Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

(11) **MX PA03011108 A**

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: **08/06/2005**

(51) Int. Cl.[7]: **C07H 19/00**

(22) Fecha de presentación: **03/12/2003**

(21) Número de solicitud: **PA03011108**

(71) Solicitante:
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N.
Av. I.P.N., 2508 07360 Distrito Federal MX

(72) Inventor(es):
GENARO VARGAS HERNANDEZ
Avenida Acueducto no. 1020 Edif. E5 Int. 402 Distrito Federal 07340 MX

(74) Representante:
MARTHA FIGUEROA PEREZ
Av. Instituto Politecnico Nacional numero 2508 Distrito Federal 07360 MX

(54) Título: **OBTENCION Y SINTESIS DE PORFIRINIL-NUCLEOTIDOS NEUTROS, SU APLICACION COMO PRO-DROGAS Y SU USO COMO AGENTES ANTICANCERIGENOS Y ANTIVIRALES.**

(54) Title: **OBTENTION AND SYNTHESIS OF NEUTRAL PORPHYRINYL-NUCLEOTIDES, THE APPLICATION AS PRO-DRUGS AND USE THEREOF AS ANTICANCER AND ANTIVIRAL AGENTS.**

(57) Resumen

La invencion describe porfirinil-nucleotidos neutros como pro-drogas que permiten transportar de manera selectiva nucleosidos con actividad terapeutica a celulas tumorales o infectadas por virus. Los porfirinil-nucleotidos contienen puentes de fosfato, fosforamidato o tiofosfato que permiten unir una o varias moleculas identicas del analogo de nucleosido de interes o bien una combinacion de distintas moleculas de nucleosidos. Asi mismo la invencion proporciona porfirinas novedosas con actividad antitumoral y/o antiviral que pueden utilizarse tanto en terapia fotodinamica por si solas, o bien como acarreadores de analogos de nucleosidos para la formacion de pro-drogas.

(57) Abstract

The invention describes neutral porphyrinyl-nucleotides as pro-drugs, which selectively transport nucleosides with therapeutic activity to tumour cells or cells infected by a virus. The porphyrinyl-nucleotides contain phosphate, phosphoramidate or thiophosphate bonds, which enable one or several identical molecules of the nucleoside analogue in question or a combination of different nucleoside molecules to be joined together. Moreover the invention provides novel porphyrins having anti-tumour and/or antiviral activity useful both in photodynamic therapy by themselves, or as carriers of nucleoside analogues so that pro-drugs can be obtained.

Obtención y síntesis de porfirinil-nucleótidos neutros, su aplicación como pro-drogas y su uso como agentes anticancerígenos y antivirales.

Campo de la invención.

La presente invención se refiere al campo de la síntesis de compuestos químicos, específicamente a la obtención de pro-drogas con aplicación terapéutica y muy particularmente a la obtención de porfirinas unidas a nucleótidos.

Antecedentes de la invención.

La síntesis de moléculas biológicamente activas es una de las áreas más importantes de la investigación en química, ya que además de aportar nuevas técnicas de síntesis, permite contribuir al desarrollo de nuevos fármacos.

Actualmente el diseño de moléculas con actividad biológica a nivel de los ácidos nucleicos es muy eficiente para la síntesis de compuestos útiles para el tratamiento de diversos padecimientos. Dentro de este campo, los análogos de nucleósidos, oligo y polinucleótidos han resultado ser potentes antivirales y antitumorales[1]. Sin embargo, para hablar de la síntesis y mecanismos de acción de este tipo de compuestos es necesario examinar la estructura de los ácidos nucleicos así como sus funciones.

I. La estructura del DNA y su función biológica.

Watson y Crick describieron a los genes como cadenas de ácido desoxirribonucleico (DNA) arreglados en forma de una doble hélice. El ADN es un biopolímero formado por dos cadenas agrupadas en forma de doble hélice, como se muestra en la figura 1. Cada cadena es un arreglo lineal de unidades similares llamadas nucleótidos (la forma fosforilada de un nucleósido), cada nucleótido esta formado por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas en el ADN: dos bases purínicas la adenina (A) y guanina (G) y dos bases pirimidínicas la timina (T) y citosina (C). Estas bases mantienen un orden particular o secuencia en el DNA, que da lugar al código que guarda la información sobre las características genéticas de un organismo.

Un nucleósido carece del grupo fosfato en posición 5´ (figura 2). Cuando la base nitrogenada se encuentra por arriba del plano del azúcar se denomina nucleósido β; los cuatro nucleósidos naturales encontrados en el DNA poseen nucleósidos β, estos son mostrados en la figura 2. La configuración de los grupos sustituyentes en el anillo de azúcar es *r*-1'-*trans*-3'-*cis*-4'.

