.10</b>	0.057 ± 0.008	> 2	0.028 ± 0.017	> 10	3.33 ± 0.04	2.29 ± 0.07
<b>1.12</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	3.66 ± 0.37	4.36 ± 0.13
<b>1.13</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	2.63 ± 1.17	4.02 ± 0.06
<b>1.14</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	--	4.26 ± 0.30
<b>1.16a</b>	> 2	> 10	> 2	> 2	3.33 ± 0.04	2.29 ± 0.07
<b>1.16b</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	--	3.0 ± 0.3
<b>1.16c</b>	> 0.8	> 0.8	> 0.8	> 0.8	1.19 ± 0.59	1.21 ± 0.52
<b>1.18</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	3.78 ± 1.60	5.02 ± 0.62
<b>1.19</b>	0.89 ± 0.02	> 2	0.24 ± 0.02	> 2	1.43 ± 0.50	1.42 ± 0.51
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	0.06 ± 0.09	> 250	0.04 ± 0.01	> 250	230 ± 7.3	--

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático de VIH-1 y VIH-2

<sup>b</sup>Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento del 50% de las células no infectadas

En cuanto a los 4''-ureidoderivados **1.12-1.14**, **1.16a-c** y **1.18**, ninguno de ellos presentó actividad significativa a concentraciones no tóxicas.

Finalmente, en el compuesto **1.19** portador de un anillo de dioxoimidazolidino se observó una actividad significativa frente a VIH-1, un orden de magnitud inferior a la del compuesto prototipo, pero este derivado resultó muy citotóxico.

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, en general todos los derivados ensayados resultaron más tóxicos que el compuesto prototipo TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**). El mecanismo implicado en la toxicidad de los derivados TSAO es, hasta el momento, desconocido, sin embargo, se ha sugerido que altas concentraciones de derivados TSAO podrían interferir a nivel de la membrana celular<sup>101</sup>.

Seguidamente, los 4''-*N*-oxalilderivados **1.8-1.10** se ensayaron frente a las enzimas Transcriptasa Inversa de VIH-1 salvaje y TI de VIH-1 mutada en la posición 138 (Glu138Lys), mutación encontrada en la TI cuando es sometida a la presión de los derivados TSAO (Tabla 1.6). El ensayo se realizó siguiendo procedimientos descritos<sup>58</sup>. En el ensayo se incluyó el derivado TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) como patrón. Según se refleja en la Tabla 1.6 los derivados **1.8-1.10** mostraron actividad inhibitoria significativa frente a la enzima TI salvaje con valores de CI<sub>50</sub> de 138, 34 y 200 µM respectivamente lo que indica que su objetivo es la TI de VIH-1. Además, el 4''-*N*-oxaloderivado **1.9** mantiene su actividad inhibitoria frente a la enzima TI mutada (Glu138Lys) (CI<sub>50</sub> = 50 µM), dato que fue corroborado en cultivo celular frente a cepas de VIH-1 resistentes a TSAO. Sin embargo, los 4''-*N*-oxalilderivados **1.8** y **1.10** resultaron inactivos frente a la enzima mutada.

**TABLA 1.6**

Actividad frente a TI salvaje y frente a TI mutada (Glu-138Lys) de los derivados **1.8**, **1.9** y **1.10**

Compuesto	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	
	TI salvaje	TI mutada (Glu138Lys)
<b>1.8</b>	138	> 500
<b>1.9</b>	34	50
<b>1.10</b>	200	> 500
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	2.23	> 500

<sup>a</sup>Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima

Los datos de actividad/toxicidad recogidos en las Tablas 1.5 y 1.6 se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Todos los derivados TSAO modificados en la posición 4'' que resultaron activos mostraron una alta especificidad por VIH-1 al igual que otros de los miembros de la familia TSAO.
2. La actividad mostrada por los 4''-*N*-metoxalil y 4''-*N*-oxamoilderivados (**1.8** y **1.10**) es comparable a la del compuesto prototipo TSAO-m<sup>3</sup>T. Sin embargo, estos compuestos presentaron una citotoxicidad mucho mayor.
3. Parece ser necesaria para la actividad la presencia de dos grupos carbonilo contiguos (comparar **1.8** con **1.16b** y **1.18**). Los 4''-ureidoderivados portadores de un solo grupo carbonilo (**1.12-1.14**) o de dos carbonilos no contiguos (**1.16a-1.16c** y **1.18**) resultaron inactivos.
4. El 4''-*N*-oxaloderivado (**1.9**) mostró actividad significativa tanto frente a la TI mutada (Glu138Lys) como frente a las cepas TSAO-resistentes siendo éste el primer derivado TSAO de “segunda generación” activo frente a las cepas resistentes a los derivados TSAO de primera generación.

#### ***1.2.2.1. Estudios de estabilidad***

A la vista de las actividades mostradas por los compuestos **1.8-1.10**, consideramos importante determinar si el agrupamiento amida de dichos compuestos era estable en el medio biológico, ya que si dicho enlace se rompiera, la actividad mostrada por los compuestos podría deberse a la liberación de TSAO-m<sup>3</sup>T (derivado muy activo).

Así, cuando el compuesto **1.8** se disolvió en DMSO y se diluyó con un 10% de suero fetal que contenía el medio de cultivo (condiciones en las que se realizan los ensayos antivirales de los compuestos), éste se transformó en un compuesto más polar. Dicho compuesto no fue TSAO-m<sup>3</sup>T (que se formaría por ruptura del enlace amida) ni el ácido **1.9** (que se formaría por hidrólisis del éster metílico). El nuevo producto que se formó, se aisló y caracterizó como el derivado **1.22** (Esquema 1.14), es decir el análogo de **1.8** desprotegido en la posición 5' del azúcar (ver parte experimental, pág 130)



Paralelamente, se estudió el comportamiento en disolución del compuesto más inestable (**1.8**) mediante RMN de  $^1\text{H}$ .

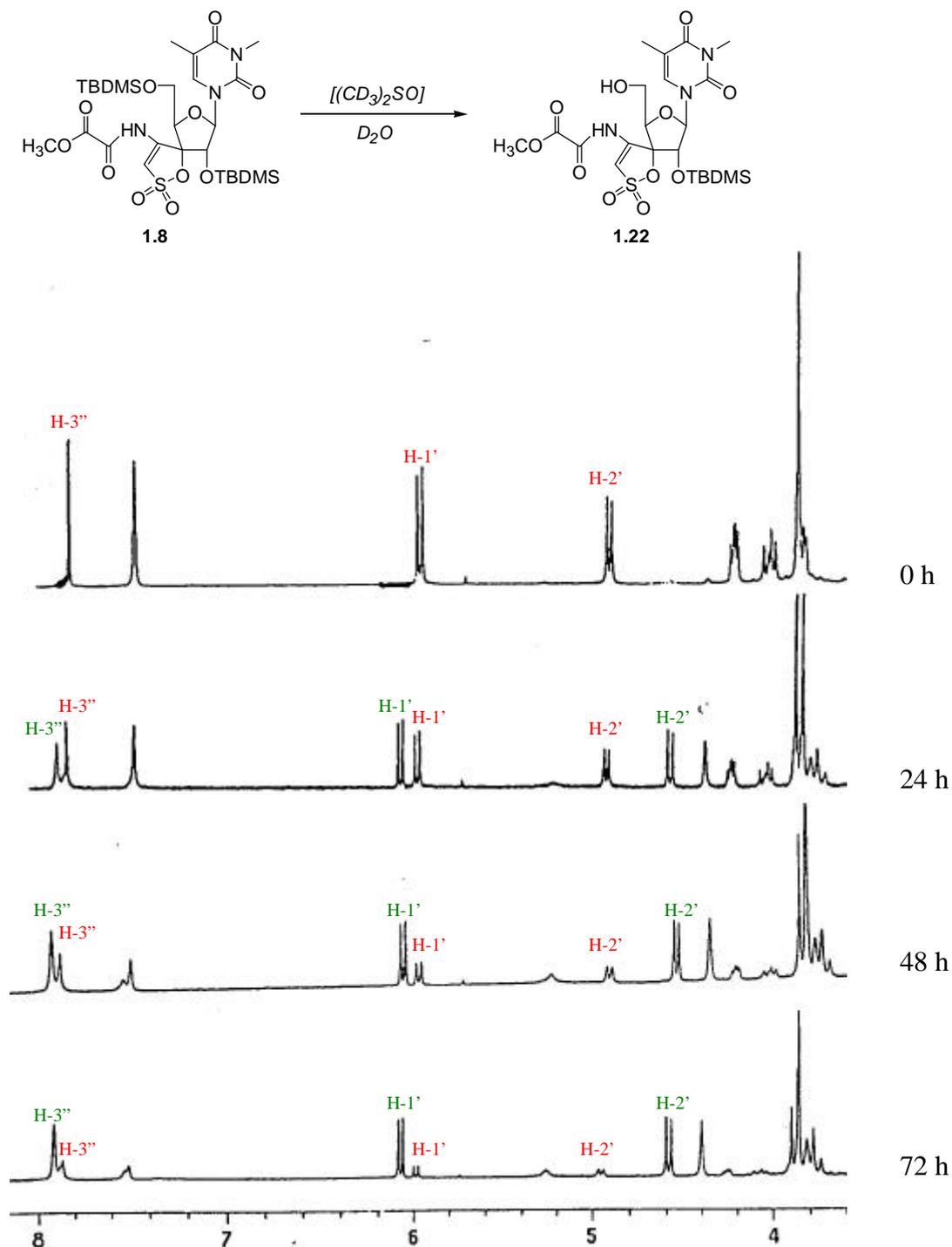


FIGURA 1.8.— Espectros de  $^1\text{H}$  RMN en la zona de 4.00 a 8.00 ppm del derivado **1.8** en  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ . Los espectros se han realizado a tiempo 0, y al cabo de 24, 48 y 72 h. Las señales marcadas en color rojo corresponden al derivado **1.8**, mientras que las marcadas en verde corresponden al derivado **1.22**

Así, se realizaron espectros de  $^1\text{H}$  RMN del derivado **1.8** en  $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$  a distintos tiempos. En la Figura 1.8 se recogen los resultados de dichos experimentos. Las señales marcadas en rojo corresponden al protón anomérico H-1' ( $\delta = 6.01$  ppm), al protón H-2' ( $\delta = 4.92$  ppm) y al protón H-3'' ( $\delta = 7.83$  ppm) del compuesto desililado **1.8**, mientras que las señales marcadas en verde, corresponden a los mismos protones en el derivado 5'-desprotegido **1.22**. Según reflejan los espectros, a las 24 h el producto 5'-desprotegido (**1.22**) está en una proporción 1.2:1 respecto al producto de partida (**1.8**), a las 48 h esta proporción aumenta hasta 2.5:1 y a las 72 h el producto está prácticamente desprotegido.

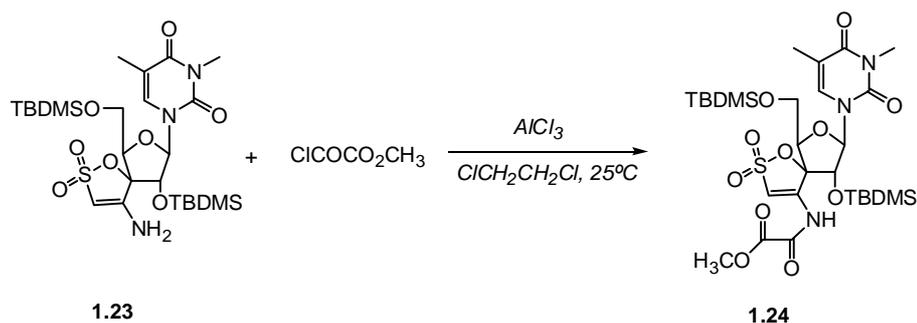
Sin embargo, cuando este experimento se realizó en un disolvente apolar ( $\text{CDCl}_3$ ) en presencia y en ausencia de  $\text{D}_2\text{O}$  la molécula es estable tras una semana en disolución, no detectándose trazas del producto desprotegido en 5'.

Los datos experimentales indican que la pérdida del grupo 5'-TBDMS en los compuestos **1.8-1.10** debe estar relacionada de algún modo con el sustituyente de la posición 4'' y con la polaridad del medio.

Existen muy pocos antecedentes en la bibliografía de desprotecciones “espontáneas” de grupos sililo en las que dicha hidrólisis se produce con asistencia intramolecular de un grupo vecino<sup>102,103</sup>. Actualmente se está estudiando este proceso a fin de poder postular un posible mecanismo de hidrólisis de dicho 5'-TBDMS con asistencia intramolecular del enlace amida de la posición 4''.

La importancia de la asistencia del grupo participante vecino en el proceso de desililación de estas moléculas queda puesto de manifiesto por el hecho de que cuando se sintetiza el análogo de **1.8** de configuración *xilo* **1.24** éste resultó ser estable en condiciones en las que su análogo de configuración *ribo* (**1.8**) se desprotege espontáneamente.

Así, el tratamiento del xiloderivado **1.23**<sup>43b</sup> (Esquema 1.16) con cloruro de metiloxalilo en presencia de  $\text{AlCl}_3$  y en dicloroetano seco, condujo al *N*-acilderivado **1.24** con un rendimiento del 53%. Cuando este derivado se mantiene en disolución de  $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$  resultó ser estable tras 10 días en disolución, no observándose la formación del derivado desprotegido en la posición 5' del azúcar.



ESQUEMA 1.16.- Síntesis del xiloderivado 1.24

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo, revelan que el grupo TBDMS de la posición 5' es imprescindible en los derivados TSAO para mantener la actividad antiviral, y como se ha visto con anterioridad, el derivado **1.8** pierde dicho grupo con mucha facilidad en las condiciones en las que se realizan los ensayos biológicos. Este hecho, unido a la gran potencia antiviral que posee **1.8**, hace que no podamos realmente evaluar la potencia conseguida al introducir el grupo metoxalilo, ya que cuando **1.8** pierde el grupo TBDMS de la posición 5' del azúcar, pasa a ser inactivo. Ello hace necesaria la búsqueda de un grupo más estable en dicha posición 5', aproximación en la que estamos trabajando en la actualidad.

## 2. DERIVADOS TSAO SUSTITUIDOS EN LA POSICION 3'' DEL ANILLO DE ESPIROAMINOOXATIOLDIOXIDO

Como ya se ha comentado en la introducción, los derivados TSAO ejercen un modo particular de inhibición sobre la TI, posiblemente interaccionando en la interfaz de las dos subunidades p66/p51 de la enzima, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente al del resto de IENN.

Con el fin de obtener una “nueva generación” de derivados TSAO con interacciones adicionales con aminoácidos de la interfaz próximos al Glu-138 de la subunidad p51 nos planteamos la preparación de nuevos análogos TSAO de fórmula general I (Figura 2.1) en los que se mantiene el grupo 4''-NH<sub>2</sub> del anillo de espiroaminooxatioldióxido, para interaccionar con el Glu-138, y se ha sustituido la posición contigua (C-3'') con grupos (R') de distinta naturaleza que podrían estar implicados en interacciones con aminoácidos próximos a dicho Glu-138 mediante puentes de hidrógeno o por sus propiedades estereoelectrónicas. Estos compuestos podrían dar lugar a una inhibición más potente de la TI y/o evitar la aparición de cepas de virus TSAO-resistentes, ya que al haber más puntos de interacción con la enzima (TI) al virus podría resultarle más difícil mutar.

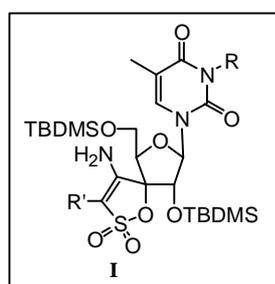


FIGURA 2.1.– Fórmula general de derivados TSAO sustituidos en la posición 3''

Cabe destacar que la síntesis de las moléculas propuestas supone un reto sintético importante ya que la reactividad del sistema heterocíclico de 4-amino- $\gamma$ -sulfoha ha sido muy poco estudiada, lo que requiere la búsqueda y puesta a punto de metodologías sintéticas adecuadas para la introducción de los sustituyentes en la posición 3'' de dicho anillo. Además, la presencia de los grupos TBDMS en las posiciones 2' y 5' del azúcar, cruciales para la actividad antiviral, pero sensibles tanto a medios ácidos como básicos, implica la elección de condiciones suaves de reacción compatibles con dichos grupos lo que limita las posibilidades sintéticas.

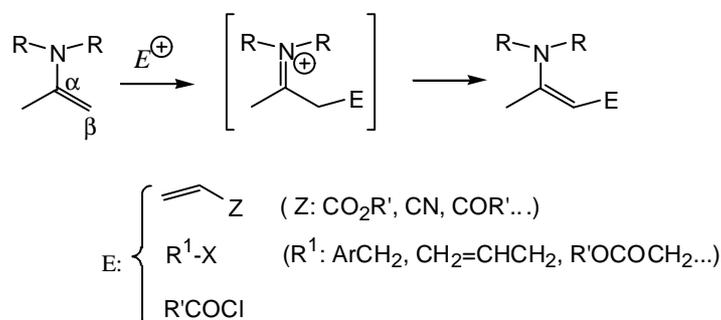
En el presente capítulo se describe la síntesis y evaluación biológica de esta nueva serie de compuestos.

## 2.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS TSAO SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 3''

### 2.1.1. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' mediante reacciones de alquilación

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, el anillo de espiroaminoxatioldióxido de los derivados TSAO se encuentra preferentemente en forma de enamina<sup>81</sup>.

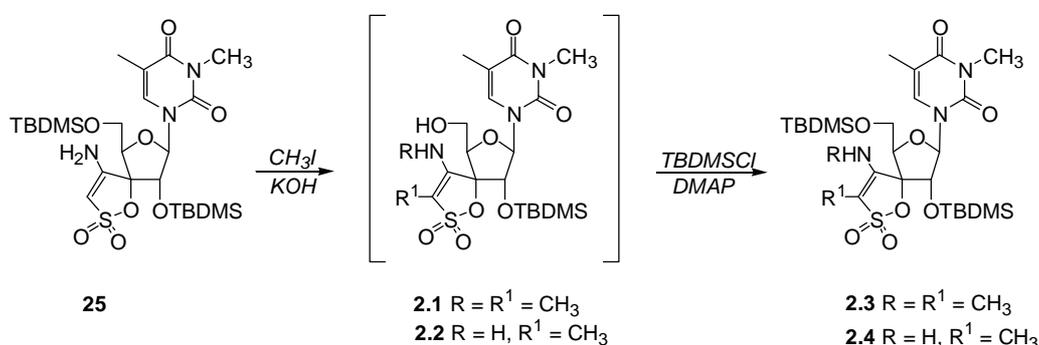
Las enaminas son unos nucleófilos muy versátiles<sup>95,104,105</sup> ya que reaccionan con una gran variedad de electrófilos (Esquema 2.1) tales como olefinas electrófilas, haluros de alquilo, cloruros de ácido, etc. generando enlaces C-C en posición  $\beta$  al grupo amino de la enamina.



ESQUEMA 2.1.–Reactividad general de enaminas

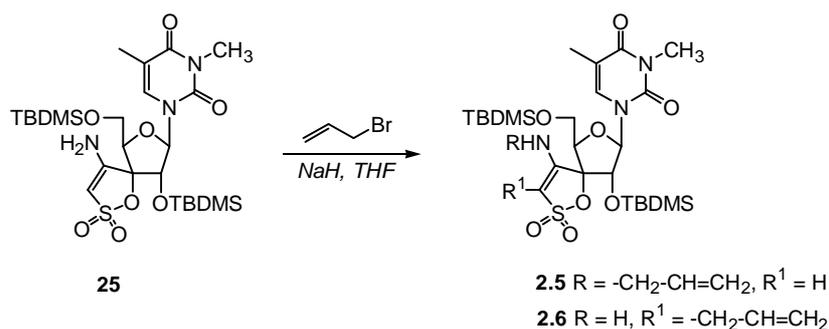
Los intentos iniciales de alquilación de TSAO- $m^3T$  (**25**) con olefinas activadas, como el acrilato de metilo, en las condiciones clásicas descritas por Stork<sup>104</sup>, tanto en disolventes apróticos ( $CH_3CN$ ) como próticos (EtOH) a reflujo y en ausencia de base, fueron infructuosos recuperándose en ambos casos el producto de partida inalterado. Análogamente, cuando se llevó a cabo la reacción utilizando haluros activados, como el bromuro de alilo, en presencia de  $Et_3N$ , para captar el HBr generado, y a reflujo de acetonitrilo, ésta resultó igualmente infructuosa recuperándose el producto de partida (**25**) inalterado.

Dada la baja reactividad del sistema enamínico del TSAO- $m^3T$  en ausencia de base, decidimos intentar las reacciones de alquilación en presencia de bases fuertes. Así, el tratamiento de TSAO- $m^3T$  (**25**) con yoduro de metilo (Esquema 2.2) en presencia de 1.2 equivalentes de KOH, en dioxano seco a temperatura ambiente, condujo a una mezcla compleja de productos desprotegidos en la posición 5' del azúcar, de la que tras una silylación posterior, pudieron aislarse el derivado N,C-dialquilado **2.3** y el compuesto de C-alquilación **2.4**, en un 20% y 18% de rendimiento, respectivamente, junto con un 35% del producto de partida sin reaccionar.

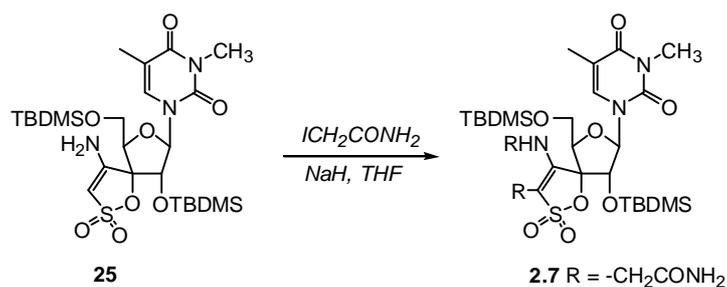


ESQUEMA 2.2.– Reacción de TSAO- $m^3T$  con  $CH_3I$

Con el fin de evitar o controlar la desprotección del grupo 5'-TBDMS, decidimos explorar otras bases como el NaH, así como otros electrófilos activados. Así, el tratamiento TSAO- $m^3T$  (**25**) con bromuro de alilo, en presencia de 1.5 equivalentes de NaH en THF seco, a temperatura ambiente (Esquema 2.3) dio lugar a una mezcla del correspondiente derivado de N-alquilación **2.5** (20%), el derivado de C-alquilación **2.6** (31%) junto con un 40% del producto de partida inalterado.

ESQUEMA 2.3.– Reacción del derivado **25** con bromuro de alilo

Análogamente, el empleo de otros haluros activados, como yodoacetamida, en condiciones similares a las ya descritas para la síntesis de **2.5** y **2.6** condujo al nucleósido N,C-dialquilado **2.7** en un 40% de rendimiento, junto con un 48% del producto de partida sin reaccionar (Esquema 2.4).

ESQUEMA 2.4.– Reacción del derivado **25** con yodoacetamida

Como se puede observar, el empleo de NaH como base no da lugar a la desprotección del grupo 5'-TBDMS, sin embargo, en ambas reacciones, se obtienen mezclas de productos de C- y/o N-alquilación junto con una gran cantidad del producto de partida sin reaccionar. Intentos posteriores de optimización de esta reacción empleando un mayor número de equivalentes de NaH y/o tiempos más prolongados de reacción, con el fin de consumir el producto de partida sin reaccionar e intentar así mejorar los rendimientos de la reacción, resultaron infructuosos, obteniéndose mezclas complejas de productos de desprotección que no se aislaron.

La determinación estructural de los compuestos **2.3-2.7**, se realizó a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. Así, en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los derivados de C-alquilación en la posición 3'' del anillo **2.4** y **2.6**, se observa la desaparición de la señal

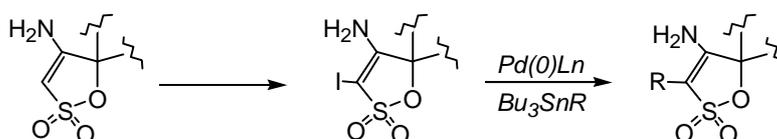
correspondiente al protón vinílico H-3'' a 5.76 ppm, así como la presencia de nuevas señales correspondientes a los grupos introducidos en dicha posición (Parte Experimental, págs. 99-99). Por otra parte, en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado N-alquilado **2.5** se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo  $\text{NH}_2$ -4'' a 6.47 ppm junto con la presencia de una nueva señal ancha, que intercambiaba con  $\text{D}_2\text{O}$  y que integraba para un protón a 6.60 ppm, que se asignó como la señal correspondiente al NH de la posición 4''. Finalmente, en los espectros de los derivados N,C-dialquilados **2.3** y **2.7** se observó la desaparición de los protones H-3'' y  $\text{NH}_2$ -4'' y la presencia de una nueva señal ancha a 5.97 y 7.31 ppm respectivamente, correspondiente al NH de la posición 4'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido.

Cuando los espiroaminoxatioldióxidos alquilados **2.3-2.7** se ensayaron frente al virus del SIDA, únicamente el derivado de C-alquilación **2.4** mostró actividad frente a VIH-1, tal y como se verá en el apartado de actividad antiviral.

Los bajos rendimientos de los productos de C-alquilación deseados, debido en parte a la falta de regioselectividad de la reacción, junto a la baja reactividad del sistema enamínico presente en las moléculas TSAO, nos llevó a abordar la síntesis regioselectiva de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido mediante una nueva estrategia sintética.

### 2.1.2. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' mediante reacciones de acoplamiento de Stille

Para la preparación de los derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' diseñamos un procedimiento sintético en dos pasos, que se halla recogido en el Esquema 2.5, basado en reacciones de acoplamiento de Stille catalizadas por paladio (Pd) entre 3''-yodonucleósidos, como electrófilos, y distintos organoestannanos. Cabe destacar que el sistema heterocíclico de  $\gamma$ -sultona, presente en nuestras moléculas, no había sido estudiado con anterioridad en reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio.



ESQUEMA 2.5.— Estrategia general para la síntesis de derivados TSAO 3''-sustituidos

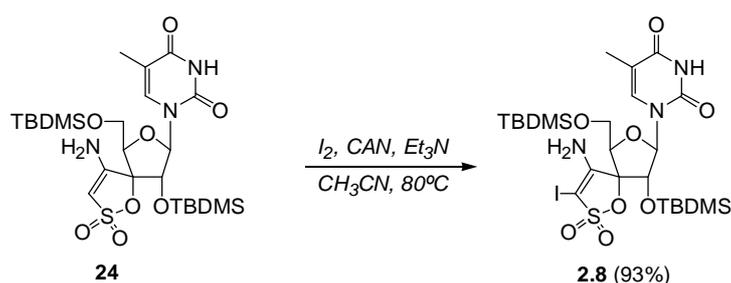
Primeramente, fue necesaria la preparación de los 3''-yodoespiroderivados, intermedios clave en la secuencia sintética.

### 2.1.2.1. Síntesis de los intermedios TSAO sustituidos en la posición 3'' con grupos halógeno

La mayoría de los métodos de halogenación descritos en la bibliografía<sup>106</sup> emplean ácidos y/o bases fuertes como oxidantes, así como temperaturas de reacción elevadas, lo que en nuestro caso resulta incompatible con los grupos TBDMS de las posiciones 2' y 5' del anillo de ribosa.

Dentro de los procedimientos suaves de halogenación, el método de halogenación oxidativa desarrollado por Robins y col.<sup>107a</sup> parecía el más adecuado. Dicho método, utilizado por primera vez por Sugiyama<sup>108</sup> en halogenaciones de sistemas bencénicos, y posteriormente ampliamente utilizado en halogenaciones de la posición C-5 de derivados de uracilo<sup>107</sup>, emplea una mezcla de I<sub>2</sub> o halogenuros metálicos y nitrato cérico amónico [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>] (CAN) conduciendo, en tiempos muy cortos de reacción, a rendimientos elevados de los correspondientes productos de halogenación.

Así, el tratamiento de TSAO-T (**24**) con yodo, (Esquema 2.6) en presencia de CAN y de Et<sub>3</sub>N, en acetonitrilo seco a 80°C, dio lugar al correspondiente 3''-yododerivado **2.8** con excelente rendimiento (93%). La presencia de Et<sub>3</sub>N es esencial para evitar la desprotección del grupo TBDMS de la posición 5' del anillo de ribofuranosa.



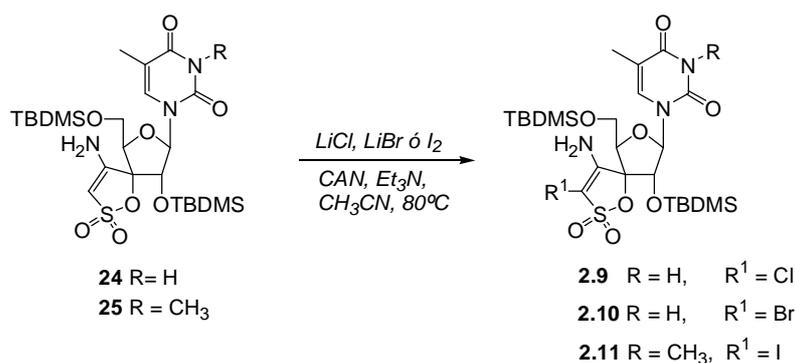
ESQUEMA 2.6.– Síntesis del yododerivado **2.8**

Cuando el yodonucleósido **2.8** se ensayó frente a VIH-1 mostró una actividad similar a la del compuesto prototipo TSAO-T. Por ello, consideramos interesante la preparación de los correspondientes cloro y bromoderivados de TSAO-T y TSAO-m<sup>3</sup>T, con el fin de comparar

su actividad con la del yododerivado (**2.8**). La preparación de estos compuestos nos permitiría estudiar el efecto del tamaño y la electronegatividad del halógeno sobre la actividad/toxicidad de los compuestos.

Así, la reacción de TSAO-T (**24**) ó TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) (Esquema 2.7) con LiCl, LiBr, ó I<sub>2</sub> en presencia de CAN y Et<sub>3</sub>N, en condiciones similares a las descritas para la síntesis de **2.8** condujo a los correspondientes 3''-haloespironucleósidos con buenos rendimientos [**2.9** (50%), **2.10** (75%), **2.11** (90%)].

La posición de halogenación de los derivados **2.8-2.11** se asignó basándose en sus datos analíticos y espectroscópicos. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN mostraron la desaparición del singlete a 5.75 ppm correspondiente al protón H-3''. En los espectros de <sup>13</sup>C RMN, se observó un desplazamiento a campo alto de la señal del C-3'' ( $\Delta\delta = 7-37$  ppm) debido a la sustitución del protón de la posición 3'' de **24** ó **25** por los grupos halógenos más apantallantes (Cl, Br, I).



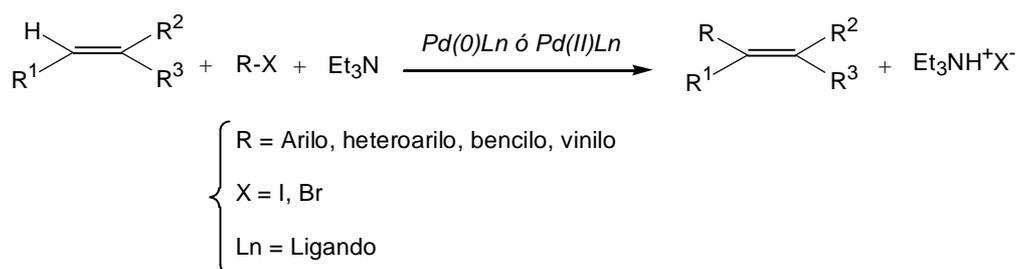
ESQUEMA 2.7.– Síntesis de los 3''-haloespironucleosidos **2.9**, **2.10** y **2.11**

### 2.1.2.2. Reacciones de acoplamiento catalizadas por Paladio

Una vez demostrada la viabilidad y los excelentes rendimientos obtenidos en la reacción de yodación de la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido decidimos, dentro de las posibilidades sintéticas que nos ofrecía este tipo de haluro orgánico sp<sup>2</sup>, explorar las reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio como metodología que nos permitiera la introducción de sustituyentes en dicha posición 3''.

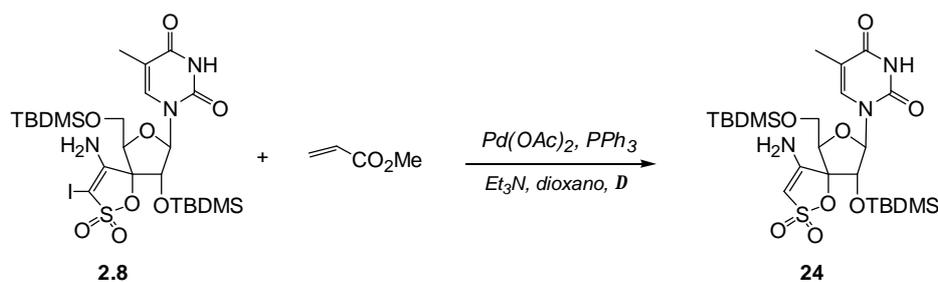
De entre las numerosas aproximaciones descritas en la bibliografía para este tipo de reacciones<sup>109</sup>, pusimos especial atención en la selección de aquellos métodos que empleasen condiciones suaves de reacción compatibles con los grupos TBDMS. La reacción de acoplamiento de Heck entre haluros orgánicos y olefinas ha sido uno de los métodos más

utilizados para la vinilación de haluros orgánicos<sup>110</sup>. Dicho método consiste en el tratamiento de un haluro orgánico  $sp^2$  de vinilo, arilo o heteroarilo, como electrófilo (Esquema 2.8), con olefinas en presencia de una amina (principalmente  $Et_3N$ ) y distintos tipos de catalizadores de Pd y ligandos (p.ej. acetato de paladio y triarilfosfinas, entre otros). La reacción es bastante general y versátil, siendo compatible con una gran variedad de grupos funcionales tanto en el haluro orgánico como en la olefina.



ESQUEMA 2.8.– Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio (Heck)

Los intentos iniciales de acoplamiento entre el 3''-yodonucleósido **2.8** con alquenos activados (acrilato de metilo) (Esquema 2.9), utilizando las condiciones clásicas de Heck [ $Pd(OAc)_2$ ,  $PPh_3$ ,  $Et_3N$ ]<sup>110</sup>, en dioxano seco, resultaron infructuosos recuperándose el producto de partida inalterado junto con el producto de reducción (TSAO-T, **24**).

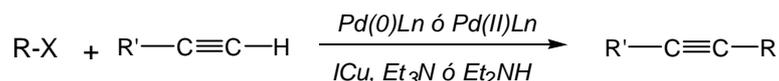


ESQUEMA 2.9.– Reacción de acoplamiento catalizada por paladio utilizando las condiciones de Heck

Se ha descrito en la bibliografía<sup>109,110</sup> que en reacciones de Heck, así como, en general, en reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio, la reducción del yododerivado de partida es una de las reacciones secundarias más comunes en este tipo de procesos.

Otro de los métodos descritos para la formación de enlaces C-C en presencia de catalizadores de Pd es la modificación de Sonogashira<sup>111</sup> del método original desarrollado por

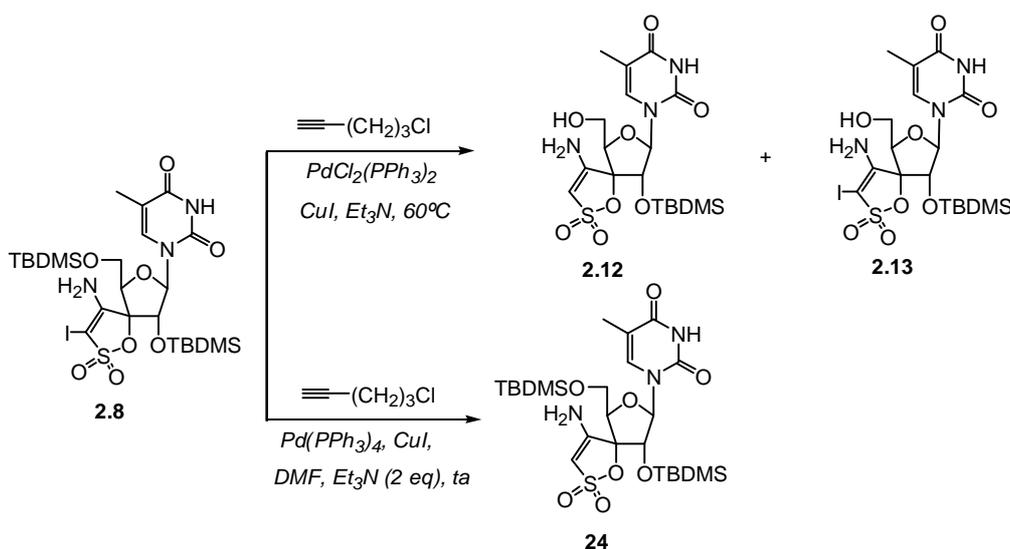
Heck, que consiste en la reacción de acoplamiento entre haluros  $sp^2$  y alquinos terminales en presencia de CuI como cocatalizador y una amina como disolvente (Esquema 2.10). El empleo de CuI como cocatalizador hace que la reacción transcurra en condiciones muy suaves, pudiéndose realizar muchas de ellas incluso a temperatura ambiente, por lo que decidimos intentar estas condiciones con nuestro yododerivado **2.8**.



ESQUEMA 2.10.– Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio (Sonogashira)

Así, la reacción de acoplamiento de **2.8** con 5-cloro-1-pentino (Esquema 2.11) en presencia de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  como catalizador, CuI como cocatalizador y  $\text{Et}_3\text{N}$  como base y como disolvente<sup>111</sup> a  $50^\circ\text{C}$ , dio lugar a una mezcla de **2.12**<sup>43b</sup> y **2.13**, ambos desprotegidos en la posición 5' del azúcar respectivamente.

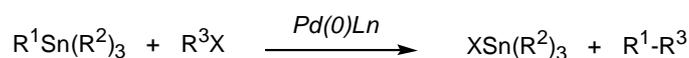
Cuando la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con un catalizador de Pd(0)  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$  en presencia de CuI, 2 equivalentes de  $\text{Et}_3\text{N}$ , y DMF como disolvente<sup>112</sup> a temperatura ambiente (Esquema 2.11), ésta resultó igualmente infructuosa aislándose el producto de partida sin reaccionar junto con el producto de reducción **24** (TSAO-T).



ESQUEMA 2.11.– Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio: método de Sonogashira

Los resultados infructuosos de los primeros intentos de acoplamiento utilizando las condiciones descritas tanto por Heck como por Sonogashira nos llevaron a explorar otras metodologías de acoplamiento. Entre ellas, el método de Stille nos permitió llevar a cabo dichas reacciones de acoplamiento con éxito.

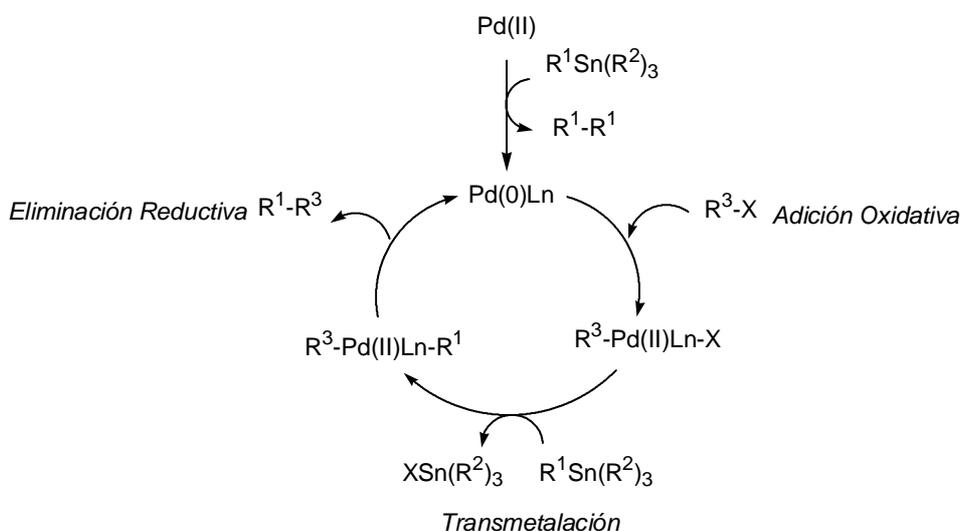
La reacción de acoplamiento catalizada por paladio entre organoestannanos y electrófilos orgánicos (haluros orgánicos o triflatos), conocida como reacción de Stille, (Esquema 2.12) es un procedimiento muy atractivo dentro de la química orgánica, ampliamente utilizado en los últimos años para la formación de enlaces C-C<sup>113-115</sup>.



ESQUEMA 2.12.– Esquema general de la reacción de Stille

El método de Stille utiliza condiciones suaves de reacción, es de una gran versatilidad sintética, al ser compatible con una gran variedad de grupos funcionales tanto en el organoestannano como en el electrófilo, transcurre con una elevada estereoespecificidad y regioselectividad y da lugar a rendimientos muy elevados, lo que hace que la metodología haya sido ampliamente utilizada en la síntesis de moléculas orgánicas complejas.

El mecanismo<sup>114</sup> comúnmente aceptado para la reacción de Stille se refleja en el Esquema 2.13 y sigue los principios generales de otras reacciones catalizadas por metales de transición. Esquemáticamente, este mecanismo consiste en un ciclo catalítico en tres pasos:



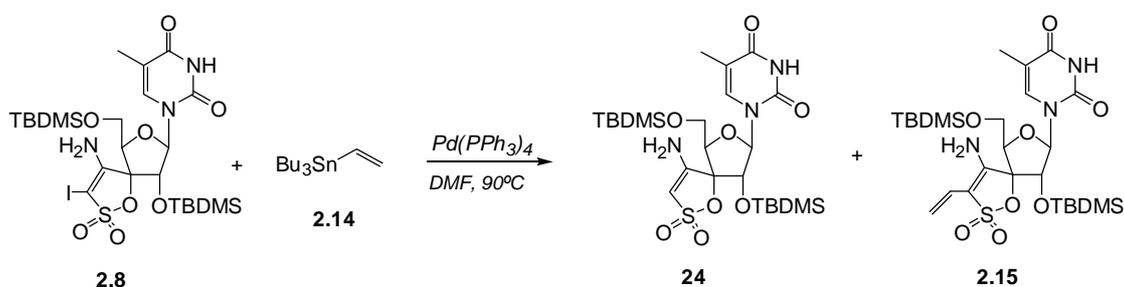
ESQUEMA 2.13.– Mecanismo propuesto para la reacción de Stille

(i) *Adición oxidativa* inicial de complejos de Pd(0) al haluro correspondiente.  
 (ii) *Transmetalación*, paso limitante de la reacción, donde se transfiere uno de los grupos del estannano  $[R^1Sn(R^2)_3]$  al complejo anteriormente formado  $[R^3-Pd(II)Ln-X]$ . En el organoestannano,  $R^1$  es el grupo que se va a transferir, generalmente un grupo insaturado (vinilo, arilo, heteroarilo, alquínilo) y  $R^2$  es un grupo no transferible (metilo o butilo).  
 (iii) Finalmente, *eliminación reductiva*, para conducir al producto de acoplamiento ( $R^1-R^3$ ) regenerándose el complejo de paladio(0) inicial  $[Pd(0)Ln]$ .