Las bases nitrogenadas se reconocen específicamente por la forma complementaria de las interacciones no-covalentes que se dan entre ellas. Estas interacciones dadas por puentes de hidrógeno son conocidas también como puentes de Watson y Crick. La timina se aparea con adenina formando dos puentes de hidrógeno, mientras que la citosina se aparea con guanina formando tres puentes de hidrógeno (figura 3).

Durante la división celular (figura 4), las cadenas de DNA son separadas por rompimiento de las interacciones débiles entre los pares de bases (Paso I). Cada cadena dirige la síntesis de una nueva cadena usando nucleótidos libres (Paso II), que se reconocen por su capacidad de aparearse con la base complementaria en cada una de las cadenas separadas. Estas reglas de apareamiento aseguran que la nueva cadena (1) sea una copia fiel de la cadena madre (2) (Paso III). Todo este proceso se conoce como *replicación del DNA*.

En el proceso de replicación, un nucleótido libre es incorporado a la cadena creciente de DNA por medio de un ataque nucleofílico del grupo OH en posición 3´ de un nucleótido de la cadena creciente sobre el fosfato α en posición 5´ del nucleótido libre en su forma metabólica trifosforilada. En esta reacción se produce la liberación de difosfato inorgánico con la subsecuente formación del puente fosfodiéster entre ambos (figura 5).

La inhibición del proceso de replicación trae como consecuencia el bloqueo de la trasferencia de la información genética de una célula madre a su progenie. En este sentido, es evidente la importancia de diseñar drogas cuya aplicación terapéutica se enfoque a detener el crecimiento de células malignas para el organismo, tales como células cancerígenas donde el proceso de replicación celular es acelerado, o células con un cierto tipo de infección viral como la provocada por el virus de inmuno deficiencia humana (VIH).

En éste sentido, la efectividad terapéutica de los análogos de nucleósidos es tal, que se consideran como las drogas más efectivas en la terapia anticancerígena y antiviral.

II. Análogos de nucleósidos.

Los llamados análogos de nucleósidos son derivados de nucleósidos naturales (figura 6) modificados en su estructura molecular con el objeto de iniciar o incrementar su actividad terapéutica. Dichos compuestos compiten con los sustratos naturales, para actuar como terminadores de cadena en la síntesis de DNA después de su incorporación a la misma (figura 5). Muchos de estos compuestos carecen del grupo 3'-hidroxilo o poseen un grupo no nucleofílico en esa posición, el grupo nucleofílico es necesario para la formación de la unión fosfato entre los nucleósidos[2]. Dentro de los análogos de nucleósidos más importantes de esta clase se encuentran el AZT, D4T, DDC, DDI y Carvobir[3], siendo el AZT el que más éxito ha tenido en el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) (figura 6)[4].

III. Pro-drogas de nucleósidos.

El primer requerimiento para la actividad biológica de un análogo de nucleósido es su transporte eficiente en la célula infectada a través de la barrera lipofílica de la membrana celular (figura 7).

De manera sistemática, después de que estas sustancias entran a la célula por difusión pasiva sencilla[5] o por medio de proteínas transportadoras unidas a la membrana[6], son trifosforiladas en el grupo 5´-OH, en el citoplasma celular, por enzimas llamadas cinasas[7]. El paso limitante en este proceso de fosforilación es la conversión al monofosfato. El trifosfato, la forma biológicamente activa del nucleósido, termina el crecimiento de la cadena de ADN[8].

La limitación metabólica del primer paso de fosforilación puede ser solucionada si el nucleósido es administrado en forma de monofosfato; sin embargo, el grupo fosfato es altamente polar bajo condiciones fisiológicas lo que limita su permeación y difusión eficiente a través de la membrana celular. Consecuentemente, se ha propuesto una estrategia para facilitar el transporte del nucleótido, que consiste en la modificación del fosfato dotándolo de un grupo hidrofóbico (éster de fosfato) con lo que efectivamente se mejora su permeación, y su difusión a través de la membrana celular. Esta estrategia también ayuda a mejorar la actividad de aquellos nucleósidos que expresan pobre actividad a la fosforilación. Las estructuras de una droga químicamente modificadas con el objeto de mejorar su función terapéutica o biológica son llamadas **pro-drogas**. Los ésteres

de fosfato son pro-drogas de nucleósidos, los cuales pueden hidrolizarse enzimática o espontáneamente para liberar el monofosfato del nucleósido en el citoplasma de la célula después de su difusión efectiva, y así evitar el difícil primer paso de fosforilación.

Hasta el momento, los análogos de nucleósidos son las drogas más efectivas encontradas en el tratamiento de personas afectadas con enfermedades de origen viral y/o cancerígeno. Sin embargo, una de las desventajas terapéuticas más importantes de los análogos de nucleósidos, es su alta toxicidad ya que dichas sustancias no son selectivas entre una célula normal y una célula infectada o cancerígena.

Las pro-drogas de nucleósidos ayudan a disminuir la toxicidad de los nucleósidos, y a aumentar su efectividad, ya que poseen acarreadores lipofílicos eficientes y selectivos que incrementan su transporte al núcleo celular de las células infectadas. En resumen, las pro-drogas de nucleósidos puede ayudar a reducir la dosis diaria de estas drogas que son caras y, en concentraciones altas, muy tóxicas.

Se han diseñado una gran variedad de acarreadores que son capaces de reconocer un nucleósido o un nucleótido por puentes de hidrógeno del tipo Watson-Crick[9,10,11,12]. Por ejemplo, Seesler[10] sintetizó una serie de nucleósidos protegidos en los grupos hidroxilo del azúcar con el grupo triisopropilsililo (Tips), figura 8. De estos compuesto, C-Tips y G-Tips transportaron selectivamente guanosina (G) y citidina (C) respectivamente. Sin embargo, el transporte de AZT por A-Tips fue limitado reflejando una asociación por puente de hidrógeno más débil en las núcleo bases timina-adenina en comparación con la asociación guanina-citocina.

Por otro lado, se han sintetizado sales de amonio hidrofóbicas (estructura A, figura 9) que trasportan monofosfatos de nucleósidos *in vitro* en un sistema de tres fases[13]. En este caso, la especie trasportadora forma un complejo con el análogo de nucleósido como el mostrado en la estructura B de la figura 9.

Hasta la fecha, se han hecho esfuerzos considerables por sintetizar pro-drogas lipofílicas del monofosfato de AZT[14,15,16,17]. Un ejemplo de ello es el fosfoéster glicosídico mostrado en la figura 10 que puede transportar AZT al cerebro de ratones[18].

Recientemente se informó que una serie de complejos de Zinc de tetraminas macrocíclicas con cadenas alquílicas de diferentes longitudes son capaces de extraer y transportar selectivamente nucleósidos y nucleótidos cuya base puede ser timina ó uracilo. Las tetraaminas de Zinc forman un complejo que se coordina con el N-3 de la núcleo-base

formando la estructura de la figura 11, responsable del transporte de los análogos de nucleósidos[19].

Con excepción del compuesto mostrado en la figura 11, todos los acarreadores de nucleósidos anteriormente mencionados fueron probados en un sistema de tres fases como el mostrado en la figura 12. El sistema esta formado por una solución buffer **aq1** del nucleósido a un pH que varia entre 6-9, una solución del transportador en cloroformo y una fase acuosa **aq2** receptora del nucleósido transportado. En este sistema el nucleósido en la fase **aq1** forma un complejo con el transportador en la fase clorofórmica, y es trasportado a la fase **aq2** después de la hidrólisis del complejo transportador-nucleósido. La eficiencia de estos acarreadores se dedujo de la cantidad de nucleósido transportado a la fase **aq2** cuantificada por medio de RMN de ^1H, UV y HPLC.

Aunque los compuestos anteriores han mostrado ser buenos acarreadores de nucleósidos *in vitro*, no se han hecho ensayos que pudieran sugerir una posible utilidad terapéutica en sistemas biológicos. Adicionalmente, muchos de ellos no son efectivos como transportadores del monofosfato de un nucleósido (MPN), lo cual da lugar a la necesidad de desarrollar una nueva estrategia para la permeación y liberación intracelular del MPN. Con este fin se han sintetizado una gran variedad de pro-drogas lipofílicas de nucleótidos. Por ejemplo, Dinh[20] sintetizó el compuesto **31** por acilación del monofosfato **30** (figura 13) utilizando diciclohexilcarbodiimida. El rendimiento de esta reacción fue de tan sólo 13 % debido a la labilidad del enlace acil-fosfato de **31**, que se hidroliza fácilmente durante el proceso de purificación. La actividad antiviral de **31** no reveló diferencias significativas respecto a la actividad del compuesto **30**, debido también a la hidrólisis rápida del enlace acil-fosfato en el medio de cultivo.