La especie catalíticamente activa es Pd(0), aunque también pueden utilizarse catalizadores de Pd(II), que serán reducidos rápidamente, en este caso por el propio estannano, a complejos de Pd(0) entrando así en el ciclo catalítico.

En la reacción se pueden utilizar una gran variedad tanto de catalizadores de Pd, como de disolventes, y aunque existen catalizadores de uso bastante general [ej.  $Pd(PPh_3)_4$ ], éstos dependerán de cada caso en particular, especialmente en sustratos poco reactivos, donde en general se requiere una optimización cuidadosa de las condiciones experimentales de reacción.

Primeramente, intentamos la reacción de acoplamiento de Stille entre el yododerivado **2.8** y uno de los reactivos de estaño comerciales más versátiles, el tri-*n*-butilvinilestannano, utilizando las condiciones clásicas de Stille. Así, el tratamiento de **2.8** con tri-*n*-butilvinilestannano (**2.14**) en presencia de  $Pd(PPh_3)_4$  como catalizador, DMF como disolvente (Esquema 2.14), a 90°C durante 24 horas, condujo al producto de reducción **24** y a una mezcla inseparable de dos productos en la que se pudo detectar, por  $^1H$  RMN, por primera vez, el producto de acoplamiento deseado **2.15**, aunque en muy bajo rendimiento (< 10%), junto con producto de partida sin reaccionar.



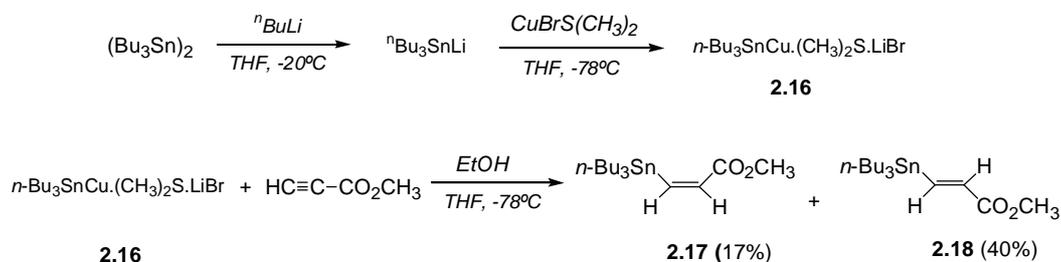
ESQUEMA 2.14.—Síntesis de **2.15** utilizando las condiciones clásicas de Stille

A pesar de haber conseguido el acoplamiento entre **2.8** y el estannano **2.14**, nos enfrentábamos a dos problemas: por un lado, a los bajos rendimientos del producto de acoplamiento, y por otro, a las dificultades de separación cromatográfica entre el producto de acoplamiento **2.15** y el producto de partida.

Con el fin de facilitar los estudios posteriores de optimización de la reacción de acoplamiento, primeramente decidimos buscar otros vinilestannanos funcionalizados que nos permitieran seguir el curso de la reacción.

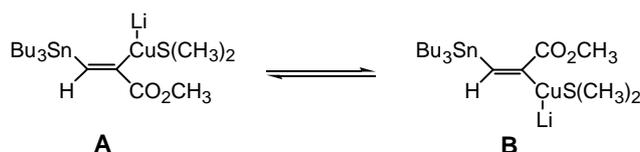
Entre los numerosos vinilestannanos descritos, elegimos inicialmente el (*E*) 3-(tri-*n*-butilestannil) acrilato de metilo **2.18**<sup>116</sup>, por su fácil preparación y por haber conducido a buenos rendimientos en otras reacciones de Stille<sup>115</sup>.

La síntesis de **2.18** (Esquema 2.15) se realizó mediante reacción de adición conjugada de complejos de Cu-Sn (**2.16**) a ésteres  $\alpha,\beta$ -acetilénicos<sup>116a</sup>. Así, el tratamiento de bis(tributilestano) en THF seco con una disolución 1.6 M de *n*-butilitio en hexano, durante 20 minutos (formación de *n*-Bu<sub>3</sub>SnLi), seguido de la adición de CuBr·S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a -78°C durante 30 minutos adicionales, condujo al complejo de Cu-Sn (**2.16**). El tratamiento posterior de **2.16** con propiolato de metilo, en presencia de etanol a -78°C, dio lugar a una mezcla de los (*Z*) y (*E*) vinilestannanos **2.17** (17%) y **2.18** (40%), donde el isómero (*E*) fue el mayoritario.

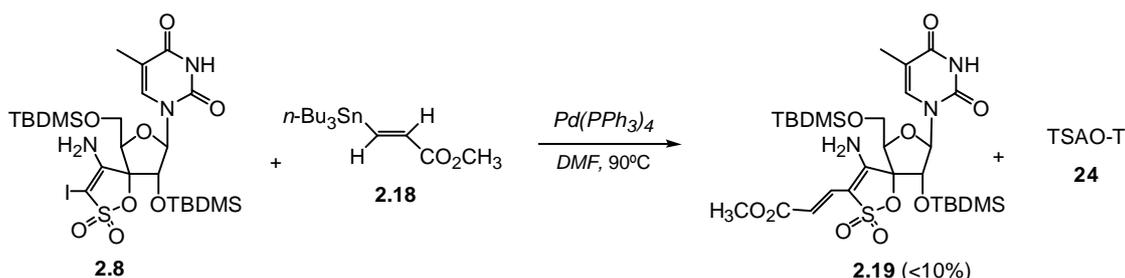


ESQUEMA 2.15.– Síntesis del derivado de estaño **2.18**

Tal y como se ha descrito en la bibliografía<sup>116a</sup>, la formación mayoritaria del isómero *E* podría explicarse en función de las condiciones utilizadas, ya que en dichas condiciones (bajas temperaturas y presencia de un disolvente prótico como el etanol) el intermedio de "control cinético" **A** (Figura 2.3) sería relativamente estable y se protonaría antes de que ocurriera la isomerización dando lugar al isómero *E* mayoritariamente.

FIGURA 2.3.– Intermedios de la síntesis de **2.17** y **2.18**

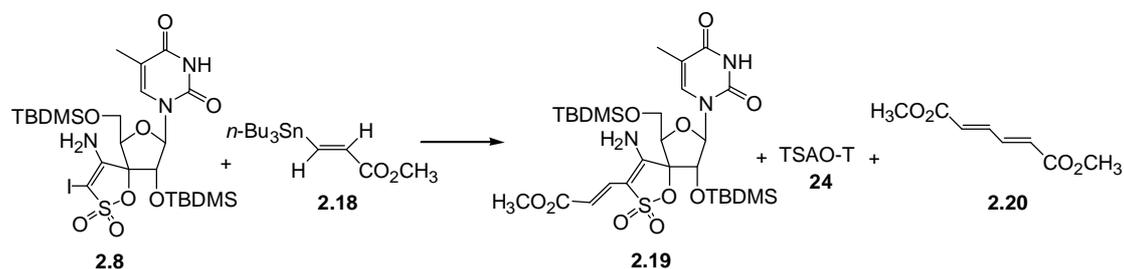
Seguidamente, el yoderivado **2.8** se hizo reaccionar con el nuevo vinilestannano sintetizado **2.18** (Esquema 2.16), en las condiciones clásicas de Stille anteriormente descritas [ $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , DMF,  $90^\circ\text{C}$ ] para dar, nuevamente, una mezcla del producto de acoplamiento deseado **2.19**, en bajo rendimiento ( $< 10\%$ ), el producto de reducción **24**, junto con un 70% del producto de partida sin reaccionar. Sin embargo, cabe destacar que en esta ocasión los productos pudieron separarse cromatográficamente tanto por HPLC como por cromatografía de capa fina, a diferencia de lo que había ocurrido en el acoplamiento con el vinilestannano (**2.14**) anteriormente descrito.

ESQUEMA 2.16.– Reacción de acoplamiento de Stille entre el yoderivado **2.8** y **2.18**

Seguidamente, se realizaron estudios de optimización de esta reacción, en presencia de distintos catalizadores de Pd, ligandos, cocatalizadores y diferentes concentraciones del estannano. Todas las reacciones se realizaron en *N*-metil-2-pirrolidinona (NMP) como disolvente a  $60^\circ\text{C}$  y bajo atmósfera de argón. Ya que dos de las mejoras de la reacción de Stille descritas en la bibliografía, que han resultado claves para solucionar problemas asociados con una baja reactividad de determinados sustratos favoreciendo el paso limitante de transmetalación, han sido el "efecto ligando" (utilización de ligandos "blandos" poco donadores como por ej. trifenilarsina)<sup>117</sup> y el efecto cocatalizador de sales de  $\text{Cu}(\text{I})$ <sup>118</sup>, ambos tipos de modificaciones se incluyeron dentro de los estudios de optimización de nuestro sistema en particular. En la Tabla 2.1 se recogen los resultados de estos estudios de optimización.

TABLA 2.1

Estudios de optimización de la reacción de Stille



Experimento <sup>a</sup>	Catalizador	Equivalentes de estannano	Tiempo de reacción (h)	Proporción de 2.19/24 <sup>b</sup>	Rendimiento de 2.19a(%) <sup>b</sup>
1	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5%)	2	> 80 h (80%) de <b>11</b>	2:1	10
2	PdCl <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub>	2	—	—	—
3	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2%)/ AsPh <sub>3</sub> (8%)	2	5	4:3	55
4	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2%)/ AsPh <sub>3</sub> (8%)	2 + 2 <sup>c</sup>	6	3:1	70
5	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (2%)/ AsPh <sub>3</sub> (8%)/ CuI (4%)	2 + 2 <sup>d</sup>	2	3:1	72
6	CuCl	2	24 h	—	—
7	CuTc	2	24 h	—	—

<sup>a</sup>Todas las reacciones se llevaron a cabo en NMP a 60°C. <sup>b</sup>Las proporciones de los productos obtenidos y los rendimientos se determinaron por HPLC. <sup>c,d</sup>Se añadieron 2 equivalentes de estannano al cabo de 1h y 2h de reacción o bien al cabo de 0.5h y 1h de reacción.

A la vista de los datos reflejados en la Tabla 2.1, podemos destacar los siguientes puntos:

1. La naturaleza del catalizador y el tipo de ligandos utilizado influye de manera decisiva en la formación del producto de acoplamiento. Los catalizadores tradicionales de Pd(0) con ligandos duros como Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, condujeron al producto de acoplamiento aunque en muy bajo rendimiento, (experimento 1). Sin embargo, el empleo de catalizadores de Pd(II) "sin ligando" como PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub> no dio lugar a la formación del producto de acoplamiento (experimento 2). Esto podría explicarse, porque, aunque estos sistemas catalíticos son muy reactivos, al no estar coordinados con ligandos, son también muy inestables, lo que representa un problema en sustratos poco reactivos, como parece ser nuestro caso, ya que podrían descomponerse antes de

dar la reacción de acoplamiento. La utilización de un complejo de paladio débilmente coordinado, como  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , junto con ligandos blandos, como trifenilarsina ( $\text{AsPh}_3$ ) (experimento 3), cataliza de forma más efectiva la reacción de acoplamiento. En este caso el producto de partida se consume en su totalidad y se mejora significativamente el rendimiento del producto de acoplamiento, respecto al uso de catalizadores como  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (comparar experimentos 1 y 3).

2. En todos los casos y condiciones estudiadas, además del correspondiente producto de acoplamiento **2.19** se aisló el producto de reducción **24** (TSAO-T), como producto secundario, junto con el derivado **2.20** resultante del homoacoplamiento oxidativo del correspondiente organoestannano. Existen precedentes en la bibliografía de este tipo de reacciones secundarias<sup>113-115</sup>.
3. El número de equivalentes de reactivo de estaño influye en la relación producto de acoplamiento/producto de reducción. A mayor número de equivalentes (experimento 4) mayor rendimiento del producto de acoplamiento (70%) y menor proporción del producto de reducción.
4. La adición de  $\text{CuI}$ , como cocatalizador (experimento 5), aumenta considerablemente la velocidad de la reacción, aunque no afecta a la relación entre el producto de acoplamiento y el producto reducido.
5. El empleo exclusivo de sales de  $\text{Cu(I)}$  como cocatalizadores [ $\text{CuCl}$  (experimento 6) ó 2-carboxilatotiofeno de cobre (I) ( $\text{CuTc}$ )<sup>119</sup> (experimento 7)] condujo, únicamente al producto de reducción **24** (TSAO-T). Aunque, recientemente se han descrito ejemplos de acoplamientos de organoestannanos con yoduros de arilo, catalizados únicamente por sales de cobre<sup>119b</sup>, en los que el acoplamiento se produce en tiempos muy cortos (minutos) incluso a bajas temperaturas, desafortunadamente en nuestro caso estas condiciones no han funcionado.

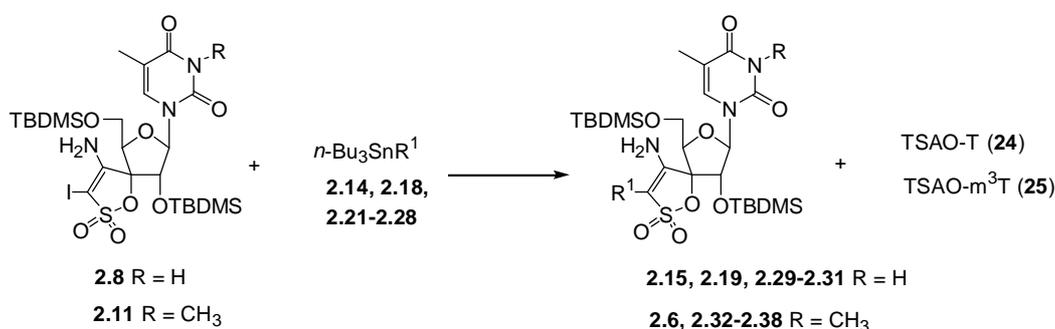
A la vista de todo lo expuesto hasta el momento, se podría concluir que las condiciones óptimas (experimento 5) en las que se obtienen mejores rendimientos del producto de acoplamiento (72% vs 10% inicial), minimizándose el producto de reducción, son aquellas en las que se utilizan conjuntamente  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (2%) como catalizador,  $\text{CuI}$  (4%) como cocatalizador y  $\text{AsPh}_3$  (8%), como sistema catalítico, NMP como disolvente, 4 equivalentes de estannano y la reacción se lleva a cabo a 60°C.

Finalmente, utilizando las condiciones experimentales óptimas, y con el fin de generalizar este tipo de reacción y así introducir diferentes grupos funcionales en la posición

3'' del anillo de espiroaminooxatioldióxido, decidimos extender la reacción de acoplamiento a otros alquénil-, alquínil-, aril-, y heteroarilestannanos, utilizando como electrófilos tanto el yododerivado **2.8** como el derivado **2.11**. Los vinilestannanos funcionalizados (*E*) *n*-Bu<sub>3</sub>SnCH=CHCO<sub>2</sub>Et (**2.21**) y (*E*) *n*-Bu<sub>3</sub>SnCH=CH<sub>2</sub>OH (**2.22**), que no eran comerciales, se prepararon previamente siguiendo los métodos descritos en la bibliografía<sup>116</sup>. En la Tabla 2.2 se recogen los resultados de estos experimentos:

TABLA 2.2

Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' mediante reacciones de acoplamiento de Stille



Compuesto	R	R <sup>1</sup>	Proporción <sup>b</sup> acoplamiento/ reducción	Rendimiento pdto. acoplado <sup>c</sup>
<b>2.6</b>	CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH=CH <sub>2</sub>	1:1	30
<b>2.15</b>	H	-CH=CH <sub>2</sub>	7:1	79
<b>2.19</b>	H	-CH=CHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (E)	3:1	72
<b>2.29</b>	H	-CH=CHCO <sub>2</sub> Et (E)	3:1	65
<b>2.30</b>	H	-CH=CHCH <sub>2</sub> OH (E)	9:1	82
<b>2.31</b>	H	-Ph	2:1	60
<b>2.32</b>	CH <sub>3</sub>	-CH=CHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (E)	3:1	66
<b>2.33</b>	CH <sub>3</sub>	-CH=CHCH <sub>2</sub> OH (E)	10:1	82
<b>2.34</b>	CH <sub>3</sub>	-Ph	2:1	60
<b>2.35</b>	CH <sub>3</sub>		3:2	50
<b>2.36</b>	CH <sub>3</sub>	-C≡C-CH <sub>3</sub>	1:1	30
<b>2.37</b>	CH <sub>3</sub>	-CN	---	---
<b>2.38</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	---	---

<sup>a</sup>La mayor parte de las reacciones se completaron al 50% en 1h pero por conveniencia se dejaron 24h.

<sup>b</sup>Las proporciones de productos obtenidos se determinaron por HPLC. <sup>c</sup>Rendimiento del producto aislado.

1. A partir de una gran variedad de estannanos se han obtenido los productos de acoplamiento deseados (**2.6**, **2.15**, **2.19**, **2.29-2.36**) con rendimientos que oscilan entre el 30% y el 82%, junto con los productos secundarios de reducción [TSAO-T (**24**) y TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**)] y los productos correspondientes de homoacoplamiento oxidativo del organoestannano. Cabe destacar que, en general, la separación del producto de acoplamiento del producto secundario de reducción fue bastante laboriosa, siendo necesarias varias purificaciones cromatográficas para obtener los derivados acoplados con los rendimientos que se encuentran reflejados en la Tabla 2.2.
2. La naturaleza del grupo transferible (R<sup>1</sup>) del organoestannano (*n*-Bu<sub>3</sub>SnR<sup>1</sup>) influye en la relación entre el producto de acoplamiento y el producto de reducción. Las variaciones encontradas en dicha relación podrían explicarse en función de la velocidad de transferencia de dicho grupo R<sup>1</sup> (R<sup>2</sup>C≡C > R<sup>2</sup>C=CH > Arilo > R<sup>2</sup>CH=CH-CH<sub>2</sub> ≈ ArCH<sub>2</sub> > CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub> > C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>). Así, en general, se observa que a medida que aumenta la reactividad del estannano, mayor es el rendimiento del producto de acoplamiento y menor el de reducción, excepto en el caso del alquínilestannano **2.25** (*n*-Bu<sub>3</sub>Sn-C≡C-CH<sub>3</sub>), el cual es tan reactivo que la velocidad de la reacción de homoacoplamiento oxidativo del propio reactivo podría ser superior a la velocidad de la reacción de acoplamiento, lo que explicaría rendimientos (30%) inferiores a los esperados. Sin embargo, aunque la reacción de acoplamiento ha funcionado con una gran variedad de estannanos, la metodología tiene limitaciones y los intentos de acoplamiento con derivados de estaño poco reactivos como Me<sub>4</sub>Sn, o como Bu<sub>3</sub>SnCN, resultaron infructuosos.
3. Finalmente se observa que la reacción de acoplamiento con alquénilestannanos sustituidos [(*E*) *n*-Bu<sub>3</sub>SnCH=CHCO<sub>2</sub>Me (**2.18**) y (*E*) *n*-Bu<sub>3</sub>SnCH=CO<sub>2</sub>Et (**2.21**) y (*E*) *n*-Bu<sub>3</sub>SnCH=CH<sub>2</sub>OH (**2.22**)], al igual que en otras reacciones de Stille descritas en la bibliografía<sup>113-118</sup>, transcurre con retención de la configuración inicial del sistema olefínico del estannano utilizado como producto de partida [(*E*) en todos los casos].

La determinación estructural de los derivados **2.6**, **2.15**, **2.19**, y **2.29-2.38** se realizó a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. La estereoquímica de los vinil-espiroderivados **2.19**, **2.29**, **2.30**, **2.32** y **2.33** se asignó como *E* (trans) en función del valor de la constante de acoplamiento  $^3J_{\text{H,H}} = 15.6\text{-}15.9$  Hz de los protones olefínicos que concuerda con los valores  $^3J_{\text{H,H}}$  observados en los organoestannanos utilizados como productos de partida<sup>116</sup>.

## 2.2. ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Los derivados TSAO-T cuya síntesis se describe en el presente capítulo fueron evaluados como agentes antivirales frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4 y CEM de forma análoga a la mencionada en el correspondiente apartado de Actividad Antiviral del capítulo 1 de esta Memoria.

Los resultados obtenidos de dicha evaluación antiviral se recogen en la Tabla 2.3, en la que se definen los parámetros utilizados para determinar actividades y toxicidades.

La primera serie de compuestos ensayados fueron los derivados de TSAO-m<sup>3</sup>T sustituidos en las posiciones 3'' y/o 4'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido con grupos metilo (**2.3** y **2.4**), alilo (**2.5** y **2.6**) y acetamida (**2.7**). Asimismo, se ensayó una segunda serie de derivados TSAO-T y TSAO-m<sup>3</sup>T portadores en la posición 3'' del anillo de grupos halógeno (**2.8-2.11**), vinilo sin sustituir (**2.15**) o vinilésteres (**2.19**, **2.29** y **2.32**), vinilalcoholes (**2.30** y **2.33**), así como grupos fenilo (**2.31** y **2.34**), tienilo (**2.35**), o propinilo (**2.36**).

Según se observa en la tabla, los derivados dialquilados en las posiciones 3'' y 4'' con grupos metilo ó acetamida (**2.3**, **2.7**) fueron inactivos frente a la replicación de VIH. Los derivados monosustituidos, tanto en la posición 3'' como en la posición 4'' con un grupo alilo (**2.5** y **2.6**) resultaron asimismo inactivos. Sin embargo, el compuesto **2.4** portador de un grupo metilo en 3'' resultó activo frente a la replicación de VIH-1, aunque mostró una actividad un orden de magnitud inferior a la del compuesto prototipo TSAO-T.

En cuanto a la segunda serie de derivados sustituidos en la posición 3'' con grupos halógeno, los 3''-yododerivados **2.8** y **2.11** presentaron actividades frente a VIH-1 similares a las del compuesto prototipo TSAO-T mientras que el 3''-bromoderivado **2.10** mostró una actividad un orden de magnitud inferior y el 3''-cloroderivado **2.9** resultó inactivo.

TABLA 2.3

Actividad antiviral frente a VIH-1 en células MT-4 y CEM  
de los derivados TSAO sustituidos en la posición 3''

Compuesto	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>				CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	
	MT-4		CEM		MT-4	CEM
	VIH-1	VIH-2	VIH-1	VIH-2		
<b>2.3</b>	> 250	> 250	$\geq 100$	> 250	> 250	234 $\pm$ 23
<b>2.4</b>	0.25 $\pm$ 0.09	> 250	2.2 $\pm$ 1.7	> 50	$\geq 250$	10 - 250
<b>2.5</b>	> 50	> 50	> 50	> 10	25 $\pm$ 20	126 $\pm$ 12.0
<b>2.6</b>	> 50	> 50	> 50	> 50	82 $\pm$ 11	45 $\pm$ 53
<b>2.7</b>	> 2	> 2	>2	> 2	3.2 $\pm$ 1.1	3.9 $\pm$ 0.2
<b>2.8</b>	0.12 $\pm$ 0.02	> 2	0.06 $\pm$ 0.02	> 2	4.3 $\pm$ 0.2	3.97 $\pm$ 0.04
<b>2.9</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	5.4 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.2
<b>2.10</b>	0.93 $\pm$ 0.23	> 10	0.85 $\pm$ 0.21	> 10	18 $\pm$ 0.5	17 $\pm$ 2.0
<b>2.11</b>	0.11 $\pm$ 0.06	> 10	0.05 $\pm$ 0.03	> 2	3.9 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 2.0
<b>2.15</b>	3.3 $\pm$ 2.2	7.5 $\pm$ 3.5	4.0 $\pm$ 1.4	4.0 $\pm$ 0.0	24 $\pm$ 3.0	35.9 $\pm$ 7.6
<b>2.19</b>	3.7 $\pm$ 0.01	9.9 $\pm$ 6.4	3.0 $\pm$ 1.4	7.3 $\pm$ 2.3	29.1 $\pm$ 7.8	39.4 $\pm$ 5.6
<b>2.29</b>	10 $\pm$ 8.9	> 50	3.5 $\pm$ 0.7	> 10	40 $\pm$ 5.7	174 $\pm$ 95
<b>2.30</b>	6.6 $\pm$ 2.9	5.4 $\pm$ 0.2	$\geq 2$	1.2 $\pm$ 0.0	17 $\pm$ 0.5	18.0 $\pm$ 1.9
<b>2.31</b>	6.7 $\pm$ 1.6	> 50	2.5 $\pm$ 0.7	> 2	55 $\pm$ 45	37 $\pm$ 23
<b>2.32</b>	2.9 $\pm$ 1.2	> 10	0.98 $\pm$ 0.87	$\geq 10$	13 $\pm$ 0.1	19.7 $\pm$ 3.3
<b>2.33</b>	5.9 $\pm$ 1.8	$\geq 10$	2.8 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 0.6	13 $\pm$ 1.9	18.0 $\pm$ 2.1
<b>2.34</b>	8.0 $\pm$ 4.1	> 50	1.7 $\pm$ 1.1	> 50	24 $\pm$ 12	65 $\pm$ 36
<b>2.35</b>	2.3 $\pm$ 2.0	> 2	1.0	> 10	3.9 $\pm$ 2.5	33 $\pm$ 14
<b>2.36</b>	> 2	> 2	> 2	> 2	3.3 $\pm$ 2.3	5.0 $\pm$ 0.6
<b>TSAO-T</b>	0.06 $\pm$ 0.03	> 10	0.06 $\pm$ 0.01	> 10	12.0 $\pm$ 2.4	--
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	0.06 $\pm$ 0.09	> 250	0.04 $\pm$ 0.01	> 250	230 $\pm$ 7.3	--

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH.

<sup>b</sup>Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento del 50% de las células no infectadas

No se observaron grandes diferencias en la actividad antiviral de los derivados TSAO portadores en 3'' de grupos vinilo (**2.15**, **2.19**, **2.29**, **2.30**, **2.32** y **2.33**), fenilo (**2.31** y **2.34**) ó tienilo (**2.35**). Todos ellos mostraron actividades significativas frente a VIH-1 aunque inferiores (dos órdenes de magnitud) con respecto al compuesto prototipo.

En general, la mayoría de los derivados sustituidos en la posición 3'' del anillo de espiro mostraron una alta especificidad por VIH-1, resultando inactivos frente a la replicación de VIH-2, al igual que el compuesto prototipo TSAO-T (**24**) y el resto de IENN comentados en la introducción.

Curiosamente, algunos de los derivados mostraron actividad antiviral significativa frente a VIH-2 a concentraciones subtóxicas. En concreto, los derivados TSAO portadores en 3'' de un grupo vinilo sin sustituir (**2.15**), o sustituido con un grupo metiléster (**2.19**) o con un grupo hidroximetilo (**2.30** y **2.33**) mostraron actividad significativa frente a VIH-2 en el rango micromolar ( $CE_{50} = 1.2-9.9 \mu M$ ). Según se observa en la Tabla 2.3, en general, la actividad frente a VIH-2 es del mismo orden de magnitud que la actividad frente a VIH-1. Esta observación es muy inusual para los IENN y nunca había sido observada anteriormente para los derivados TSAO.

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, la mayoría de los derivados ensayados mostraron toxicidades celulares comparables a la del compuesto prototipo TSAO-T aunque resultaron sustancialmente más citotóxicos que el TSAO- $m^3T$ , excepto el derivado **2.4** portador de un grupo metilo en la posición 3'' que no fue tóxico ( $CC_{50} \geq 250 \mu M$ ).

Finalmente, los derivados sustituidos en 3'' que habían resultado más activos frente a VIH-1 (**2.4**, **2.8**, **2.10**, y **2.11**) se ensayaron frente a cepas de virus VIH TSAO-resistentes que contienen la mutación 138 Glu Lys (que confiere resistencia a los derivados TSAO). En todos los casos, al igual que el compuesto prototipo TSAO-T y otros derivados TSAO, resultaron inactivos a concentraciones de  $500 \mu M$ .

Los datos de actividad/toxicidad recogidos en la Tabla 2.3 se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. La presencia del grupo amino primario en el anillo de espiroaminoxatiodióxido es importante para la actividad anti-VIH-1, la sustitución de uno de los protones de dicho grupo amino por un metilo (**2.3**), alilo (**2.6**) o acetamido (**2.7**) dio lugar a compuestos inactivos.
2. La naturaleza del sustituyente de la posición 3'' parece afectar de manera significativa a la actividad antiviral frente a VIH-1. Así, los derivados de TSAO-T y TSAO- $m^3T$  sustituidos en 3'' con un grupo metilo (**2.4**) o halógeno (**2.8**, **2.10** y **2.11**) resultaron más activos que los derivados portadores de grupos vinilo (**2.15**, **2.19**, **2.29**, **2.30**, **2.32** y **2.33**), fenilo (**2.31** y **2.34**) o tienilo (**2.35**).
3. En cuanto a los derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' del anillo de espiro con grupos halógeno, la naturaleza de éste también parece ser importante para la actividad frente a la replicación de VIH-1. Así, la introducción de un yodo en posición 3'' dio lugar a compuestos (**2.8** y **2.11**) que presentan una actividad antiviral similar a la del compuesto prototipo. El correspondiente bromoderivado **2.10** mostró una actividad un

orden de magnitud inferior a TSAO-T, mientras que el 3''-cloroderivado **2.9** fue inactivo.

4. En general, todos los derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' resultaron más tóxicos que el compuesto prototipo TSAO-m<sup>3</sup>T. Cabe destacar, que a diferencia del comportamiento observado para otros derivados TSAO<sup>43,45</sup>, la introducción de un grupo metilo en la posición 3 del anillo de timina no conduce a una reducción de la citotoxicidad de los compuestos (comparar **2.8** y **2.11**, **2.19**, **2.30**, **2.31** derivados de TSAO-T con **2.32**, **2.33**, **2.34** derivados de TSAO-m<sup>3</sup>T).
5. Los derivados portadores en 3'' de grupos vinilo diferentemente funcionalizados (**2.15**, **2.19** y **2.30**) han resultado ser los primeros ejemplos de derivados TSAO que inhiben de manera significativa la replicación de VIH-2. Aunque los requisitos estructurales necesarios para que los derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido muestren actividad frente a VIH-2 no están del momento claros y será necesario preparar un mayor número de compuestos, de manera muy preliminar, podemos destacar que la conjugación entre el grupo vinilo de la posición 3'' y el anillo de espiroaminoxatioldióxido parece jugar un papel importante en la actividad frente a VIH-2 de los compuestos (comparar **2.15** con **2.6**).

Ensayos enzimáticos frente a la Transcriptasa Inversa de VIH-2 indican que el objetivo de estos compuestos no es la mencionada enzima. Actualmente se están llevando a cabo estudios sobre el mecanismo de acción de estos compuestos a fin de determinar en que punto del ciclo replicativo del VIH-2 actúan.

Se podría concluir, según los resultados expuestos en el presente capítulo que los derivados TSAO portadores de grupos vinilo conjugados en la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido constituyen un nuevo grupo de inhibidores que podrían actuar por un mecanismo de acción dual interfiriendo con la TI de VIH-1 y con un proceso distinto en células infectadas por VIH-2. En la actualidad, nuestros esfuerzos están dirigidos, no sólo a profundizar en el mecanismo de acción dual de estos derivados sino también a la optimización de estos inhibidores con el fin de obtener compuestos más potentes y de menor toxicidad.

La búsqueda de inhibidores específicos no nucleosídicos de la TI de VIH-1 con actividad frente a VIH-2 es un área de investigación de gran actualidad e interés<sup>120</sup>. En general, los escasos IENN con actividad VIH-1 y VIH-2 que han aparecido en la bibliografía

en los dos últimos años actúan a nivel de TI de VIH-2<sup>120</sup>. Por otro lado, en febrero de este año<sup>121</sup> se ha descrito el primer inhibidor no nucleosídico de la replicación de VIH-1 y VIH-2 que interfiere con la replicación viral a través de dos mecanismos distintos, por un lado, actuando a nivel de TI de VIH-1 y por otro interfiriendo en el proceso de entrada de VIH-1 y VIH-2 dentro de la célula.

### 3. ESTRATEGIA “DOBLE FÁRMACO”: CONJUGADOS [TSAO-T]-[FOSCARNET]

Como ya se ha comentado en la introducción, la terapia combinada es la práctica habitualmente utilizada en clínica para minimizar los efectos secundarios de los fármacos anti-SIDA, potenciar la actividad de éstos y/o evitar la aparición de cepas de virus resistentes a los mismos.

Una de las aproximaciones utilizadas en el diseño de terapias combinadas, es la combinación de compuestos que se unen a sitios distintos de la misma proteína viral. Así, por ejemplo, dentro de los inhibidores de TI se han estudiado un gran número de combinaciones entre 2',3'-didesoxinucleósidos (ddN) e inhibidores específicos no nucleosídicos<sup>34,65,66</sup> (IENN). Aunque, la combinación de foscarnet (inhibidor que se une al sitio de unión del pirofosfato) con ddN o IENN ha sido muy poco explorada, se han descrito experimentos de combinación “*in vitro*” de foscarnet con AZT en los que se observa un efecto aditivo entre ambos fármacos<sup>122,123</sup>.

Dentro de las combinaciones en las que se han incluido a los derivados TSAO, nuestros colaboradores en el Instituto Rega de la Universidad de Lovaina llevaron a cabo experimentos de combinación “*in vitro*” de TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) con foscarnet (**15**), basados en el hecho de que las cepas TSAO-resistentes (138-Lys) son inhibidas por foscarnet y a su vez las cepas foscarnet-resistentes son sensibles a la inhibición por TSAO-m<sup>3</sup>T. Además, se da una circunstancia adicional que apoya aún más la realización de este tipo de estudios: el foscarnet no sólo inhibe la cepa TSAO-resistente sino que muestra una actividad frente a dicha cepa un orden de magnitud superior a la mostrada frente a la cepa viral salvaje (138-Glu) [CI<sub>50</sub> (µg/mL): 0.34 vs 2.59]. Este hecho no se ha observado con ningún otro inhibidor de la Transcriptasa Inversa de VIH-1 y nos llevó a postular, que una combinación de foscarnet con los derivados TSAO podría retrasar y/o evitar la aparición de la cepa 138-Lys resistente a estos últimos.

Así, cuando ambos inhibidores se combinan en cultivo celular a distintas concentraciones, se observa un efecto aditivo entre ambos. A concentraciones altas de ambos inhibidores, se consigue retrasar la replicación viral hasta 45 días sólo detectándose la formación de partículas virales tras eliminar los compuestos del cultivo celular. En la actualidad, se está llevando a cabo la caracterización a nivel molecular de estas cepas virales con el fin de determinar si corresponde a la cepa viral salvaje, o aparece la mutación 138-Lys característica de los derivados TSAO, la de foscarnet u otra nueva mutación.

Sin embargo, como se ha mencionado en la introducción, el foscarnet, compuesto de naturaleza polianiónica a pH fisiológico, presenta problemas de permeabilidad a través de la membrana celular, lo que se traduce en bajas concentraciones intracelulares de este fármaco en las células infectadas por el virus. Con el fin de paliar este problema, consideramos que una aproximación interesante a la terapia combinada podría ser el diseño de conjugados, utilizando la estrategia denominada “doble-fármaco” (Figura 3.1) consistente en la combinación en una misma molécula de dos inhibidores (fármacos) unidos covalentemente mediante un enlace lábil. Dicho “conjugado” tras atravesar la membrana celular liberaría, bien química y/o enzimáticamente, a ambos inhibidores.

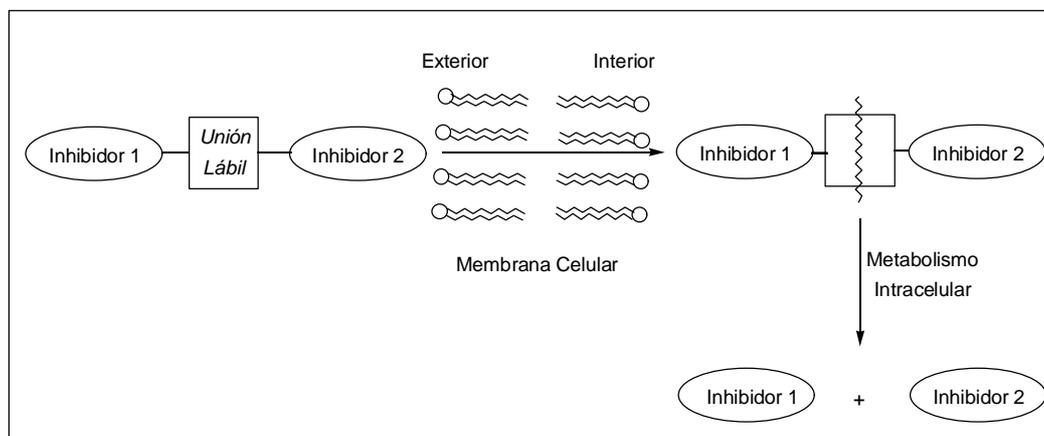


FIGURA 3.1.– Estrategia “doble fármaco”

Basándonos en los resultados de combinación “in vitro” de TSAO-m<sup>3</sup>T y foscarnet y utilizando la estrategia “doble-fármaco”, hemos diseñado y sintetizado compuestos de fórmula general I (Figura 3.2) que combinan en su estructura una molécula TSAO con una molécula de foscarnet unidas mediante un enlace covalente lábil. Como molécula TSAO elegimos el análogo sustituido en la posición N-3 de la timina con un grupo hidroxipropilo **3.1**<sup>124</sup> (Figura 3.2) ya que este compuesto es uno de los derivados TSAO más activos de todos

los sintetizados hasta el momento ( $EC_{50} = 0.03 \mu\text{M}$ ) y es portador en su estructura de un grupo hidroxilo donde podría anclarse covalentemente la molécula de foscarnet. La unión del foscarnet a dicho hidroxilo del derivado TSAO podría realizarse bien a través del grupo carboxilato (unión O-C, **Ia**) o bien a través del resto fosfonato (unión O-P, **Ib**) (Figura 3.2). En ambos tipos de conjugados la unión entre ambas moléculas es una unión lábil de tipo éster que podría ser metabolizada intracelularmente.

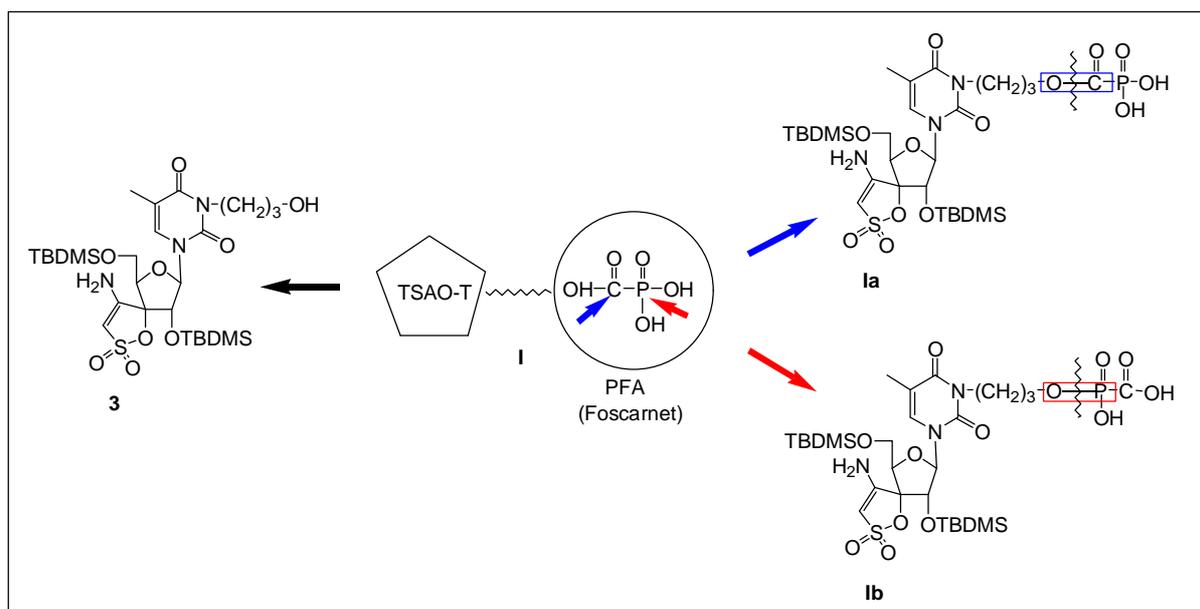


FIGURA 3.2.– Conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ia** y **Ib**

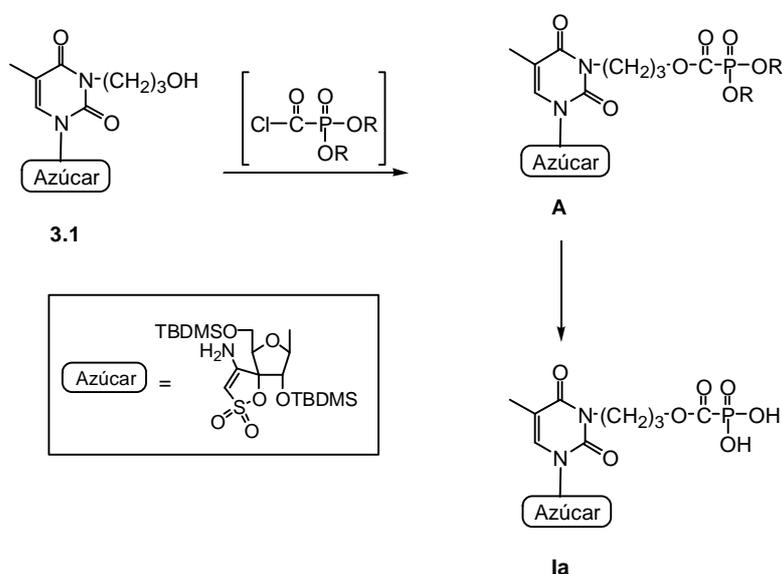
Con el diseño y síntesis de este tipo de “conjugados” pretendemos explorar: (i) si la elevada lipofilia del derivado de TSAO-T podría ayudar a “transportar” el foscarnet dentro de la célula. En ambos tipos de conjugados (**Ia** y **Ib**), además de la propia lipofilia aportada por la molécula TSAO, la carga negativa disminuiría respecto a la de la molécula de foscarnet, facilitando asimismo su paso a través de la membrana celular; (ii) si una vez dentro, y dependiendo de la naturaleza de la unión (O-C ó O-P), el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] sería metabolizado liberando ambos inhibidores y (iii) estudiar el efecto que tendría en la actividad antiviral la liberación de mayores concentraciones intracelulares de foscarnet.