Alternativamente, Peyrottes[21] informó la síntesis (figura 14), la descomposición cinética y actividad biológica de fosfotriésteres de AZT (compuestos tipo **34**). Estas pro-drogas contienen un grupo S-*t*-butilacetil-2-tioetilo (*t*BuSATE), y un fenol *p*-sustituido en la región del fosfato, los cuales experimentan su descomposición mediada por la enzima carboxiesterasa que conduce a la liberación intracelular del monofosfato del AZT (figura 15). El compuesto **34** mostró ser un buen acarreador de AZT al comparar los valores de IC_{50} de **34** y del AZT (IC_{50} de **34** = 0.002, IC_{50} del AZT = 0.003) que sugieren que la pro-droga **34** es menos tóxica que AZT a la misma concentración.

Dentro de los transportadores de nucleósidos que han tenido un mayor impacto en la actualidad son los arilfosfatos del AZT que han sido preparados por Clercq[22]. El análisis biológico de estas pro-drogas revelaron una pronunciada selectividad anti-VIH en células MT4. De todos los derivados obtenidos, el compuesto **37** es el de mayor potencial inhibitorio ya que su IC_{50} es alrededor de 3-4 veces menor respecto al de AZT. La estrategia de síntesis utilizada por De Clercq se muestra en la figura 16. El material de partida es fenol, el cuál reacciona con oxicloruro de fósforo en dietil éter para dar el aril fosforodiclorhidato **35**. Este compuesto se hizo reaccionar con el éster metílico de la alanina en diclorometano en presencia de trietilamina para dar el clorofosforamidato **36**. La reacción de **36** con AZT en THF se condujo en presencia de *N*-metilimidazol usado como base para dar el fosforamidato **37**.

IV. El uso de porfirinas en química clínica.

La terapia foto-dinámica (siglas en inglés PDT) es un método alternativo y relativamente nuevo en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (principalmente de pulmón, esófago, tracto genitourinario, tracto digestivo, cabeza, cuello y páncreas)[23]. Esta técnica requiere de una combinación de oxígeno, luz visible y una droga (un foto sensor) para causar la destrucción del tejido neoplásico. El principio básico en el que se fundamenta la técnica es el efecto fotodinámico observado como una aceleración de la destrucción selectiva del tejido dañado bajo la acción de fotones; este principio fue descubierto por Raab[24]. Meyer[25] descubrió que las porfirinas son buenos fotosensores cuando se inyectó a sí mismo una solución de hematoporfirina (figura 17) y al exponerse a la luz solar observó que se había provocado severos daños en su cara y manos. Posteriormente Auler y Banzer[26] observaron una gran actividad fluorescente además de necrosis en tumores de animales experimentales a los que se les había administrado una porfirina para someterlos posteriormente a la acción de luz UV. Por su parte Lipson[27] encontró evidencia clara de que una preparación de porfirinas era selectivamente incorporada por algunos tumores. Tuvo que pasar otra década antes de que Diamond[28] proporcionara información clara de que tales tumores sensibilizados podían ser destruidos por irradiación y así, en 1976, Kelly y Snell[29] informaron el primer ejemplo clínico del tratamiento fotodinámico en un paciente con cáncer de vejiga. Después de este último reporte, un estudio clínico detallado por Dougherty[30] condujo eventualmente a la primera aprobación de un sensibilizador

denominado Photofrin, el cual es una mezcla compleja de oligómeros de hematoporfirina, para la terapia fotodinámica.

En resumen, la terapia fotodinámica (PDT) consiste de las siguientes etapas (figura 18): un fotosensor porfirínico con alta selectividad hacia tumores se administra al paciente y después de un intervalo de tiempo (tiempo de deposición) en el que se permite al fotosensor obtener la máxima diferenciación entre tejido normal y maligno, el tumor es irradiado para destruir las células anormales (fotonecrosis). El fotosensor es usualmente administrado vía intravenosa mediante una solución buffer o por medio de liposomas, mientras que la fuente de luz es a menudo un láser ya que éste puede ser conectado a fibras ópticas que permiten el tratamiento de tumores profundos con buena precisión.

En el proceso de foto destrucción del tejido tumoral o efecto fotodinámico, están involucrados dos mecanismos oxidativos, llamados de tipo I y tipo II (diagrama de Jablonski, figura 19). Ambos mecanismos son iniciados cuando el fotosensor **P** en su estado fundamental S_0 es excitado a su estado singulete S_1 por absorción de aproximadamente 200 kJ de energía, posteriormente la especie pasa del estado S_1 al estado triplete T_1. En el mecanismo de tipo I, el fotosensor en su estado T_1 interactúa con oxígeno mediante la trasferencia de un electrón para producir radicales libres que son citotóxicos para la célula neoplásica. En el mecanismo de tipo II, se genera oxígeno singulete (el principal agente citotóxico para la célula tumoral) como resultado de la transferencia de energía del estado T_1 del fotosensor al estado fundamental triplete de la molécula de oxígeno. El oxígeno singulete reacciona con biomoléculas esenciales tales como lípidos no saturados (incluyendo colesterol) y residuos de α-aminoácidos como el triptofano, histidina y metionina que son los constituyentes esenciales más reactivos de membranas biológicas[31]. Muchas de las porfirinas que han sido probadas *in vitro* e *in vivo* ejercen su fotoactividad después de una asociación preferencial con membranas mitocondriales, nucleares o del retículo endoplásmico, siendo el fotodaño principal en componentes celulares tales como proteínas y lípidos de las células tumorales que conduce a la necrosis y rompimiento de la célula tumoral.