En los últimos años ha habido un gran interés tanto en la búsqueda de pro-fármacos lipófilos de foscarnet<sup>125-128</sup> como de conjugados de foscarnet con nucleósidos antivirales<sup>129-133</sup>, sin embargo, hasta el momento no se han descrito “combinaciones” químicas de foscarnet con inhibidores específicos de la Transcriptasa Inversa de VIH-1.

### 3.1. Síntesis de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet]

Como preámbulo a la síntesis cabe destacar que el ácido fosfonofórmico no es un fosfonato sencillo, sino que la yuxtaposición de los grupos fosforilo y carbonilo le confiere una reactividad bastante compleja, que aún no ha sido totalmente explorada. Así, estudios mecanísticos han demostrado que a pH neutro, puede ocurrir (generalmente en triésteres y en menor medida en diésteres de foscarnet)<sup>130,131</sup> el ataque nucleófilo tanto al átomo de C como al de P lo que puede dar lugar a rupturas no deseadas de los enlaces P-O, C-O y P-C<sup>134,135</sup>.

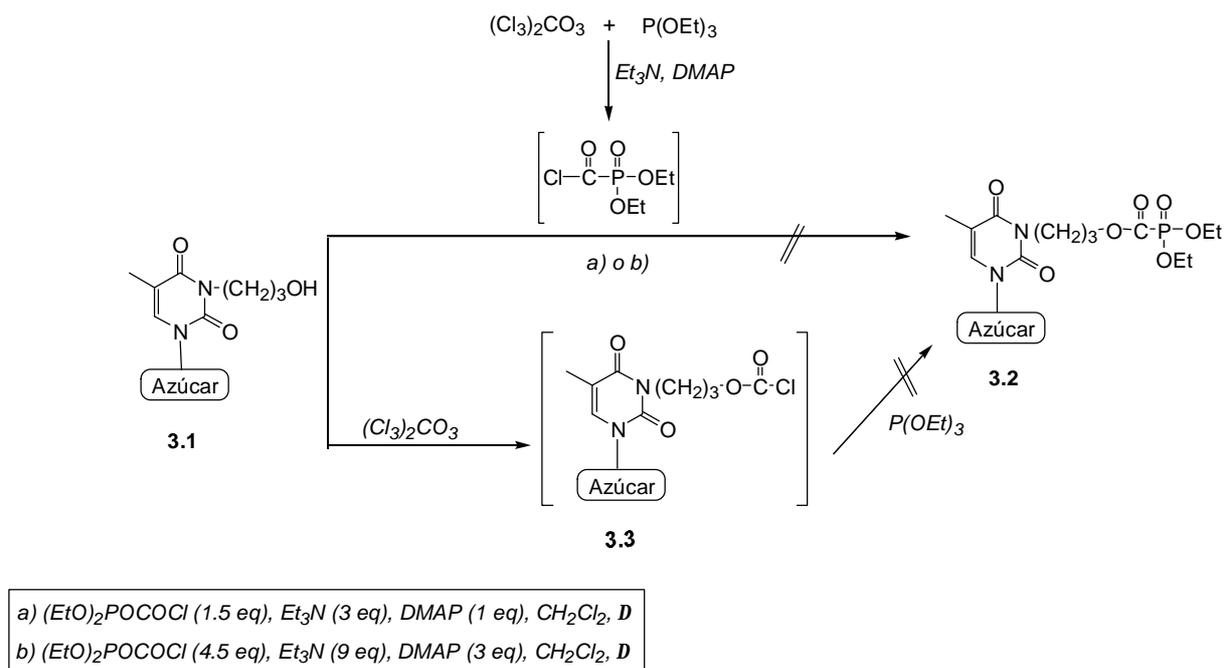
Primeramente, nos planteamos la preparación del conjugado **Ia** (unión O-C). Para ello diseñamos un procedimiento sintético en dos pasos (Esquema 3.1) basado en métodos descritos en la literatura para la unión de foscarnet a la posición 5'-OH de nucleósidos antivirales<sup>136</sup>. El procedimiento consiste en la acilación del derivado TSAO **3.1** con el cloruro del ácido fosfonofórmico adecuado, seguido de la desprotección selectiva de los grupos alquilfosfonato del conjugado intermedio **A** para dar lugar al monoéster de foscarnet con el ácido fosfónico libre (**Ia**).



ESQUEMA 3.1.– Procedimiento para la síntesis del conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ia**

Sin embargo, los intentos de condensación del alcohol **3.1** con 1.5 equivalentes de cloruro de (dietoxifosforil)formilo (Esquema 3.2), generado "in situ" a partir de trifosgeno y fosfito de trietilo<sup>136</sup> en presencia de  $Et_3N$  y DMAP, resultaron infructuosos recuperándose el

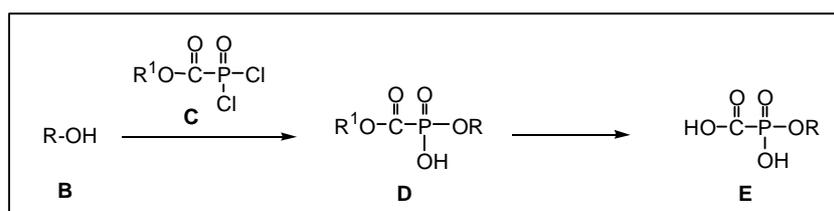
producto de partida inalterado. Cuando esta misma reacción se llevó a cabo utilizando un mayor número de equivalentes del cloruro de ácido (4.5 equivalentes) nuevamente se recuperó el producto de partida sin reaccionar junto con una mezcla inseparable de productos desprotegidos. Igualmente, el tratamiento del alcohol **3.1** (Esquema 3.2) con trifosgeno, para obtener el cloroformiato **3.3**, seguido de la adición de trietilfosfito dio lugar a la recuperación del producto de partida inalterado.



ESQUEMA 3.2.– Conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] (unión O-C)

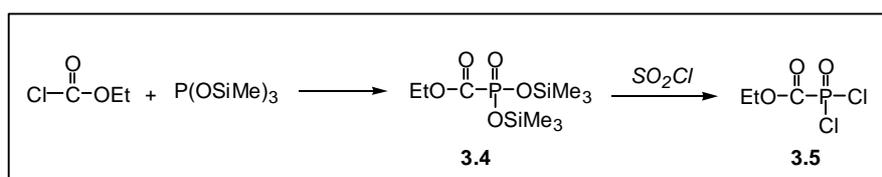
Cabe destacar que existen pocos precedentes de conjugados de foscarnet con análogos nucleosídicos unidos a través del resto carboxilato del foscarnet<sup>136</sup> y que estos compuestos se obtienen con bajos rendimientos (inferiores al 25%). Además, aunque en algunos casos se ha descrito la utilización de otras condiciones de reacción (como es el empleo de piridina a reflujo)<sup>136</sup> en nuestro caso en particular resultaron ser incompatibles con los grupos TBDMS presentes en la molécula TSAO. Por ello, y a la vista de los resultados experimentales negativos, decidimos abandonar la síntesis de este tipo de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] (**Ia**) y dirigir nuestros esfuerzos hacia la preparación del segundo tipo de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] (**Ib**) unidos a través del átomo de fósforo del foscarnet. Las uniones O-P en conjugados de foscarnet y nucleósidos antivirales han sido las más exploradas<sup>129-133,137</sup> y las que mejores resultados han dado tanto desde un punto de vista sintético como biológico.

Para la síntesis de este tipo de conjugados diseñamos un procedimiento sintético, en dos pasos, basado nuevamente en una de las metodologías descritas en la bibliografía<sup>137b</sup>. La estrategia sintética que se halla recogida en el Esquema 3.3 consiste en la esterificación de un alcohol primario (**B**) con un agente fosforilante adecuado (**C**) para dar lugar al correspondiente P,C-díéster de foscarnet **D** que por posterior hidrólisis del éster carboxílico conduciría al monoéster de foscarnet **E**.



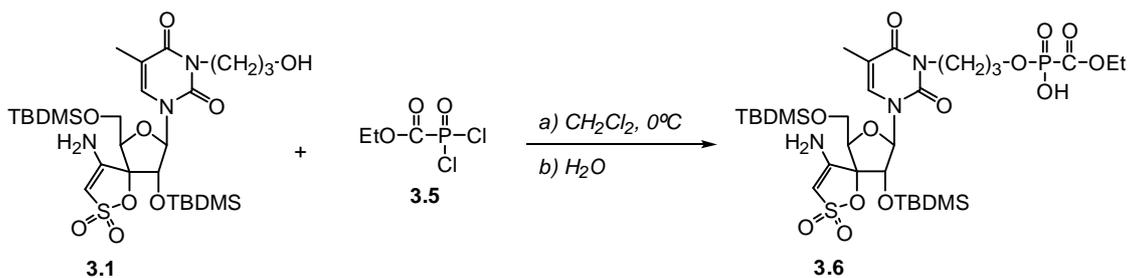
ESQUEMA 3.3.– Procedimiento general para la síntesis de conjugados de foscarnet (unión O-P)

Para la síntesis del conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib**, siguiendo esta metodología, fue necesario la preparación previa del agente fosforilante. Así, el tratamiento de cloroformiato de etilo con fosfito de tris(trimetilsililo) (Esquema 3.4) condujo al [bis(trimetilsilil)fosforil] formiato de etilo **3.4** con buen rendimiento (75%). La reacción posterior de **3.4** con cloruro de tionilo<sup>133b</sup> dio lugar al (diclorofosforil)formiato de etilo **3.5** con un 84% de rendimiento. Este reactivo fosforilante es muy inestable y, tras destilarse a vacío, se utilizó inmediatamente en la siguiente etapa de reacción.



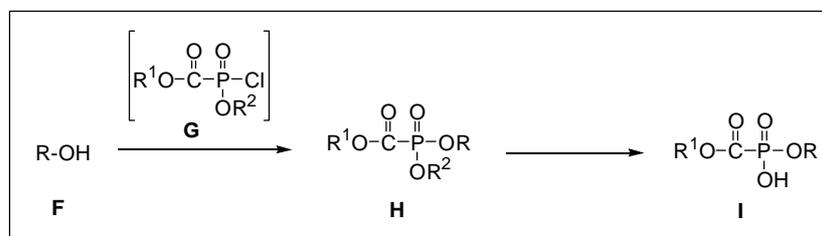
ESQUEMA 3.4.– Preparación del agente fosforilante **3.5**

El posterior tratamiento de **3.1** con el diclorofosforilderivado **3.5** (Esquema 3.5) en presencia de Et<sub>3</sub>N utilizando DMF seca como disolvente, no condujo al díéster de foscarnet esperado obteniéndose mezclas complejas de productos desprotegidos que no fueron identificados. Sin embargo, cuando esta misma reacción de fosforilación se llevó a cabo utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco como disolvente, se obtuvo el díéster de foscarnet **3.6** con un 31% de rendimiento.

ESQUEMA 3.5.– Síntesis del derivado **3.6**

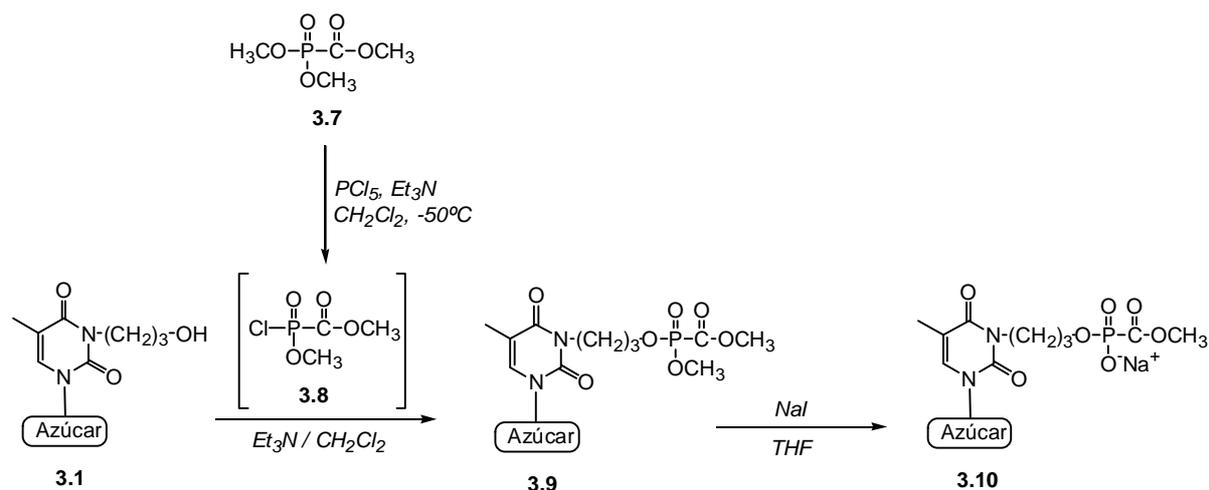
Dado el bajo rendimiento obtenido en la síntesis del aducto [TSAO-T]-[Foscarnet] **3.6**, y previo a los estudios de hidrólisis del grupo éster del mismo, procedimos a la búsqueda de un procedimiento alternativo que nos permitiera acceder a P,C-diésteres [TSAO-T]-[Foscarnet] con mejores rendimientos.

Un método alternativo podría ser el que se halla recogido en el esquema 3.6. El P,C-diéster de foscarnet **I** podría obtenerse por condensación de un alcohol primario (**F**) con el agente fosforilante adecuado (**G**) seguido de la hidrólisis selectiva del grupo alquilsulfonato ( $\text{OR}^2$ ) del triéster **H** así obtenido. Esta metodología se ha empleado con éxito para la preparación de P,C-diésteres de foscarnet con nucleósidos<sup>129</sup>.



ESQUEMA 3.6.– Metodología general para la generación de P,C-diésteres de foscarnet

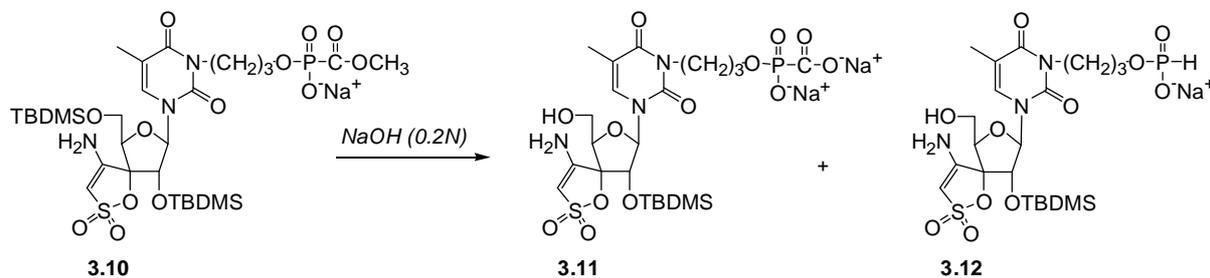
La reacción de **3.1** con el reactivo fosforilante **3.8** (Esquema 3.7), generado “*in situ*” a partir de (dimetilfosforil)formiato de metilo **3.7** y  $\text{PCl}_5$ , condujo al triéster de foscarnet **3.9** con excelente rendimiento (91%). Seguidamente, la desprotección selectiva del grupo  $\text{OCH}_3$  unido al átomo de P del triéster **3.9**, con NaI (0.9 equivalentes) en THF seco<sup>130</sup>, dio lugar al conjugado **3.10** en forma de sal sódica con buen rendimiento (80%).

ESQUEMA 3.7.- Síntesis del diéster de foscarnet **3.10**

La identificación estructural de los conjugados **3.6**, **3.9** y **3.10** se realizó a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. Los datos de IR mostraron la presencia de una banda intensa a  $1710 \text{ cm}^{-1}$  característica del grupo éster. Los espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN desacoplado (Tabla 3.1) mostraron señales a -4.50, -2.53 y -7.41 ppm, respectivamente, valores que concuerdan con otros tri- y diésteres de foscarnet descritos en la bibliografía<sup>125-133,137</sup>. En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se observó la aparición de nuevas señales correspondientes a los nuevos grupos alquílicos de las moléculas (1.16-4.10 ppm). Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN desacoplado (Tabla 3.1) mostraron la presencia de un doblete a 172.34 ppm (**3.6**), 174.20 ppm (**3.9**) y 174.61 ppm (**3.10**) con constantes de acoplamiento a un enlace de  $J_{\text{P,C}} = 248\text{-}250 \text{ Hz}$ , que se asignó al C=O del grupo éster. Los carbonos situados a dos y tres enlaces del átomo de fósforo aparecieron como dobletes (Tabla 3.1), con valores de constantes de acoplamiento de  $^2J_{\text{P,C}} = 6.2\text{-}5.5 \text{ Hz}$  y  $^3J_{\text{P,C}} = 6.8\text{-}3.8 \text{ Hz}$ , respectivamente.

Una vez obtenido el diéster de foscarnet **3.10** con buen rendimiento, intentamos la saponificación del éster metílico con el fin de obtener el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib** propuesto. Así, el tratamiento de **3.10** con NaOH 0.2N (Esquema 3.8) seguido de neutralización con resina Dowex 50 Wx4 (forma  $\text{H}^+$ ) condujo a una mezcla (1:1) de dos productos de elevada polaridad, que tras separación cromatográfica en fase reversa ( $\text{C}_{18}$ ), fueron identificados como el monoéster de foscarnet **3.11** (53%) en forma de sal disódica y el producto **3.12** (43%) resultante de la descarboxilación por ruptura del enlace P-C. En ambos productos se había producido la desprotección de la posición 5' del anillo de ribofuranosa de la molécula de TSAO-T. Es conocido en la bibliografía que los grupos TBDMS pueden ser

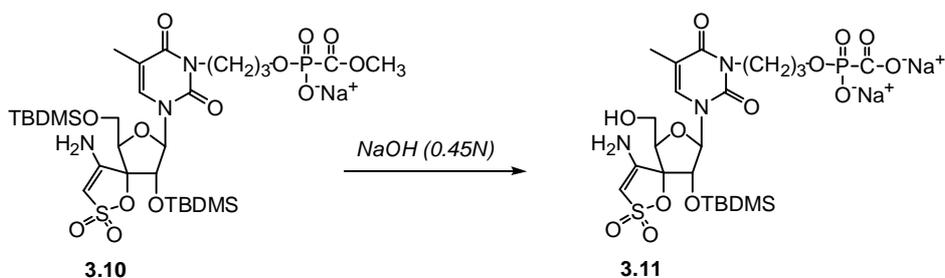
hidrolizados, lentamente en medio básico. La polaridad del disolvente o la presencia de nucleófilos pueden acelerar dicha hidrólisis básica<sup>138</sup>.



ESQUEMA 3.8.– Reacción de hidrólisis de **3.10** con NaOH (0.2N)

Aunque no existen precedentes en la bibliografía de rupturas del enlace P-C en reacciones de hidrólisis de diésteres de foscarnet, sí existen antecedentes de descarboxilaciones similares en hidrólisis en medio básico (NaOH) de triésteres de foscarnet<sup>134-136</sup> (más inestables). En estos estudios se ha descrito que la concentración de OH<sup>-</sup> es un factor importante y cuando se utilizan concentraciones de NaOH superiores a 0.2 N la hidrólisis es más rápida que la ruptura del enlace P-C, pudiéndose evitar así la descarboxilación<sup>135</sup>.

Con estos precedentes, y a la vista de los resultados experimentales obtenidos en los primeros intentos de hidrólisis del diéster **3.10**, utilizamos concentraciones superiores de NaOH con el fin de evitar o minimizar la ruptura del enlace P-C y, por tanto, la descarboxilación. Así, cuando la reacción de hidrólisis de **3.9** se llevó a cabo en presencia de NaOH 0.45 N (Esquema 3.9) se obtuvo el derivado **3.11** desprotegido en la posición 5' con buen rendimiento (76%). En este caso, no se observó la formación del producto de descarboxilación.

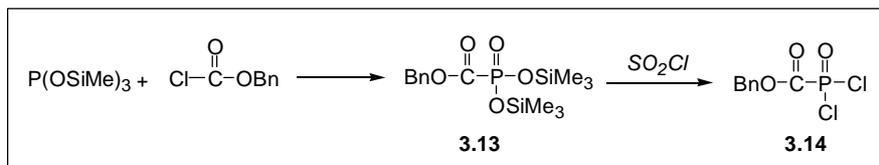


ESQUEMA 3.9.– Reacción de hidrólisis de **3.10** con NaOH (0.45N)

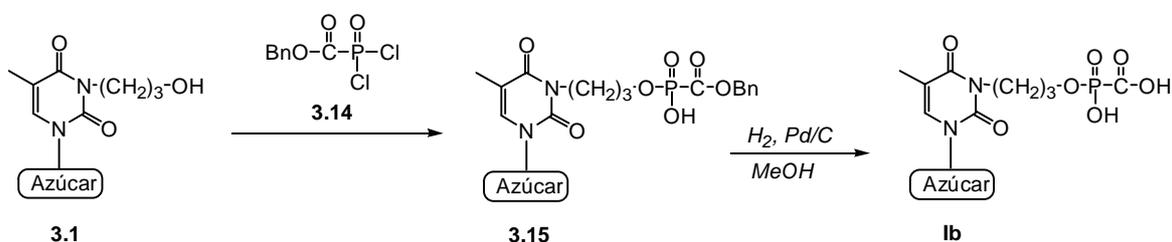
Los espectros de IR de **3.11** y **3.12** mostraron la desaparición de la banda del C=O del éster a  $1710\text{ cm}^{-1}$ . En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se observó la desaparición de las señales correspondientes a uno de los grupos TBDMS así como la desaparición del singlete a 3.87 ppm correspondiente al grupo metilo del éster en el producto de partida (**3.10**). Sin embargo, los datos que nos ayudaron a discernir entre ambas estructuras fueron los siguientes: a) En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de **3.12** se observó la presencia de un doblete a 6.59 ppm ( $J_{\text{P,H}} = 623\text{ Hz}$ ) característico del agrupamiento P-H<sup>125</sup>. b) En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de **3.11** se observó la aparición de un doblete a 199.27 ppm ( $J_{\text{P,C}} = 230\text{ Hz}$ ) correspondiente al carbonilo del grupo ácido, señal que no aparece en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del derivado **3.12** (Tabla 3.1). c) El espectro de  $^{31}\text{P}$  RMN de **3.11** mostró una señal a -12.19 ppm mientras que en el espectro del derivado **3.12** dicha señal apareció a 6.83 ppm, (en la zona positiva del espectro), lo que sugiere la presencia del agrupamiento P-H en **3.12**<sup>125</sup>. Finalmente, los espectros de masas de alta resolución concordaron con las estructuras propuestas.

Los intentos de sililación de **3.10** tanto con TBDMSCl en piridina seca como con TBDMSCl / DMAP en DMF seca resultaron infructuosos. Dada la imposibilidad de acceder al aducto [TSAO-T]-[Foscarnet] disililado (molécula objetivo **Ib**) mediante esta aproximación, utilizamos otros grupos protectores del carboxilo del foscarnet que pudieran ser eliminados en el paso final por métodos más suaves, evitando el medio básico.

Como grupo protector alternativo elegimos el grupo bencilo, ya que a pesar de haber sido escasamente empleado en la síntesis de ésteres de foscarnet<sup>131</sup>, podría ser eliminado mediante hidrogenación catalítica (condiciones suaves compatibles con los grupos TBDMS de la molécula TSAO). La preparación del correspondiente éster bencílico de foscarnet **3.15** (Esquema 3.11) se llevó a cabo de manera análoga a la descrita para la síntesis del diéster alquílico **3.6**. Previamente fue necesaria la preparación del correspondiente reactivo fosforilante. Así, el tratamiento de cloroformiato de bencilo con fosfito de tris(trimetilsililo) (Esquema 3.10) condujo al derivado **3.13** (89% de rendimiento) que por reacción posterior con cloruro de tionilo dio lugar al (diclorofosforil)formiato de bencilo **3.14** con rendimiento moderado (30%). Esta es la primera vez que se describe la síntesis del dicloroderivado **3.14**. Los intentos de optimización de ésta reacción, bien utilizando  $\text{SO}_2\text{Cl}$  o  $\text{PCl}_5$ , resultaron infructuosos ya que el dicloro bencilderivado **3.14** resultó ser más inestable que el correspondiente dicloroetilderivado **3.5** anteriormente descrito, y descompone rápidamente en el proceso de destilación.

ESQUEMA 3.10.– Preparación del reactivo fosforilante **3.14**

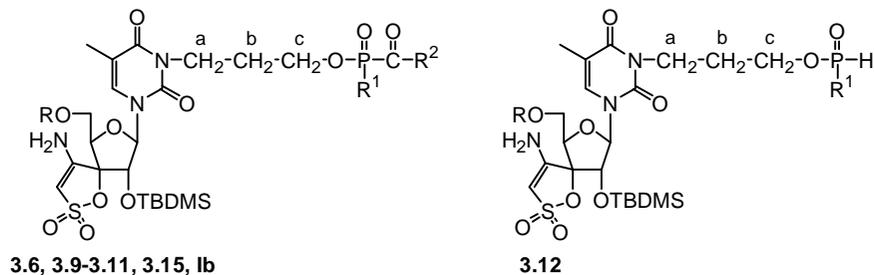
Una vez sintetizado el reactivo fosforilante **3.14** se hizo reaccionar con el derivado TSAO **3.1** (Esquema 3.11), en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco a baja temperatura ( $-20^\circ\text{C}$ ), dando lugar al bencilderivado **3.15** (54% de rendimiento). Finalmente, la hidrogenación catalítica (Pd/C al 10%) de **3.15** permitió acceder al conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib** con un 60% de rendimiento.

ESQUEMA 3.11.– Síntesis del conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib**

La identificación estructural de los compuestos **3.15** y **Ib** se realizó de manera análoga a la descrita para los derivados de foscarnet anteriormente comentados. En el espectro de IR de **3.15** se observó la presencia de una banda a  $1707\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbonilo del éster bencílico, así como la desaparición de la misma en el derivado **Ib**. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los conjugados **3.15** y **Ib** mostraron la presencia de las señales correspondientes a dos grupos TBDMS, la presencia de las señales características del grupo bencilo para **3.15** y la desaparición de las mismas para **Ib**. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (Tabla 3.1) mostraron señales a 175.62 ppm para **3.15** y a 182.01 ppm para **Ib**, que se asignaron a los grupos carbonilos del éster (para **3.15**) y ácido (para **Ib**). Por último, los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN (Tabla 3.1), así como los espectros de masas de alta resolución, resultaron coherentes con las estructuras propuestas.

Todos los compuestos preparados en este capítulo resultaron ser altamente higroscópicos y no dieron análisis elementales satisfactorios. Sin embargo, los datos de RMN, espectrometría de masas de alta resolución y rigurosos análisis de las muestras por HPLC nos permitieron comprobar la pureza de los productos y descartar la existencia de trazas del producto de partida **3.1** (que podría interferir en los ensayos de actividad biológica).

**TABLA 3.1.**– Datos más significativos de  $^{13}\text{C}$  RMN y  $^{31}\text{P}$  RMN del sustituyente de la posición N-3 de los derivados **3.6**, **3.9-3.12**, **3.15** y **Ib**. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) registrados en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 100 MHz



Compuesto	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	CH <sub>2</sub> a	CH <sub>2</sub> b ( <sup>3</sup> J <sub>P,C</sub> )	CH <sub>2</sub> c ( <sup>2</sup> J <sub>P,C</sub> )	CO ( <sup>1</sup> J <sub>P,C</sub> )	Otros	<sup>31</sup> P RMN <sup>a</sup>
<b>3.6</b>	TBDMS	OH	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	40.18 s	30.07 d (5.9)	65.34 d (6.2)	172.34 d (250)	61.28 d (CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J <sub>P,C</sub> = 4.2)	-4.50
<b>3.9<sup>b</sup></b>	TBDMS	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	38.2 s	30.38 d (6.7)	65.6 d (6.1)	174.20 d (248)	51.72 d (CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J <sub>P,C</sub> = 3.8)	-2.53
<b>3.10</b>	TBDMS	O <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	OCH <sub>3</sub>	40.16 s	29.94 d (6.9)	65.33 d (6.1)	174.61 d (248)	51.73 d (CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , <sup>3</sup> J <sub>P,C</sub> = 3.8)	-7.41
<b>3.11</b>	H	O <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	O <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	40.42 s	30.93 d (4.0)	63.92 d (6.1)	199.27 d (230)		-12.19
<b>3.12</b>	H	O <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	–	40.11 s	30.74 d (6.1)	62.92 d (5.5)	–		6.83
<b>3.15</b>	TBDMS	OH	OCH <sub>2</sub> Ph	40.18 s	29.94 d (6.8)	65.31 d (6.1)	175.62 d (230)	66.71 d (CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, <sup>3</sup> J <sub>P,C</sub> = 3.8)	-4.24
<b>Ib</b>	TBDMS	OH	OH	40.16 s	30.07 d (6.8)	64.30 d (6.1)	182.01 d (235)		-12.2

<sup>a</sup>Registrados a 161.8 MHz, <sup>b</sup>Registrado en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

### 3.2. ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Los derivados nucleosídicos, cuya síntesis se describe en el presente capítulo, fueron evaluados como agentes antivirales frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4 y CEM de forma análoga a la mencionada en el correspondiente apartado de Actividad Antiviral del capítulo 1 de esta Memoria.

Los compuestos ensayados son conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] en los que ambos inhibidores se han unido mediante una unión lábil de tipo éster a través del grupo fosforilo de foscarnet (unión P-O) y el grupo hidroxilo terminal del 3-*N*-(hidroxipropil)derivado de TSAO-T **3.1**. Se han ensayado tanto los conjugados intermedios, el triéster de foscarnet protegido con grupos alquílicos (**3.9**), y los correspondientes P,C-diésteres de foscarnet conjugados con grupo C-alquilo (**3.6**, **3.10**) o bencilo (**3.15**), así como el monoéster de foscarnet con el grupo ácido fosfónico libre (**Ib**, molécula objetivo).

Los resultados obtenidos de la evaluación biológica de **3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15** y **Ib** se recogen en la Tabla 3.2. En dicha tabla se incluyen como compuestos de referencia el 3-*N*-(hidroxipropil)derivado de TSAO-T (**3.1**) y el foscarnet (**15**) (compuestos que se generarían en la hidrólisis de los conjugados en cultivo celular), que han sido evaluados siguiendo los mismos procedimientos que los compuestos objeto de este estudio.

Según se observa en la tabla, todos los compuestos ensayados mostraron actividades significativas frente a la replicación de VIH-1, en todos los casos superiores a la actividad mostrada por el propio foscarnet **15**, aunque en general inferiores a la del compuesto TSAO de referencia **3.1**. Así el triéster de foscarnet **3.9** fue el derivado más activo de la serie ( $CE_{50} = 0.08-0.28 \mu\text{M}$ ) mostrando actividad significativa frente a VIH-1. Los P,C-diésteres de foscarnet en los que el grupo carboxilo del foscarnet está protegido con un grupo etilo (**3.6**), metilo (**3.10**) o bencilo (**3.15**), mostraron actividades frente a VIH-1 moderadas ( $CE_{50} = 1.26-20.1 \mu\text{M}$ ), aunque resultaron ser dos órdenes de magnitud inferiores a las del compuesto de referencia **3.1**. El monoéster de foscarnet **Ib** mostró una actividad superior ( $CE_{50} = 0.47-0.82 \mu\text{M}$ ) a la de los P,C-diésteres de PFA anteriores.

Todos los fármacos ensayados resultaron ser de 5 a 50 veces menos tóxicos ( $CC_{50} = 18.4-178 \mu\text{M}$ ) que el compuesto patrón **3.1** ( $CC_{50} = 3.86 \mu\text{M}$ ). Ninguno de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] ensayados resultó activo frente a VIH-2 en cultivo celular.

**TABLA 3.2**

Actividad antiviral frente a VIH-1 en células MT-4 y CEM de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet]

Compuesto	$CE_{50} (\mu\text{M})^a$				$CC_{50} (\mu\text{M})^b$	
	MT-4		CEM/0		MT-4	CEM/0
	VIH-1	VIH-2	VIH-1	VIH-2		
<b>3.6</b>	$4.23 \pm 0.57$	> 50	$2.13 \pm 1.62$	> 50	$84.3 \pm 12.92$	$135 \pm 1.4$
<b>3.9</b>	$0.282 \pm 0.005$	> 10	$0.08 \pm 0.0$	> 10	$18.4 \pm 1.9$	$20.9 \pm 0.85$
<b>3.10</b>	$20.1 \pm 3.0$	> 50	$4.5 \pm 0.7$	> 50	$55.5 \pm 26.7$	$146 \pm 41.7$
<b>3.15</b>	$1.26 \pm 0.37$	> 50	$3.0 \pm 0.0$	> 50	$84.0 \pm 37.4$	$138 \pm 7.8$
<b>Ib</b>	$0.82 \pm 0.05$	> 50	$0.47 \pm 0.46$	> 50	$111 \pm 2.1$	$178 \pm 62.4$
<b>3.1</b>	$0.030 \pm 0.003$	> 2	$0.011 \pm 0.006$	> 2	$3.86 \pm 0.29$	$3.86 \pm 0.29$
<b>Foscarnet</b>	$80.1 \pm 10.1$	$70.6 \pm 3.9$	$55.5 \pm 6.3$	$47.6 \pm 4.8$	$294 \pm 7.3$	$248 \pm 15.1$

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH

<sup>b</sup>Concentración citotóxica que inhibe el crecimiento del 50% de las células no infectadas

Como se ha mencionado en la introducción, el foscarnet es un antiviral de amplio espectro que muestra actividad no sólo frente a VIH-1 y VIH-2, sino también frente a virus herpes y citomegalovirus. Una manera de detectar si los conjugados liberan foscarnet sería el ensayo frente a estos virus. Sin embargo, cuando los conjugados **3.6**, **3.9**, **3.10** y **3.15** y **Ib** se ensayaron frente a citomegalovirus (CMV) y virus varicela zoster (VZV) en células de pulmón embrionario humano (HEL) ninguno mostró actividad significativa.

Por otro lado, como ya hemos comentado anteriormente, el foscarnet es un orden de magnitud más activo frente a la cepa TSAO-resistente (138-Lys) que frente a la cepa viral salvaje (138-Glu). Basándonos en este hecho, se podría postular que una liberación de foscarnet a partir de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] podría dar lugar a actividad frente a dicha cepa TSAO-resistente. Así, cuando se ensayaron en cultivo celular los conjugados intermedios **3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15** y **Ib** frente a la cepa TSAO-resistente (Tabla 3.3) se observó que, a diferencia de los derivados TSAO, los derivados **3.6**, **3.10**, **3.15** y **Ib** mostraron actividades significativas a concentraciones no tóxicas frente a dichas cepas ( $CE_{50} = 25, 50, 20$  y  $20 \mu\text{M}$ , respectivamente).

**TABLA 3.3**

Actividad antiviral frente a las cepa de VIH-1 TSAO-resistente en cultivos CEM de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] **3.6, 3.9, 3.10, 3.15** y **Ib**

CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Compuesto						3.1	Foscarnet
	3.6	3.9	3.10	3.15	Ib			
Cepa viral salvaje (Glu138)	2.13 $\pm$ 1.62	0.08 $\pm$ 0.01	4.5 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.0	0.47 $\pm$ 0.46		0.01 $\pm$ 0.01	80.1 $\pm$ 10.1
Cepa viral mutada (Lys138)	25	> 10	50	20	20		> 2	8.73

<sup>a</sup>Concentración efectiva para proteger al 50% de las células del efecto citopático del VIH.

Seguidamente, con el fin de determinar si los conjugados “per se” podrían estar involucrados de algún modo en la actividad antiretroviral observada se realizaron ensayos de inhibición directa tanto frente a la enzima TI de VIH-1 salvaje como frente a la enzima TI mutada en la posición 138 (Glu138Lys) (Tabla 3.4).

**TABLA 3.4**

Actividad frente a TI salvaje y frente a TI mutada (Glu-138Lys) de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] **3.6, 3.9, 3.10, 3.15, Ib**

Compuesto	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	
	TI salvaje	TI mutada (Glu138Lys)
<b>3.6</b>	6.3	293
<b>3.9</b>	11.3	> 500
<b>3.10</b>	4.8	394
<b>3.15</b>	36	298
<b>Ib</b>	3.7	484
<b>3.1</b>	3.0	> 500
<b>TSAO-m<sup>3</sup>T</b>	2.23	> 500

<sup>a</sup>Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima

Los ensayos de inhibición directa de la enzima salvaje ponen de manifiesto que todos los conjugados son inhibidores potentes de la misma con valores de CI<sub>50</sub> comparables, en general, al 3-*N*-(hidroxipropil)derivado de TSAO-T **3.1**. Asimismo, los conjugados **3.6, 3.10, 3.15** y **Ib** mostraron actividad significativa, aunque moderada, frente a la enzima TI de VIH-1 mutada en la posición 138.

A la vista de todos los datos expuestos hasta el momento, cabe destacar algunos aspectos. Primeramente, el hecho de que todos los conjugados sintetizados sean inactivos frente a la replicación de VIH-2 y otros virus (CMV y VZV) podría indicar que a partir de estos derivados no se libera intra- o extracelularmente foscarnet, o bien que la concentración de foscarnet liberada no es suficiente para producir la acción antiviral. Por otro lado, la actividad mostrada por los conjugados **3.6**, **3.10**, **3.15** y **Ib** frente a la cepa de VIH-1 TSAO-resistente podría interpretarse a partir de la liberación de foscarnet, o bien, que la propia molécula de conjugado “per se” pudiera estar involucrada de algún modo en la actividad observada. De hecho, de los datos de inhibición directa de los conjugados frente a la TI mutada (Glu138Lys) se deduce que estos compuestos inhiben de manera significativa la enzima sin necesidad de ser metabolizados.

Finalmente, con el fin de aclarar estos puntos se llevaron a cabo estudios de estabilidad de los conjugados en distintos medios biológicos que nos permitieran determinar si la unión éster (P-O) entre ambos inhibidores se metaboliza intracelularmente liberando foscarnet (**15**) y el derivado de TSAO-T **3.1**.

### **3.2.1 Estudios de estabilidad de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet]**

Uno de los objetivos claves de la aproximación “doble fármaco” abordada en este capítulo es que los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] preparados sean estables extracelularmente, y que una vez dentro de la célula, el enlace éster pueda ser hidrolizado por enzimas celulares regenerándose ambos tipos de inhibidores.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, en primer lugar, se realizaron estudios de estabilidad química del conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib** y de los conjugados intermedios **3.6**, **3.9**, **3.10** y **3.15** a pH fisiológico en solución salina de tampón fosfato (PBS, pH = 7.4), así como, estudios de estabilidad extracelular mediante incubación de los derivados a 37°C en suero humano (condiciones que mimetizan las condiciones extracelulares), monitorizándose ambos experimentos por HPLC. En estas condiciones todos los compuestos son estables, con tiempos de vida media superiores a 180 minutos, lo que parece indicar que los conjugados son estables químicamente a pH fisiológico, y por otro lado, que todos ellos parecen cumplir uno de los requisitos básicos de la aproximación “doble fármaco” que es su estabilidad extracelular.

Una vez comprobada la estabilidad química y extracelular de los conjugados, se realizaron estudios de metabolismo de éstos mediante incubación de los compuestos a 37°C en extractos de células CEM (condiciones que mimetizan las condiciones experimentales de los ensayos “*in vitro*”). Durante la incubación se tomaron alícuotas a diferentes tiempos ( $t = 0, 30, 60, 180$  minutos) que fueron posteriormente analizadas por HPLC utilizándose como patrón el 3-*N*-(hidroxipropil)derivado de TSAO-T **3.1** (que se liberaría de los conjugados tras la ruptura del enlace P-O éster). El foscarnet no pudo usarse como patrón en estos experimentos ya que no puede ser detectado por UV. Estos estudios demostraron que, en estas condiciones a partir de los conjugados intermedios **3.6, 3.9, 3.10 y 3.15** (con el resto de foscarnet parcial o totalmente protegido) el enlace P-O éster no se rompe. Sin embargo, en el conjugado **Ib** con el ácido fosfónico libre, el enlace éster sí se metaboliza liberando intracelularmente el derivado TSAO patrón **3.1** como metabolito mayoritario y presumiblemente la molécula de foscarnet (**15**). Además, el cromatograma de HPLC (Figura 3.3) indica la formación de otro metabolito minoritario ( $T_r = 16.39$  min) que fue posteriormente caracterizado como el derivado TSAO patrón desprotegido en la posición 5' del azúcar (**3.16**).

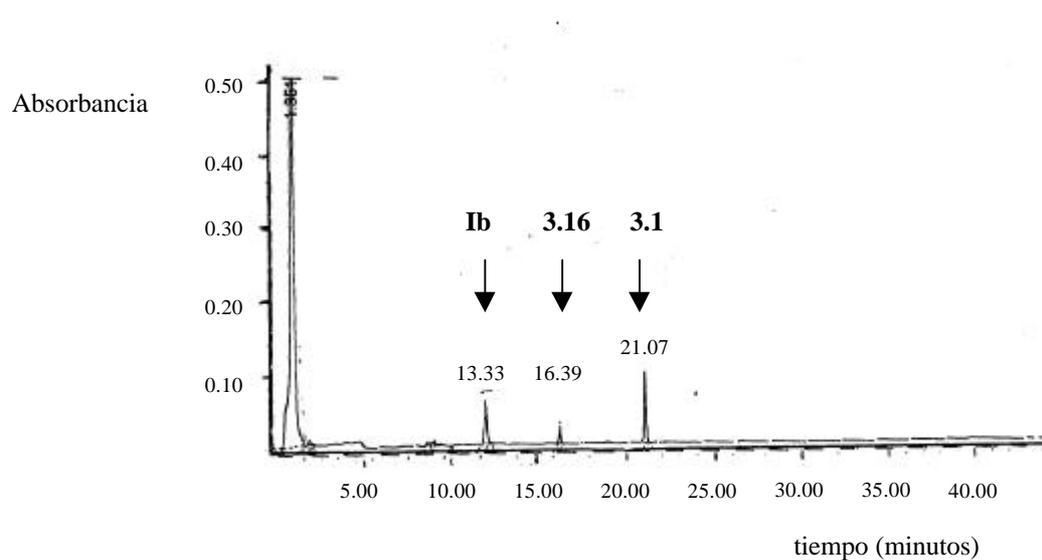


FIGURA 3.3.– Cromatograma de HPLC obtenido en los estudios de metabolismo del conjugado **Ib** en extractos celulares CEM al cabo de 30 minutos

En la Figura 3.4 se reflejan los resultados de estos estudios de hidrólisis del conjugado **Ib** al cabo de 30, 60 y 180 minutos. Como puede observarse el tiempo de vida media del compuesto **Ib** en extractos de células CEM es inferior a 30 minutos (de 20 a 25 minutos) y al cabo de 180 minutos se ha producido aproximadamente la hidrólisis del 80% del conjugado.