Mientras que el proceso de fotonecrosis del tumor es conocido, la localización y selectividad de las porfirinas por células tumorales no se comprende en su totalidad, pero al parecer hay varios factores que determinan dicha selectividad[32]. Se sabe que las porfirinas son transportadas por el torrente sanguíneo formando un complejo con

lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las células con cáncer, en común con otras células que proliferan rápidamente, aumentan su requerimiento de colesterol para la biosíntesis de membranas, lo anterior sobre expresa un receptor (apo B/E) de lipoproteínas de baja densidad en la membrana celular, de este modo el complejo lipoproteína-porfirina es reconocido por el receptor antes mencionado. Puesto que la membrana en células con cáncer es más lipofílica que en células normales, la porfirina ingresa a la célula con mayor facilidad. Sin embargo, podría darse el caso de que la porfirina que ingresó a la célula tumoral saliera de ella debido a esta característica de lipofilicidad. Para explicar por que no sucede lo anterior, se ha postulado que debido a que el pH en el interior de las células tumorales es de alrededor de 6.9, este medio ligeramente ácido provoca una reacción de protonación en el anillo pirrólico de la porfirina una vez que está adentro de la célula formando una especie catiónica que no atraviesa fácilmente de regreso a la membrana celular; de este modo la porfirina queda atrapada dentro de la célula. Esto podría explicar la acumulación selectiva de porfirinas en células neoplásicas.

V. Interacción de las porfirinas con el DNA celular.

Por otro lado, la formación de complejos DNA-porfirina es otra de las razones a través de las cuales se puede explicar porque estos macrociclos poseen actividad antitumoral; es decir, el complejo inhibe la actividad de la enzima telomerasa (esta enzima replica las partes terminales de los cromosomas llamados telómeros) que ha sido asociada con la proliferación e inmortalidad de células con cáncer. El 90 % de las líneas celulares tumorales expresan la enzima telomerasa y sólo unas pocas células somáticas normales lo hacen[33]. Las porfirinas más usadas en los estudios de inhibición de la telomerasa son catiónicas, ellas interaccionan con los telómeros (DNA de cadena cuádruple rico en guanina) por atracciones electrostáticas con el grupo fosfato. Por otro lado, se han propuesto tres tipos de interacciones entre porfirinas catiónicas y la doble hélice: intercalación, enlace al surco exterior y enlace al surco exterior con auto-apilamiento[34]. El modo de enlace depende de la naturaleza de los sustituyentes en posición *meso* de la porfirina, la secuencia de DNA, la presencia y naturaleza de iones metálicos ligados a la porfirina y la presencia de interacciones de apilamiento o stacking π-π entre la porfirina y las núcleo bases del DNA. La figura 20 muestra la interacción de porfirinas catiónicas con DNA de cadena cuádruple (izquierda) y DNA de cadena doble (derecha). La interacción

con DNA de cadena cuádruple ocurre por un apilamiento de los tetrámeros de guanina en los telómeros así como interacciones electrostáticas de los grupos cargados positivamente y los grupos fosfatos. La interacción con el DNA de cadena doble ocurre por semi-intercalación de la porfirina en el DNA. Recientemente, Ishikawa[35] encontró que la inserción de cobre (II) en el macrociclo de la porfirina incrementa notablemente la unión a telómeros. La alta afinidad fue atribuida a la naturaleza plana del compuesto de la porfirina coordinada a Cu que facilita su intercalación con el DNA. Niedbala observó que los derivados con Co suprimen el crecimiento de células de melanoma maligno humano[36]. Por otro lado, estudios recientes indican que algunas porfirinas aniónicas también interactúan con el DNA aunque su mecanismo de interacción no ha sido bien establecido[37].