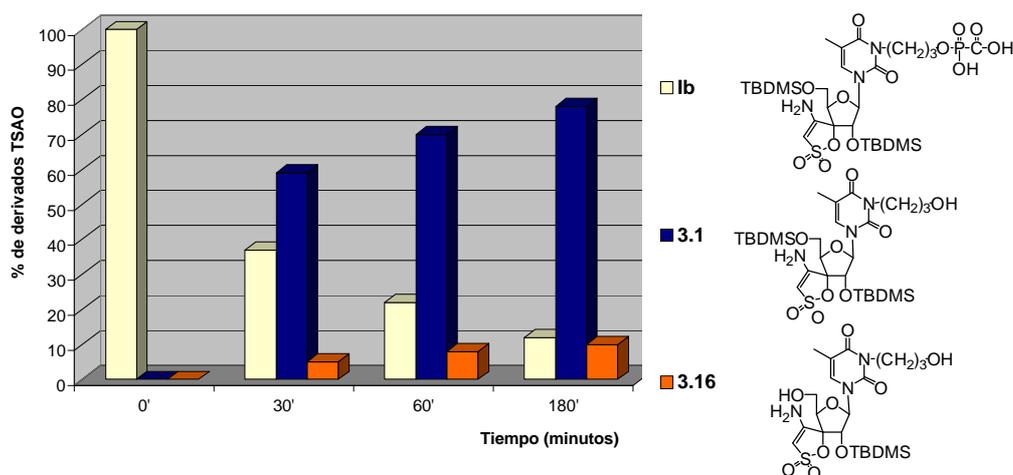


FIGURA 3.4.– Estudios de hidrólisis del conjugado **Ib** en extractos de células CEM

La eficacia antiviral de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] depende de muchos factores como es la inhibición enzimática, permeabilidad a través de membranas celulares, estabilidad extracelular y metabolismo intracelular y la correlación entre todos estos factores es muy complicada. Sin embargo, todos los resultados biológicos expuestos en este apartado se podrían resumir en los siguientes puntos:

1. Se han obtenido conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] (**3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15** y **Ib**) con actividad significativa frente a VIH-1 muy superior a foscarnet (**15**) aunque inferior a la del derivado prototipo TSAO **3.1**.
2. La toxicidad de los compuestos descritos en este capítulo es marcadamente menor que la observada para el derivado TSAO utilizado de referencia **3.1**.
3. Los P,C-diésteres de foscarnet protegidos con un grupo etilo (**3.6**), metilo (**3.10**) o bencilo (**3.15**) así como el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] con el ácido fosfónico libre (**Ib**) han mostrado actividad significativa frente a cepas de virus VIH-1 TSAO-resistentes.
4. Los estudios de metabolismo de estos compuestos en extractos de células CEM indican que el conjugado **Ib** con el resto de foscarnet desprotegido, sí se hidroliza intracelularmente liberando el 3-N-(hidroxipropil)derivado de TSAO-T **3.1** y presumiblemente la molécula de foscarnet, lo que indica que la hipótesis de diseño de estos conjugados ha funcionado con éxito. Por el contrario, los conjugados

intermedios protegidos o parcialmente desprotegidos **3.6**, **3.9**, **3.10** y **3.15** no se hidrolizan en estas condiciones.

5. Todos los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] **3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15** y **Ib** mostraron actividad en ensayos directos de inhibición de la TI de VIH-1. Asimismo, los conjugados parcialmente protegidos **3.6**, **3.10** y **3.15** junto con el conjugado final desprotegido **Ib** resultaron activos frente a la TI mutada en la posición 138 (Glu138Lys).
6. Los resultados expuestos en los puntos 4 y 5 parecen indicar que, la actividad mostrada por los conjugados intermedios **3.6**, **3.10** y **3.15** (tanto frente a la cepa viral salvaje como a la cepa viral mutada) es debida a la acción inhibitoria de los compuestos “per se”.
7. La actividad mostrada por el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] desprotegido **Ib** frente a la cepa viral salvaje podría ser debida tanto a la liberación intracelular del derivado TSAO **3.1** y foscarnet (**15**), como (ya que no sabemos sí el conjugado se metaboliza intracelularmente en su totalidad) a la acción intrínseca de la propia molécula conjugada puesto que ésta muestra actividad frente a TI. Sin embargo, probablemente las razones por las que la actividad frente a VIH-1 mostrada por el conjugado **Ib** sea inferior a la del derivado **3.1** (que se libera intracelularmente a partir del conjugado) podrían ser diferencias de permeabilidad a través de membranas celulares de estos derivados.
8. La actividad mostrada por el conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] desprotegido **Ib** frente a la cepa viral mutada (Glu-138-Lys), podría explicarse tanto mediante la liberación de foscarnet (**15**) (en este caso nunca podría ser debida al derivado **3.1** pues éste es inactivo frente a la cepa viral mutada) como por la acción intrínseca del conjugado si éste no llega a metabolizarse en su totalidad.

Se podría concluir que la aproximación abordada en el presente capítulo, consistente en la síntesis de conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] unidos a través de un enlace covalente lábil ha resultado viable tanto desde el punto de vista químico como desde el punto de vista biológico. Desde el punto de vista químico, se ha sintetizado el primer conjugado de foscarnet con un IENN (TSAO-T) de la Transcriptasa Inversa de VIH-1. Desde un punto de vista biológico, esta estrategia ha conducido a compuestos de marcada actividad antiretroviral frente a VIH-1 así como a actividades moderadas frente a cepas de virus TSAO-resistentes.

Además, se han realizado estudios de metabolismo que sugieren que la hipótesis de diseño ha funcionado y el enlace P-O entre los dos tipos de inhibidores podría hidrolizarse intracelularmente.

En la actualidad se están seleccionando y caracterizando cepas de VIH-1 resistentes al conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] **Ib**, con el fin de estudiar si la liberación de foscarnet podría retrasar y/o evitar la aparición de la cepa 138-Lys TSAO-resistente.

#### **4. MODELO DE INTERACCIÓN DEL TSAO-T CON LA TRANSCRIPTASA INVERSA DE VIH-1**

Como ya se ha comentado en la introducción, se han descrito en los últimos años estudios de co-cristalización entre distintos inhibidores específicos y la TI de VIH-1. De manera análoga, se está intentando la co-cristalización de TSAO-T con la TI de VIH-1, por el grupo de los Profesores D. Stuart y D. Stammers de la Universidad de Oxford, si bien, hasta el momento no se dispone de cristales de calidad suficiente para su análisis por rayos X. En el año 1997, y en paralelo a los trabajos de síntesis y evaluación biológica, iniciamos una colaboración con el grupo del Dr. Federico Gago de la Universidad de Alcalá, quien lleva a cabo estudios de modelado molecular con el fin de establecer un modelo de interacción entre los derivados TSAO y su enzima objetivo la TI de VIH-1. Dichos estudios de modelado se realizaron inicialmente empleando las coordenadas descritas para otros inhibidores específicos complejados con la enzima.

##### **4.1. Modelo preliminar de interacción del TSAO-T con la Transcriptasa Inversa de VIH-1**

El modelo preliminar del que disponíamos<sup>47,53ac,54</sup> al inicio del trabajo que se halla recogido en la presente memoria (esquemáticamente representado en la Figura 4.1) sitúa al TSAO-T próximo a la interfaz entre las subunidades (p66/p51) del heterodímero (TI), con la mayor parte de la molécula alojada en el bolsillo hidrófobo de la subunidad p66, al que se unen el resto de los IENN, y el anillo de espiroaminoxatioldióxido apuntando hacia la subunidad p51. El amino de dicho espiroanillo se sitúa a distancia de puente de hidrógeno con la cadena lateral (grupo carboxilo) del Glu-B138 de dicha subunidad p51. El modelo sugiere que el grupo 5'-TBDMS se aloja en la cavidad definida por los aminoácidos aromáticos Tyr-A181, Tyr-A188 y Trp-A229. El grupo TBDMS de la posición 2' se localiza en una zona

hidrófoba definida por la Val-A106 y la Val-A179. El anillo de timina se sitúa por encima del plano definido por la Tyr-A318 en una cavidad delineada por las cadenas laterales de la Leu-A100, la Lys-A103, la Val-A106 y la Leu-A234 y los carbonilos del esqueleto carbonado de la Lys-A101, la His-A235 y la Pro-A236<sup>53c,54</sup>. Esta orientación dispone el anillo de timina de tal forma que los sustituyentes de la posición N-3 se encontrarían dirigidos hacia el canal que conecta el bolsillo de unión (de los IENN) con el disolvente, lo que explicaría la gran diversidad de grupos que pueden ser introducidos en dicha posición<sup>47,48,55b</sup> que van desde un grupo metilo<sup>48</sup> hasta cadenas mucho más largas y funcionalizadas, incluyendo incluso una molécula terminal de AZT o d4T<sup>139</sup> como en los heterodímeros de marcada actividad [TSAO-T]-[AZT] o [TSAO-T]-[d4T]<sup>139</sup>.

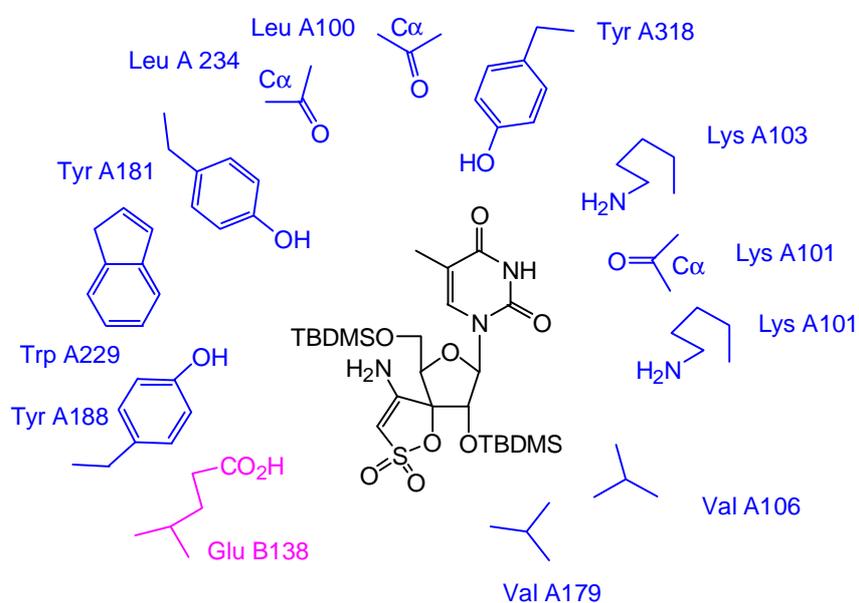


FIGURA 4.1.– Modelo preliminar de interacción del TSAO-T con la TI de VIH-1. En azul se representan los aminoácidos de la subunidad p66 (notación A en los aminoácidos) y en rosa los de la subunidad p51 (notación B en los aminoácidos).

Aunque este modelo no pudo ser confirmado experimentalmente, sí correlacionaba con la mayoría de los resultados biológicos obtenidos para las diferentes modificaciones sobre los derivados TSAO.

A lo largo de lo que ha sido el trabajo presentado en esta Memoria, se han contrastado los resultados del modelado molecular con los datos de actividad biológica con el fin de validar y refinar el modelo de interacción.

Asimismo, con el fin de validar el modelo de interacción propuesto diseñamos modificaciones tanto en el inhibidor como en la enzima. En el presente capítulo se recogen los resultados de tales modificaciones.

#### 4.1.1. Modificaciones sobre el inhibidor TSAO-T

En el modelo de interacción propuesto existe una interacción desfavorable entre el oxígeno de la posición 4 del anillo de timina del TSAO-T y el carbonilo del esqueleto carbonado de la His-A235 (Figura 4.2). El potencial electrostático negativo generado en esta región del inhibidor resulta desfavorable para la unión a la enzima ya que, según se observa en la figura, este oxígeno se sitúa en una zona de potencial negativo, próximo al mencionado carbonilo del esqueleto carbonado de la His-A235 dando lugar a interacciones electrostáticas de tipo repulsivo con la enzima. Por tanto, se podría razonar que la eliminación de dicho oxígeno de la timina del TSAO-T debería dar lugar a una molécula de mayor afinidad por la enzima al desaparecer la interacción desfavorable, lo que debería traducirse en un aumento de actividad de la misma respecto al prototipo TSAO-T.

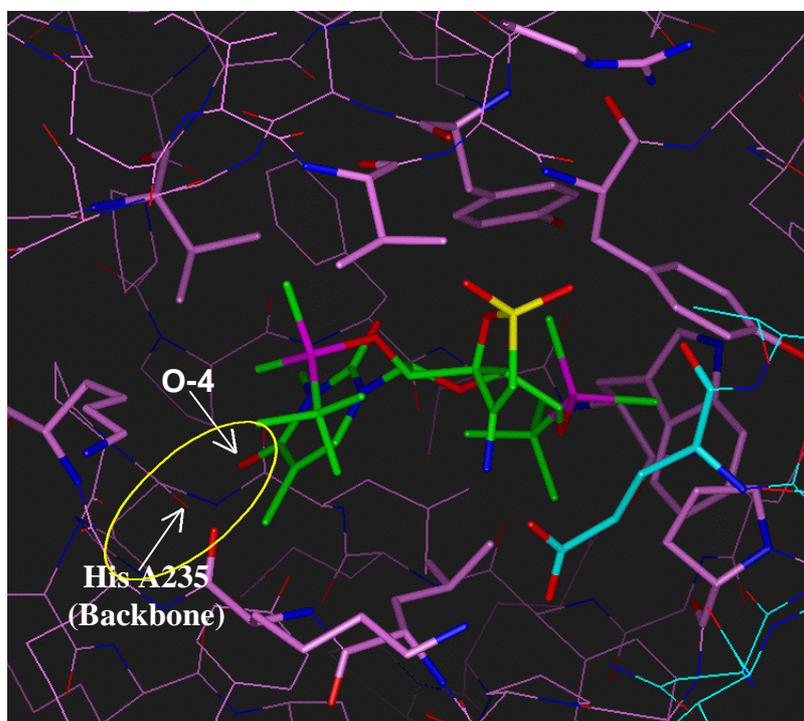
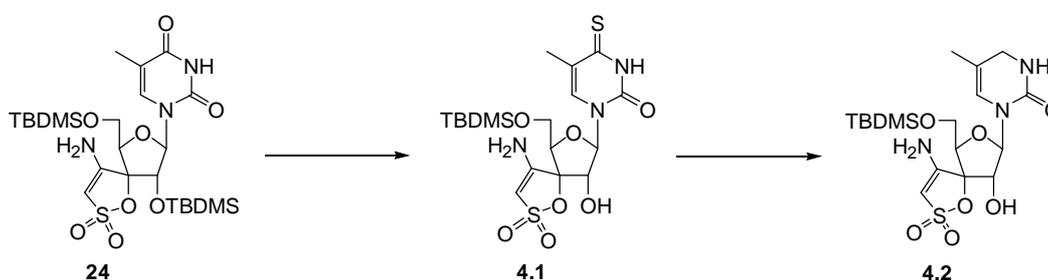


FIGURA 4.2.– Modelo de interacción del TSAO-T con la TI de VIH-1.

Así, con el fin de comprobar esta hipótesis nos planteamos la preparación del derivado TSAO portador de un anillo de 2-pirimidinona (**4.2**, Esquema 4.1).

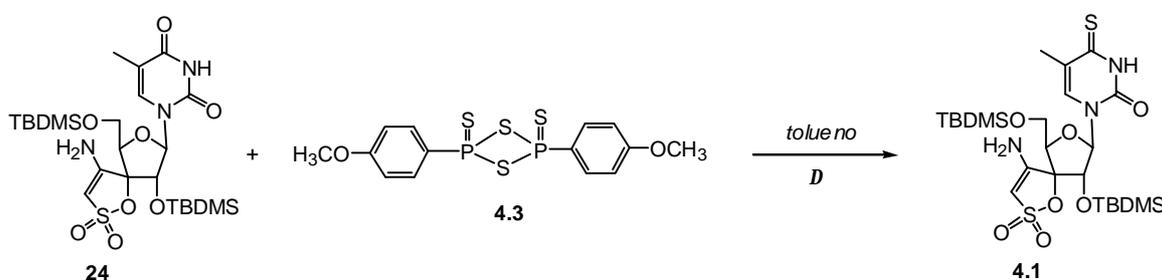
#### 4.1.1.1. Síntesis de análogos de TSAO-T modificados en la posición 4 del anillo de timina

Para la preparación de la molécula objetivo **4.2**, utilizamos el procedimiento sintético en dos pasos que se refleja en el esquema 4.1. Dicho procedimiento consiste en la reacción de tionación de la posición 4 del anillo de timina, seguido de desulfuración reductiva del grupo tiocarbonilo para dar lugar al anillo de 2-pirimidinona.



ESQUEMA 4.1.– Procedimiento para la síntesis del derivado **4.2**

La síntesis del 4-tioderivado (**4.1**) se realizó utilizando el reactivo de Lawesson<sup>140</sup>, uno de los agentes de tionación más versátiles en la generación de tioamidas, que ha sido ampliamente utilizado en la formación de 4-tioderivados de pirimidinas<sup>140b,c</sup>. Así, la reacción de TSAO-T (**24**) con el reactivo de Lawesson (**4.3**) en tolueno seco a 80°C (Esquema 4.2) condujo al derivado **4.1** con un 60% de rendimiento.



ESQUEMA 4.2.– Síntesis del 4-tioderivado **4.1**



Existen precedentes bibliográficos, aunque escasos, de migraciones similares de dobles enlaces en reacciones de desulfuración reductiva en presencia de “Ni<sub>2</sub>B”<sup>144</sup>.

La asignación estructural de los derivados **4.2** y **4.4** no fue obvia y requirió la utilización de técnicas de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN tanto mono- como bidimensionales así como de espectroscopia de masas.

Los espectros de UV de **4.2** y **4.4** fueron similares entre sí, con un sólo máximo de absorción ( $\lambda_{\text{max}} = 231$  y  $230$  nm) respectivamente, a diferencia de los dos máximos de absorción observados para el tioderivado de partida **4.1** ( $\lambda_{\text{max}} = 332$  y  $230$  nm) lo que confirmaba la desaparición del grupo tiocarbonilo.

Los datos de espectroscopía de masas de las dos estructuras eran idénticos [MS (ES+) m/z = 598.3 (M + Na)<sup>+</sup>] lo que indicaba que se trataba de dos isómeros portadores de anillos de 2-pirimidona.

En los espectros de <sup>1</sup>H RMN de ambas estructuras se observó la presencia de un nuevo grupo CH<sub>2</sub> respecto al compuesto de partida y desplazamientos químicos y multiplicidades diferentes del resto de las señales de los protones de la base (Tabla 4.1). Sin embargo, mientras en el espectro de <sup>1</sup>H RMN de **4.2** el nuevo grupo metileno apareció como un doblete de dobletes a 3.82 y 3.88 ppm que se simplificaba al añadir D<sub>2</sub>O (y que se asignó como el CH<sub>2</sub>-4 contiguo al grupo NH-3 de la base), en el espectro de <sup>1</sup>H RMN de **4.4** el nuevo metileno apareció como un multiplete a  $\delta = 3.90$  ppm y no se modificó al añadir D<sub>2</sub>O. En este derivado se observó, sin embargo, que el protón vinílico a 5.93 ppm era la señal que se simplificaba al añadir D<sub>2</sub>O, lo que indicaba que estaba contiguo al NH-3. La señal correspondiente al NH-3 apareció en ambos compuestos desplazada a campo alto  $\Delta\delta_{4.2} = 5.46$  ppm y  $\Delta\delta_{4.4} = 4.23$  ppm respecto al producto de partida **4.1** (Tabla 4.1) y con una multiplicidad diferente.

En los espectros de <sup>13</sup>C RMN de **4.2** y **4.4** (Tabla 4.1) se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo 4-tiocarbonilo a 192.33 ppm y la aparición de una nueva señal correspondiente a un carbono de tipo metilénico. Para el compuesto **4.2** el nuevo metileno apareció a  $\delta = 45.52$  ppm y correlacionaba a un enlace en el experimento de HMQC con los protones a 3.82 ppm y 3.88 ppm de la posición 4 del anillo de 2-pirimidinona. En el experimento HMBC (Figura 4.3) se observaron correlaciones a dos y tres enlaces entre la nueva señal de carbono a  $\delta = 45.52$  ppm y los protones NH-3 ( $\delta = 6.19$  ppm), CH<sub>3</sub>-5 ( $\delta = 1.69$  ppm) y H-6 ( $\delta = 6.15$  ppm). Por otro lado, en el compuesto **4.4** el nuevo carbono CH<sub>2</sub> que apareció a  $\delta = 46.90$  ppm correlacionaba en el experimento de HMBC (Figura 4.3)

con el protón H-1' ( $\delta = 5.74$  ppm), H-4 ( $\delta = 5.93$  ppm) y CH<sub>3</sub>-5 ( $\delta = 1.67$  ppm) por lo que se asignó como el CH<sub>2</sub> de la posición 6.

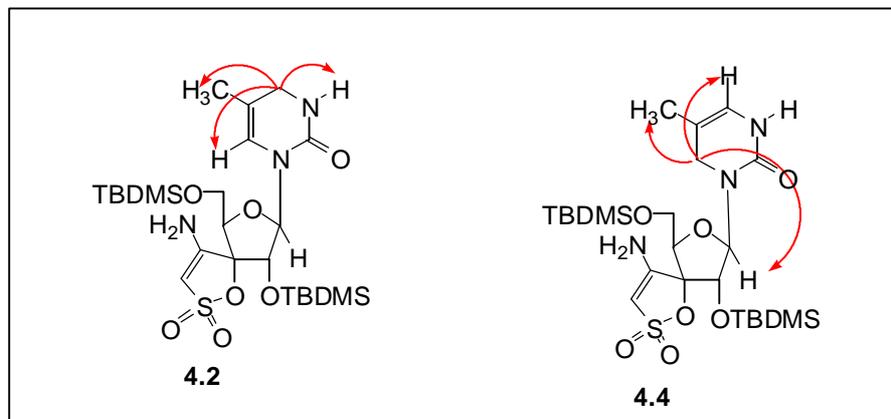


FIGURA 4.3.– Señales de correlación observadas para el nuevo grupo CH<sub>2</sub> en el experimento HMBC sobre los derivados 4.2 y 4.4

Con el fin de validar nuestra hipótesis de diseño, los nuevos análogos TSAO sintetizados 4.1, 4.2 y 4.4 se ensayaron frente a la replicación de VIH (Tabla 4.2). En contra de lo esperado, los derivados 4.2 y 4.4 (que carecían del grupo carbonilo en la posición 4) mostraron una actividad inferior (de 2 a 4 veces) a la del compuesto prototipo TSAO-T. Por tanto, los resultados obtenidos parecían contrarios a la hipótesis propuesta.

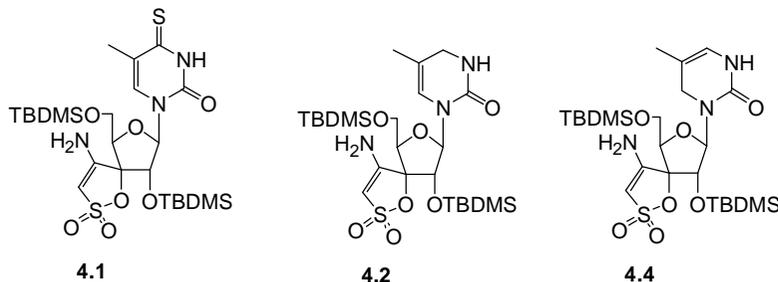
**TABLA 4.2**

Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4 y CEM de los derivados TSAO modificados en la posición 4

Compuesto	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>			
	MT-4		CEM/0	
	VIH-1	VIH-2	VIH-1	VIH-2
<b>4.1</b>	0.17 $\pm$ 0.05	> 10	0.17 $\pm$ 0.16	> 2
<b>4.2</b>	0.20 $\pm$ 0.03	> 10	0.10 $\pm$ 0.0	> 2
<b>4.4</b>	0.23 $\pm$ 0.06	> 10	0.12 $\pm$ 0.0	> 10
<b>TSAO-T</b>	0.06 $\pm$ 0.03	> 20	0.06 $\pm$ 0.01	> 20

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

**TABLA 4.1.**– Datos más significativos de  $^1\text{H}$  RMN<sup>a</sup> y  $^{13}\text{C}$  RMN<sup>b</sup> de los derivados **4.1**, **4.2** y **4.4**. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz) registrados en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$



Compuesto	NH-3	H-4 <i>J</i> (Hz)	CH <sub>3</sub> -5 <i>J</i> (Hz)	H-6 <i>J</i> (Hz)	C-2	C-4	C-5	CH <sub>3</sub> -5	C-6
<b>4.1</b>	11.65 s ancho	–	2.05 d (1.3)	7.56 d	152.03	192.33	120.05	17.23	132.46
<b>4.2</b>	6.19 dd (1.3, 2.6)	3.82 dd, 3.88 dd (15.1)	1.69 d (0.5)	6.15 m ancho	153.77	45.52	110.82	16.54	121.76
<b>4.4</b>	7.42 m ancho	5.93 m	1.67 d (1.1)	3.80-4,02 m	154.10	120.72	106.14	16.99	46.90

<sup>a</sup>Registrados a 400 MHz

<sup>b</sup>Registrados a 100 MHz

#### 4.1.2. Modificaciones en la enzima

En el modelo de interacción, del TSAO-T con la enzima, propuesto existía una interacción favorable entre el potencial electrostático negativo generado por el grupo sulfona del anillo de espirooxatioldióxido del TSAO-T y la zona positiva generada por la cadena lateral de la Arg-A172. Por tanto, se podría postular que un cambio de esta Arg-A172 por una Ala (que daría lugar a una disminución en la zona de potencial positivo) debería traducirse en una pérdida de la afinidad de la enzima por los derivados TSAO, sin afectar a la afinidad por el resto de inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN). Es decir, si esto ocurriera podríamos validar biológicamente el modelo de interacción propuesto.

Sin embargo, cuando el equipo del Dr. Balzarini (nuestro colaborador en el Instituto Rega de la Universidad de Lovaina) llevó a cabo la mutación propuesta en la enzima y ensayó tanto los derivados TSAO como otros IENN frente a dicha enzima mutada los resultados no corroboraron la hipótesis propuesta. En contra de lo esperado, los derivados TSAO, resultaron más sensibles frente a la enzima mutada (7-10 veces más activos) que frente a la enzima salvaje (Tabla 4.3) mientras que la sensibilidad del resto de los IENN (UC781, delavirdine, efavirenz, o ddGTP) no se vio afectada por la mutación.

**TABLA 4.3**

Actividad de TSAO-T y TSAO-m<sup>3</sup>T frente a la enzima salvaje y de la enzima mutada (Arg172Ala)

Compuesto	CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	
	TI salvaje	TI mutada (Arg172Ala)
TSAO-T <sup>b</sup>	3.6 ± 0.2	0.37 ± 0.0
TSAO-m <sup>3</sup> T <sup>b</sup>	2.80 ± 0.18	0.42 ± 0.01
UC-781	0.008 ± 0.0008	0.007 ± 0.0001
Delavirdine	0.30 ± 0.07	0.18 ± 0.01
Efavirenz	0.007 ± 0.004	0.003 ± 0.0008
ddGTP <sup>b</sup>	0.42 ± 0.04	0.54 ± 0.06

<sup>a</sup>Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima

<sup>b</sup>En mM

Por tanto, a la vista de todo lo expuesto hasta este punto y a pesar de que el modelo propuesto explicaba la mayoría de los resultados biológicos obtenidos con los derivados TSAO, las modificaciones realizadas tanto en el inhibidor como en la enzima iban en contra del mismo. Además, como ya se ha mencionado, datos biológicos recientes indican que la unión de los derivados TSAO a la enzima da lugar a una desestabilización del heterodímero<sup>63,64</sup>. Este resultado difícilmente podía ser explicado con el modelo de interacción propuesto, en el que la unión del TSAO, mayoritariamente alojado en la subunidad p66 y con una interacción fuerte (puente de Hidrógeno) con el Glu-B138 de la subunidad p51, debería estabilizar el heterodímero.

Todas estas piezas contradictorias nos llevaron a comenzar de nuevo, e intentar encontrar un modo de unión alternativo.

#### **4.2. Nuevo modelo de interacción de los derivados TSAO con la TI de VIH-1**

Nuestro modelo preliminar de interacción estaba quizás demasiado dirigido y restringido en un intento de unir los derivados TSAO en el bolsillo hidrófobo donde interaccionan todos los inhibidores específicos no nucleosídicos descritos.

Por ello, la aproximación utilizada por el equipo del Dr. Gago en los nuevos estudios de docking consistió en ampliar la posible zona de unión del TSAO a la proteína más allá del bolsillo hidrófobo de interacción de los IENN. Además, se emplearon todas las coordenadas de la transcriptasa inversa de VIH-1 descritas tanto para la apoenzima (enzima sin complejar) como para la enzima complejada con distintos inhibidores o con el ADN.

Como resultado de estos estudios, se propone un nuevo modelo de interacción<sup>124</sup> de los derivados TSAO con la TI de VIH-1 que da respuesta satisfactoria a nuestros resultados experimentales. El nuevo modelo difiere claramente del modo “clásico” de unión de los IENN a la transcriptasa inversa de VIH-1.

En el nuevo modelo propuesto (Figura 4.4) el TSAO-m<sup>3</sup>T se une a la interfaz entre ambas subunidades p66/p51 de la enzima y no hace uso del bolsillo hidrófobo al que se unen el resto de IENN.

El TSAO-m<sup>3</sup>T se orienta en la interfaz de tal manera (Figura 4.4 B) que el elevado momento dipolar del anillo de espiroaminoxatioldióxido se alinea adecuadamente en el campo creado por la región electrostática positiva de la Lys-A101 y Lys-A103 (de la subunidad p66) y el Glu-B138 cargado negativamente de la subunidad p51. El grupo amino

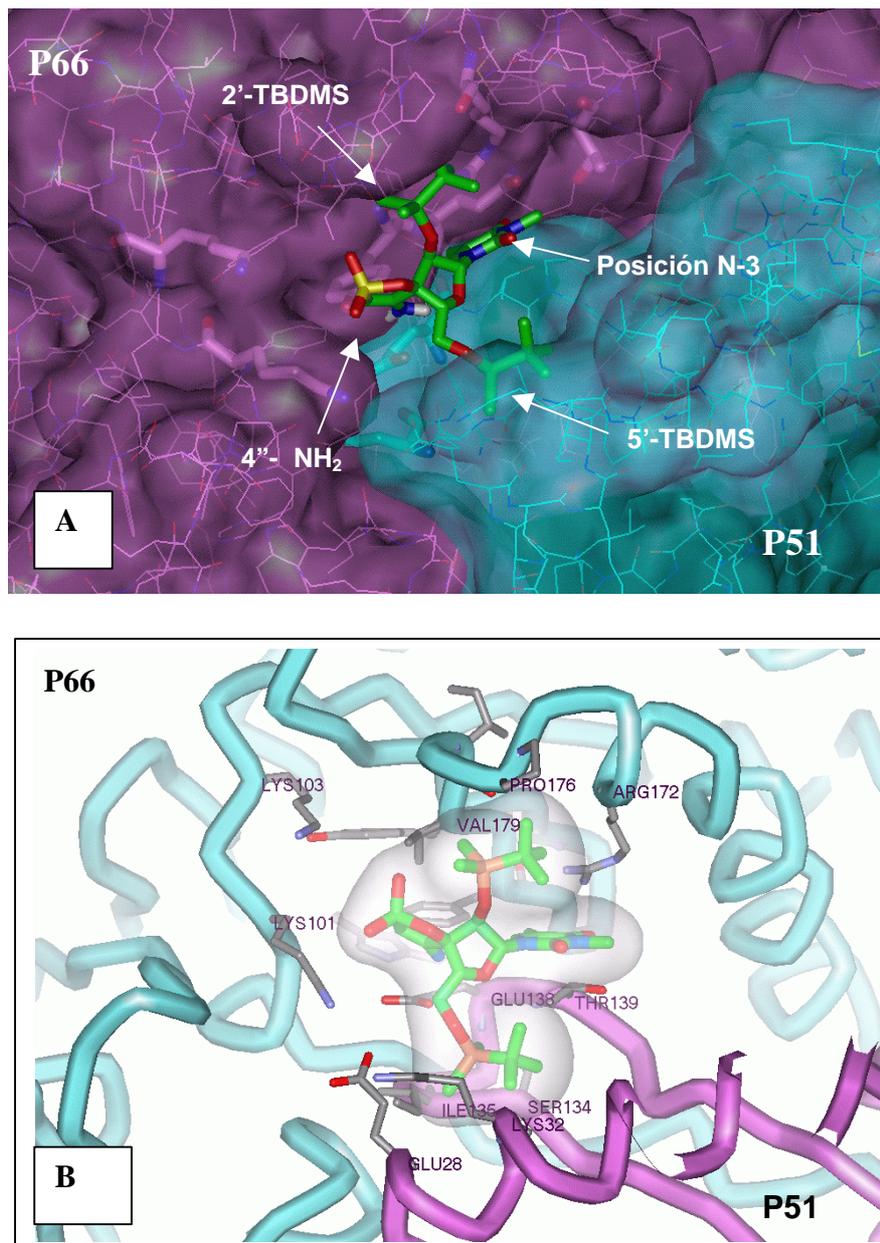


FIGURA 4.4.– Nuevo modelo de interacción de los derivados TSAO con la TI de VIH-1

(4''-NH<sub>2</sub>) del espiroanillo interacciona mediante puente de hidrógeno con el grupo carboxilo del mencionado Glu-B138 de la subunidad p51. Existe otra importante interacción polar, en este nuevo modelo, entre el carbonilo de la posición 4 del anillo de timina y el grupo hidroxilo de la Thr-B139 de la subunidad p51, que se encuentran a distancia de puente de hidrógeno.

Este nuevo modelo, y en concreto esta interacción, pone de manifiesto la importancia del O-4 de la timina en el inhibidor y explica la disminución de la potencia inhibitoria frente a VIH-1 de los derivados **4.2** y **4.4** ya que al eliminar dicho carbonilo se ha eliminado una

interacción favorable (puente de hidrógeno) con la enzima, lo que se traduce en una pérdida de actividad antiviral.

El modelo da asimismo una explicación satisfactoria al aumento de afinidad por los derivados TSAO cuando se muta la Arg-A172 de la enzima por una Alanina (Tabla 4.3). Cuando se calculan las contribuciones, tanto electrostáticas como de Van der Waals, a la energía de unión del complejo TSAO/TI de los distintos aminoácidos de la enzima, se observa para la Arg-A172 una contribución electrostática ligeramente desfavorable, contribución que desaparece cuando este residuo se muta por una Ala. La contribución a la energía de unión de este residuo es debida fundamentalmente al resto guanidinio que según se observa en la Figura 4.4 B se apila sobre el anillo de timina del TSAO-T. La contribución desfavorable a la energía de unión se ve agravada por el hecho de que para que TSAO se una a la enzima, la Arg-A172 (cuya cadena lateral de guanidinio está cargada a pH fisiológico) debe desolvatarse. La energía de desolvatación de este residuo, cargado positivamente, es muy grande y no se compensa por ninguna carga negativa del entorno, lo que supone una penalización energética grande. Esta penalización desaparece cuando la Arg se reemplaza por una Ala (residuo mucho más lipófilo) lo cual se traduce en un aumento de la afinidad y por tanto de la potencia antiviral del TSAO-T.

Siguiendo con el modelo de interacción, el resto de las interacciones entre el TSAO-m<sup>3</sup>T y la TI son hidrófobas y hacen uso de dos cavidades hidrófobas de la interfaz de la enzima que son los bolsillos de unión de los grupos TBDMS de las posiciones 2' y 5' (Figura 4.4 A). Así, el grupo 5'-TBDMS interacciona en la subunidad p51 en una gran cavidad hidrófoba definida por las cadenas laterales de los residuos Ile-B31, Val-B35 y el esqueleto hidrocarbonado de la Lys-B32 y la Ser-B134 (Figura 4.4 B). Dicho grupo 5'-TBDMS encaja en la mencionada cavidad casi como una mano y su guante lo que explica los requisitos estructurales tan estrictos de este grupo y el porqué cualquier modificación del mismo da lugar a una marcada pérdida de afinidad por la enzima<sup>43,45,47,52b</sup>, debido a la pérdida de puntos de interacción favorables con la misma.

En lo que respecta al grupo 2'-TBDMS, éste interacciona en la subunidad p66 en un bolsillo hidrófobo, de mayor tamaño que el anterior (Figura 4.4 A), definido por la Pro-A176 y la Val-A179 (Figura 4.4 B). En este caso, el mayor tamaño del bolsillo explica el porqué en esta posición es posible una mayor variación estructural sin pérdida significativa de la actividad<sup>52b</sup>.

Finalmente, este modelo está, asimismo, de acuerdo con la gran diversidad de sustituyentes que admite la posición N-3 del anillo de timina del TSAO-T<sup>47,55,139</sup>. Según el modelo, dichos sustituyentes se sitúan paralelos a la interfaz entre ambas subunidades mayormente expuestos al disolvente (Figura 4.4 A).

A modo de resumen, se puede concluir que los nuevos estudios de “docking” han llevado a proponer un nuevo modo de unión de los derivados TSAO diferente del modo “clásico” de unión del resto de inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN). Según este nuevo modelo, los derivados TSAO no se unen en el bolsillo alostérico al que se unen los demás IENN sino que se unen en la interfaz entre ambas subunidades (p66/p51) de la Transcriptasa Inversa interaccionando con aminoácidos distintos de aquellos con los que interaccionan el resto de IENN.

#### 4.3. Mecanismo de Inhibición de la TI por los derivados TSAO

A la vista del modelo cabe preguntarse ¿cuál es el mecanismo de inhibición de la transcriptasa inversa por parte de los derivados TSAO?

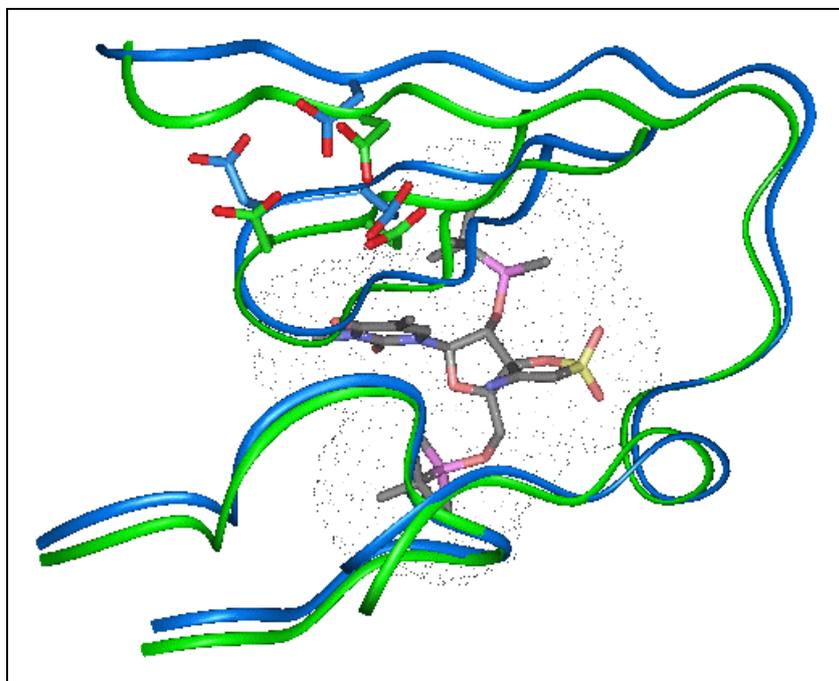


FIGURA 4.5.– Modelo simplificado que contiene los Aspárticos del centro catalítico, en presencia (color verde) y en ausencia (color azul) de TSAO- $m^3T$

Como ya se ha mencionado en la introducción, los derivados TSAO parecen actuar interfiriendo el proceso de dimerización de la enzima<sup>64</sup>. La presencia del compuesto en la interfaz entre ambas subunidades puede perturbar el proceso dinámico de asociación de las subunidades y/o evitar el cambio conformacional necesario para tener la enzima en su forma catalíticamente activa<sup>63,64</sup>. Se ha demostrado que en presencia de TSAO-T<sup>63</sup> y TSAO-e<sup>3</sup>T<sup>64</sup> se produce una desestabilización del heterodímero de la enzima lo que conlleva una inactivación parcial de la misma y una marcada disminución de afinidad por el ADN viral.

Se ha descrito en la literatura que los IENN (inhibidores alostéricos) cuando se unen a la TI de VIH-1 provocan cambios en la estructura de la enzima, respecto a la apoenzima<sup>42</sup>. Concretamente, se produce un movimiento concertado de las láminas  $\beta_6$ ,  $\beta_9$  y  $\beta_{10}$ , que contienen los aspárticos del centro catalítico (Asp-A110, Asp-A185 y Asp-A186) produciendo una distorsión de dicho centro catalítico interfiriendo así la síntesis del ADN viral. El equipo del Dr. Gago llevó a cabo simulaciones de dinámica molecular con la apoenzima y con la enzima complejada con TSAO-m<sup>3</sup>T. Cuando se compararon ambas simulaciones (Figura 4.5) en presencia de TSAO-m<sup>3</sup>T (color verde en la Fig. 4.5) y en ausencia de TSAO-m<sup>3</sup>T (color azul en la Fig. 4.5), se observa al igual que con el resto de inhibidores alostéricos (IENN) una distorsión de los aspárticos del centro catalítico aunque mediante un mecanismo diferente a la observada para el resto de IENN. En este caso la unión de TSAO-m<sup>3</sup>T provoca cambios en las láminas  $\beta_5$  y  $\beta_6$  y desplazamientos de las láminas  $\beta_9$  y  $\beta_{10}$  y en la hélice- $\alpha$  inmediatamente anterior a  $\beta_9$ .

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Reichert-Jung Kofler y no están corregidos.

Los análisis elementales de los compuestos no descritos en la bibliografía se hallan en el rango de  $\pm 0.4$  respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado en el laboratorio de microanálisis del C.N.Q.O. “Lora Tamayo” con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian Gemini a 200 y 50 MHz, en un Varian UNITY INOVA-300 a 300 y 75 MHz, o en un Varian UNITY-500 a 500 y 125 MHz. Los espectros monodimensionales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en condiciones estándar. Los espectros NOE se generaron con un tiempo de mezcla de 2 seg.; los demás parámetros de adquisición fueron idénticos a los utilizados en  $^1\text{H}$ -RMN.

Los experimentos de correlación heteronuclear de desplazamientos químicos utilizando la técnica de detección inversa se obtuvieron utilizando la secuencia de pulsos HMQC. Las condiciones de adquisición empleadas fueron las siguientes: Tiempo de espera entre acumulaciones 0.969 s; anchura espectral en el dominio de protón, 5972 Hz; anchura espectral en el dominio de carbono, 18750 Hz; número de incrementos, 256 y 2048\*1024 puntos para la matriz de datos. El experimento se optimizó para una constante de acoplamiento a un enlace de 150 Hz. El tiempo de anulación se optimizó empíricamente a 300 ms.

Finalmente, los espectros de correlación heteronuclear de desplazamientos químicos a larga distancia mediante detección inversa se obtuvieron utilizando la secuencia HMBC. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones que el HMQC optimizando para constantes de acoplamiento de 7 Hz. La anchura espectral en el dominio de  $^{13}\text{C}$  se amplió a 20151 Hz.

La determinación del ión molecular se llevó a cabo mediante las técnicas de electroespray positivo (ES+) y electroespray negativo (ES-) registrándose dichos experimentos en un Hewlett Packard 1100 MSD.

Los espectros de IR se registraron con un espectrómetro Shimadzu IR-435.

Las cromatografías de capa fina analítica se realizaron en cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice tipo 60 F<sub>254</sub> (Merck). Los compuestos se detectaron con una lámpara de luz UV de 254 nm y/o mediante pulverización con una disolución de ácido sulfúrico/etanol (3:7) y calentando.

Las cromatografías preparativas se realizaron mediante cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en cromatotrón, en placas de 1 y 2 mm de espesor, con gel de sílice Merck tipo 60 PF 254 con CaSO<sub>4</sub>, velocidad de flujo (5-10 mL/min).

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron con gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh).

Los análisis de HPLC se realizaron en:

1. Aparato Waters 484 System utilizando una columna de fase reversa  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (0.05% TFA) (70:30). Velocidad de flujo: 1 ml/min. Detección: UV ( $\lambda=254$  nm).
2. Aparato Pharmacia LKB Biotechnologies 2141 utilizando una columna de fase reversa Lichrocart Superspher 60 RP-8. Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (0.05% TFA) (55:45). Velocidad de flujo: 1 ml/min. Detección: UV ( $\lambda=267$  nm).

**PRODUCTOS COMERCIALES**

<b>Acido hipofosforoso</b>	ALDRICH
<b>Acido propiólico</b>	ALDRICH
<b>Acido trifluoroacético</b>	FLUKA
<b>Alcohol bencílico</b>	ALDRICH
<b>Acrilato de metilo</b>	ALDRICH
<b>Anhídrido acético</b>	PANREAC
<b>Anhídrido trifluoroacético</b>	ALDRICH
<b>Aza-isobutironitrilo</b>	FLUKA
<b>Bisulfato sódico</b>	ALDRICH
<b>Bis(Tributilestaño)</b>	ALDRICH
<b>Borano en THF (1M)</b>	ALDRICH
<b>Borohidruro sódico</b>	ALDRICH
<b>Borabicyclononano</b>	ALDRICH
<b>Bromoacetato de bencilo</b>	ALDRICH
<b>3-Bromopropanol</b>	ALDRICH
<b>Bromuro de alilo</b>	ALDRICH
<b><i>n</i>-Butillitio</b>	ALDRICH
<b>Carbonato de cesio</b>	FLUKA
<b>Carbonato potásico</b>	QUIMICEN
<b>Cianuro sódico</b>	PANREAC
<b>Cloroformiato de bencilo</b>	ALDRICH
<b>Cloroformiato de etilo</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de Aluminio</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de benzoilo</b>	FEROSA
<b>Cloruro de Cobre</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de metiloxalilo</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de níquel hexahidratado</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de tionilo</b>	ALDRICH
<b>Cloruro de <i>t</i>-butildimetilsililo</b>	ALDRICH

---

<b>Cloruro de metanosulfonilo</b>	FLUKA
<b>Cloruro de p-toluensulfonilo</b>	ALDRICH
<b>Complejo de dimetilsulfuro-bromuro de cobre (I)</b>	ALDRICH
<b>DIBAL-H</b>	ALDRICH
<b>Dibencilidenacetona dipaladio (0)</b>	ALDRICH
<b><i>N,N</i>-Diisopropiletildiamina</b>	ALDRICH
<b>Dimetilamina al 33% en etanol</b>	FLUKA
<b>4-<i>N,N</i>-Dimetilaminopiridina</b>	ALDRICH
<b><i>N,N</i>-Dimetilformamida</b>	ALDRICH
<b>Hexabutildisilazano</b>	ALDRICH
<b>Hexametildisilazano</b>	ALDRICH
<b>Hidruro sódico (60%)</b>	ALDRICH
<b>Hidruro de tributilestaño</b>	ALDRICH
<b>Isocianato de benzoilo</b>	ALDRICH
<b>Isocianato de etilo</b>	ALDRICH
<b>Isocianato de etoxicarbonilo</b>	ALDRICH
<b>Isocianato de etoxicarbonilmetilo</b>	ALDRICH
<b>Isocianato de 1-metacriloilo</b>	ALDRICH
<b>1,2-isopropiliden-<math>\alpha</math>-D-xilofuranosa</b>	PFANSTIEHL
<b>Metilamina al 33% en etanol</b>	FLUKA
<b>Metilamina en metanol (2M)</b>	ALDRICH
<b><i>N</i>-Metil-2-pirrolidinona</b>	ALDRICH
<b>Nitrato amónico de Cerio (IV)</b>	ALDRICH
<b>Nitrito de isoamilo</b>	ALDRICH
<b>Nitrito de pentilo</b>	ALDRICH
<b>Nitrito de <i>terc</i>-butilo</b>	ALDRICH
<b>Nitrito sódico</b>	PANREAC
<b>Níquel Raney</b>	FLUKA
<b>Óxido de cromo</b>	ALDRICH
<b>Paladio sobre carbono</b>	FLUKA
<b>Paladio (0) tetrakis(trifenilfosfina)</b>	ALDRICH
<b>Pentacloruro de fósforo</b>	MERCK
<b>Piridina</b>	ALDRICH

---

<b>Propiolato de etilo</b>	ALDRICH
<b>Propiolato de metilo</b>	ALDRICH
<b>Reactivo de Lawesson</b>	ALDRICH
<b>Sulfato amónico</b>	ALDRICH
<b>Sulfato de cobre</b>	FLUKA
<b>Sodio metal</b>	FLUKA
<b>Timina</b>	ALDRICH
<b>Tri-<i>n</i>-butilalilestaño</b>	ALDRICH
<b>Tri-<i>n</i>-butilfenilestaño</b>	ALDRICH
<b>(Tri-<i>n</i>-butilestannil)-1-propino</b>	ACROSS
<b>Tri-<i>n</i>-butil-2-tienilestaño</b>	ALDRICH
<b>Tri-<i>n</i>-butilvinilestaño</b>	ALDRICH
<b>Tri-<i>n</i>-butilcianoestaño</b>	ALDRICH
<b>Trietilamina</b>	ALDRICH
<b>Trietilfosfito</b>	ALDRICH
<b>Trifenilarsina</b>	ALDRICH
<b>Trimetilsililtrifluorometanosulfonato</b>	ALDRICH
<b>Tris(trimetilsilil)fosfito</b>	ALDRICH
<b>Yodo</b>	ALDRICH
<b>Yoduro de Cobre (I)</b>	ALDRICH
<b>2-Yodoacetamida</b>	ALDRICH
<b>Yoduro de metilo</b>	ALDRICH



## II.1. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PARTIDA.

### II.1.1. Derivados de azúcares

#### **1,2-Di-*O*-acetil-5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-3-*O*-mesil-D-ribofuranosa<sup>48</sup>**

##### **a) 5-*O*-Benzoil-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-xilofuranosa<sup>48</sup>**

A una disolución de 1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-xilosa (5 g, 26.3 mmol) en diclorometano:piridina (10:1), (100:10 mL) a -20°C se añade lentamente cloruro de benzoilo (4 mL, 28.93 mmol). Se deja subir lentamente la temperatura manteniendo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se vierte sobre agua y hielo, y se extrae con diclorometano (2 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa de HCl 1N (50 mL) y finalmente con agua (2 x 100 mL). Se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 5:1) obteniéndose 6.5 g (84%) de un sólido blanco que se caracteriza como 5-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-xilofuranosa. PF 82-84°C. PF (bibl.<sup>43</sup>) 83.5-84.5°C.

##### **b) 5-*O*-Benzoil-3-*C*-ciano-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-ribofuranosa<sup>48</sup>**

A una suspensión de dicromato de piridinio (4.2 g, 11.1 mmol) en diclorometano seco (20 mL), a 0°C (en baño de agua/hielo), se añade anhídrido acético (5.6 mL). La mezcla resultante se deja agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añade lentamente una disolución de 5-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-

xilofuranosa (5.0 g, 17 mmol) en diclorometano seco (20 mL). La mezcla de reacción resultante se calienta a reflujo durante 30 minutos. Una vez que se alcanza la temperatura ambiente, se vierte sobre acetato de etilo (100 mL) y el precipitado se filtra sobre gel de sílice previamente impregnada en acetato de etilo. El filtrado se evapora sequedad y el residuo resultante se coevapora con tolueno (3 x 50 mL) obteniéndose un sólido blanco (4.38 g) que se identifica como el 3'-ulosilderivado [IR (KBr) 1770  $\text{cm}^{-1}$  (CO furanosilulosa)].

Una mezcla del 3'-ulosilderivado, éter etílico (67 mL), agua (33 mL), bicarbonato sódico (2.78 g, 32.88 mmol) y cianuro sódico (0.81 g, 16.44 mmol) se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez finalizada la reacción se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con éter etílico (2 x 60 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 1:2) obteniéndose un sólido blanco (4.68 g, 90%) que se caracteriza como 5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-ribofuranosa.

**c) 5-*O*-Benzoil-3-*C*-ciano-1,2-*O*-isopropiliden-3-*O*-mesil- $\alpha$ -D-ribofuranosa<sup>48</sup>**

A una disolución de 5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-1,2-*O*-isopropiliden- $\alpha$ -D-xilofuranosa (4.5 g, 14.1 mmol) en piridina seca (75 mL) y a 0°C, se añade cloruro de metanosulfonilo (6.0 mL, 77.5 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a 0°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vierte sobre agua y hielo y se extrae la fase acuosa con diclorometano (2 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan sucesivamente con una disolución acuosa de HCl 1N (2 x 50 mL), agua (2 x 50 mL) y finalmente con una solución acuosa saturada de NaCl (50 mL). El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 2:1) para dar un sólido (5.26 g, 94%) que se identifica espectroscópicamente como 5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-1,2-*O*-isopropiliden-3-*O*-mesil- $\alpha$ -D-ribofuranosa. PF 101,5-102,5°C (EtOH). PF (bibl.<sup>51</sup>) 102-103°C.

**d) 1,2-Di-*O*-acetil-5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-3-*O*-mesil-D-ribofuranosa<sup>48</sup>**

El compuesto anterior (5.0 g, 12.6 mmol) se disuelve en 30 mL de una mezcla 9:1 de ácido trifluoroacético:agua y se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida y se coevapora con diclorometano (2 x 50 mL). El residuo

obtenido se disuelve en piridina seca (38 mL), se añade anhídrido acético (18 mL) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se evapora a presión reducida y el residuo obtenido se coevapora con etanol (2 x 10 mL). El bruto resultante de la reacción se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 2:1) para dar un jarabe blanco (5.2 g, 95%) que se identifica por sus datos analíticos y espectroscópicos como 1,2-di-*O*-acetil-5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-3-*O*-mesil-*D*-ribofuranosa.

### II.1.2. Derivados de nucleósidos

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-*D*-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (TSAO-T, 24)**

**a) 1-(2'-*O*-Acetil-5'-*O*-benzoil-3'-*C*-ciano-3'-*O*-mesil-*b*-*D*-ribofuranosil)-timina<sup>48</sup>**

Sobre una suspensión de timina (1.80 g, 20.2 mmol) en hexametildisilazano (26 mL) se añade sulfato amónico (0.010 g), y la mezcla se calienta a reflujo hasta que se solubiliza el producto. Se evapora el disolvente a presión reducida a temperatura inferior a 30°C, y el residuo obtenido se coevapora con tolueno (10 mL). Sobre el jarabe así obtenido se añade una disolución de 1,2-di-*O*-acetil-5-*O*-benzoil-3-*C*-ciano-3-*O*-mesil-*D*-ribofuranosa (4.5 g, 10.2 mmol) en acetonitrilo seco (52 mL) y a continuación, trimetilsililtriflato (3.65 mL, 15.3 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 2 horas. Seguidamente, se vuelve a añadir trimetilsililtriflato (3.65 mL, 15.3 mmol) y se calienta durante 3 horas adicionales a 80°C. Se enfría la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en diclorometano (100 mL) y se vierte sobre una disolución acuosa de bicarbonato sódico y hielo. Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con diclorometano (2 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se tratan con una disolución saturada de NaCl (50 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 1:2), obteniéndose 4.34 g (84%) de una espuma que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como 1-(2'-*O*-acetil-5'-*O*-benzoil-3'-*C*-ciano-3'-*O*-mesil-β-*D*-ribofuranosil)timina.

**b) [1-[*b*-D-Ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (1.4)<sup>48</sup>**

El compuesto anterior (4.30 g, 8.47 mmol) se disuelve en acetonitrilo seco (70 mL), se añade carbonato de Cesio (2.76 g, 8.47 mmol), y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtra, se neutraliza el filtrado con ácido acético y finalmente se evapora el disolvente a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se trata con una solución de metilamina en etanol (100 mL) a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evapora a sequedad a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna (diclorometano:metanol, 10:1) para dar 2.14 g (70%) de un sólido blanco que se identifica espectroscópicamente como [1-[*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido).

**c) [1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (TSAO-T, 24)<sup>48</sup>**

A una suspensión de [1-[*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (**1.4**) (2.0 g, 5.50 mmol) en acetonitrilo seco (120 mL), se añade 4-dimetilaminopiridina (2.68 g, 22.0 mmol) y cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl) (3.30 g, 22.0 mmol). Se comprueba que el pH está entre 7-8, y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida, y el residuo obtenido se trata con acetato de etilo (150 mL) y disolución acuosa de HCl 1N (75 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (2 x 75 mL). Se combinan las fases orgánicas y se lavan sucesivamente con agua y disolución acuosa saturada de NaCl. Finalmente se seca la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 2:1) para dar 2.5 g (80%) de un sólido amorfo que se identifica por sus datos analíticos y espectroscópicos como TSAO-T (**24**).

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (TSAO-*m*<sup>3</sup>T, 25)<sup>48</sup>**

Una disolución de **24** (1.0 g, 1.69 mmol), carbonato potásico (0.25 g, 1.85 mmol) y yoduro de metilo (188  $\mu$ L, 3.28 mmol) en acetona seca (6 mL) se calienta a reflujo durante 2 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida, y el residuo obtenido se trata con acetato de etilo (100 mL) y disolución saturada de NaCl (100 mL). Se decanta la fase orgánica, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía de columna (hexano:acetato de etilo, 1:1), para dar 0.98 g (95%) de un sólido amorfo que se identifica por sus datos analíticos y espectroscópicos como TSAO-*m*<sup>3</sup>T (**25**).

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-xilofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (1.23)<sup>43b</sup>**

Siguiendo el procedimiento de alquilación descrito para la síntesis de TSAO-*m*<sup>3</sup>T, una disolución de [1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-xilofuranosil]-timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido)<sup>43</sup> (0.20 g, 0.34 mmol), carbonato potásico (0.02 g, 0.37 mmol) e yoduro de metilo (95  $\mu$ L, 0.68 mmol) en acetona (5 mL) se calienta a reflujo durante 4 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida, y el residuo obtenido se trata con acetato de etilo (20 mL) y disolución saturada de NaCl (3 x 10 mL). Se decanta la fase orgánica, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1), obteniéndose 0.20 g (98%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como [1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-xilofuranosil]-3-*N*-(metil)timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (**1.24**)<sup>43b</sup>. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 0.88, 0.89 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.92 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.96 (d, 2H, *J*<sub>4',5'</sub> = 5.2 Hz, 2H-5'), 4.57 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 4.2 Hz, H-2'), 4.67 (t, 1H, H-4'), 5.65 (s, 1H, H-3''), 6.14 (d, 1H, H-1'), 6.30 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.48 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 49.72; H, 7.51; N, 6.96. Hallado: C, 49.62; H, 7.52; N, 6.93.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-[3-hidroxiopropil-  
timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.1)<sup>124</sup>**

Sobre una disolución de TSAO-T (24) (0.2 g, 0.34 mmol) en acetona seca (5 mL), se añade carbonato potásico triturado y seco (0.02 g, 0.37 mmol) y 3-bromopropanol (0.09 mL, 1.02 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 5 h. Una vez completada la reacción se deja que se alcance la temperatura ambiente y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en diclorometano (15 mL) y se lava con una disolución acuosa de NaCl (2 x 15 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 1:2), obteniéndose un sólido blanco amorfo (0.17 g, 77%) que se identifica como **3.1**<sup>124</sup>. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.82, 0.98 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.95 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.55 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>, OH), 4.10 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OH, 2H-5'), 4.34 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-4'), 4.67 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.1 Hz, H-2'), 5.78 (s, 1H, H-3''), 6.10 (d, 1H, H-1'), 6.48 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.52 (d, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ: 12.87 (CH<sub>3</sub>-5), 18.34, 19.01 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.69, 26.22 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 30.38 (CH<sub>2</sub>), 38.20 (NCH<sub>2</sub>), 58.56 (CH<sub>2</sub>OH), 62.11 (C-5'), 74.72 (C-2'), 83.60, 87.70 (C-4', C-3''), 92.15 (C-3'), 93.25 (C-1'), 110.99 (C-5), 134.11 (C-6), 150.52, 151.25 (C-2, C-4''), 163.85 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub> C, 50.05; H, 7.26; N, 6.49. Hallado: C, 50.12; H, 7.35; N, 6.29.

## II.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS TSAO MODIFICADOS EN LA POSICIÓN 4'' DEL ANILLO DE ESPIROAMINOOXATIOLDIÓXIDO

### II.2.1. Síntesis del análogo desaminado de TSAO-T

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-  
espiro-5''-(1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) y [1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribo-  
furanosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-nitro-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido)  
(1.1 y 1.3)**

A una disolución de *n*-pentilnitrito (1.15 mL, 8.3 mmol) en THF seco (10 mL) a reflujo y bajo atmósfera de argón se añade gota a gota una disolución de TSAO-m<sup>3</sup>T **25**

(0.25 g, 0.41 mmol) en THF seco (8 mL). La mezcla de reacción manteniendo el reflujo se somete a la acción de una lámpara de tungsteno de 160W colocada aproximadamente a 0.07 metros de la mezcla de reacción durante 30 minutos. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en metanol (1 mL) y diclorometano (9 mL), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora a sequedad. El residuo finalmente obtenido se purifica dos veces en el cromatotrón primero utilizando como eluyente (hexano:acetato de etilo, 2:1) y posteriormente con (diclorometano:metanol, 200:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.036 g (15%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **1.1**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.81, 0.99 (2s, 18H, *t*-Bu), 1.92 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.91 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'a</sub> = 2.7, *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 12.1 Hz, H-5'a), 4.07 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'b</sub> = 4.3 Hz, H-5'b), 4.36 (dd, 1H, H-4'), 4.66 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 6.19 (d, 1H, H-1'), 7.23 (d, 1H, *J*<sub>3'',4''</sub> = 6.5 Hz, H-4''), 7.44 (d, 1H, H-3''), 7.48 (d, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 13.15 (CH<sub>3</sub>-5), 18.40, 18.88 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.79, 26.48 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 28.04 (CH<sub>3</sub>-3), 63.24 (C-5'), 76.31 (C-2'), 85.43 (C-4'), 88.14 (C-1'), 96.41 (C-3'), 111.39 (C-5), 129.72 (C-6), 133.78, 137.57 (C-3'', C-4''), 152.11 (C-2), 163.44 (C-4). MS(ES+) *m/z* 598.3 (M + Na)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 50.99; H, 7.53; N, 4.76. Hallado: C, 50.90; H, 7.51; N, 4.65.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.078 g (29%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **1.3**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.79, 0.90 (2s, 18H, *t*-Bu), 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-5), 3.26 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-3), 4.15 (m, 2H, 2H-5'), 4.51 (m, 1H, H-4'), 4.98 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.1 Hz, H-2'), 6.11 (d, 1H, H-1'), 7.50 (s, 1H, H-6), 8.99 (s ancho, 1H, NH), 9.33 (s ancho, 1H, NH). MS (ES+) *m/z* 649.3 (M + 1)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 46.28; H, 6.83; N, 8.63. Hallado: C, 46.21; H, 6.77; N, 8.69.

## II.2.2. Síntesis de derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4''

### (4''S)-4'',O-5'-hemiacetal cíclico de [1-(*b*-D-ribofuranosil)timina]-3'-espiro-5''-(4''-oxo-1'',2''-oxatolano-2'',2''-dióxido) (**1.6**)

A una disolución de **1.4**<sup>48</sup> (0.2 g, 0.55 mmol) en metanol (5 mL, a 0°C, se le añade una disolución de HCl 0.1 N en metanol (30 mL) y la mezcla de reacción se mantiene a

temperatura ambiente durante 24 h. A continuación se neutraliza a pH = 5, con una solución de NaOH 1N en metanol y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo así obtenido se trata con isobutanol (30 mL) y agua (30 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con isobutanol (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo finalmente obtenido se purifica por cromatografía de columna (diclorometano:etanol, 6:1), obteniéndose 0.15 g (70%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **1.6**. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN de **1.6** muestran que en solución de dimetilsulfóxido deuterado [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO], el cetónucleósido **1.6** se encuentra en forma hemiacetálica. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] δ: 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-5), 3.65 (d, 1H, J<sub>3''a,3''b</sub> = 14.0 Hz, H-3''a), 4.03 (dd, 1H, J<sub>4',5'a</sub> = 3.6, J<sub>5'a,5'b</sub> = 10.4 Hz, H-5'a), 4.05 (d, 1H, H-3''b), 4.13 (dd, 1H, J<sub>4',5'b</sub> = 5.2 Hz, H-5'b), 4.64 (dd, 1H, J<sub>2',OH</sub> = 6.8, J<sub>1',2'</sub> = 7.2 Hz, H-2'), 4.58 (dd, 1H, H-4'), 5.87 (d, 1H, H-1'), 6.03 (d, 1H, OH), 7.59 (m, 1H, H-6), 8.41 (s ancho, 1H, OH), 11.47 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] δ: 11.87 (CH<sub>3</sub>-5), 54.85 (CH<sub>2</sub>-3''), 68.92 (C-5'), 69.39 (C-2'), 82.72 (C-4'), 89.75 (C-1'), 96.36 (C-4''), 107.67 (C-3'), 110.14 (C-5), 135.71 (C-6), 150.40 (C-2), 163.35 (C-4). MS (ES+) m/z 363.1 (M + 1)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S: C, 37.90; H, 4.24; N, 7.37. Hallado: C, 37.80; H, 4.33; N, 7.22.

**(4''S)-4'',O-5'-hemiacetal cíclico de [1-[2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-oxo-1'',2''-oxatiolano-2'',2''-dióxido) (1.7)**

A una disolución de **1.4**<sup>48</sup> (0.2 g, 0.55 mmol) en metanol (5 mL, a 0°C, se le añade una disolución de HCl 0.1 N en metanol (30 mL) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación se neutraliza a pH = 5, con una solución de NaOH 1N en metanol y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo así obtenido se disuelve en acetonitrilo seco (8 mL) se le añade TBDMSCl (0.16 g, 1.03 mmol) y DMAP (0.13 g, 1.06 mmol) manteniendo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se trata con acetato de etilo, se filtra sobre gel de sílice y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (diclorometano: metanol, 5:1), obteniéndose 0.09 g (71%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **1.7**. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.88 (s, 9H, *t*-Bu), 1.85 (d, 3H, J = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.62 (d, 1H, J<sub>3''a,3''b</sub> = 13.9 Hz, H-3''a),

4.03 (d, 1H, H-3''b), 4.20 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 2.9$ ,  $J_{5'a,5'b} = 10.7$  Hz, H-5'a), 4.15 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.9$  Hz, H-5'b), 4.79 (dd, 1H, H-4'), 4.93 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.1$  Hz, H-2'), 6.02 (d, 1H, H-1'), 7.44 (s ancho, 1H, OH), 7.58 (d, 1H, H-6), 10.25 (s ancho, 1H, NH-3).  $^{13}\text{C}$  RMN [50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 12.27 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.04 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.55 [ $(\text{C-CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 56.08 ( $\text{CH}_2$ -3''), 70.09 (C-5'), 71.91 (C-2'), 83.48 (C-4'), 95.38 (C-1'), 98.17 (C-4''), 109.8 (C-5), 111.93 (C-3'), 130.93 (C-6), 150.35 (C-2), 163.76 (C-4). MS (ES+)  $m/z$  477.2 ( $M + 1$ )<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{SSi}$ : C, 45.36; H, 5.92; N, 5.88. Hallado: C, 45.44; H, 5.87; N, 5.91.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metilimina]-3'-espiro-5''-[4''-metoxalilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.8)**

*Método A*

A una disolución de TSAO- $m^3T$  (**25**)<sup>48</sup> (0.2 g, 0.33 mmol) en dicloroetano seco (3 mL) a 0°C se añade  $\text{Et}_3\text{N}$  (71  $\mu\text{L}$ , 0.99 mmol) y cloruro de metiloxalilo (22  $\mu\text{L}$ , 0.47 mmol). Se comprueba que el pH sea ligeramente básico (pH = 8-9), y si no es así, se añade  $\text{Et}_3\text{N}$  hasta conseguirlo. La mezcla de reacción se calienta a 60°C durante 1 hora. Una vez completada la reacción, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en diclorometano (7 mL) y se lava, con una solución acuosa de HCl 0.1N (2 x 3 mL) y finalmente con agua (2 x 4 mL), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo así obtenido se purifica en el cromatotrón (diclorometano:acetato de etilo, 10:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.08 g (35%) de una espuma blanca que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como **1.8**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.70, 0.79 (2s, 18H, *tert*-Bu), 1.97 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.92 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 2.3$ ,  $J_{5'a,5'b} = 13.0$  Hz, H-5'a), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 2.2$  Hz, H-5'b), 4.48 (t, 1H, H-4'), 4.97 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, H-2'), 6.07 (d, 1H, H-1'), 7.77 (s, 1H, H-3''), 7.94 (d, 1H, H-6), 10.60 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}\text{C}$  RMN [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.92 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.33, 19.05 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.68, 26.23 [ $(\text{C-CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.11 ( $\text{CH}_3$ -3), 54.26 ( $\text{OCH}_3$ ), 61.86 (C-5'), 73.78 (C-2'), 83.23, 88.92 (C-1', C-4'), 92.43 (C-3'), 110.26 (C-3''), 111.19 (C-5), 134.01 (C-6), 139.43 (C-4''), 151.12 (C-2), 155.59 ( $\text{CO-CO}_2\text{CH}_3$ ), 159.12 ( $\text{C=O-CO}_2\text{CH}_3$ ), 163.01 (C-4). Análisis elemental (%):

Calculado para  $C_{28}H_{47}N_3O_{11}SSi_2$ : C, 48.74; H, 6.87; N, 6.09. Hallado: C, 48.59; H, 6.75; N, 5.94.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.041 g (41%) de producto de partida (TSAO- $m^3T$ , **25**) sin reaccionar.

#### *Método B*

A una disolución de **25** (0.1 g, 0.17 mmol) en dicloroetano seco (1 mL) sobre tamiz molecular 4 Å, se añade una disolución de cloruro de metiloxalilo (18 µL, 0.19 mmol) y tricloruro de aluminio (0.014 g, 0.19 mmol) en dicloroetano seco (1 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez completada la reacción, se añade una mezcla de agua y hielo y la mezcla resultante se agita durante una hora adicional. A continuación, se filtra la reacción sobre celita y el filtrado se lava con agua (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo así obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.75 g (66%) de una espuma blanca que se caracterizó como **1.8**.

De las fracciones de menor movilidad se obtuvieron 0.018 g (18%) de producto de partida TSAO- $m^3T$  (**25**) sin reaccionar.

#### **[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-oxaloamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.9)**

A una disolución de **1.8** (0.1 g, 0.14 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL) se añade una solución acuosa de NaOH 1N (0.16 mL, 0.16 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se añade una disolución acuosa de HCl 0.1N hasta conseguir un pH ligeramente ácido (pH 5) y posteriormente, acetato de etilo (10 mL) y agua (5 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (2 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (5 mL), se secan sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo así obtenido se purifica en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 15:1), obteniéndose 0.098 g (70%) de una espuma blanca que se identifica como **1.9**.  $^1H$  RMN [300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.77, 0.96 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.97 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $CH_3-5$ ),

3.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.2$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.0$  Hz, H-5'a), 4.20 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.3$  Hz, H-5'b), 4.44 (t, 1H, H-4'), 4.95 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, H-2'), 6.05 (d, 1H, H-1'), 7.79 (s, 1H, H-3''), 7.94 (d, 1H, H-6), 10.79 (s ancho, 1H, NH-4''). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 13.07 (CH<sub>3</sub>-5), 18.34, 19.77 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.68, 27.16 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 29.03 (CH<sub>3</sub>-3), 62.77 (C-5'), 74.84 (C-2'), 84.61 (C-4'), 87.42, 94.53 (C-3', C-1'), 111.34, 111.58 (C-3'', C-5), 134.07 (C-6), 140.61 (C-4''), 152.17 (C-2), 162.05 (CONH), 163.30 (C-4), 167.15 (COOH). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 47.98; H, 6.71; N, 6.22. Hallado: C, 47.77; H, 6.81; N, 6.05.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-oxamoilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.10)**

El compuesto **1.9** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con una disolución saturada de NH<sub>3</sub>/metanol (5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 45 minutos, se neutraliza con ácido acético y se evapora a sequedad. El residuo así obtenido se disuelve en diclorometano (20 mL) y se lava con agua (2 x 10 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (1 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (diclorometano:acetato de etilo, 10:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.021 g (21%) de una espuma blanca que se caracterizó como TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**).

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.054 g (52%) de una espuma blanca que se identifica como **1.10**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.78, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-5), 3.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 2.2$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.9$  Hz, H-5'a), 4.31 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.7$  Hz, H-5'b), 4.43 (dd, 1H, H-4'), 4.72 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.3$  Hz, H-2'), 6.25 (d, 1H, H-1'), 7.64 (s ancho, 1H, NH), 7.50 (s, 1H, H-6), 7.78 (s, 1H, H-3''), 8.15 (s ancho, 1H, NH), 10.65 (s ancho, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 13.01 (CH<sub>3</sub>-5), 18.30, 19.73 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.57, 26.89 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 28.64 (CH<sub>3</sub>-3), 62.70 (C-5'), 74.98 (C-2'), 84.69, 86.95 (C-1', C-4'), 94.49 (C-3'), 110.71, 111.59 (C-3'', C-5), 133.76 (C-6), 140.56 (C-4''), 152.19 (C-2), 160.58 (COCONH<sub>2</sub>), 160.81 (COCONH<sub>2</sub>), 163.31 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 48.05; H, 6.87; N, 8.30. Hallado: C, 48.10; H, 6.77; N, 8.14.

### II.2.2.1 Síntesis de derivados TSAO portadores de grupos carbonilo en la posición 4'' por reacciones con isocianatos

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-ureido-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) y [1-[2',5'-di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-*terc*-butildimetilsilil)-ureido-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.12 y 1.13)**

A una disolución de TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.2 g, 0.33 mmol) en diclorometano seco (5 mL), bajo atmósfera de argón y a  $-30^\circ\text{C}$ , se añade clorosulfonilisocianato (CSI) (0.19 g, 1.32 mmol) y se mantiene la agitación durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se neutraliza con una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 mL), se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo así obtenido se disuelve en acetonitrilo seco (2 mL), se añade TBDMSCl (0.098 g, 0.66 mmol) y DMAP (0.08 g, 0.66 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 horas, y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en diclorometano (15 mL), se lava con una disolución acuosa de HCl 0.1N (3 x 10 mL) y con agua (1 x 10 mL), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.87 g (35%) de una espuma blanca que se caracteriza como **1.13**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:  $\delta$  0.82, 0.96 (2s, 18H, *2t*-Bu), 1.92 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.95 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.9$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.0$  Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.5$  Hz, H-5'b), 4.30 (dd, 1H, H-4'), 5.07 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.7$  Hz, H-2'), 5.57 (d, 1H, H-1'), 6.13 (s ancho, 1H, NHSi), 7.13 (s, 1H, H-3''), 7.69 (d, 1H, H-6), 9.05 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.94 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.48, 18.81 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.77, 26.19, 26.41 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.05 ( $\text{CH}_3$ -3), 61.73 (C-5'), 73.59 (C-2'), 84.73 (C-4'), 89.86 (C-3'), 95.12 (C-1'), 100.85 (C-3''), 111.64 (C-5), 138.29 (C-6), 144.35 (C-4''), 152.43 (C2), 154.54 ( $\text{C=ONHSi}$ ), 163.31 (C-4). MS (ES+)  $m/z$  785.3 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ . Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{32}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_9\text{SSi}_3$ : C, 50.50; H, 7.94; N, 7.46. Hallado: C, 50.45; H, 7.89; N, 7.49.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.085 g (40%), de una espuma blanca que se caracteriza como **1.12**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.82, 0.88 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.93 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.89 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 6.7$ ,  $J_{5'a,5'b} = 11.9$  Hz, H-5'a), 4.06 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.3$  Hz, H-5'b), 4.17 (dd, 1H, H-4'), 5.06 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.5$  Hz, H-2'), 5.54 (d, 1H, H-1'), 6.09 (s ancho, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 7.12 (s, 1H, H-3''), 7.66 (d, 1H, H-6), 9.05 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.91 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.56, 18.93 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.79, 26.16 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.12 ( $\text{CH}_3$ -3), 61.73 (C-5'), 73.74 (C-2'), 84.48 (C-4'), 89.23 (C-3'), 96.31 (C-1'), 100.60 (C-3''), 111.03 (C-5), 139.04 (C-6), 145.58 (C-4''), 152.53 (C2), 154.50 ( $\text{CONH}_2$ ), 163.21 (C-4). MS (ES+)  $m/z$  669.3 ( $\text{M} + \text{Na}$ )<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9\text{SSi}_2$ : C, 48.27; H, 7.17; N, 8.66. Hallado: C, 48.16; H, 7.12; N, 8.72.

*Procedimiento general de acilación de TSAO- $m^3T$  con isocianatos sustituidos*

Sobre una disolución de TSAO- $m^3T$  (**25**) (1 mmol) en acetonitrilo seco se añade el isocianato correspondiente (4-20 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 80°C entre 3-96 horas. Se evapora el disolvente a sequedad y el residuo se purifica en el cromatotrón. A continuación, se indica para cada compuesto el tiempo de reacción, el número de mmol de isocianato, el eluyente utilizado en la cromatografía, el rendimiento de los productos aislados y los datos analíticos y espectroscópicos.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-etilureido)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.14)**

TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) se hace reaccionar con isocianato de etilo (260  $\mu\text{L}$ , 3.3 mmol) durante 96 horas, siguiendo el procedimiento general. El residuo finalmente obtenido se purifica en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 200:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.058 g (50%) de una espuma blanca que se identifica como **1.14**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.83, 0.89 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.15 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.93 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.25 (cd, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.88 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 6.7$ ,  $J_{5'a,5'b} = 11.9$  Hz, H-5'a), 4.08 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.5$  Hz, H-5'b), 4.18 (dd, 1H, H-4'), 5.04 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.6$  Hz, H-2'), 5.50 (d, 1H, H-1'), 6.18 (t, 1H, NH), 7.12 (s, 1H, H-3''), 7.67 (d, 1H, H-6), 8.87

(s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.91 ( $\text{CH}_3$ -5), 15.36 ( $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}$ ), 18.39, 18.81 [ $(\text{CH}_3)_3-\text{C}-\text{Si}$ ], 25.72, 26.18 [ $(\text{CH}_3)_3-\text{C}-\text{Si}$ ], 28.03 ( $\text{CH}_3$ -3), 35.61 ( $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 61.60 (C-5'), 73.55 (C-2'), 84.38 (C-4'), 89.25 (C-3'), 96.45 (C-1'), 100.06 (C-3''), 111.63 (C-5), 138.89 (C-6), 145.41 (C-4''), 152.34 (C-2), 153.67 ( $\text{NHCONH}$ ), 163.17 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_9\text{SSi}_2$ : C, 49.83; H, 7.47; N, 8.30. Hallado: C, 49.73; H, 7.39; N, 8.46.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.048 g (48%) del producto de partida inalterado.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-benzoilureido)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.16a)**

Siguiendo el procedimiento general, TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) se trata con isocianato de benzoilo (0.12 mL, 1.02 mmol) durante 26 horas. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1) obteniéndose 0.12 g (90%) de una espuma blanca que se identifica como **1.16a**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.78, 0.85 (2s, 18H, *t*-Bu), 1.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -5), 3.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 4.06 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.7$ ,  $J_{5'a,5'b} = 10.9$  Hz, H-5'a), 4.21 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 6.3$  Hz, H-5'b), 4.41 (dd, 1H, H-4'), 4.97 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H-2'), 6.08 (d, 1H, H-1'), 7.45 (s, 1H, H-3''), 7.68-7.70 (m, 4H, H-6, Ph), 8.15 (d, 1H,  $J = 6.9$  Hz, Ph), 8.17 (d, 1H, Ph), 10.60 (s ancho, 1H, NH), 11.40 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 13.11 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.30, 19.02 [ $(\text{CH}_3)_3-\text{C}-\text{Si}$ ], 25.71, 26.22 [ $(\text{CH}_3)_3-\text{C}-\text{Si}$ ], 28.07 ( $\text{CH}_3$ -3), 62.12 (C-5'), 74.54 (C-2'), 85.18 (C-4'), 89.26 (C-1'), 92.14 (C-3'), 107.41 (C-3''), 111.53 (C-5), 129.24 (Ph), 129.91 (Ph), 132.40 (Ph), 134.95, 135.18 (Ph, C-6), 142.50 (C-4''), 151.26 ( $\text{NHCONH}$ ), 152.04 (C-2), 163.42 (C-4), 170.52 ( $\text{COPh}$ ). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{SSi}_2$ : C, 52.78; H, 6.71; N, 7.46. Hallado: C, 52.69; H, 6.69; N, 7.55.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-etoxicarbonilureido)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.16b)**

De acuerdo con el procedimiento general, TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) se trata con isocianato de etoxicarbonilo (41  $\mu\text{L}$ , 0.51 mmol) durante 3 horas. El residuo finalmente obtenido se purifica en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 200:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.095g (80%) de una espuma blanca que se identifica como de **1.16b**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.89 (2s, 18H, *2t*-Bu), 1.34 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.96 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.8$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.2$  Hz, H-5'a), 4.15 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 6.3$  Hz, H-5'b), 4.38 (m, 3H, H-4',  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.87 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz, H-2'), 6.03 (d, 1H, H-1'), 7.36 (s, 1H, H-3''), 7.55 (d, 1H, H-6), 10.01 (s ancho, 1H, NH-4''), 10.52 (s ancho, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 13.06 ( $\text{CH}_3$ -5), 14.45 ( $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2\text{O}$ ), 18.35, 19.02 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.68, 26.23 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.04 ( $\text{CH}_3$ -3), 55.71 ( $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2\text{O}$ ), 62.05 (C-5'), 74.56 (C-2'), 85.09 (C-4'), 89.19 (C-3'), 91.83 (C-1'), 106.61 (C-3''), 111.47 (C-5), 135.09 (C-6), 142.48 (C-4''), 150.50, 151.97 (C-2,  $\text{NHCONH}$ ), 156.18 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 163.36 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{SSi}_2$ : C, 48.45; H, 7.01; N, 7.79. Hallado: C, 48.33; H, 7.09; N, 7.88.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.005 g (5%) de producto de partida (TSAO- $m^3\text{T}$ , **25**) inalterado.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-metacrilolureido)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.16c)**

De acuerdo con el procedimiento general, TSAO- $m^3\text{T}$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) se trata con isocianato de 1-metacrililo (0.12 g, 1.02 mmol) durante 72 horas. El residuo final se purifica en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 60:1) obteniéndose 0.09 g (75%) de una espuma blanca que se identifica como **1.16c**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.78, 0.97 (2s, 18H, *2t*-Bu), 1.90 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 2.70 (s, 3H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ), 3.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.97 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.8$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.2$  Hz, H-5'a), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 6.4$  Hz, H-5'b), 4.36 (dd, 1H, H-4'), 4.83 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz, H-2'), 5.85 (m, 1H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_{2a}$ ), 6.03 (d, 1H, H-1'), 6.18 (m, 1H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_{2b}$ ), 7.35 (s, 1H, H-3''), 7.56 (d, 1H, H-6), 10.17 (s ancho, 1H, NH-4''), 11.24 (s ancho, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  RMN [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 13.02 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.20 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_{2b}$ ), 18.32, 19.02 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.57, 26.20 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.10 ( $\text{CH}_3$ -3), 62.11 (C-5'), 74.63 (C-2'), 85.12, 88.88 (C-4', C-1'), 91.92 (C-3'), 107.21 (C-3''), 111.54 (C-5), 125.73 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ), 134.88 (C-6), 139.02 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ), 142.42 (C-4''), 151.19, 152.02 (C-2,  $\text{NHCONH}$ ), 163.41 (C-4), 171.42 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{SSi}_2$ : C, 50.40; H, 7.05; N, 7.84. Hallado: C, 50.36; H, 7.11; N, 7.86.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-(3-etoxicarbonilmetilcureido)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido], y [1-[2',5'-di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-[3''-(etoxicarbonilmetil)-2'',4''-dioxoimidazolidin-1''-il]-carbonilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.18 y 1.19)**

Una disolución de TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) en acetonitrilo seco (2 mL) se hace reaccionar con isocianato de acetato de etilo (34  $\mu$ L, 0.34 mmol) en presencia de  $Et_3N$  (10  $\mu$ L, 0.07 mmol) en tubo cerrado a 100°C durante 12 horas. Se evapora el disolvente a sequedad y el residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 4:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aislan 0.06 g (52%) de una espuma blanca que se caracteriza como **1.18**.  $^1H$  RMN [300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.84, 0.88 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.25 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1.93 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $CH_3-5$ ), 3.33 (s, 3H,  $CH_3-3$ ), 3.92 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 7.0$ ,  $J_{5'a,5'b} = 11.9$  Hz, H-5'a), 4.24-4.40 (m, 6H,  $CH_2CO_2CH_2CH_3$ , H-4', H-5'b), 5.07 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.5$  Hz, H-2'), 5.53 (d, 1H, H-1'), 6.53 (m, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-3''), 7.69 (d, 1H, H-6), 9.30 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}C$  RMN [75 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 14.35, 14.56 ( $CH_3-CH_2$ ,  $CH_3-5$ ), 18.55, 18.79 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 25.84, 26.23 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 29.03 ( $CH_3-3$ ), 42.55 ( $CH_2CO_2CH_2CH_3$ ), 61.62 (C-5'), 73.50 (C-2'), 84.45 (C-4'), 89.21 (C-3') 97.44 (C-1'), 100.67 (C-3''), 111.75 (C-5), 139.01 (C-6), 145.51 (C-4''), 152.52 (C-2), 153.95 (NHCONH), 163.18 (C-4), 170.42 ( $CO_2CH_2CH_3$ ).MS (ES+)  $m/z$  733.3 (M + 1)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para  $C_{30}H_{52}N_4O_{11}SSi_2$ : C, 49.16; H, 7.25; N, 7.64. Hallado: C, 49.10; H, 7.12; N, 7.96.