La capacidad de las porfirinas para transportar sustancias biológicamente activas fue recientemente probada con los trabajos realizados por Graca[38] en el área de terapia de cáncer por captura de neutrones utilizando compuestos de boro (TCNB)[39,40]. Graca preparó una serie de porfirinas funcionalizadas con grupos carborano (figura 21). Estos compuestos fueron obtenidos con el objetivo de estudiar el efecto de la distribución de carborano sobre la toxicidad celular y su localización subcelular en células B16 (cáncer de piel de ratón). Un ejemplo de los compuestos obtenidos por Graca son las carboranoporfirinas **38** y **39** los cuales resultaron ser poco tóxicas y los estudios por fluorescencia sugieren que estos compuestos se localizan en un sitio muy cercano al núcleo celular y son capaces de liberar grandes cantidades de boro a células B16, lo cual mostró que los compuestos *nido*-carboranoporfirina son buenos acarreadores de boro.

VI. Porfirinil-nucleósidos.

Con todos los hechos presentados anteriormente se hace evidente que, de todos los transportadores de nucleósidos conocidos hasta el momento, las porfirinas son particularmente prometedoras debido a su fácil transporte al interior de la célula y su demostrada tendencia a acumularse en tejidos neoplásicos. Existen reportes en la literatura de porfirinas sustituidas con monosacáridos[41], estradiol[42], y fulerenos[43]; sin embargo, los ejemplos que a continuación se presentan son los únicos informados en la literatura sobre porfirinilnucleósidos.

El primer reporte data de 1990 y fue hecho por Czuchajowski[44,45] quien sintetizó porfirinas covalentemente unidas a un nucleósido, compuestos que denominó porfirinilnucleósidos.

Los compuestos sintetizados fueron el 5´-*O*-(5-*p*-fenilen-10,15,20-tri-*p*-tolilporfirin)uridina **40** y el 5´-*O*-(5-*p*-fenilen-10,15,20-tri-*p*-tolilporfirin)-2´,3´-isopropilidenuridina **41** de la figura 22. Estos compuestos fueron obtenidos al mezclar a temperatura ambiente *Meso-p*-hidroximetil-tri-*p*-tolilporfirina, 5´-*O*-tosil-2´,3´-isopropiliden uridina, e hidruro de sodio en DMF. Los compuestos fueron analizados por RMN de ^{1}H, ^{13}C y espectrometría de masas de alta resolución utilizando la técnica FAB. Más tarde se evaluó la actividad antitumoral de estos compuestos al explorar la supresión del crecimiento de células de melanoma maligno humano (M21-HPB) mostrando que el compuesto **41** inhibe el crecimiento del tumor en un 66 % respecto al control (o blanco) a una concentración 10^{-6} M[46].

A pesar de los resultados obtenidos, los porfirinil-nucleósidos no presentan desde el punto de vista estructural las características idóneas para actuar como pro-drogas de nucleósidos, ya que el enlace fenólico es difícil de romper para liberar al nucleósido intracelularmente.

Por otro lado, oligonucleósidos funcionalizados con porfirinas (figura 23) con el esqueleto modificado a manera de proveer una orientación paralela de las entidades de porfirina, se comportan como cromóforos de sistemas fotosintéticos naturales[47].

El estudio de la manera en la cual los llamados análogos de nucleósidos interaccionan con el DNA de células infectadas con cáncer han tenido un gran impacto en los últimos años. Sin embargo, alguno de ellos tales como el AZT, son altamente tóxicos debido a su interacción igualmente importante con el DNA de las células normales. El primer requerimiento para la actividad de estas drogas es el transporte eficiente a través de la membrana celular. Adicionalmente, tales compuestos son sustratos pobres ante la acción de las enzimas cinasas para producir su metabolito trifosforilado activo biológicamente, lo cual conduce a una pobre actividad y aparición de resistencia celular.

La síntesis química juega un papel fundamental en el diseño de drogas o fármacos que tienen un marcado impacto en biología y en medicina. El principal objetivo en el desarrollo de una droga es encontrar una molécula adecuada que posea la actividad farmacológica deseada reduciendo al mínimo la posibilidad de efectos colaterales o secundarios. En el diseño de nuevos fármacos, las transformaciones químicas en la estructura de una molécula pueden inducir cambios dramáticos en las características fisicoquímicas de las moléculas y por lo tanto en su actividad biológica[48]. Es por ello que el desarrollo de nuevos

y mejores fármacos contra enfermedades que tienen un alto impacto en la sociedad, continua siendo importante.

A pesar de la investigación realizada hasta el momento, hasta antes de la presente invención no existían pro-drogas específicas para células cancerosas e infectadas por virus que utilizaran porfirinas como acarreadores en conjunto con nucleósidos con probada actividad terapéutica, tales como el AZT o semejantes, y que permitiera a la vez unir a la molécula acarreadora a través de un puente de fosfato, fosforamidato o tiofosfato con una o varias moléculas idénticas del análogo de nucleósido de interés o bien una combinación de distintas moléculas de nucleósidos.