De las fracciones de movilidad intermedia se aislan 0.042 g (30%) de una espuma blanca que se caracteriza como **1.19**.  $^1H$  RMN [400 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.79, 0.87 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.27 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1.93 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $CH_3-5$ ), 3.26 (s, 3H,  $CH_3-3$ ), 4.03 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 5.0$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.3$  Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 5.7$  Hz, H-5'b), 4.22 (m, 2H,  $J = 1.6$ ,  $J = 7.0$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 4.44 (m, 3H, H-4',  $CH_2N$ ), 4.60 (m, 2H,  $J = 17.9$ ,  $J = 15.6$  Hz,  $CH_2$ ), 4.84 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz, H-2'), 6.02 (d, 1H, H-1'), 7.43 (s, 1H, H-3''), 7.55 (d, 1H, H-6), 10.25 (s ancho, 1H, NH-4'').  $^{13}C$  RMN [100 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 13.01 ( $CH_3-5$ ), 14.39 ( $CH_3CH_2O$ ), 18.34, 19.01 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 25.69, 26.22 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 28.05 ( $CH_3-3$ ), 40.61 ( $CH_2-N$ ), 48.70 ( $CH_2$ -ciclo), 62.03 (C-5'), 62.67 ( $CH_2OOC$ ), 74.70 (C-2'), 85.01 (C-4'), 89.34 (C-1'), 91.37 (C-3'), 107.23 (C-3''), 111.49 (C-5), 135.09 (C-6),

142.38 (C-4''), 148.30 (CH<sub>2</sub>CON), 151.96 (C-2), 156.64 (NCON), 163.34 (C-4), 167.09 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 167.50 (NHCON). MS (ES-) m/z 814.5 (M - 1)<sup>-</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>33</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>SSi<sub>2</sub> C, 48.57; H, 6.55; N, 8.38. Hallado: C, 49.27; H, 6.44; N, 8.10.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.01 g (10%) del producto de partida inalterado (**25**).

**[1-[2'-O-(*terc*-Butildimetilsilil)-5'-O-(metoxycarbonilacetil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-(metil)timina]-3'-espiro-5''-[4''-imino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.21)**

Siguiendo el método B descrito en la página 127, **25** (0.1 g, 0.17 mmol) se hace reaccionar con cloruro de acetilacetato de metilo (25 µL, 0.34 mmol) y tricloruro de aluminio (0.028 g, 0.38 mmol) durante una hora. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo 2:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aislan (0.04 g, 40%) de una espuma blanca que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como **1.21**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.89 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.91 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.50 (AB, *J* = 16.3 Hz, CH<sub>2</sub>-3''), 3.69 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.07 (AB, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.25 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'</sub> = 4.9 Hz, H-5a'), 4.30 (AB, 1H, *J* = 14.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.25 (dd, 1H, *J*<sub>5a',5b'</sub> = 10.8 Hz, H-5b'), 4.84 (dd, 1H, *J* = 2.0, *J*<sub>4',5'b</sub> = 4.94 Hz, H-4'), 4.90 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 5.3 Hz, H-2'), 5.82 (d, 1H, H-1'), 7.60 (d, 1H, H-6), 8.76 (s ancho, 1H, NH-4''). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 13.02 (CH<sub>3</sub>-5), 17.58 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.04 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 26.96 (CH<sub>3</sub>-3), 42.13 (CH<sub>2</sub>-3''), 51.61 (OCH<sub>3</sub>), 53.23 (CH<sub>2</sub>), 71.06 (C-5'), 72.62 (C-2'), 84.29 (C-4'), 95.22 (C-1'), 97.27 (C-3'), 110.18 (C-5), 133.27 (C-6), 151.15 (C-2), 162.51 (C-4), 166.04, 166.11 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 167.91 (C-4''). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>SSi: C, 46.85; H, 5.98; N, 7.13. Hallado: C, 46.95; H, 6.02; N, 7.15.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen (0.034 g, 34%) de producto de partida **25** sin reaccionar.

**[1-[2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-metoxalilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.22)**

Para realizar los estudios de estabilidad el derivado **1.8** (0.01 g), se disuelve en 1 mL de una mezcla [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO: H<sub>2</sub>O, 1:1] y se realizan experimentos de 1H RMN a tiempo 0 h, 24 h, 48h, y 72 h. A las 72 h se detecta un 80% del derivado desprotegido en la posición 5' del azúcar **1.22**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] δ: 0.70 (s, 9H, *t*-Bu), 1.90 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.87 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.79-3.91 (m, 2H, 2H-5'), 4.41 (s, 1H, H-4'), 4.60 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, H-2'), 5.28 (s ancho, 1H, OH), 6.08 (d, 1H, H-1'), 7.57 (s, 1H, H-6), 7.93 (d, 1H, H-3''), 11.60 (s ancho, 1H, NH-4'').

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-xilofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-metoxalilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (1.24)**

Siguiendo el método B descrito en la página 127, [1-[2',5'-di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-xilofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) **1.23**<sup>43b</sup> (0.1 g, 0.17 mmol) se hace reaccionar con cloruro de metiloxalilo (18 μL, 0.19 mmol) durante una hora. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo 2:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aislan (0.06 g, 53%) de una espuma blanca que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como **1.24**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.82, 0.86 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.92 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.94 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (d, 2H, *J*<sub>4',5'</sub> = 6.0 Hz, 2H-5'), 4.69 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 3.9 Hz, H-2'), 4.93 (t, 1H, H-4'), 6.26 (d, 1H, H-1'), 7.41 (d, 1H, H-6), 7.65 (s, 1H, H-3''), 9.51 (s ancho, 1H, NH-4''). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 48.74; H, 6.87; N, 6.09. Hallado: C, 48.50; H, 6.62; N, 6.15.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen (0.034 g, 34%) de producto de partida **1.23** sin reaccionar.

## II.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS TSAO SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 3'' DEL ANILLO DE ESPIROAMINOOXATIOLDIÓXIDO

### II.3.1. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' y 4'' por reacciones de alquilación

[1-[2',5'-Di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-metilamino-3''-metil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] y [1-[2',5'-di-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-metil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.3 y 2.4)

A una disolución de TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) en dioxano seco (5 mL) se añade KOH (0.014 g, 0.25 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos. Seguidamente, se añade yoduro de metilo (48  $\mu$ L, 0.34 mmol), manteniendo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se neutraliza con ácido acético y se trata con acetato de etilo (30 mL) y una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (20 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución acuosa saturada de NaCl (25 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo así obtenido se disuelve en acetonitrilo seco (5 mL), se añade 4-dimetilaminopiridina (0.083 g, 0.68 mmol) y TBDMSCl (0.10 g, 0.68 mmol) manteniendo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disuelve en acetato de etilo (20 mL) y se lava con agua (1 x 20 mL). Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se trata con acetato de etilo (2 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan sucesivamente con una solución acuosa fría (4°C) de HCl 1N (1 x 20 mL), agua (1 x 20 mL) y con una solución saturada de NaCl (1 x 20 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aislan 0.020 g (20%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.3**. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ : 0.81, 0.98 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.98 (d, 3H,  $J$ =1.1 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3''), 3.08 (d, 3H,  $J_{CH_3,NH}$ =5.1 Hz, CH<sub>3</sub>-4''), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.80 (dd, 1H,  $J_{4',5'a}$  = 2.4,  $J_{5'a,5'b}$  = 12.2 Hz, H-5'a), 3.96 (dd, 1H,  $J_{4',5'b}$  = 2.8 Hz, H-5'b), 4.26 (t, 1H, H-4'), 4.41 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  = 8.0 Hz, H-2'), 5.97 (m, 1H,

NH-4''), 6.01 (d, 1H, H-1'), 7.26 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para  $C_{27}H_{47}N_3O_8SSi_2$ : C, 51.32; H, 7.82; N, 6.65. Hallado: C, 51.21; H, 7.62; N, 6.50.

De las fracciones de movilidad intermedia se aislan 0.035 g (35%) de producto de partida inalterado (TSAO- $m^3T$ ).

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.018 g (18%) de una espuma blanca que se identifica como **2.4**.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $CDCl_3$ ]  $\delta$ : 0.78, 0.97 (2s, 18H, *2t*-Bu), 1.91 (s, 3H,  $CH_3$ -3''), 1.98 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $CH_3$ -5), 3.34 (s, 3H,  $CH_3$ -3), 3.84 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 2.1$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.4$  Hz, H-5'a), 3.97 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 2.9$  Hz, H-5'b), 4.30 (dd, 1H, H-4'), 4.45 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 5.59 (s ancho, 2H,  $NH_2$ ), 6.09 (d, 1H, H-1'), 7.22 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para  $C_{26}H_{47}N_3O_8SSi_2$ : C, 50.64; H, 7.67; N, 6.80. Hallado: C, 50.61; H, 7.72; N, 6.66.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-alilamino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] y [1-[2',5'-di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-alil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.5 y 2.6)**

A una solución de TSAO- $m^3T$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) en THF seco (5 mL) se añade NaH 60% (0.006 g, 0.25 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añade bromuro de alilo (30  $\mu$ L, 0.34 mmol), manteniendo la reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Seguidamente, se neutraliza con ácido acético, se filtra a través de gel de sílice y se evapora a sequedad. El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 5:1).

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.021 g (20%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.5**.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.80, 0.96 (2s, 18H, *2t*-Bu), 2.01 (s, 3H,  $CH_3$ -5), 3.26 (s, 3H,  $CH_3$ -3), 3.82-3.88 (m, 2H,  $\underline{CH_2}$ -CH=CH $_2$ ), 4.00 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.2$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.4$  Hz, H-5'a), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.6$  Hz, H-5'b), 4.30 (dd, 1H, H-4'), 4.69 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, H-2'), 5.28 (dd, 1H,  $J = 1.4$ ,  $J_{cis} = 10.2$  Hz,  $\underline{CH_2}$ -CH=CH $_2$ ), 5.40 (dd, 1H,  $J_{trans} = 17.2$  Hz,  $\underline{CH_2}$ -CH=CH $_2$ ), 5.79 (s, 1H, H-3''), 5.91 (ddd, 1H,  $\underline{CH_2}$ -CH=CH $_2$ ), 5.99 (d, 1H, H-1'), 6.60 (m, 1H, NH-4''), 7.46 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para  $C_{28}H_{49}N_3O_8SSi_2$ : C, 52.23; H, 7.67; N, 6.53. Hallado: C, 52.12; H, 7.62; N, 6.50.

De las fracciones movilidad intermedia se aislan 0.033 g (31%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.6**.  $^1\text{H}$  RMN [200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.98 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.95 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.13-3.17 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -CH=CH $_2$ ), 3.27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 4.03 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.6$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.2$  Hz, H-5'a), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.4$  Hz, H-5'b), 4.34 (t, 1H, H-4'), 4.65 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 5.08 (dd, 1H,  $J = 1.6$   $J_{\text{cis}} = 8.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -CH=CH $_2$ ), 5.25 (dd, 1H,  $J_{\text{trans}} = 17.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ -CH=CH $_2$ ), 5.80-5.91 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -CH=CH $_2$ ), 6.11 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.13 (d, 1H, H-1'), 7.50 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_8\text{SSi}_2$ : C, 52.23; H, 7.67; N, 6.53. Hallado: C, 52.21; H, 7.66; N, 6.41.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.040 g (40%) de producto de partida (TSAO- $\text{m}^3\text{T}$ ) sin reaccionar.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-carbamoilmetilamino-3''-carbamoilmetil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.7)**

Siguiendo el procedimiento descrito para los derivados **2.5** y **2.6**, una disolución de TSAO- $\text{m}^3\text{T}$  (**25**) (0.1 g, 0.17 mmol) en THF (5 mL) a temperatura ambiente, se hace reaccionar con yodoacetamida (0.062 g, 0.34 mmol) durante 2 h. El residuo finalmente obtenido se purifica dos veces en el cromatotrón utilizando como eluyentes (hexano: acetato de etilo, 5:1) y posteriormente (diclorometano: metanol, 20:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aislan 0.047 g (40%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.7**.  $^1\text{H}$  RMN [200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.78, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.95 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.22-3.25 (m, 7H,  $\text{CH}_3$ -3, 2 $\text{CH}_2$ ), 4.08 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.6$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.0$  Hz, H-5'a), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.0$  Hz, H-5'b), 4.32 (t, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.12 (d, 1H, H-1'), 6.55 (s ancho, 4H, 2CONH $_2$ ), 7.31 (s ancho, 1H, NH-4''), 7.54 (d, 1H, H-6). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{SSi}_2$ : C, 48.51; H, 7.16; N, 9.75. Hallado: C, 48.44; H, 7.22; N, 9.71.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.048 g (48%) de producto de partida (TSAO- $\text{m}^3\text{T}$ , **25**) sin reaccionar.

### II.3.2. Síntesis de los intermedios TSAO sustituidos en la posición 3'' con grupos halógenos

#### *Procedimiento general de halogenación:*

A una disolución de TSAO-T (**24**) (1 mmol) o TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) en acetonitrilo seco (10 mL) y bajo atmósfera de argón, se añade cloruro de litio (3.6 mmol), bromuro de litio (2 mmol) o yodo molecular (0.6 mmol), CAN (0.5 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.5 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 1-48 h. El residuo obtenido tras el procesado apropiado se purifica en el cromatotrón. A continuación se indica, para cada compuesto, el tiempo de reacción, el procesado utilizado, el eluyente utilizado en la cromatografía, el rendimiento de los productos aislados y los datos analíticos y espectroscópicos.

#### **[1-[2',5'-Di-O-(terc-butildimetilsilil)-b-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-yodo-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.8)**

De acuerdo con el procedimiento general, TSAO-T (**24**) (0.20 g, 0.34 mmol) se hace reaccionar con I<sub>2</sub> (0.05 g, 0.20 mmol), durante 1 h. Una vez completada la reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a sequedad. Sobre el residuo así obtenido, se añade acetato de etilo frío (30 mL), una solución acuosa saturada de NaCl fría (4°C) (15 mL) y una solución acuosa fría (4°C) de NaHSO<sub>3</sub> (5%) (8 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo frío (4°C) (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución acuosa saturada y fría (4°C) de NaCl, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 1:1) obteniéndose 0.23 g (93%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **2.8**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.81, 0.96 (2s, 18H, 2t-Bu), 1.90 (d, 3H, J = 1.0 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 4.06 (dd, 1H, J<sub>4',5'a</sub> = 3.6, J<sub>5'a,5'b</sub> = 12.2 Hz, H-5'a), 4.09 (dd, 1H, J<sub>4',5'b</sub> = 3.7 Hz, H-5'b), 4.37 (t, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H, J<sub>1',2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 6.06 (d, 1H, H-1'), 6.56 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.46 (d, 1H, H-6), 10.30 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 12.41 (CH<sub>3</sub>-5), 18.41, 18.95 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.76, 26.46 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 47.84 (C-3''), 62.89 (C-5'), 75.56 (C-2'), 84.77, 86.71 (C-1', C-4'), 94.39 (C-3'), 112.34 (C-5'), 135.86 (C-6), 151.60 (C-4''), 152.53 (C-2), 163.63 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 40.27; H, 5.91; N, 5.87. Hallado: C, 40.51; H, 5.91; N, 5.79.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-cloro-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.9)**

Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de TSAO-T (**24**) (0.20 g, 0.34 mmol) en acetonitrilo seco (4 mL) se hace reaccionar con cloruro de litio (0.03g, 0.68 mmol) durante 48 h. Una vez completada la reacción, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se trata con acetato de etilo frío (4°C) (30 mL) y con una solución acuosa saturada de NaCl fría (4°C) (15 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo frío (4°C) (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan finalmente con una solución acuosa saturada y fría (4°C) de NaCl (30 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1) para dar 0.11 g (50%) de una espuma blanca que se identifica como **2.9**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.81, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.90 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 4.08 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'a</sub> = 3.3, *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 9.5 Hz, H-5'a), 4.13 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'b</sub> = 4.3 Hz, H-5'b), 4.39 (dd, 1H, H-4'), 4.69 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 6.09 (d, 1H, H-1'), 6.67 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.45 (d, 1H, H-6), 10.30 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 12.41 (CH<sub>3</sub>-5), 18.44, 18.96 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.74, 26.43 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 62.83 (C-5'), 75.44 (C-2'), 84.82, 86.63 (C-4', C-1'), 92.50 (C-3'), 93.92 (C-3''), 112.44 (C-5'), 135.75 (C-6), 145.57 (C-4''), 151.62 (C-2), 163.66 (C-4).

Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub> C, 46.17; H, 6.78; N, 6.73. Hallado: C, 43.45; H, 6.45; N, 6.04.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-bromo-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.10)**

De acuerdo con el procedimiento general, TSAO-T (0.20 g, 0.34 mmol) se trata con bromuro de litio (0.06 g, 0.68 mmol) durante 2 h y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se trata con acetato de etilo frío (4°C) (30 mL) y con una solución acuosa saturada y fría (4°C) de NaCl (15 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo frío (4°C) (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan finalmente con una solución acuosa saturada y fría (4°C) de NaCl (30 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo finalmente obtenido se

purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1) para dar 0.17 g (75%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.10**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.90 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 4.07 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.4$ ,  $J_{5'a,5'b} = 10.5$  Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.1$  Hz, H-5'b), 4.37 (t, 1H, H-4'), 4.68 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.06 (d, 1H, H-1'), 6.61 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.45 (d, 1H, H-6), 10.30 (s ancho, 1H,  $\text{NH}$ -3).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.40 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.42, 18.96 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.73, 26.43 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 62.83 (C-5'), 75.47 (C-2'), 79.92 (C-3''), 86.52, 86.72 (C-4', C-1'), 93.47 (C-3'), 112.40 (C-5'), 135.79 (C-6), 148.00 (C-4''), 151.60 (C-2), 163.61 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{SSi}_2$ : C, 43.11; H, 6.33; N, 6.28. Hallado: C, 43.40; H, 6.45; N, 6.04.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metilimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-yodo-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.11)**

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, TSAO- $\text{m}^3\text{T}$  (**25**) (0.20 g, 0.34 mmol) se hace reaccionar con  $\text{I}_2$  (0.05 g, 0.20 mmol) durante 1 h. Una vez completada la reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a sequedad. Sobre el residuo así obtenido se añade acetato de etilo frío (30 mL), una solución acuosa saturada de NaCl fría (4°C) (15 mL) y una solución acuosa fría (4°C) de  $\text{NaHSO}_3$  (5%) (8 mL). Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo frío (4°C) (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución acuosa saturada y fría (4°C) de NaCl, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo finalmente obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 1:1) para dar 0.22 g (90%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **2.11**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.79, 0.98 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.94 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 4.06 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.8$ ,  $J_{5'a,5'b} = 10.2$  Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.0$  Hz, H-5'b), 4.37 (t, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, H-2'), 6.13 (d, 1H, H-1'), 6.55 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.48 (d, 1H, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.41 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.41, 18.95 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.76, 26.46 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 28.10 ( $\text{CH}_3$ -3), 47.84 (C-3''), 62.89 (C-5'), 75.55 (C-2'), 86.71, 84.77 (C-1', C-4'), 94.39 (C-3'), 112.34 (C-5'), 135.86 (C-6), 151.60 (C-4''), 152.53 (C-2), 163.63 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{IN}_3\text{O}_8\text{SSi}_2$ : C, 41.15; H, 6.08; N, 5.76. Hallado: C, 40.40; H, 6.05; N, 5.33.

**[1-[2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-yodo-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.13)**

A una disolución del 3''-yodonucleósido **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) en Et<sub>3</sub>N seca (3 mL) y bajo atmósfera de argón, se añade PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.005g, 0.003 mmol), CuI (0.008g, 0.01 mmol) y 5-cloro-1-pentino (0.03 g, 0.28 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene a 50°C, durante 2 horas. Una vez completada la reacción, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se añade acetato de etilo (3 x 25 mL) y H<sub>2</sub>O (15 mL). A continuación, se decanta la fase orgánica y se lava sucesivamente con H<sub>2</sub>O (4 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 50:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.019 g (23%) de un sólido blanco que se caracteriza como **2.12**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.79 (s, 9H, *t*-Bu), 1.89 (d, 3H, *J*=1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.84 (m, 1H, H-5'a), 4.01 (m, 1H, H-5'b), 4.39 (m, 1H, H-4'), 4.96 (d, 1H, *J*<sub>1,2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 5.96 (m, 2H, H-1', 5'-OH), 6.72 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.91 (d, 1H, H-6), 10.20 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 12.48 (CH<sub>3</sub>-5), 17.69 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.09 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 27.36 (CH<sub>3</sub>-3), 47.40 (C-3''), 61.03 (C-5'), 74.87 (C-2'), 84.84 (C-4'), 89.04 (C-3'), 95.69 (C-1'), 110.72 (C-5'), 135.77 (C-6), 151.32 (C-4''), 151.84 (C-2), 162.75 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi: C, 37.08; H, 4.91; N, 6.83. Hallado: C, 37.02; H, 4.88; N, 6.85.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.019 g (30%) de un sólido blanco que se caracteriza como [1-[2'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) **2.13**<sup>43b</sup>.

### II.3.3. Síntesis de derivados TSAO sustituidos en la posición 3'' por reacciones de acoplamiento de Stille

#### II.3.3.1. Síntesis de los reactivos de estaño no comerciales (2.18, 2.21 y 2.22)

##### (Z) 3-(Tri-*n*-butilestannil) acrilato de metilo y (E) 3-(tri-*n*-butilestannil) acrilato de metilo (2.17 y 2.18)<sup>116</sup>

Sobre una disolución de bis(tributilestaño) (10.34 mmol) en tetrahidrofurano seco (80 mL), bajo atmósfera de argón a -20°C, se añade gota a gota una disolución 1.6 M en hexano de *n*-butillitio (6.3 mL, 10.34 mmol) y la mezcla resultante se agita durante 20 min. Seguidamente, la mezcla de reacción se enfría a -78°C, se añade (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S-BrCu (I) (2.13 g, 10.34 mmol) y se mantiene la agitación durante 30 min adicionales. A continuación manteniendo la temperatura a -78°C, se añade una disolución de propiolato de metilo (0.8 mL, 8.3 mmol) en tetrahidrofurano (4 mL) y etanol (3 mL), y la mezcla de reacción se agita vigorosamente durante 2 h. Finalmente, se añade etanol (0.4 mL), una disolución acuosa saturada de cloruro amónico (8 mL) y éter (80 mL) dejando que la reacción alcance la temperatura ambiente. Se decanta la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con éter (3 x 60 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de cloruro amónico (100 mL), se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo final se purifica mediante cromatografía de columna (hexano:éter, 50:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.21 g (7%) de un aceite incoloro que se caracteriza como **2.17**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.71-1.11 [m, 15H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Sn], 1.22-1.73 [m, 12H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn], 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.32 (d, 1H, *J*<sub>Sn,H</sub> = 70, *J*<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, (CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)) 7.70 (d, 1H, CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 1.3 g (40%) de un aceite incoloro que se caracteriza como **2.18**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.70-1.19 [m, 15H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn], 1.20-1.41 [m, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn], 1.51-1.65 [m, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn], 3.70 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.32 (d, 1H, *J*<sub>Sn,H</sub> = 120, *J*<sub>trans</sub> = 19.4 Hz, CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 7.72 (d, 1H, CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>Sn: C, 51.23; H, 8.60. Hallado: C, 52.15; H, 8.44.

**(E) 3-(Tri-*n*-butilestannil) propenoato de etilo (2.21)<sup>116</sup>**

Siguiendo el procedimiento anteriormente indicado a partir de bis(tributilestaño) (10.34 mmol) y propiolato de etilo se aislan 1.2 g (30%) de un aceite incoloro que se caracteriza como **2.21**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.70-1.19 [m, 15H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn], 1.18-1.37 (m, 9H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn), 1.50-1.63 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn), 3.65 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.29 (d, 1H, *J*<sub>Sn,H</sub> = 120, *J*<sub>trans</sub> = 19.0 Hz, CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 7.72 (d, 1H, CH=CH-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>Sn: C, 52.47; H, 8.81. Hallado: C, 52.10; H, 8.54.

**(E) 3-(tri-*n*-Butilestannil)-2-propen-1-ol<sup>116</sup> (2.22)**

A una disolución del ester metílico **2.18** (1.3 g, 3.3 mmol) en éter dietílico seco (42 mL), a -78°C y bajo atmósfera de argón, se añade una disolución de DIBAL-H 1M (8.6 mL, 8.2 mmol). La mezcla de reacción se agita durante 1 h a -78°C y luego durante 2 h a 0°C. Seguidamente, se añaden 2 mL de una disolución acuosa saturada de cloruro amónico y se deja que alcance la temperatura ambiente. Finalmente, sobre la mezcla de reacción se añade Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se filtra a través de Florisil. El filtrado se lava con éter y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en cromatografía de columna (hexano:éter, 25:1), obteniéndose 0.6 g (50%) de un aceite incoloro que se identifica como **2.22**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.81-0.95 (m, 15H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn), 1.26-1.48 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn), 1.51-1.58 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Sn), 3.66 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, OH), 4.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6.18 (m, 2H, (CH=CH-CH<sub>2</sub>OH)). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>OSn: C, 51.90; H, 9.29. Hallado: C, 51.15; H, 9.44.

**II.3.3.2. Reacciones de acoplamiento catalizadas por Paladio***Procedimiento general de acoplamiento de Stille:*

A una disolución del 3'-yodonucleósido **2.8** ó **2.11** (1 mmol) en *N*-metil-2-pirrolidinona (NMP) seca y bajo atmósfera de argón, se añade trifenilarsina (AsPh<sub>3</sub>) (0.08 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>) (0.02 mmol) y CuI (0.04 mmol). Al cabo de 10 minutos, a temperatura ambiente, se añade el reactivo de estaño

correspondiente (2 mmol) disuelto en NMP y la mezcla de reacción se calienta a 60°C. Transcurrida 1 h se añade 1 mmol extra del reactivo de estaño correspondiente y al cabo de 2 h 1 mmol adicional más, manteniendo la reacción a 60°C durante 12h. Una vez completada la reacción, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se añade acetato de etilo (25 mL) y H<sub>2</sub>O (15 mL). A continuación, se decanta la fase orgánica y se lava sucesivamente con H<sub>2</sub>O (4 x 15 mL) hasta total eliminación de la NMP. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad. El residuo así obtenido, se disuelve en acetonitrilo (20 mL), se lava repetidas veces con hexano caliente (7 x 10 mL), con el fin de eliminar el exceso de reactivo de estaño, y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón ó en cromatografía de capa fina preparativa, siendo en general necesario realizar dos o más cromatografías para una purificación completa de los compuestos obtenidos. A continuación, se indica para cada compuesto el tipo de cromatografía, los eluyentes empleados en ésta, el rendimiento de los productos aislados, y los datos analíticos y espectroscópicos.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-vinil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.15)**

De acuerdo con el procedimiento general, **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con tri-*n*-butilvinilestaño (**2.14**) (0.18 g, 0.56 mmol). El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón dos veces (hexano:acetato de etilo, 2:1).

De las bandas de mayor movilidad se aíslan 0.068 g (79%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.15**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.79, 0.80 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.97 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 4.05 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'a</sub> = 3.5, *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 12.5 Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'b</sub> = 3.8 Hz, H-5'b), 4.32 (dd, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 5.17 (dd, 1H, *J*<sub>cis</sub> = 11.4, *J* = 0.6 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 5.45 (dd, 1H, *J*<sub>trans</sub> = 17.5 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 6.05 (d, 1H, H-1'), 6.49 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.53 (dd, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 7.49 (d, 1H, H-6), 10.32 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 12.53 (CH<sub>3</sub>-5), 18.38, 18.93 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.68, 26.37 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 63.02 (C-5'), 75.94 (C-2'), 84.92, 85.33 (C-1', C-4'), 91.24 (C-3'), 111.01 (C-3''), 112.32 (C-5''), 121.94 (CH=CH<sub>2</sub>), 133.70, 136.42 (CH=CH<sub>2</sub>, C-6), 145.51 (C-4''), 151.61 (C-2), 163.73 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 50.70; H, 7.36; N, 6.82. Hallado: C, 50.75; H, 7.35; N, 6.87.

De las bandas de menor movilidad se recuperan 0.008g (10%) de TSAO-T.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(*E*)-2-metoxicarboniletenil]-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.19)**

Tal y como se indica en el procedimiento general, el iodonucleósido **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (*E*) 3-(tri-*n*-butilestannil)acrilato de metilo (**2.18**) (0.16 g, 0.56 mmol). El residuo finalmente obtenido se purifica primero en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 50:1) y posteriormente en cromatografía de capa fina preparativa (diclorometano:metanol, 20:1), en tres desarrollos.

De las bandas de mayor movilidad se obtienen 0.016 g (20%) de TSAO-T.

De las bandas de menor movilidad se aíslan 0.068 g (72%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.19**.  $^1\text{H}$  RMN [200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.80, 0.95 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.90 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.2$ ,  $J_{5'a,5'b} = 8.6$  Hz, H-5'a), 4.13 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.1$  Hz, H-5'b), 4.39 (t, 1H, H-4'), 4.78 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.1$  Hz, H-2'), 6.03 (d, 1H, H-1'), 6.08 (d, 1H,  $J_{\text{trans}} = 15.6$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$ ), 7.49-7.57 (m, 4H,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{NH}_2$ , H-6), 10.40 (s ancho, 1H,  $\text{NH}$ -3).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 12.93 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.35, 18.92 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.68, 26.23 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 54.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.92 (C-5'), 74.80 (C-2'), 83.23, 88.90 (C-1', C-4'), 92.42 (C-3'), 110.31 (C-3''), 111.28 (C-5), 129.22 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$ ), 132.12 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$ ), 134.2 (C-6), 151.11 (C-4''), 152.11 (C-2), 160.11 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 163.33 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{SSi}_2$ : C, 49.90; H, 7.03; N, 6.24. Hallado: C, 49.79; H, 7.09; N, 6.32.

**[1-[2',5'-Di-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(*E*)-2-etoxicarboniletenil]-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.29)**

Siguiendo el procedimiento general, el iodo derivado **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (*E*) 3-(tri-*n*-butilestannil)-propenoato de etilo (**2.21**) (0.21 g, 0.56 mmol). El residuo finalmente obtenido se purificó en el cromatotrón dos veces consecutivas usando (diclorometano:metanol, 20:1) como eluyentes.

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.019 g (23%) de TSAO-T.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.063 g (65%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.29**.  $^1\text{H}$  RMN [200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.80, 0.95 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.24 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.90 (d, 3H,  $J = 1.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 3.06 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.09-4.22 (m, 4H, 2H-5',  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.39 (t, 1H,  $J_{4',5'} = 4.0$  Hz, H-4'), 4.76 (d, 1H,

$J_{1',2'} = 8.1$  Hz, H-2'), 6.04 (d, 1H, H-1'), 6.06 (d, 1H,  $J_{\text{trans}} = 15.9$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$ ), 7.46 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.50 (m, 2H, H-6,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$ ), 10.47 (s ancho, 1H, NH-3). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{SSi}_2$ : C, 50.63; H, 7.18; N, 6.11. Hallado: C, 50.55; H, 7.09; N, 6.17.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(*E*)-(3-hidroxi-1-propenil)]-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.30)**

Siguiendo el procedimiento general, **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (*E*)-3-(tri-*n*-butilestannil)-2-propen-1-ol (**2.22**) (0.19 g, 0.56 mmol). El residuo finalmente obtenido se purifica en el cromatotrón dos veces (diclorometano: metanol, 25:1).

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.008 g (10%) de TSAO-T.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.074 g (82%) de una espuma blanca que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como **2.30**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.90 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.5$ ,  $J_{5'a,5'b} = 8.9$  Hz, H-5'a), 4.08 (dd, 2H,  $J = 1.6$ ,  $J_{\text{CH}_2,\text{OH}} = 4.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.4$  Hz, H-5'b), 4.32 (t, 1H, H-4'), 4.70 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.06 (d, 1H, H-1'), 6.12 (dt, 1H,  $J_{\text{trans}} = 16.0$ ,  $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 4.6$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 6.35 (dt, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 6.48 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.49 (d, 1H, H-6), 10.31 (s ancho, 1H, NH-3).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 13.03 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.38, 18.95 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.68, 26.33 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 63.22 (C-5'), 75.40 (C-2'), 85.23, 88.20 (C-1', C-4'), 92.42 (C-3'), 111.31 (C-3''), 111.48 (C-5'), 129.32 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 134.42 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ , C-6), 152.11 (C-4''), 152.31 (C-2), 163.03 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9\text{SSi}_2$ : C, 50.21; H, 7.36; N, 6.82. Hallado: C, 50.12; H, 7.22; N, 6.79.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-fenil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.31)**

Siguiendo el procedimiento general, **2.8** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con tri-*n*-butilfenilestaño (**2.23**) (0.18 g, 0.56 mmol). El residuo finalmente obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1) siendo necesarias dos purificaciones.

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.057 g (60%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.31**.  $^1\text{H}$  RMN [400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]  $\delta$ : 0.83, 0.96 (2s, 18H, 2*t*-Bu),

1.91 (d, 3H,  $J = 1.3$  Hz, CH<sub>3</sub>-5), 4.13 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.5$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.3$  Hz, H-5'a), 4.15 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.7$  Hz, H-5'b), 4.45 (dd, 1H, H-4'), 4.78 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.11 (d, 1H, H-1'), 6.45 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.37 (m, 1H, Ph), 7.45 (m, 2H, Ph), 7.52 (d, 1H, H-6), 7.57 (m, 1H, Ph), 7.59 (m, 1H, Ph), 10.32 (s ancho, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 12.43 (CH<sub>3</sub>-5), 18.43, 18.93 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.72, 26.41 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 63.11 (C-5'), 75.35 (C-2'), 85.20, (C-4'), 86.80 (C-1'), 91.35 (C-3'), 105.40 (C-3''), 112.26 (C-5), 128.28, 128.94, 129.13, 129.97 (Ph), 135.77 (C-6), 145.48 (C-4''), 151.62 (C-2), 163.64 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 54.11; H, 7.11; N, 6.31. Hallado: C, 54.10; H, 7.01; N, 6.30.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.04 g (20%) de TSAO-T.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metilimina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(*E*)-[2-metoxicarboniletenil]-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.32)**

Siguiendo el procedimiento general, **2.11** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (*E*)-3-(tri-*n*-butilestannil) acrilato de metilo (**2.18**) (0.16 g, 0.55 mmol). El residuo obtenido se purifica primero en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 50:1) y finalmente en cromatografía de capa fina preparativa (diclorometano:metanol, 25:1) en tres desarrollos.

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.015 g (16%) de TSAO-m<sup>3</sup>T.

De las fracciones de menor movilidad se aislan 0.063 g (66%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.32**. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 0.82, 0.91 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-5), 3.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.8$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.0$  Hz, H-5'a), 4.13 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.0$  Hz, H-5'b), 4.42 (t, 1H, H-4'), 4.76 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.08 (d, 1H,  $J_{trans} = 15.8$  Hz, CH=CH-CO<sub>2</sub>Me), 6.13 (d, 1H, H-1'), 6.42 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.51 (s, 1H, H-6), 7.54 (d, 1H, CH=CH-CO<sub>2</sub>Me). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 12.93 (CH<sub>3</sub>-5), 18.38 (CH<sub>3</sub>), 18.95, 18.92 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.68, 26.23 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 54.0 (OCH<sub>3</sub>), 62.72 (C-5'), 74.80 (C-2'), 83.23, 88.90 (C-1', C-4'), 92.44 (C-3'), 110.33 (C-3''), 111.18 (C-5'), 129.23 (CH=CH-CO<sub>2</sub>Me), 132.12 (CH=CH-CO<sub>2</sub>Me), 134.2 (C-6), 151.11, 152.11 (C-4'', C-2), 160.13 (CO<sub>2</sub>Me), 163.35 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 50.63; H, 7.18; N, 6.11. Hallado: C, 50.57; H, 7.12; N, 6.19.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(*E*)-(3-hidroxi-1-propenil)]-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.33)**

De acuerdo con el procedimiento general, **2.11** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (*E*) 3-(tri-*n*-butilestannil)-2-propen-1-ol (**2.22**) (0.19 g, 0.56 mmol). El residuo finalmente obtenido se purifica dos veces en el cromatotrón (diclorometano:metanol, 20:1).

De las bandas de mayor movilidad se obtienen 0.009 g (10%) de TSAO- $m^3T$ .

De las bandas de menor movilidad se aíslan 0.075 g (82%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.33**.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.79, 0.27 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.95 (d, 3H,  $J = 1.4$  Hz,  $CH_3-5$ ), 3.27 (s, 3H,  $CH_3-3$ ), 3.99 (m, 1H, OH), 4.07 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.3$ ,  $J_{5'a,5'b} = 8.0$  Hz, H-5'a), 4.13 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 3.3$  Hz, H-5'b), 4.20 (m, 2H,  $CH_2$ ), 4.36 (t, 1H, H-4'), 4.65 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2$  Hz, H-2'), 6.13 (dt, 1H,  $J_{trans} = 16.0$ ,  $J_{CH,CH_2} = 4.6$  Hz,  $CH=CH-CH_2OH$ ), 6.16 (d, 1H, H-1'), 6.41 (dt, 1H,  $J = 1.8$  Hz,  $CH=CH-CH_2OH$ ), 6.54 (s ancho, 2H,  $NH_2$ ), 7.52 (d, 1H, H-6).  $^{13}C$  RMN [75 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 13.09 ( $CH_3-5$ ), 18.41, 18.98 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 26.34, 26.38 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 28.06 ( $CH_3-3$ ), 61.7 ( $CH_2$ ), 63.13 (C-5'), 75.40 (C-2'), 85.17, 88.23 (C-1', C-4'), 92.42 (C-3'), 111.31 (C-3''), 112.48 (C-5), 114.77 ( $CH=CH-CH_2OH$ ), 129.27 ( $CH=CH-CH_2OH$ ), 134.45 (C-6), 152.14, 152.22 (C-2, C-4''), 163.34 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $C_{28}H_{49}N_3O_9SSi_2$ : C, 50.96; H, 7.48; N, 6.37. Hallado: C, 50.80; H, 7.35; N, 6.42.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-metiltimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-fenil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.34)**

Siguiendo el procedimiento general, **2.11** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con tri-*n*-butilfenilestaño (**2.23**) (0.18 g, 0.56 mmol). El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.57 g (60%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.34**.  $^1H$  RMN [300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.89 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.95 (d, 3H,  $J = 1.2$  Hz,  $CH_3-5$ ), 3.29 (s, 3H,  $CH_3-3$ ), 4.01 (dd, 1H,  $J_{4',5'a} = 4.3$ ,  $J_{5'a,5'b} = 12.3$  Hz, H-5'a), 4.15 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 4.8$  Hz, H-5'b), 4.45 (t, 1H, H-4'), 4.78 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 6.5$  Hz, H-2'), 6.20 (d, 1H, H-1'), 6.54 (s ancho, 2H,  $NH_2$ ), 7.33-7.60 (m, 6H, Ph, H-6).  $^{13}C$  RMN [75 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 13.15 ( $CH_3-5$ ), 18.39, 18.93 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 25.65, 26.41 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 29.03 ( $CH_3-3$ ), 63.13 (C-5'), 75.61 (C-2'), 85.29, 87.40 (C-1', C-4'), 91.45

(C-3'), 108.2 (C-3''), 111.33 (C-5), 128.93, 129.12, 129.96 (Ph), 134.01 (C-6), 145.44 (C-4''), 152.12 (C-2), 163.30 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 54.76; H, 7.26; N, 6.18. Hallado: C, 54.67; H, 7.31; N, 6.10.

De las fracciones de menor movilidad se obtienen 0.027 g (15%) de TSAO-m<sup>3</sup>T.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(2-tienil)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.35)**

Siguiendo el procedimiento general, **2.11** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con tri-*n*-butil-2-tienilestaño (**2.24**) (0.21 g, 0.56 mmol). El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1).

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.048 g (50%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **2.35**. <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.80, 0.96 (2s, 18H, *t*-Bu), 1.94 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 4.03 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'a</sub> = 3.5, *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 12.3 Hz, H-5'a), 4.15 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'b</sub> = 3.7 Hz, H-5'b), 4.44 (t, 1H, H-4'), 4.73 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.2 Hz, H-2'), 6.19 (d, 1H, H-1'), 6.54 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.16 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 3.6, *J*<sub>4,5</sub> = 5.1 Hz, H-4<sub>tiofeno</sub>), 7.25 (dd, 1H, *J*<sub>3,5</sub> = 2.3, *J*<sub>3,4</sub> = 3.6 Hz, H-3<sub>tiofeno</sub>), 7.52 (s, 1H, H-6), 7.61 (dd, 1H, H-5<sub>tiofeno</sub>). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 13.01 (CH<sub>3</sub>-5), 18.47, 19.02 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 26.51, 28.11 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 28.63 (CH<sub>3</sub>-3), 63.15 (C-5'), 75.80 (C-2'), 85.36 (C-4'), 87.02 (C-1'), 92.00 (C-3'), 101.51 (C-3''), 111.45 (C-5), 127.67, 128.08, 128.28, 128.49 (Tiofeno), 134.92 (C-6), 146.34 (C-4''), 152.24 (C-2), 163.40 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>: C, 50.77; H, 6.91; N, 6.13. Hallado: C, 50.27; H, 6.44; N, 6.10.

De las fracciones de menor movilidad se recuperan 0.047 g (26%) de TSAO-m<sup>3</sup>T.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-metiltimina]-3'-espiro-5''-[4''-amino-3''-(1-propinil)-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido] (2.36)**

De acuerdo con el procedimiento general, **2.11** (0.1 g, 0.14 mmol) se trata con (tri-*n*-butilestannil)-1-propino (**2.25**) (0.18 g, 0.56 mmol). El residuo obtenido tras procesar la reacción se purifica primero en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1) seguido de cromatografía preparativa (hexano:acetato de etilo, 4:1), en tres desarrollos.

De las fracciones de mayor movilidad se obtienen 0.025 g (30%) de TSAO-m<sup>3</sup>T.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.027 g (30%) de una espuma blanca que se caracteriza como **2.36**.  $^1\text{H}$  RMN [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 0.84, 0.95 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.92 (d, 3H,  $J=1.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -5), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -C $\equiv$ C), 3.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3), 3.92 (dd, 1H,  $J_{4',5'a}=4.2$ ,  $J_{5'a,5'b}=12.4$  Hz, H-5'a), 4.12 (dd, 1H,  $J_{4',5'b}=4.3$  Hz, H-5'b), 4.33 (t, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H,  $J_{1',2'}=8.3$  Hz, H-2'), 6.15 (d, 1H, H-1'), 6.81 (s ancho, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.49 (d, 1H, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ : 5.07 ( $\text{CH}_3$ -C $\equiv$ C), 12.98 ( $\text{CH}_3$ -5), 17.79, 18.39 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ], 25.14, 26.02 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ], 28.15 ( $\text{CH}_3$ -3), 62.04 (C-5'), 75.25 (C-2'), 77.22 ( $\text{CH}_3$ -C $\equiv$ C), 83.42 (C-4'), 87.55 (C-1'), 91.27 (C-3'), 93.71 ( $\text{CH}_3$ -C $\equiv$ C), 98.83 (C-3''), 110.89 (C-5'), 133.36 (C-6), 150.05 (C-2), 151.07 (C-4''), 163.15 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_8\text{SSi}_2$ : C, 52.39; H, 7.38; N, 6.55. Hallado: C, 52.30; H, 7.29; N, 6.50.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-(metil)timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-3''-alil-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (2.6)**

Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar el iodo nucleósido **25** (0.1 g, 0.14 mmol) con tri-*n*-butilalilestaño (**2.26**) (0.18 g, 0.56 mmol). El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1) siendo necesarias dos purificaciones.

De las bandas de mayor movilidad se aíslan 0.026 g (30%) de una espuma blanca que se identifica como **2.6** (ver página 132).

De las bandas de menor movilidad se obtienen 0.016 g (20%) de TSAO- $\text{m}^3\text{T}$ .

## II.4. SINTESIS DE CONJUGADOS [TSAO-T]-[FOSCARNET]

### II.4.1. Síntesis de reactivos de fósforo no comerciales

**[Di(trimetilsilil)fosforil]formiato de etilo<sup>137b</sup> (3.4)**

Sobre clorofornio de etilo (7.2 mL, 67 mmol) enfriado a 0°C y bajo atmósfera de argón, se añade gota a gota el fosfito de tris(trimetilsililo), (25 mL, 67 mmol) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, la mezcla de reacción se destila a vacío (10 mmHg) observándose que primero destila el cloruro de

trimetilsililo, después el ácido fosfórico de bis(trimetilsililo), y finalmente 13 g (75%) de un aceite incoloro que se identificó como **3.4**.  $Peb_{10}$  100-102°C.  $Peb_{10}$  (bibl.<sup>133a</sup>) 68-70°C.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.28 (m, 27H, 9CH<sub>3</sub>), 1.29 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz,  $CO_2CH_2CH_3$ ), 4.23 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz,  $CO_2CH_2CH_3$ ).

#### (Diclorofosforil)formiato de etilo<sup>137b</sup> (3.5)

Sobre una disolución de **3.4** (5 g, 18 mmol) en tolueno (20 mL) bajo atmósfera de argón se añade cloruro de tionilo (3.2 mL, 53 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo a presión reducida y el residuo obtenido se purifica mediante destilación a vacío (10 mmHg) obteniéndose 2.7 g (84%) de un aceite incoloro que se caracteriza como **3.5**.  $Peb_{12}$  84-86°C.  $Peb_{10}$  (bibl.<sup>133b</sup>) 64°C.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 1.41 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz,  $CO_2CH_2CH_3$ ), 4.47 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $CO_2CH_2CH_3$ ).

#### [Di(trimetilsilil)fosforil]formiato de bencilo (3.13)

A partir de cloroformiato de bencilo (5.4 mL, 36 mmol) y fosfito de tris(trimetilsililo) (12 mL, 36 mmol), se prepara el [di(trimetilsilil)fosforil]formiato de bencilo siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **3.5**.  $Peb_{10}$  (10 mmHg) 154-156°C (11g, 89%).  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 0.02 (m, 27H, 9CH<sub>3</sub>), 5.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.4 (m, 5H, Ph).  $^{13}C$  RMN [100 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$  : 0.70, 1,96 (CH<sub>3</sub>-Si), 67.40 (CH<sub>2</sub>), 129,24, 129.34, 136.20, 167.45 (Ph), 170.20 ( $\underline{C}O_2Bn$ ).

$^{31}P$  [161.88 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : -21.81.

#### (Diclorofosforil)formiato de bencilo (3.14)

Sobre una disolución de **3.13** (2 g, 5.5 mmol) en tolueno seco (10 mL) y bajo atmósfera de argón se añade cloruro de tionilo (1.1 mL, 16 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se evaporan el disolvente y el exceso de reactivo a presión reducida. El residuo obtenido se destila a vacío (10 mmHg) obteniéndose 0.4 g (30%) de un aceite incoloro que se caracteriza como **3.14**.  $Peb_{10}$  120°C.  $^1H$  RMN [200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ]  $\delta$ : 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.4 (m, 5H, Ph).

#### II.4.2. Conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet]

##### [1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[3-[[[(etoxicarbonil)hidroxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.6)

A una disolución de **3.5** (0.047 g, 0.25 mmol) recién preparado en diclorometano seco (2.5 mL), a -20°C y bajo atmósfera de argón, se añade gota a gota una disolución previamente enfriada a -20°C del alcohol **3.1** (0.1 g, 0.15 mmol) en diclorometano (3.5 mL) y Et<sub>3</sub>N (70 µL, 0.45 mmol) secos. Transcurridos 5 minutos de reacción se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en acetato de etilo (20 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (4 x 10 mL) y con una solución acuosa saturada de NaCl saturada (10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo final se purifica en el cromatotrón (acetato de etilo:metanol, 5:1), obteniéndose 0.036 g (31%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **3.6**. I.R. (KBr)  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN [400 MHz, CD<sub>3</sub>OD]  $\delta$ : 0.67, 0.83 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.16 (t, 3H,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.82 (m, 5H, CH<sub>3</sub>-5, CH<sub>2</sub>), 3.79-3.92 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2H-5'), 4.07 (q, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.19 (t, 1H,  $J = 3.6 \text{ Hz}$ , H-4'), 4.41 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.2 \text{ Hz}$ , H-2'), 5.48 (s, 1H, H-3''), 5.86 (d, 1H, H-1'), 7.36 (d, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN [100 MHz, CD<sub>3</sub>OD]  $\delta$ : 13.11 (CH<sub>3</sub>-5), 14.60 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.79, 19.23 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.91, 26.49 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 30.07 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 5.9 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>), 40.18 (NCH<sub>2</sub>), 61.28 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 4.2 \text{ Hz}$ , CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.21 (C-5'), 65.34 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.2 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>OP), 75.98 (C-2'), 85.70 (C-4'), 88.75 (C-1'), 90.88 (C-3''), 93.16 (C-3'), 112.17 (C-5), 135.72 (C-6), 152.45 (C-2), 153.60 (C-4''), 164.51 (C-4), 172.34 (d,  $J_{\text{P,C}} = 250 \text{ Hz}$ , CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN [161.88 MHz, CD<sub>3</sub>OD]  $\delta$ : -4.50. MS (FAB)  $m/z$ : Hallado: 783.9727 (MH<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>PSSi<sub>2</sub>). Calculado: 783.9729. HPLC (CH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O, 40:60) Tr = 7.83 min.

##### [1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[3-[[[(metoxi-carbonil)metoxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.9)

Sobre una disolución de (dimetilfosforil)formiato de metilo **3.7** (72 µL, 0.54 mmol) en CCl<sub>4</sub> seco (4.5 mL), se añade PCl<sub>5</sub> (0.102 g, 0.496 mmol) y la suspensión resultante se calienta a 50°C durante 1.5 horas. La mezcla de reacción se evapora a sequedad y el residuo resultante bajo atmósfera de argón se enfría a -50°C. Sobre el residuo anterior (**3.8**) se añade

una disolución de **3.1** (0.1 g, 0.15 mmol) en diclorometano seco (1.1 mL) y Et<sub>3</sub>N (75 µL, 2.56 mmol), previamente enfriada a -50°C. Una vez completada la reacción se evapora el disolvente a sequedad y el residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 1:1), obteniéndose 0.12 g (91%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **3.9**. I.R. (KBr)  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN [300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 0.83, 0.98 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.95 (d, 3H,  $J = 1.2 \text{ Hz}$ , CH<sub>3</sub>-5), 2.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (m, 5H, CH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>), 4.30 (m, 2H, H-5'), 4.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.35 (m, 1H, H-4'), 4.67 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 8.2 \text{ Hz}$ , H-2'), 5.78 (s, 1H, H-3''), 6.11 (d, 1H, H-1'), 6.50 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.53 (d, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN [50 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ : 12.87 (CH<sub>3</sub>-5), 18.34, 19.01 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.69, 26.22 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 30.38 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.7 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>), 38.20 (NCH<sub>2</sub>), 51.72 (d,  $J_{\text{P,CH}_3} = 3.8 \text{ Hz}$ , CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 52.6 (d,  $J_{\text{P,CH}_3} = 6.2 \text{ Hz}$ , OCH<sub>3</sub>), 62.91 (C-5'), 65.6 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.1 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>O), 76.22 (C-2'), 85.68, 87.54 (C-4', C-1'), 91.15 (C-1'), 93.16 (C-3'), 111.99 (C-5), 134.31 (C-6), 152.42, 153.25 (C-2, C-4''), 163.85 (C-4), 174.20 (d,  $J_{\text{P,C}} = 248 \text{ Hz}$ , C=O<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P RMN [161.88 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : -2.53. MS (FAB) *m/z*: Hallado: 783.9732 (MH<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>PSSi<sub>2</sub>). Calculado: 783.9729. HPLC (CH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O, 50:50) Tr = 8.23 min.

**Sal sódica de [1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-*N*-[3-[[[(metoxicarbonil)hidroxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.10)**

Sobre una disolución de **3.9** (0.1 g, 0.13 mmol) en THF seco (1.5 mL), y bajo atmósfera de argón se añade NaI seco (0.017 g, 0.11 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón durante 6 h. Después de evaporar el disolvente, el residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (acetato de etilo:metanol, 5:1), obteniéndose 0.079g (80%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **3.10**. I.R. (KBr)  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN [400 MHz, CD<sub>3</sub>OD]  $\delta$ : 1.00, 1.16 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 2.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17 (d, 3H,  $J = 0.9 \text{ Hz}$ , CH<sub>3</sub>-5), 3.94 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.19 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, 2H-5'), 4.53 (t, 1H,  $J = 3.8 \text{ Hz}$ , H-4'), 4.74 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 8.2 \text{ Hz}$ , H-2'), 5.83 (s, 1H, H-3''), 6.27 (d, 1H, H-1'), 7.75 (d, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN [100 MHz, CD<sub>3</sub>OD]  $\delta$ : 9.30 (CH<sub>2</sub>), 13.16 (CH<sub>3</sub>-5), 18.73, 19.18 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.95, 26.53 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 29.94 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.9 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>), 40.16 (NCH<sub>2</sub>), 51.73 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 3.8 \text{ Hz}$ , CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.33 (C-5'), 65.33 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.1 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>OP), 76.10 (C-2'), 85.79 (C-4'), 87.54 (C-1'), 91.16 (C-3''), 93.54

(C-3'), 112.22 (C-5), 135.26 (C-6), 150.48 (C-2), 153.17 (C-4''), 164.55 (C-4), 174.61 (d,  $J_{P,C} = 248$  Hz,  $\underline{CO_2CH_3}$ ).  $^{31}P$  RMN [161.88 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : -7.41. MS (FAB) m/z: Hallado: 792.9279 ( $MH^+$ ,  $C_{29}H_{51}N_3NaO_{13}PSSi_2$ ). Calculado: 792.9282. HPLC ( $CH_3:H_2O$ , 40:60) tr = 7.21 min.

**Sal disódica de [1-[2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[(3-[[hidroxicarbonil]hidroxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.11)**

*Método A*

Sobre una disolución de **3.10** (0.1 g, 0.13 mmol) en THF seco (1.5 mL) se le añade una solución acuosa de NaOH 0.2 N (0.75 mL, 0.2 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente 2 h. Una vez completada la reacción se añade resina Dowex 50 Wx4 (forma  $H^+$ ) hasta conseguir un pH 5, se filtra y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo así obtenido se purifica en cromatografía de fase reversa  $C_{18}$  (acetonitrilo: agua, 95:5).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 0.035 g (53%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **3.11**.  $^1H$  RMN [400 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : 1.01 (s, 9H, *t*-Bu), 2.12 (m, 5H,  $CH_2$ ,  $CH_3$ -5), 3.97 (dd, 1H,  $J_{5'a,5'b} = 12.3$ ,  $J_{4',5'a} = 2.5$  Hz, H-5'a), 4.12 (dd, 1H,  $J_{4',5'b} = 2.8$  Hz, H-5'b), 4.26 (m, 2H,  $NCH_2CH_2CH_2O$ ), 4.53 (t, 1H, H-4'), 4.90 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, H-2'), 5.83 (s, 1H, H-3''), 6.26 (d, 1H, H-1'), 8.14 (s, 1H, H-6).  $^{13}C$  RMN [100 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : 13.34 ( $CH_3$ -5), 18.88 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 26.10 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 30.93 (d,  $J_{P,CH_2} = 4.0$  Hz,  $CH_2$ ), 40.42 ( $NCH_2$ ), 61.67 (C-5'), 63.92 (d,  $J_{P,CH_2} = 6.1$  Hz,  $CH_2O$ ), 76.75 (C-2'), 86.29 (C-4'), 89.52 (C-1'), 91.28 (C-3''), 95.79 (C-3'), 112.13 (C-5), 137.11 (C-6), 153.05 (C-2), 153.17 (C-4''), 164.77 (C-4), 199.27 (d,  $J_{P,C} = 230$  Hz,  $CO_2Na$ ).  $^{31}P$  RMN [161.88 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : -12.19. MS (FAB) m/z: Hallado: 685.6228 ( $MH^+$ ,  $C_{22}H_{34}N_3Na_2O_{13}PSSi$ ). Calculado: 685.6226.

De las fracciones de menor movilidad se aíslan 0.035 g (43%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como la sal sódica de [1-[2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[3-[[[hidroxifosfonoil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) **3.12**.  $^1H$  RMN [400 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : 0.67 (s, 9H, *t*-Bu), 1.79 (m, 5H,  $CH_2$ ,  $CH_3$ -5), 3.59-4.01 (m, 6H,  $NCH_2CH_2CH_2O$ , 2H-5'), 4.21 (m, 1H, H-4'), 4.57 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.7$  Hz, H-2'), 5.51 (s, 1H, H-3''), 5.97 (d, 1H, H-1'), 6.59 (d, 1H,  $J_{P,H} = 623$  Hz, PH),

7.72 (s, 1H, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN [100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ]  $\delta$ : 13.34 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.75 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 26.09 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 30.74 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 40.11 ( $\text{NCH}_2$ ), 61.65 (C-5'), 62.92 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 76.75 (C-2'), 86.29 (C-4'), 89.52 (C-1'), 91.28 (C-3''), 95.66 (C-3'), 112.23 (C-5), 137.11 (C-6), 153.05 (C-2), 153.56 (C-4''), 163.47 (C-4).  $^{31}\text{P}$  RMN (161.88 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.83. MS (FAB) m/z: Hallado: 619.6311 ( $\text{MH}^+$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{NaO}_{11}\text{PSSi}$ ). Calculado: 619.6313.

### Método B

A una disolución de **3.10** (0.1 g, 0.13 mmol) en THF seco (1.5 mL) se le añade una solución acuosa de NaOH 0.45 N (0.75 mL, 0.2 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente 30 min. Una vez completada la reacción se añade resina Dowex 50 Wx4 (forma  $\text{H}^+$ ) hasta conseguir un pH neutro, se filtra y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo así obtenido se purifica en cromatografía de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (acetonitrilo: agua, 95:5), obteniéndose 0.063 g (76%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **3.11**.

### [1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[[3-[[[(benciloxycarbonil)hidroxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (3.15)

Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis del derivado **3.7**, una disolución de (diclorofosforil)formiato de bencilo (**3.14**) (0.06 g, 0.25 mmol) recién preparado, tal y como se ha indicado anteriormente y el alcohol **3.1** (0.1 g, 0.15 mmol) se hacen reaccionar durante 15 minutos. El residuo finalmente obtenido tras el procesado se purifica en el cromatotrón (acetato de etilo:metanol, 5:1), obteniéndose 0.07 g (54%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **3.15**. I.R. (KBr)  $\nu = 1710$   $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN [400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ]  $\delta$ : 0.99, 1.15 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 2.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -5.), 3.91-4.20 (m, 6H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , 2H-5'), 4.51 (t, 1H,  $J = 3.6$  Hz, H-4'), 4.77 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.1$  Hz, H-2'), 5.39 (ABs, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.81 (s, 1H, H-3''), 6.19 (d, 1H, H-1'), 7.53-7.46 (m, 3H, Ph), 7.60 (m, 2H, Ph), 7.70 (s, 1H, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN [100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ]  $\delta$ : 9.30 ( $\text{CH}_2$ ), 13.06 ( $\text{CH}_3$ -5), 18.76, 19.21 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 25.95, 26.48 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ], 29.94 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 40.18 ( $\text{NCH}_2$ ), 62.01 (C-5'), 65.31 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 6.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 66.71 (d,  $J_{\text{P,CH}_2} = 3.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.94 (C-2'), 85.73 (C-4'), 88.69 (C-1'), 90.91 (C-3''), 93.18 (C-3'), 112.15 (C-5), 129.14

(Ph), 129.48 (Ph), 135.70 (C-6), 137.41 (Ph), 152.43 (C-2), 153.62 (C-4''), 164.46 (C-4), 175.62 (d,  $J_{P,C} = 230$  Hz,  $\underline{C}O_2CH_2Ph$ ).  $^{31}P$  RMN [161.88 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : -4.24. MS (FAB) m/z: Hallado: 847.0425 ( $MH^+$ ,  $C_{35}H_{56}N_3O_{13}PSSi_2$ ). Calculado: 847.0423. HPLC ( $CH_3:H_2O$ , 40:60) Tr = 10.85 min. . HPLC ( $CH_3:H_2O$ , 35:65) Tr = 7.25 min.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3-N-[3-[[[(hidroxicarbonil)hidroxifosforil]oxi]propil]timina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (Ib)**

Una disolución de **3.15** (0.1 g, 0.12 mmol) en metanol (10 mL) se somete a hidrogenación en presencia de Pd/C 10% (10% en peso) (0.01 g, 7.8 mmol) a 25°C y 30 psi de presión durante 1 hora. A continuación se filtra el catalizador, se lava con metanol (10 mL) y el filtrado se evapora a sequedad obteniéndose 0.06 g (60%) de un sólido blanco amorfo que por sus datos analíticos y espectroscópicos se identifica como **Ib**.  $^1H$  RMN [400 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : 0.81, 0.97 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.92 (m, 2H,  $\underline{CH}_2$ ), 1.96 (s, 3H,  $CH_3-5$ ), 3.74-4.08 (m, 6H,  $NCH_2CH_2CH_2O$ , 2H-5'), 4.33 (t, 1H,  $J_{4',5'a} = 3.8$ ,  $J_{4',5'b} = 3.7$  Hz, H-4'), 4.54 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.1$  Hz, H-2'), 5.63 (s, 1H, H-3''), 6.03 (d, 1H, H-1'), 7.51 (s, 1H, H-6).  $^{13}C$  RMN [100 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : -5.47, -4.94, -4.91, -4.24 ( $CH_3-Si$ ), 9.30 ( $CH_2$ ), 13.12 ( $CH_3-5$ ), 18.78, 19.23 [ $(CH_3)_3-C-Si$ ], 25.91, 26.48 [ $(\underline{C}H_3)_3-C-Si$ ], 30.07 (d,  $J_{P,CH_2} = 6.8$  Hz,  $CH_2$ ), 40.16 ( $NCH_2$ ), 63.22 (C-5'), 64.30 (d,  $J_{P,CH_2} = 6.1$  Hz,  $\underline{CH}_2O$ ), 76.03 (C-2'), 85.71 (C-4'), 88.51 (C-1'), 90.96 (C-3''), 93.22 (C-3'), 112.18 (C-5), 135.62 (C-6), 152.48 (C-2), 153.53 (C-4''), 164.55 (C-4), 182.01 (d,  $J_{P,C} = 235$  Hz,  $\underline{C}O_2H$ ).  $^{31}P$  RMN [161.88 MHz,  $CD_3OD$ ]  $\delta$ : -12.20. MS (FAB) m/z: Hallado: 756.9199 ( $MH^+$ ,  $C_{28}H_{50}N_3O_{13}PSSi_2$ ). Calculado: 756.9198. HPLC ( $CH_3:H_2O$ , 35:65) Tr = 4.93 min.

## II.5. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE TSAO-T MODIFICADOS EN LA POSICIÓN 4 DEL ANILLO DE TIMINA.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-4-tiotimina]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (4.1)**

A una disolución de TSAO-T (**24**) (0.2 g, 0.34 mmol) en tolueno seco (10 mL) se añade el reactivo de Lawesson (0.17 g, 0.41 mmol) y se calienta a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión

reducida. El residuo obtenido se purifica en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 2:1) obteniéndose 0.125 g (60%) de **4.1** como un sólido amarillo amorfo. UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  = 331.7 y 230.5 nm,  $\lambda_{\min}$  = 287.4 nm. <sup>1</sup>H RMN [200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 0.83, 0.96 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 2.05 (d, 3H,  $J$  = 1.3 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 4.06 (dd, 1H,  $J_{4',5'a}$  = 3.8,  $J_{5'a,5'b}$  = 7.6 Hz, H-5'a), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'b}$  = 3.4 Hz, H-5'b), 4.34 (dd, 1H, H-4'), 4.71 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  = 8.1 Hz, H-2'), 5.76 (s, 1H, H-3''), 5.99 (d, 1H, H-1'), 6.47 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.56 (d, 1H, H-6), 11.65 (s ancho, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 17.23 (CH<sub>3</sub>-5), 18.39, 18.95 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.72, 26.34 [(C-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 63.02 (C-5'), 75.35 (C-2'), 85.38, 87.65 (C-4', C-3''), 87.68 (C-3'), 92.31 (C-1'), 120.05 (C-5), 132.46 (C-6), 148.78 (C-4''), 152.03 (C-2), 192.33 (C-4). Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>: C, 47.57; H, 7.15; N, 6.93. Hallado: C, 47.45; H, 7.10; N, 6.90.

**[1-[2',5'-Di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3,4-dihidro-5-metil-2-pirimidona]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) y [1-[2',5'-di-O-(*terc*-butildimetilsilil)-*b*-D-ribofuranosil]-3,6-dihidro-5-metil-2-pirimidona]-3'-espiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxatiol-2'',2''-dióxido) (4.2 y 4.4)**

A una disolución del tioderivado **4.1** (0.1 g, 0.17 mmol) en metanol (1 mL) y THF (1.41 mL) se añade cloruro de níquel hexahidratado (NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O) (0.33 g, 1.37 mmol) y la mezcla resultante se enfría a 0°C. Sobre esta mezcla de reacción se añade NaBH<sub>4</sub> (0.31 g, 8.25 mmol), observándose que la reacción es fuertemente exotérmica. Transcurridos 30 minutos la mezcla resultante se filtra a través de celita y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo así obtenido se disuelve en diclorometano (20 mL), se lava con una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (10%) (2 x 10 mL) y posteriormente con una solución saturada de EDTA (10 mL) y H<sub>2</sub>O (10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo finalmente obtenido se purifica primero en el cromatotrón (hexano:acetato de etilo, 3:1) y posteriormente en cromatografía de capa fina preparativa (hexano: acetato de etilo, 3:2) en tres desarrollos.

De las fracciones de mayor movilidad se aislan 0.020 g (20%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **4.4**. UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  = 230.8 nm,  $\lambda_{\min}$  = 211.5 nm. <sup>1</sup>H RMN [400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]  $\delta$ : 0.86, 0.94 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.67 (d, 3H,  $J_{\text{CH}_3-5, \text{H}_4}$  = 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.80-4.02 (m, 4H, 2H-5', CH<sub>2</sub>-6), 4.10 (dd, 1H,  $J_{4',5'a}$  = 4.1,  $J_{4',5'b}$  = 3.1 Hz, H-4'), 4.67 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  = 7.9 Hz, H-2'), 5.64 (s, 1H, H-3''), 5.74 (d, 1H, H-1'), 5.93 (m, 1H, H-4),

6.48 (s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.42 (m, 1H, NH-3). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 16.99 (CH<sub>3</sub>-5), 18.64, 18.95 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.95, 26.40 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 46.90 (CH<sub>2</sub>-6), 63.19 (C-5'), 71.95 (C-2'), 83.67 (C-4'), 89.02 (C-1'), 91.31 (C-3''), 92.22 (C-3'), 106.14 (C-5), 120.72 (C-4), 153.58 (C-4''), 154.10 (C-2). MS (ES+) m/z 598.3 (M + Na)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 50.06; H, 7.88; N, 7.30. Hallado: C, 49.98; H, 7.76; N, 7.15.

De las fracciones de menor movilidad se aislan 0.024 g (25%) de un sólido blanco amorfo que se caracteriza como **4.2**. UV (CH<sub>3</sub>CN) λ<sub>max</sub> = 231.7 nm, λ<sub>min</sub> = 210.2 nm. <sup>1</sup>H RMN [400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 0.87, 0.94 (2s, 18H, 2*t*-Bu), 1.69 (d, 3H, *J* = 0.5 Hz, CH<sub>3</sub>-5), 3.82 (ddd, 1H, *J*<sub>4a,4b</sub> = 15.1, *J*<sub>4a,NH</sub> = 1.3 Hz, H-4a), 3.88 (ddd, 1H, *J*<sub>4b,NH</sub> = 2.6 Hz, H-4b), 3.94 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'a</sub> = 4.4, *J*<sub>5'a,5'b</sub> = 12.0 Hz, H-5'a), 4.03 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'b</sub> = 3.1 Hz, H-5'b), 4.09 (dd, 1H, H-4'), 4.60 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, H-2'), 5.59 (d, 1H, H-1'), 5.62 (s, 1H, H-3''), 6.15 (d, 1H, H-6), 6.19 (dd, 1H, NH-3), 6.51 (s ancho, 1H, NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN [75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] δ: 15.64 (CH<sub>3</sub>-5), 18.43, 18.75 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 25.76, 26.08 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si], 45.52 (CH<sub>2</sub>-4), 62.89 (C-5'), 75.95 (C-2'), 83.44 (C-4'), 89.78 (C-1'), 90.71 (C-3''), 92.31 (C-3'), 110.82 (C-5), 121.76 (C-6), 153.77 (C-4''), 157.57 (C-2). MS (ES+) m/z 598.3 (M + Na)<sup>+</sup>. Análisis elemental (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub>: C, 50.06; H, 7.88; N, 7.30. Hallado: C, 50.02; H, 7.70; N, 7.21.

## II.6. MÉTODOS BIOLÓGICOS

El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 [VIH-1 (HTLV-III<sub>B</sub>)] se obtuvo de células H9 persistentemente infectadas por VIH. Los stocks de virus se prepararon de los sobrenadantes de células MT4 infectadas por VIH-1 (III<sub>B</sub>). El VIH-2 (ROD) fue proporcionado por el Dr. L. Montaigner (Pasteur Institute, París, France). Las células CEM/0 se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection (Rockville, MD).

### II.6.1. Ensayos de actividad antiviral

#### II.6.1.1. *Ensayo de viabilidad*<sup>94</sup>

Todos los ensayos biológicos han sido realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

Se suspenden células CEM ( $4 \times 10^5$  células/mL) en medio de cultivo y se infectan con VIH-1 o VIH-2 a una concentración 100 veces superior a la dosis infectiva 50% (CCDI<sub>50</sub>). Se transfieren 100 mL de la suspensión de células infectadas a pocillos de microplacas, se mezcla con 100 mL de la dilución adecuada del compuesto en estudio y se incuba a 37°C. Después de 4 días, se determina el número de células viables en una cámara de recuento de glóbulos rojos mediante tinción con tripano azul en cultivos infectados y no infectados. La concentración efectiva 50% (CE<sub>50</sub>) y la concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) se definen como la concentración del compuesto que reduce el número de células viables en un 50% en células infectadas y no infectadas, respectivamente.

#### II.6.1.2. *Formación de sincitios*

La formación de células gigantes en células CEM inducida por VIH-1 se determina microscópicamente.

## II.6.2. Ensayos de citotoxicidad

### Determinación de viabilidad por el método de exclusión del colorante tripano azul, descrito en el apartado II.6.1.1

Se estudió el tiempo mínimo requerido por el compuesto para expresar su efecto citopático. Así, la viabilidad de células CEM se determinó tras 2 horas en contacto de las células con el compuesto, lavado e incubación durante 1, 3 ó 5 días a 37°C, y se comparó con la citotoxicidad del compuesto tras 1, 3 ó 5 días de contacto, determinándose la  $CC_{50}$ .

### II.6.3. Ensayos de inhibición directa de la enzima Transcriptasa Inversa salvaje y mutada (Glu138Lys)<sup>58</sup>

Para la realización de estos experimentos se emplearon diferentes concentraciones (500, 50 y 5  $\mu$ M) del correspondiente compuesto **3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15**, **Ib**, **4.2**, y **4.4** con el fin de conocer la concentración efectiva que inhibe al 50% la actividad de la enzima TI. Se ensayó también el derivado TSAO-m<sup>3</sup>T (**25**) con fines comparativos, así como un control del experimento sin inhibidor.

Para cada una de las concentraciones de los diferentes derivados mencionados anteriormente se preparó la siguiente mezcla de reacción (se señala entre paréntesis la concentración final de reactivo para un volumen total de reacción 50  $\mu$ L): 16.542  $\mu$ L de agua, 2  $\mu$ L de buffer Tris.HCl (pH = 7.8) 1 M (50  $\mu$ M), 3  $\mu$ L de tritón 1% (0.06%), 0.625  $\mu$ L de ditiotretitol 0.4 M (5 mM) y 0.25  $\mu$ L de glutation 0.06 M, (300  $\mu$ M), 7.5  $\mu$ L de KCl 1 M (150 mM), 2.5  $\mu$ L de EDTA 10 mM (500  $\mu$ M), 0.25  $\mu$ L de suero de albúmina bovina 5 mg/mL (1.25  $\mu$ g), dGTP\* (1  $\mu$ L, 4.6  $\mu$ M) ( $\mu$ Ci/mL), 3.333  $\mu$ L de poli (rC).oligo (dG) (0.1 mM), 2.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 100 mM (5mM), 5  $\mu$ L del inhibidor de una concentración 10 veces superior a la que se desea probar, 5  $\mu$ L de agua en el caso del control y 5  $\mu$ L de enzima Transcriptasa Inversa salvaje o mutada Glu138Lys. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min. Se añade levadura RNA (200  $\mu$ L, 2 mg/mL) y disolución saturada de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> con ácido tricloroacético (TCA) (1 mL, 5% v/v). Posteriormente se pone en hielo durante 20 min y se filtra a vacío lavando con TCA (5%) (20 mL) y etanol (20 mL). Se añade líquido de centelleo (HISAFE II) (10 mL) posteriormente se determinan las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo.

#### II.6.4. Selección de cepas de VIH-1 resistentes

Se someten 6 mL de células CEM ( $4 \times 10^5$  células/mL) infectadas por VIH-1 a 2 ó 3 veces el  $CE_{50}$  de los derivados TSAO (**1.1**) y (**Ib**) en 25 cm<sup>2</sup> de frascos de cultivo (Falcon, Becton Dickinson). El medio de cultivo de RPMI-1640 contiene 10% de suero bovino fetal, 2mM de glutamina y 0.075% NaHCO<sub>3</sub>. La multiplicidad de la infección inicial fue 200 cultivos celulares infectados con dosis-50 (CDID<sub>50</sub>). Diferentes pases se llevaron a cabo cada 4 ó 5 días añadiendo 0.5 a 10 mL del sobrenadante del cultivo infectado a un volumen de cultivo fresco de 5 mL conteniendo  $4 \times 10^5$  células CEM no infectadas/mL y cantidades crecientes de inhibidor (~5 veces).

#### II.6.5. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la Transcriptasa Inversa de cepas de VIH-1 resistentes

Se infectan células MT-4 ( $3 \times 10^5$  células/mL) con diferentes cepas de VIH-1 a 200 CCID<sub>50</sub> y se incuban en cultivos celulares RPMI-1640 durante 3 días a 37°C. Entonces, las células se centrifugan, se lavan dos veces con PBS y se suspenden en agua miliQ con MgCl<sub>2</sub> y proteinasa K. La suspensión celular se incuba a 56°C durante 1 hora y a continuación se calienta a 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenan a -20°C. La PCR (polimerasa Chain reaction) se lleva a cabo según el procedimiento descrito<sup>79</sup>.

#### II.6.6. Estudios de metabolismo

##### II.6.6.1. Estabilidad en PBS

La estabilidad química de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] **3.6**, **3.9**, **3.10**, **3.15** y **Ib** se determinó utilizando un buffer de fosfato salino (PBS, pH = 7.4). Así sobre 12 mL de PBS (pH = 7.4) se añaden 100 µL de una solución del conjugado (0.5 mM en dimetilsulfóxido). La mezcla resultante se calienta a 37°C con un baño de agua. Se toman alícuotas a diferentes tiempos (t = 0, 30, 60 y 180 minutos) que posteriormente se analizan por HPLC, [columna de fase reversa Lichrocart Superspher 60 RP-8, velocidad de flujo 1 mL/min. Detección UV ( $\lambda = 260$  nm)] utilizando como fase móvil CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (0.05% TFA).

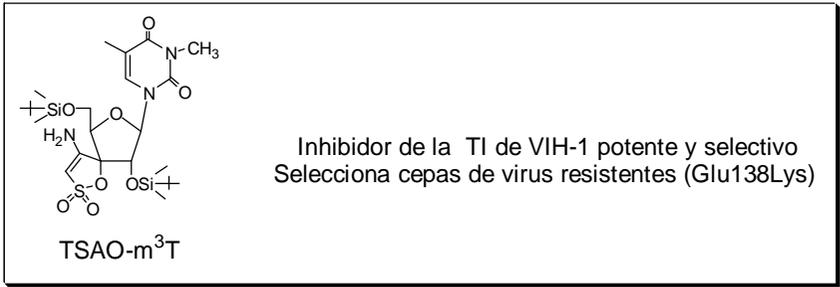
### ***II.6.6.2. Estabilidad en suero humano***

Sobre 1.8 mL de suero humano se añaden 0.2 mL de una solución de los conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] (10 µg/mL en CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN =1:1, v/v) y la mezcla resultante se incuba a 37°C. Se toman alícuotas a diferentes tiempos (t = 0, 30, 60 y 180 minutos) de 0.1 mL a la que se añade 400 µL de CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>COOH (9:1 v/v). Las muestras se centrifugan y 400 µL del sobrenadante se evapora. El residuo final se disuelve en 200 µL de CH<sub>3</sub>CN al 30% . Finalmente, 100 µL se inyectan y se analizan por HPLC, [columna de fase reversa Lichrocart Superspher 60 RP-8, velocidad de flujo 1 mL/min. Detección UV ( $\lambda = 260$  nm)] utilizando como fase móvil CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (0.05% TFA).

### ***II.6.6.3. Estabilidad en extractos de células CEM***

Para la obtención de los extractos de células CEM, se toman 200 mL de células CEM se centrifugan y se lavan dos veces con PBS, una vez con buffer de Tris.HCl (pH = 7.8) 1 M (100 µM) y β-mercaptoetanol (90 mM). Seguidamente, se suspenden en 500 µL del mismo buffer. A continuación, se lleva a cabo la sonicación de las células y las suspensión resultante se centrifuga a 15000 rpm. Finalmente se toman los sobrenadantes y se congelan a -80°C hasta su utilización.

Para la realización de los ensayos se incuba a 37°C una concentración 100 µM del derivado TSAO correspondiente (**1.1, Ib**) junto con 100 µL del extracto de células CEM. Se toman alícuotas a diferentes tiempos (t = 0, 30, 60 y 180 minutos) de 50 µL a la que se añade 100 µL de metanol frío. Seguidamente, se centrifuga y 100 µL del sobrenadante se inyectan para su análisis por HPLC, [columna de fase reversa Lichrocart Superspher 60 RP-8, velocidad de flujo 1 mL/min. Detección UV ( $\lambda = 260$  nm)] utilizando como fase móvil CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (0.05% TFA).



**Objetivos**

"Nueva generación" de derivados TSAO con un perfil de resistencias diferente

Modelo de Interacción TSAO-T/TI de VIH-1

**Estrategias**

Eliminación del grupo 4"-NH<sub>2</sub>

Interacción con la Lys 138 de la cepa TSAO-resistente

Interacciones adicionales con aminoácidos próximos al Glu 138

Estrategia "Doble Fármaco" Alternativa a la terapia combinada

**Resultados**

<p>TSAO-desaminado (1.1)</p>	<p>TSAO-4"-sustituido (1.8)</p>	<p>TSAO-3"-sustituidos (2.15, 2.19, 2.30)</p>	<p>Conjugado [TSAO-T]-[Foscarnet] (Ib)</p>
<p>Nuevo prototipo No selecciona cepas mutadas Glu138Lys</p>	<p>Activo frente a la TI mutada (138Lys)</p>	<p>Primeros derivados TSAO con actividad frente a VIH-2 (¿mecanismo dual?)</p>	<p>Actividad frente a cepas TSAO-resistentes Liberación intracelular de los dos inhibidores</p>

4.2

Nuevo modelo de interacción TSAO/TI Distinto al resto de IENN

## CONCLUSIONES

Con el fin de obtener derivados TSAO de “segunda generación”, con un perfil de actividad/resistencias diferente al de los derivados TSAO de “primera generación” y que además pudieran de algún modo retrasar y/o evitar la aparición de cepas de virus resistentes, se han abordado diferentes aproximaciones.

Primeramente, se han preparado derivados TSAO modificados en la posición 4” del anillo de espiroaminoxatioldióxido mediante, por un lado, la eliminación del grupo 4”-NH<sub>2</sub> y por otro, la introducción sobre este amino de grupos carbonilos que pudieran ser capaces de interactuar con el grupo amino de la Lys de la posición 138 de las cepas TSAO-resistentes. Asimismo, se ha abordado la preparación de derivados TSAO que pudieran dar lugar a interacciones adicionales con la TI del VIH-1. Para ello se han sintetizado compuestos en los que manteniendo el grupo 4”-amino del espiroanillo (para interactuar con el Glu-138) se ha sustituido la posición contigua (3”) con grupos de diferente naturaleza que pudieran interactuar con aminoácidos de la enzima próximos a dicho Glu-138. Además, utilizando la estrategia doble-fármaco” se han preparado conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] como una alternativa a la terapia combinada. Finalmente, la preparación de derivados TSAO modificados en la posición 4 del anillo de Timina, ha constituido una herramienta muy útil que ha ayudado a postular un modo de interacción de los derivados TSAO con la TI de VIH-1, diferente al del resto de inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN).

Desde el punto de vista Químico, explorar la reactividad del anillo de 4-amino- $\gamma$ -sultona ha supuesto un reto sintético importante ya que la reactividad de este anillo había sido muy poco estudiada. Además, la síntesis de las moléculas objetivo abordadas en este trabajo ha requerido la búsqueda de condiciones suaves de reacción compatibles con la presencia de los grupos TBDMS de la molécula TSAO, esenciales para la actividad antiviral, lo que ha limitado las posibilidades sintéticas.

Las aportaciones más significativas del trabajo reflejado en la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. La acilación regioselectiva del grupo amino de la posición 4'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido se ha llevado a cabo mediante reacciones de acilación tanto con cloruros de ácido como con isocianatos con buenos rendimientos. Sin embargo, las reacciones de alquilación de dicho espiroanillo transcurren con baja regioselectividad y dan lugar a mezclas de productos de C y N-alquilación.
2. Se ha desarrollado una metodología sintética para la funcionalización regioselectiva de la posición 3'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido mediante reacciones de acoplamiento de Stille catalizadas por paladio. La preparación de los intermedios de esta reacción ha requerido la puesta a punto de reacciones de halogenación en dicha posición 3''.
3. Se ha sintetizado el primer conjugado de foscarnet con un IENN (TSAO-T) de la TI de VIH-1. Para la preparación de este conjugado se ha puesto a punto un procedimiento sintético, en el que se utiliza un grupo bencilo como protector del carboxilo del foscarnet, que ha permitido el empleo de condiciones suaves de reacción compatibles con los grupos funcionales del TSAO y en las que no se han observado procesos de descarboxilación.
4. Se ha preparado el análogo de TSAO-T en el que se ha eliminado el grupo carbonilo de la posición 4 del anillo de timina mediante reacción de desulfuración reductiva utilizando, por primera vez en anillos de pirimidina, boruro de níquel como agente reductor.

Desde el punto de vista Biológico, los resultados de mayor interés son los siguientes:

1. Con la eliminación del grupo amino de la posición 4'' del anillo de espiroaminoxatioldióxido de las moléculas TSAO se ha obtenido un nuevo tipo de compuesto que manteniendo la especificidad frente a la replicación de VIH-1 no selecciona ninguna de las mutaciones descritas como resistentes a otros IENN,

---

incluyendo la mutación específica de los derivados TSAO (Glu138 Lys). Este nuevo prototipo podría actuar por un mecanismo de acción distinto a los IENN clásicos y derivados TSAO descritos hasta el momento.