Breve descripción de los dibujos.

Figura 1. Representación de la doble cadena del DNA.

Figura 2. Nucleósidos que constituyen el DNA.

Figura 3. Acoplamiento entre bases pirimidínicas y purínicas en el DNA.

Figura 4. Proceso de replicación del DNA.

Figura 5. Crecimiento de la cadena de DNA durante el proceso de replicación.

Figura 6. Análogos de nucleósidos utilizados en el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana y otras enfermedades de origen viral.

Figura 7. Transporte de nucleósidos a través de la membrana celular.

Figura 8. Nucleósidos protegidos de Seesler.

Figura 9. Sales de amonio hidrofóbicas transportadoras de monofosfatos de nucleósidos in vitro.

Figura 10. Pro-droga lipofílica del monofosfato de AZT.

Figura 11. Complejo de tetraamina de Zinc y núcleo base.

Figura 12. Sistema trifásico utilizado en pruebas *in vitro* de pro-drogas.

Figura 13. Pro-drogas de MPN.

Figura 14. Síntesis de fosfotriésteres de AZT. (a) *t*BuSATEOP[N(iPr)$_2$]$_2$, 1*H*-tetrazol, HN(*i*Pr)$_2$, CH_3CN; (b) AZT, 1*H*-tetrazol, CH_3CN, tBuOOH, Tolueno.

Figura 15. Descomposición intracelular del fosfotriester de Peyrottes al monofosfato de AZT.

Figura 16. Arilfosfatos de AZT obtenidos por Clercq. (a) $POCl_3$, éter etílico, *N*-metilimidazol, 89%; (b) metilalanina, CH_2Cl_2, Et_3N, 100%, (c) AZT, THF, *N*-metilimidazol, 76%.

Figura 17. Hematoporfirina.

Figura 18. Etapas en el tratamiento con la terapia fotodinámica.

Figura 19. Diagrama de Jablonski para mostrar los mecanismos de tipo I y II (P = porfirina fotosensora).

Figura 20. Interacción de porfirinas catiónicas con DNA de cadena cuádruple y doble. *Izquierda*: complejo porfirina catiónica-DNA de cadena cuádruple. Grupos fosfato (color amarillo); guaninas (color ciena); adenina (verde); timina (naranja): porfirina (azul y blanco). *Derecha:* interacción de apilamiento entra la porfirina y el DNA de doble cadena.

Figura 21. Porfirinas funcionalizadas por grupos carborano. (a) 1-Litio-2-metil-*o*-carboran, DME, reflujo, 10 h (75%); (b) *n*-Buli, THF, -78 °C, DMF; (c) solución al 5% HCl; (d) pirrol, TFA, CH_2Cl_2; (e) *p*-cloroanil; (f) $ZnCl_2$, CH_2Cl_2/THF/piridina; (g) piridina/piperidina, 36 h; (h) Dowex-50wx2-100.

Figura 22. Porfirinil-nucleósidos de Czuchajowski. Izquierda: 5´-*O*-(5-*p*-fenilen-10,15, 20-tri-*p*-tolilporfirin)uridina; Derecha: 5´-*O*-(5-*p*-fenilen-10, 15, 20-tri-*p*-tolilporfirin)-2´, 3´-isipropilidenadenosina.

Figura 23. Oligonucleósidos funcionalizados con porfirinas.

Figura 24. Síntesis de 5-hidroximetil-trifenilporfirina **93**. a) $Zn(OAc)_2$, ácido propiónico, reflujo, 4 h; b) *p*-cloroanil, piridina, CH_2Cl_2, temperatura ambiente, 1 h.; c) HCl acuoso al 18%.; d) $LiAlH_4$, THF, 0°C temp. amb., 3 h.

Figura 25. Esquema de reacción de la porfirina **93** con dos equivalentes de AZT.

Figura 26. Ruta retrosintética para la síntesis de los porfirinil-nucleótidos neutros de la invención.

Figura 27. Ruta retrosintética para la obtención del nucleósido de la serie ribosa.

Figura 28. Ruta retrosintética para la obtención del nucleósido de la serie desoxirribosa (AZT).

Figura 29. Ruta retrosintética para la obtención de la tetrafenilporfirina **50**.

Figura 30. Ruta retrosintética para la obtención de la porfirina **53**.

Figura 31. Esquema de reacción de 5-(p-aminofenil),10,15,20-trifenil-porfirina (**53**) con PCl_3.

Figura 32. Esquema de reacción del compuesto **63** con AZT.

Figura 33. Mezcla diastereomérica de tiofosforamidatos **74**.

Figura 34. Acoplamiento de los complejos metálicos **54**, **55** y **56** con AZT.