2. El derivado TSAO portador de un grupo ácido en la posición 4" del espiroanillo representa el primer ejemplo de derivados TSAO de "segunda generación" con actividad frente a cepas TSAO-resistentes.
3. Los derivados TSAO portadores en la posición 3" del espiroanillo de grupos vinilo conjugados inhiben de manera significativa la replicación de VIH-2. Estos derivados podrían actuar por un mecanismo de acción dual interfiriendo con la TI de VIH-1 y con un proceso distinto en células infectadas por VIH-2.
4. Se han preparado conjugados [TSAO-T]-[Foscarnet] como una alternativa a la terapia combinada. Estos conjugados son activos frente a las cepas de virus TSAO-resistentes. Los estudios de metabolismo de estos compuestos sugieren que la hipótesis de diseño ha funcionado y que el enlace P-O entre ambos inhibidores podría hidrolizarse intracelularmente.

**BIBLIOGRAFIA**

1. a) Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS epidemic update: December 2000. <http://www.unaids.org>. b) UNAIDS/WHO. Epidemiological fact sheet on HIV/AIDS and sexually transmitted infections. 2000 update, Spain. <http://www.who.ch/emc/diseases/hiv>.
2. Secretaría del plan nacional sobre el SIDA. Centro nacional de epidemiología. Vigilancia epidemiológica del SIDA en España, registro nacional de casos de SIDA (balance a 30 de Junio de 2000). <http://www.msc.es/sida/menu.htm>.
3. Broder, S. AIDS. Modern concepts and therapeutic challenges. Ed. Marcel Dekker, New York. **1987**.
4. Wormser, G. P.; Stahl, R. E.; Bottone, E. J. AIDS and other Manifestations of HIV infection. Noyes publications. New Jersey. **1987**.
5. Barré-Sinoussi, F.; Cherman, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Yezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, **1983**, 220, 868-871.
6. Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Reed, E.; Gallo, R. C. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science*, **1984**, 224, 497-500.
7. a) Powell, K. L.; Darby, G. HIV reverse transcriptase as a target for antiviral drugs, en *Design of Anti-AIDS drugs*. Ed. De Clercq, E. Elsevier. Amsterdam. **1990**, 123-140. b) De Clercq, E. Antiviral agents and human viral diseases. 4<sup>th</sup> Ed. Lippincott Raven Publishers. Philadelphia. **1997**, 1-44.
8. Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. Molecular targets for AIDS therapy. *Science*, **1990**, 249, 1533-1544.

9. De Clercq, E. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *AIDS Res. Human Retrovir.*, **1992**, 8, 119-134.
10. Jacobo-Molina, A.; Arnold, E. HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry*, **1991**, 30, 6351-6356.
11. Arnold, E.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R. G. Williams, R. L.; Lu, X.; Ding, J.; Clark, A. D.; Zhang, A.; Ferris, A. L. Clark, P.; Hizi, A.; Hughes, S. H. Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active sites locations. *Nature*, **1992**, 357, 85-89.
12. Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **1992**, 256, 1783-1790.
13. Jacobo-Molina, A.; Ding, J.; Nanni, R. G.; Clark, A. D.; Lu, X.; Tantillo, C.; Williams, R. L.; Kamer, G.; Ferris, A. L. Clark, P.; Hizi, A.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 6320-6324.
14. Ren, J.; Esnouf, R.; Garman, E.; Somers, D.; Ross, C.; Kirby, I.; Keeling, J.; Darby, G.; Jones, Y.; Stuart, D.; Stammers, D. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nature Struct. Biol.*, **1995**, 2, 293-302.
15. Patel, P. H.; Jacobo-Molina, A.; Ding, J.; Tantillo, C.; Clark, A. D. Jr.; Raag, R.; Nanni, R. G.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Insights into DNA polymerisation mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **1995**, 34, 5351-5363.
16. Spence, R.; Kati, W. M.; Anderson, K. S.; Johnson, K. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Science*, **1995**, 267, 98-993.
17. Vandamme, A. M.; Vaerenbergh, Van ; De Clercq, E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antiviral. Chem. Chemother.*, **1998**, 9, 187-203.
18. Mitsuya, M.; Popovic, M.; Yarchoan, R; Matsushita, S.; Gallo, R. C.; Broder, S. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science*, **1984**, 226, 172-174.
19. De las Heras, F. G.; Camarasa, M. J.; Fiandor, J. Nucleosides: Potential drugs for AIDS therapy. *In Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics*. Springer, Verlag. Berlin. Heidelberg. **1990**.

20. De Clercq, E. Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 2491-2517.
21. De Clercq, E. In a search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1997**, *10*, 674-693.
22. Yarchoan, R.; Mitsuya, H.; Thomas, R. V.; Pluda, J. M.; Hartman, N. R.; Perno, C. F.; Marczyk, K. S.; Allain, J. P.; Johns, D. G.; Broder, S. In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2',3'-dideoxyinosine. *Science*, **1989**, *245*, 412-415.
23. Larder, B. A.; Kemp, S. D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, **1989**, *246*, 1155-1158.
24. Richman, D. D.; Fischl, M. A.; Grieco, M. H. and the AZT Collaborative Working Group. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *New Engl. J. Med.*, **1987**, *317*, 192-197.
25. Soudeyns, H.; Yao, X. J.; Gao, Q.; Belleau, B.; Kraus, J. L.; Nguyen-Ba, N.; Spira, B.; Wainberg, M. A. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy-3'-triacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1991**, *35*, 1386-1390.
26. a) De Clercq, E. Trends in the development of new antiviral agents for the chemotherapy of infections caused by herpesviruses and retroviruses. *Rev. Med. Virol.*, **1995**, *5*, 149-164. b) De Clercq, E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1995**, *8*, 200-239.
27. a) Broder, S. Clinical applications of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) and related dideoxynucleosides. *Med. Res. Rev.*, **1990**, *10*, 419-439.
28. Clavel, F.; Guétard, A. HIV-2, the West African AIDS virus. *AIDS*, **1987**, *1*, 135-140.
29. a) Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two patent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 6127-6133. b) Harrington, J. A.; Reardon, J. E.; Spector, T. 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate: an inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, *37*, 918-920.
30. a) Boucher, C. A. B.; O'Sullivan, E.; Mulder, J. W.; Ramautarsing, C.; Kellman, P.; Darby, G.; Lange, J. M. A.; Goudsmit, J.; Larder, B. A. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency

- virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.*, **1992**, *165*, 105-110. b) Schinazi, R. F.; Larder, B. A.; Mellors, J. W. Mutations in retroviral genes associates with drug resistance. *Int. Antiviral News*, **1997**, *5*, 129-133. c) Menéndez-Arias, L.; Domingo, E. Resistance tables for antiretroviral drugs. *AIDS Cyberg J.*, **1998**, *1*, 95-127.
31. a) De Clercq, E. Development of resistance of human immunodeficiency virus (HIV) to anti-HIV agents: how to prevent the problem? *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, *9*, 21-36. b) De Clercq, E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections: strategies to overcome drug resistance development. *Med. Res. Rev.*, **1996**, *16*, 125-157. c) Larder, B. A. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Gen. Virol.*, **1994**, *75*, 951-957. d) Balzarini, J.; Naesens, L.; De Clercq, E. New antivirals-mechanism of action and resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, **1998**, *1*, 535-546.
32. a) Balzarini, J.; De Clercq, E. Analysis of inhibition of retroviral reverse transcriptase. *Methods Enzymol.* **1996**, *275*, 472-502. b) Balzarini, J.; De Clercq, E. Biochemical pharmacology of nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors active against HIV. In: *Textbook of AIDS medicine*, Merigan T. C.; Barlett, J. G.; Bolognesi, D. Eds. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, **1998**, cap. 47, 815-847.
33. a) Balzarini, J.; Hao, Z.; Herdewijn, P.; Johns, D. G.; De Clercq, E. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1991**, *88*, 1499-1503. b) Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Dvorakova, H.; Hao, Z.; Snoeck, R.; Herdewijn, P.; Johns, D. G.; De Clercq, E. 9-[(2RS)-3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1991**, *88*, 4691-4965. c) Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosemberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; Baba, M.; Johns, D. G.; De Clercq, E. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1989**, *86*, 332-336. d) Pauwels, R.; Balzarini, J.; Schols, D.; Baba, M.; Desmyter, J.; Rosemberg, I.; Holy, A.; De Clercq, E. Phosphonylmethoxyethyl purine derivatives, a new class of anti-human immunodeficiency virus agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, *32*, 1025-1030.

- 
34. Balzarini, J. Suppression of resistance to drugs targeted to human immunodeficiency virus reverse transcriptase by combination therapy. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *58*, 1-27.
35. a) Tisdale, M.; Alnadaf, T.; Cousens, D. Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, *41*, 1094-1098. b) Harrigan, R.; Stone, C.; Griffin, P.; Bloor, S.; Tisdale, M.; Larder, B.CNAA2001 Trial Team. Antiretroviral activity and resistance profile of the carbocyclic nucleoside HIV reverse transcriptase inhibitor 1592U89. *Fourth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, USA, 22-26 January **1997**, Washington DC, Abstract n° 15. c) Fitzgibbon, J. E.; Howell, R. M. Haberzetzl, C. A.; Sperber, S. J.; Gockle, D. J.; Dubin, D. T. Human immunodeficiency virus type 1 po gene mutations which cause decreases susceptibility to 2',3'-dideoxycytidine. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1992**, *36*, 153-157.
36. De Clercq, E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res.*, **1998**, *38*, 153-179.
37. Young, S. D. Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Perspect. Drug Discov. Des.*, **1993**, *1*, 181-192.
38. a) Tantillo, C.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R. G.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Pauwels, R.; Andries, K.; Janssen, P. A. J.; Arnold, E. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *243*, 369-387. b) Smerdon, S. J.; Jäger, J.; Wang, J.; Kohlstaedt, L. A.; Chirino, A. J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 3911-3915.
39. a) Stammers, D.; Somers, D.; Ross, C.; Kirby, I.; Ray, P. H.; Wilson, J. E.; Norman, M.; Ren, J.; Esnouf, R.; Garman, E.; Jones, Y.; Stuart, D. Crystals of HIV-1 reverse transcriptase diffracting to 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *242*, 586-588. b) Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **1998**, *282*, 1669-1675.

40. Nanni, R. G.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A., Hughes, S. H.; Arnold, E. Review of HIV-1 reverse transcriptase three-dimensional structure: implications for drug design. *Perspect. Drug Discovery Design*, **1993**, *1*, 129-150.
41. a) Ding, j.; Das, K.; Moereels, H.; Koymans, L.; Andries, K.; Janssen, P. A.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 407-415. b) Esnouf, R., Ren, J.; Hopkins, A.; Ross, C.; Jones, Y.; Stammers, D.; Stuart, D. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl) piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1997**, *94*, 3984-3989.
42. Esnouf R.; Ren, J. S.; Ross, C.; Jones, Y.; Stammers, D.; Stuart, D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 303-308.
43. a) Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Schols, D.; Perno, C. F.; Vandamme, A. M.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E. 2',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)pyrimidine (TSAO) nucleoside analogues: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are targeted at the viral reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1992**, *89*, 4392-4396. b) Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. 3'-Spiro-nucleosides, a new class of specific human immunodeficiency virus type 1 inhibitors: synthesis and antiviral activity of [2'-5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-xylo-and-ribofuranose]-3'-spiro-5''-[4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide] (TSAO) pyrimidine nucleosides. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 2721-2727. c) Velázquez, S.; Jimeno, M. L.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J. Synthesis of [1-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-arabino- and  $\beta$ -D-ribofuranosyl]-cytosine]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide). Analogs of the highly specific anti-HIV-1 agent TSAO-T. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 11013-11022.
44. a) Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Alvarez, R.; Ingate, S.; Jimeno, M. L.; Karlsson, A.; De Clercq, E.; Balzarini, J. TSAO derivatives: Highly specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. *Nucleosides . Nucleotides.*, **1995**, *14*, 25255-25258. b) Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Karlsson, A. TSAO derivatives: Hihly specific human

- immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitors. *Drugs of the Future*, **1993**, *18*, 1043-1055.
45. Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E. [2'-5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (TSAO) derivatives of purine and pyrimidinenucleosides as potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 1073-1080.
46. Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; Bathurst, I. C.; Barr, P. J.; De Clercq, E. Kinetics of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase by the novel HIV-1-specific nucleoside analogue [2'-5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-ribo-furanosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)thymine (TSAO-T). *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 11831-11838.
47. Camarasa, M. J.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Velázquez, S.; Alvarez, R.; Chamorro, C.; Jimeno, M. L.; Pérez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J. HIV-1 Specific reverse transcriptase inhibitors: Why are TSAO-nucleosides so unique? *J. Carbohydr. Chem.*, **2000**, *19*, 451-469.
48. Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J. TSAO analogues. Stereospecific synthesis and anti-HIV-1 activity of 1-[2'-5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) pyrimidine and pyrimidine-modified nucleosides. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 2988-2995.
49. a) Velázquez, S.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J. TSAO analogues. 3. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 2',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) purine and purine-modified nucleosides. *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3230-3239. b) Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis of {1-[2',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-xylo-and  $\beta$ -D-ribofuranosyl]-thymine}-3'-spiro-5''-{4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide} (TSAO). A novel type of specific anti-HIV agents. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3029-3032.
50. Alvarez, R.; Jimeno, M. L.; Pérez-Pérez, M. J.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Synthesis and anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 3'-spiro nucleoside analogues of TSAO-T. *Antiviral Chem. Chemother.*, **1997**, *8*, 507-517.

51. Alvarez, R.; San-Félix, A.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Novel TSAO derivatives. Synthesis and anti-HIV-1 activity of allofuranosyl-TSAO-T analogs. *Nucleosides . Nucleotides*, **1996**, *15*, 349-359.
52. a) Ingate, S. T.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Novel L-lyxo and 5'-deoxy-5'-modified TSAO-T analogs: synthesis and anti-HIV-1 activity. *Antiviral. Res.*, **1995**, *32*, 149-164. b) Ingate, S. T.; Pérez-Pérez, M. J.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Synthesis and anti-HIV-1 activity of novel TSAO-T derivatives modified at the 2'- and 5'-positions of the sugar moiety. *Antiviral. Res.*, **1995**, *32*, 281-299.
53. a) Ingate, S. T.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Synthesis and anti-HIV-1 activity of [1-[2',5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-  $\beta$ -L-ribofuranosyl]thymine]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (L-TSAO-T), the L-enantiomer of the highly specific HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitor TSAO-T. *Antiviral Chem. Chemother.*, **1995**, *6*, 365-370. b) Alvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C-F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. 1,2,3-Triazole-[2'-5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-  $\beta$ -D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (TSAO) analogues: synthesis and anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 4185-4194. c) Velázquez, S.; Alvarez, R.; Pérez, C.; Gago, F., De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Regiospecific synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of novel 5-substituted N-alkylcarbamoyl and N,N-dialkylcarbamoyl 1,2,3-triazole-TSAO analogues. *Antiviral. Chem. Chemother.*, **1998**, *9*, 481-489.
54. Velázquez, S.; Chamorro, C.; Pérez-Pérez, M. J.; Alvarez, R.; Jimeno, M. L.; Martín-Domenech, A.; Pérez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; San-Félix, A.; Camarasa, M. J. Abasic analogues of TSAO-T as the first sugar derivatives that specifically inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4636-4647.
55. a) Chamorro, C., Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M- J.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; San-Félix, A. An approach towards the synthesis of potential metal-chelating TSAO-T derivatives as bidentate inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antiviral Chem. Chemother.*, **1998**, *9*, 413-423. b) Chamorro, C., De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; San-Félix, A. TSAO-T analogues bearing aminoacids at position N-3 of thymine: synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2000**, *11*, 61-69.

56. Jonckheere, H.; Taymans, J. M.; Balzarini, J.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; Desmyter, J.; De Clercq, E.; Anné, J. Resistance of HIV-1 reverse transcriptase against [2',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)] (TSAO) derivatives is determined by the mutation Glu138 Lys on the p51 subunit. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 25255-25258.
57. Balzarini, J.; Kleim, J. P.; Riess, G.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E.; Karlsson, A. Sensitivity of (138 GLU LYS) mutated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) to HIV-1-specific RT inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *201*, 1305-1333.
58. Balzarini, J.; Karlsson, A.; Vandamme, A. M.; Pérez-Pérez, M. J.; Vrang, L.; Öberg, B.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains selected for resistance against the HIV-1-specific [2',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)]-β-D-pentofuranosyl (TSAO) nucleoside analogues retain sensitivity to HIV-1-specific non-nucleoside inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1993**, *90*, 6952-6956.
59. Balzarini, J.; Karlsson, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Vrang, L.; Walbers, J.; Zhang, H.; Öberg, B.; Vandamme, A. M.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E. HIV-1 specific reverse transcriptase inhibitors show differential activity against HIV-1 mutant strains containing different amino acid substitutions in the reverse transcriptase. *Virology*, **1993**, *192*, 246-253.
60. Balzarini, J.; Karlsson, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Camarasa, M. J.; Tarpley, W. G.; De Clercq, E. Treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells with combinations of HIV-1 specific inhibitors results in a different resistance pattern than does treatment with single-drug therapy. *J. Virol.*, **1993**, *67*, 5353-5359.
61. Balzarini, J.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Karlsson, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E. Human immunodeficiency virus type 1-specific [2',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)-purine analogues show a resistance spectrum that is different from that of the human immunodeficiency virus type-1-specific non-nucleoside analogues. *Mol. Pharmacol.*, **1993**, *43*, 109-114.
62. Boyer, P. L.; Ding, J.; Arnold, E.; Hughes, S. H. Subunit specificity of mutations that confer resistance to nonnucleoside inhibitors in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, *38*, 1909-1914.

63. a) Harris, D.; Lee, R.; Misra, H. S.; Pandey, P. K.; Pandey, V. N. The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 5903-5908. b) Misra, H. S.; Pandey, P. K.; Pandey, V. N. An enzymatically active chimeric HIV-1 reverse transcriptase (RT) with the RNase-H domain of murine leukemia virus RT exists as a monomer. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 9785-9789.
64. Sluis-Gremer, N.; Dmitrienko, G. I.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Parniak, M. A. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimer destabilization by 1-[spiro[4''-amino-2'',2''dioxo-1'',2''-oxathiole-5'',3'[-2',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]]]-3-ethylthymine. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 1427-1433.
65. Moyle, G. J. Viral resistance patterns selected by antiretroviral drugs and their potential to guide treatment choice. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **1997**, *6*, 943-964.
66. Vandamme, A. M.; Van Vaerenberg, K.; De Clercq, E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antiviral Chem. Chemother.*, **1998**, *9*, 187-203.
67. Collier, A. C.; Coombs, R. W.; Schoenfeld, D. A.; Bassett, R. L.; Timpone, J.; Baruch, A.; Jones, M.; Facey, K.; Whitacre, C.; McAuliffe, V. J.; Merigan, R. C.; Reichman, R. C.; Hooper, C.; Corey, L. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *New Engl. J. Med.*, **1996**, *334*, 1011-1017.
68. Gulick, R. M.; Mellors, J. W.; Havlir, D.; Eron, J. J.; Gonzalez, C.; McMahon, D.; Richman, D. D.; Valentine, F. T.; Jonas, L.; Meibohm, A.; Emini, E. A.; Chodakewitz, J. A. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New Engl. J. Med.*, **1997**, *337*, 734-739.
69. Cao, Y.; Qin, L.; Zhang, L.; Safrit, J.; Ho, D.D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl. J. Med.*, **1995**, *332*, 201-208.
70. Pantaleo, G.; Menzo, S.; Vaccarezza, M.; Graziosi, C.; Cohen, O.J.; Demarest, J.F.; Montefiori, D.; Orenstein, J.M.; Fox, C.; Schragar, L.K.; Margolick, J. B.; Buchbinder, S.; Giorgi, J.V.; Fauci, A.S. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *New Engl. J. Med.*, **1995**, *332*, 209-216.
71. Vandamme, A. M.; Van Laethem, K.; Van Vaerenbergh, K.; De Clercq, E. *International Antiviral News*, **1998**, *6:10*, 182-187.

72. Balzarini, J.; Pelemans, H.; Pérez-Pérez, M.J.; San-Félix, A.; Camarasa, M.J.; De Clercq, E.; Karlsson, A. Marked inhibitory activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against human immunodeficiency virus type 1 when combined with (-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Mol. Pharmacol.*, **1996**, *49*, 882-890.
73. Iversen, A.K.; Shafer, R.W.; Wehrly, K.; Winters, M.A.; Mullins, J.I.; Chesebro, B.; Merigan, T.C. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J. Virol.*, **1996**, *70*, 1086-1090.
74. Balzarini, J.; Karlsson, A.; Sardana, W.; Emini, E.A.; Camarasa, M.J.; De Clercq, E. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-specific reverse transcriptase (RT) inhibitors may suppress the replication of specific drug-resistant (E138K) RT HIV-1 mutants or select for highly resistant (Y181C-C181I) RT HIV-1 mutants. *Proc Natl. Acad. Sci., USA*, **1994**, *91*, 6599-6603.
75. a) Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M.J.; Velazquez, S.; San-Félix, A.; Camarasa, M.J.; De Clercq, E.; Karlsson, A. Suppression of the breakthrough of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in cell culture by thiocarboxanilide derivatives when used individually or in combination with other HIV-1-specific inhibitors (i.e. TSAO derivatives). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1995**, *92*, 5470-5474.  
b) Balzarini, J.; Pelemans, H.; Aquaro, S.; Perno, C.F.; Witvrouw, M.; Schols, D.; De Clercq, E.; Karlsson, A. Highly favorable antiviral activity and resistance profile of the novel thiocarboxanilide pentenyloxy ether derivatives UC-781 and UC-82 as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. *Mol. Pharmacol.*, **1996**, *50*, 394-401.
76. Balter, M. New HIV strain could pose health threat. *Science*, **1998**, *281*, 1425-1426.
77. Yerly, S.; Kaiser, L.; Race, E.; Clavel, F.; Perrin, L. Reverse transcriptase and protease gene analysis at the time of primary HIV-1 infection. *2<sup>nd</sup> Int Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies*, Lake Maggiore, Italy, 24-27 June 1998, Abstract n° 107.
78. a) Murai, S.; Murai, T.; Kato, S. Hydrogenolysis of trigonal carbon-nitrogen bonds. Reduction of C-X to C-H. Selectivity Strategy & Efficiency in Modern organic Chemistry. *Comprehensive Organic Chemistry* Trost, M. B.; Fleming, I. Eds, Pergamon Press: Oxford, **1991**, *8*, cap. 4.5.5, 915-922. b) Doldouras, G. A.; Kollonitsch, J. A direct, selective and general method for reductive deamination of primary amines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 341-342.

79. a) Nickon, A.; Hill, A. S. A direct method for reductive deamination of aliphatic amines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1152-1157. b) Barton, D. H. R.; Bringmann, G.; Lamotte, G.; Motherwell, W. B.; Motherwell, A. E. A.; Reactions of relevance to the chemistry of aminoglycoside antibiotics. Part 14. A useful radical-deamination reaction. *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1980**, 2657-2664.
80. a) Coulter, J. M.; Lewis, J. M.; Lynch, P. P. Hydrogenolysis the enamines-I. Reaction with aluminium hydride. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 4489-4500. b) Lewis, J. W.; Pearce, A. A. Hydrogenolysis of enamines. Part II. Hydroboration-protonolysis. *J. Chem. Soc., (B)*, **1969**, 863-867.
81. Camarasa, M. J.; Jimeno, M. L., Pérez-Pérez, M. J.; Alvarez, R.; Velázquez, S.; Lozano, A. Synthesis, NMR studies and theoretical calculations of novel 3-spiro branched ribofuranoses. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 12187-12200.
82. Lobatón, E.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. An efficient synthesis of 3'-spiro sultone nucleosides functionalized on the sultone moiety via Pd-catalyzed cross-coupling reaction. *Synlett*, **2000**, *9*, 1312-1314.
83. a) Singaram, B.; Goralski, C. T.; Rangaishenvi, M. V. Brown, H. C. Convenient conversion of aldehydes and ketones into the corresponding alkenes via hydroboration of their enamines. A remarkably simple synthesis of either [Z]- or [E]-alkenes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 384-386. b) Singaram, B.; Rangaishenvi, M. V.; Brown, H. C.; Goralski, C. T.; Hasba, D. L. Hydroboration 86. Convenient conversion of aldehydes and ketones into the corresponding alkenes via hydroboration of their enamines. A remarkably simple synthesis of either [Z]- or [E]-alkenes. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1543-1549.
84. Friary, R. J.; Gilligan, J. M.; Szajewky, R. P.; Falci, K. J.; Franck, R. W. Heterocyclic Synthesis via intramolecular acylation of enamines derived from amino acids. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 3487-3491.
85. a) Kornblum, N.; Iffland, D. C. The selective replacement of the aromatic primary amino group by hydrogen in aromatic-aliphatic diamines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, *71*, 2137-2143. b) Zollinger, H.; *The chemistry of Functional Groups*, Supplement C, pt 1; Patai, R.; Rappoport, Z. John Wiley & Sons. New York, **1983**, 603-669. b) March, J. "Advanced Organic Chemistry. 4th edition" John Wiley & Sons. New York **1992**, 721-722.

86. a) Korzeniowsky, S. H.; Blum, L.; Gokel, G. W. Reduction of aryldiazonium compounds in nonpolar media. *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 1469-1478. b) Nakayama, J.; Yoshida, M.; Simamura, O. Reduction of diazonium salts with silyl and stannyl hydrides. A new route for the replacement of amino-groups of aromatic amines by hydrogen. *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 4609-4613.
87. Perez-Perez, M. J.; Balzarini, J.; Hosova, M.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J. Synthesis of adamantane spiro sultones as potential antiviral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, *2(7)*, 647-648.
88. a) Cadogan, J. I. G.; Molina, G. A. A simple and convenient deamination of aromatic amines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1973**, 541-542. b) Doyle, M. P.; Dellaria, J. F.; Siegfried, B.; Bishop, S. F. Reductive deamination of arylamines by alkyl nitrites in *N,N*-dimethylformamide. A direct conversion of arylamines to aromatic hydrocarbons. *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 3494-3498.
89. Nair, V.; Richardson, S. G.; Modification of Nucleic Acid Bases via radical Intermediates: synthesis of dihalogenated purine nucleosides. *Synth. Commun.*, **1982**, 670-672.
90. Nair, V.; Richardson, S. G. Utility of purinyl radicals in the synthesis of base-modified nucleosides and alkylpurines: 6-amino group replacement by H, Cl, Br and I. *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 3969-3974.
91. a) Smith, W. B.; Ho, O. C. Application of the isoamyl nitrite-diiodomethane route to aryl iodides. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 2543-2544. b) Van der Wenden, E. M.; Von Frijtag, J. K.; Künzel, D.; Mathôt, R. A. A.; Danhof, M.; Ijzerman, A. P.; Soudijn, W. Ribose-modified adenosine analogues as potential partial agonists for the adenosine receptor. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4000-4006.
92. a) Ford, H.; Siddiqui, M. A.; Driscoll, J. S.; Marquez, V. E.; Kelley, J. A.; Mitsuya, H.; Shirasaka, T. Lipophilic acid-stable adenosine deaminase activated anti HIV-prodrugs for central nervous system delivery. 2. 6-Halo and 6-alkoxy prodrugs of 2'- $\beta$ -fluoro-2',5'-dideoxyinosine. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 1189-1195. b) Driscoll, J. S.; Siddiqui, M. A.; Ford, H.; Kelley, J. A.; Roth, J. S.; Mitsuya, H.; Tanaka, M.; Marquez, V. E. Lipophilic acid-stable adenosine deaminase activated anti HIV prodrugs for central nervous system delivery. 3. 6-amino prodrugs of 2'- $\beta$ -fluoro-2',3'-dideoxyinosine. *J. Med. Chem.*, **1996**, *38*, 1619-1625.

93. Bernier, J-L.; Hémichart, J-P.; Warin, V.; Trentesaux, C.; Jardillier, J-C.; 5-Cinnamoyl-6-aminouracil derivatives as novel anticancer agents. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 497-502.
94. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosemberg, I.; Holy, A.; Schellekens H.; De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS*, **1991**, 5, 21-28.
95. Withesell, J. K. Selectivity Strategy & Efficiency in Modern organic Chemistry. *Comprehensive Organic Chemistry* Trost, M. B.; Fleming, I. Eds, Pergamon Press: Oxford, **1991**, 6, cap. 4.1, 705-725. b) Hickmott, P. W. Enamines: recent advances in synthetic, spectroscopic, mechanistic and stereochemical aspects-I. *Tetrahedron*, **1982**, 38, 14, 1975-2050.
96. a) Hehre, W. T.; Radom, L.; Schelyer, P. von R.; Pople, J. A.; In Ab initio molecular theory. John Wiley & Sons, New York. **1986**. b) Summers, M. F.; Marzilli, L. G.; Bax, A. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments of coenzyme B<sub>12</sub> through the use of new two-dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 4285-4294.
97. Mulzer, J. D. Synthesis of esters, activated esters and lactones. In *Comprehensive Organic Synthesis*. Eds. Trost, B. M.; Fleming, I. Pergamon Oxford. **1991**, 6, 323-417.
98. Polushin. N. Synthesis of functionally modified oligonucleotides from methoxyoxalamido precursors. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 3231-3234.
99. Dhar, D. N.; Keshava, K. S. Murthy. Recent advances in the chemistry of chlorosulfonyl isocianato. *Synthesis*, **1986**, 437-449.
100. Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; de las Infantas, P.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Volpini, R.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Cristalli, G.; Melman, N.; Park, K-S.; Ji, X-D.; Jacobson, K.A. Synthesis and Biological activity of a new series of N<sup>6</sup>-carboxiamido derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide as A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> adenosine receptor agonists. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3174-3185.
101. Balzarini, J.; Naesens, J.; Bohman, C.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Camarasa, M. J., De Clercq, E. Metabolism and pharmacokinetics of the anti-HIV-1-specific inhibitor [1-[2',5'-bis-O-(tert-butyl)dimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl]-3-N-methyl-thymine]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide). *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 46, 69-77.

- 
102. Kawahara, S. I.; Wada, T.; Sekine, M. Unprecedented mild acid-catalyzed desilylation of the 2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl group from chemically synthesized oligoribonucleotide intermediates via neighbouring group participation of the intermediate phosphate residue. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9461-9468.
103. Greco, M. N.; Zhong, H. M.; Maryanoff, B. E. Unusual lability of  $\alpha$ -silyloxy  $\beta$ -amino carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 4959-4962.
104. Stork, G.; Brizzolara, A.; Landesman, H.; Szmuszkovicz, J.; Terrel, R. The enamine alkylation of carbonyl compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 207-222.
105. Whitesell, J. K.; Whitesell, M. A. Alkylation of ketones and aldehydes via their nitrogen derivatives. *Synthesis*, **1983**, 517-536.
106. a) Prussoff, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1959**, *32*, 295-296. b) Béres, J.; Bentrude, W. G.; Kalman, A.; Parkanyi, L.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis, structure and antitumor and antiviral activities of a series of 5-halouridine cyclic 3',5'-monophosphates. *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 488-493.
107. a) Asakura, J.; Robins, M. J. Cerium (IV) catalyzed iodination at C5 uracil nucleosides. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 2855-2858. b) Asakura, J.; Moris, M. J. Cerium (IV)-mediated halogenation at C5 of uracil derivatives. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4928-4933.
108. Sugiyama, T. A mild and convenient procedure for conversion of aromatic compounds into their iodides using ammonium hexanitratocerate (IV). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, *54*, 2847-2848.
109. a) Tsuji, J. *In Palladium Reagents and Catalyst: Innovations in Organic Synthesis*; John Wiley & sons: Chichester, **1995**, cap. 4, pág. 125. b) Farina, F. *In Comprehensive Organometallic Chemistry II*; E. Abel, W.; Stone, F. G. A.; Wilkinson, G. Eds. Pergamon Press: Oxford, **1995**, *12*, cap. 34, pág 161.
110. a) Heck, R. F. Palladium-catalyzed reactions of organic halides. *Acc. Chem. Res.*, **1979**, *12*, 146-151. b) Heck, R. F. Palladium-catalyzed vinylation of organic halides. *Org. React.*, **1982**, *27*, 345-389.
111. a) Sonogashira, K.; Tohda, J.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 4467-4470. b) Robins, M. J.; Barr, P. J. Nucleic Acid Related Compounds, 39. Efficient conversion of 5-iodo to alkynyl and

- derived 5-substituted uracil bases and nucleosides. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1854-1862.
112. Hobbs Jr, F. W. Palladium-catalyzed synthesis of alkynylamino nucleosides. A universal linker for nucleic acids. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3420-3422.
113. Stille, J. K. The palladium-catalyzed cross coupling reactions of organotin reagents with organic electrophiles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1986**, *25*, 508-524.
114. Mitchel, T. N. Palladium-catalysed reactions of organotin compounds. *Synthesis*, **1992**, 803-814.
115. Farina, F.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. J. The Stille Reaction. *Org. React.*, **1997**, *50*, 1-652.
116. a) Piers, E.; Chong, J. M.; Morton, H. E. Reaction of (Trimethylstannyl)copper reagents with  $\alpha,\beta$ -acetylenic esters. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 4905-4908. b) Piers, E.; Chong, J. M.; Gustafson, K.; Andersen, R. J. A total synthesis of ( $\pm$ ) triophamine. *Can. J. Chem.*, **1984**, *62*, 1-5.
117. Farina, V.; Krishnan, B. Large rate accelerations in the Stille reaction with tri-2-furylphosphine and triphenylarsine as palladium ligands: Mechanistic and synthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 9585-9595.
118. a) Liebeskind, L. S.; Fengl, R. W. 3-Stannylcyclobutenediones as nucleophilic cyclobutenedione equivalents. Synthesis of substituted cyclobutenediones and cyclobutenedione monoacetals and the beneficial effect of catalytic copper iodide on the Stille reaction. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5359-5364. b) Farina, V.; Kapadia, S.; Krishnan, B.; Wang, C.; Liebeskind, L. S. On the nature of the "Copper Effect" in the Stille Cross-coupling. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 5905-5911.
119. a) Piers, E.; Wong, T. Copper (I) Chloride-mediated intramolecular coupling of vinyltrimethylstannane and vinyl halide functions. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3609-3610. b) Allred, G. D.; Liebeskind, L. S. Copper-mediated cross coupling of organoestannanes with organic iodides at or below room temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2748-2749.
120. a) Milton, J.; Slater, M. J.; Bird, A. J. Spinks, D.; Scott, G.; Price, C. E.; Downing, S.; Green, D. V. S.; Madar, S.; Bethell, R.; Stammers, D. K. Biaryl Acids: Novel Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 Reverse transcriptase types 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 2623-2628. b) Ren, J.; Diprose, J.; Warren, J.; Esnouf, R. M.; Bird, L. E.; Ikemizu, S.; Slater, M.; Milton, J.; Balzarini, J.; Stuart, D. I.; Stammers, D.

- K. Phenylethylthiazolylthiourea (PETT) Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5633-5639.
121. Buckheit Jr, R. W.; Watson, K.; Fliakas-Boltz, V.; Russell, J.; Loftus, T. L.; Osterling, M. C.; Turpin, J. A.; Pallansch, L. A.; White, E. L.; Lee, J. W.; Oh, J. W.; Kwon, H. S.; Chung, S. G.; Cho, E. H. SJ-3366, a unique and highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that also inhibits HIV-2. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 393-400.
122. Koshida, R.; Vrang, L.; Gilljam, G.; Harmenberg, J.; Öberg, B.; Wahren, B. Inhibition of human immunodeficiency virus in vitro by combinations of 3'-azido-3'-dideoxythymidine and foscarnet. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, *33*, 778-780.
123. Erikson, B. F.; Schinazi, R. F. Combinations of 3'-azido-3'-dideoxythymidine (zidovudine) and phosphonoformate (foscarnet) against human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, *33*, 663-669.
124. Rodríguez-Barrios, F.; Pérez, C.; Lobatón, E.; Velázquez, S.; Chamorro, C.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Camarasa, M. J.; Pelemans, H.; Balzarini, J.; Gago F. Identification of a putative binding site for TSAO derivatives at the p51/p66 interface of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1853-1865.
125. Norén, J. O.; Helgstrand, E.; Juhanson, N. G.; Misiorny, A.; Stening, G. Synthesis of esters of phosphonoformic acid and their antiherpes activity. *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 264-270.
126. Iyer, K. P.; Philips, L. R.; Biddle, J. A.; Thakker, D. R.; Egar, W. Synthesis of acyloxyalkyl acylphosphonates as potential prodrugs of the antiviral trisodium phosphonate (foscarnet sodium). *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 7141-7144.
127. Briggs, A. D.; Camplo, M.; Freeman, S.; Lunstrom, J.; Pring, B. G. Acyloxymethyl and 4-acyloxybenzyl diester prodrugs of Phosphonoformate. *Tetrahedron.*, **1996**, *52*, 14937-14950.
128. Hostetler, K. Y.; Hammond, J. L.; Kini, G. D.; Hostetler, S. E.; Beadle, J. R.; Aldern, K. A.; Chou, Ting-Chao; Richman, D. D.; Mellors, J. W. In vitro anti-HIV-1 activity of sn-2-substituted 1-O-octadecyl-sn-glycero-3-phosphonoformate analogues and synergy with zidovudine. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2000**, *11*, 213-220.
129. Saha, J.; Ruprecht, R. M.; Rosowsky, A. 3'-Azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxycytidine derivatives containing a small 5'-(O-alkoxycarbonylphosphinyl) or

- 5'-(O-cholesterylcarbonylphosphinyl) substituent. *Nucleosides . Nucleotides*, **1971**, *10*, 1465-1475.
130. Rosowsky, A.; Fu, H.; Pai, N.; Mellors, J.; Ritchman, D. D.; Hostetler, K. Y. Synthesis and in vitro activity of long-chain 5'-O-[(Alkoxy carbonyl)phosphinyl]-3'-azido-3'-deoxythymidines against wild type and AZT- and foscarnet-resistant strains of HIV-1. *J. Med. Chem.*, **1987**, *40*, 2482-2490.
131. Griengl, H.; Hayder, W.; Penn, G.; De Clercq, E.; Rosenwirth, B. Phosphonoformate and Phosphonoacetate derivatives of 5-substituted 2-deoxyuridines. Synthesis and antiviral activity. *J. Med. Chem.*, **1988**, 1831-1839.
132. Lambert, R. W.; Martin, J. A.; Thomas, G. J.; Duncan, I. B.; Hall, M. J. Synthesis and Antiviral Activity of phosphonoacetic and phosphonoformic acid esters of 5-bromo-2'-desoxyuridine and related pyrimidine nucleosides and acyclonucleosides. *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 367-374.
133. Rosowsky, A.; Saha, J.; Fazely, F.; Koch, J.; Ruprecht, R. M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by phosphonoformate esters of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, *172*, 288-294.
134. Mitchel, A. G.; Nichols, D.; Walker, I.; Irwin, W. J.; Freeman, S. Products, Kinetics, mechanisms of hydrolysis of dibenzyl(methoxycarbonyl) phosphonate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1991**, 1297-1303.
135. Krol, E. S.; Davis, J. M.; Thatcher, G. R. J. Hydrolysis of phosphonoformate esters, Product distribution and reactivity patterns. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 118-119. b) Krol, E. S.; Thatcher, G. R. J. Hydrolysis of phosphonoformate triesters, Rate acceleration of a millionfold in nucleophilic substitution by phosphorus. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1993**, 793-794.
136. Charvet, A-S.; Camplo, M.; Faury, P.; Graciet, J-C.; Mourier, U.; Chermann, J-C.; Kraus, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by phosphonoformate- and phosphonoacetate-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine conjugates. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 2216-2223.
137. a) Morita, T.; Okamoto, Y.; Sakurai, H. A mild and facile synthesis of alkyl- and arylphosphonyl dichlorides under neutral conditions. Reaction of bis(trimethylsilyl) phosphonates with  $\text{PCl}_5$ . *Chemistry Letters*, **1980**, 435-438. b) Vaghefi, M.; McKernan, P. A.; Robins, R. K. Synthesis and antiviral activity of certain nucleoside 5'-phosphonoformate derivatives. *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 1389-1393.

138. a) Ogilvie, K. K.; Beaucage, S. L.; Schiffman, A. L.; Theriault, N. Y.; Sadama, K. L. The synthesis of oligoribonucleotides II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry, VII. *Can. J. Chem.*, **1978**, *56*, 2768-2780. b) Nelson, T.; Grouch, R. Selective deprotection of silyl ethers. Review. *Synthesis*, **1996**, 1031-1068.
139. a) Velázquez, S.; Tuñón, V.; Jimeno, M. L.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Chamorro, C.; Lobatón, E.; Esteban-Gamboa, A.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M.J. Novel series of [ddN]-[TSAO-T] heterodimers as potential bi-functional inhibitors of HIV-1 RT. Studies in the linker and ddN region. *Nucleosides. Nucleotides* **1999**, *18*, 1029-1030. b) Velázquez, S.; Tuñón, V.; Jimeno, M. L.; Chamorro, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Potential multifunctional inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. Novel [AZT]-[TSAO-T] and [d4T]-[TSAO-T] heterodimers modified in the linker and in the dideoxynucleoside region. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5188-5196.
140. a) Scheibye, S.; Pedersen, B. S.; Lawesson, S. -O. Studies on organophosphorous compounds XXI. The dimer of *p*-methoxyphenylthionophosphinesulfide as thiation reagent. A new route to thiocarboxamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1978**, *87*, 229-238. b) Palomino, E.; Meltsner, B. R.; Kessel, D.; Horwitz, J. P. Synthesis and in vitro evaluation of some modified 4-thiopyrimidine nucleosides for prevention or reversal of AIDS-Associated Neurological disorders. *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 258-263. (c) Czernecki, S.; Le Diguarher, T.; Valéry, J. M. Synthesis and anti-HIV-1 activity of base modified analogues of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT). *Nucleosides. Nucleotides*, **1993**, *12*, 369-380.
141. a) Fox, J. J.; Praag, D. V. Pyrimidine Nucleosides. V. 2-oxo-hexahydropyrimidines and their nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 486-489. b) Wightman, R.; Holy, A. Nucleic Acid Components and their analogues. CLIX. Synthesis of some 2-pyrimidone nucleosides. *Collec. Czesch. Chem. Commun.*, **1973**, *38*, 1381-1396.
142. Guziec, F. S.; Wasmund, L. M. An improved method for the preparation of desoxopeptides-Reduction of endothiopeptides. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 23-26.
143. Khurana, J. M.; Gogia, A. Synthetically useful reactions with nickel boride. A review. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1997**, *29*, 1-32.

144. Everby, M. R.; Oldroyd, A. C.; Waigh, R. D. Synthesis of 4,5-dihydro-1*H*-imidazoles from 1,5-dihydro-2*H*-imidazoles using 'nickel boride'. *Heterocycles*, **1986**, *24*, 2871-2877.