Figura 35. Reacción de acoplamiento de **63** con el furanósido **48**.

Figura 36. Reacción de acoplamiento de los compuestos **54-56** con el furanósido **48**.

Figura 37. Esquema de síntesis de 5-(p-aminofenil),10,15,20-trifenil-porfirina (**53**) y sus complejos metálicos **54**, **55** y **56**. (a) BF_3, CH_2Cl_2, 1 h; (b) *p*-cloroanil, 45°C, 1 h, (55%); (c) HNO_3 fumante, $CHCl_3$, 2 h, 0 °C (46%); (d) $SnCl_2$, HCl conc., 2 h, 65-70 °C (94%); (e) $M(OAc)_2$, CH_2Cl_2, MeOH, 2 h.

Figura 38. Esquema de síntesis de las porfirinas **84-89**.

Figura 39. Reacción de la porfirina **85** con AZT.

Figura 40. Secuencia de reacciones utilizadas en la obtención del compuesto **48**.

Figura 41. Obtención de la timina persililada.

Figura 42. RMN-^{1}H (270 MHz, Py-d_5) del compuesto **48**.

Figura 43. RMN-^{13}C (270 MHz, Py-d_5) del compuesto **48**.

Figura 44. RMN-Correlación ^{1}H-^{13}C utilizando la secuencia de pulsos HMBC (270 MHz, Py-d_5) del compuesto **48**.

Figura 45. Síntesis de AZT.

Figura 46. RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O) del AZT.

Figura 47. RMN-^{13}C (400 MHz, D_2O) del AZT.

Figura 48. Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento de ^{1}H y ^{31}P representativos para los compuestos **74-77**. Se observan singulete (s), múltiple (m); pseudotriple (pseu-t), pseudoquíntuple (pseudo-q), doble de triples (dt).

Figura 49. Desplazamientos químicos de ^{13}C representativos para los compuestos **74-77**.

Figura 50. Ion molecular calculado, fragmento calculado y fragmento encontrado para los compuestos **75**, **76** y **77**.

Figura 51. Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento de ^{1}H y ^{31}P representativos para los compuestos **79-82**. Se observan singulete (s), múltiple (m); pseudotriple (pseu-t), pseudoquíntuple (pseudo-q), doble de triples (dt).

Figura 52. Desplazamientos químicos de ^{13}C representativos para los compuestos **79-82**.

Figura 53. Ion molecular calculado y encontrado para los compuestos **80-82**.

Figura 54. Condiciones de reacción y rendimientos de **53-56** y **84** con bromuro de bromoacetilo.

Figura 55. Reacción de **95** con dos equivalentes de AZT en presencia de hidroperóxido de terbutilo.

Figura 56. Curva de calibración para la determinación de DNA.

Figura 57. Localización celular de la porfirina (rojo) y Sytox (verde) en células de melanoma B16 de ratón determinada por microscopía de fluorescencia confocal. Arriba (Izquierda): células B16 teñidas con Sytox (control), Arriba (derecha): células B16 teñidas con el compuesto **53**, centro (izquierda): células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **74**, Centro (derecha): células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **79**, abajo (Izquierda): células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **75**, abajo(derecha) células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **80**.

Figura 58. Inhibición de la replicación de DNA en células B16 para los compuestos **48**, **53**, **74**, **75**, **79** y **80**.

Figura 59. Localización celular de la porfirina (rojo) y SYTOX (verde) en células de melanoma B16 de ratón determinada por microscopía de fluorescencia confocal. Izquierda: células B16 teñidas con Sytox (control); centro: células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **53**; derecha: células B16 incubadas 12 h con 20 μM del compuesto **86**.

Figura 60. Inhibición de la replicación de DNA en células B16 por las porfirinas **53-56** y **84-89**. Se observa cuadrado plano (cupl); piramidal (pi) y octahédrico (oc).

Figura 61. Localización celular de los compuestos (a) Control, (b) AZT, (c) **90**, (d) **85**, (e) **93**, (f) **98** (g) **97** y (h) **96** en Células B16 incubadas 12 h con el compuesto correspondiente. (los núcleos fueron teñidos con sytox en verde y en rojo observamos a la porfirina).

Figura 62. Inhibición de la replicación de DNA en células B16 por las pro-drogas **93**, **96-98**.

Figura 63. Resumen de la actividad biológica de los porfirinil-nucleósidos de la invención. Se observa el valor promedio de seis mediciones realizadas en los ensayos con los porfirinil-nucleótidos neutros y con las porfirinas de la invención.

Objetivos de la invención.

Es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar moléculas porfirínicas como acarreadores novedosos para análogos de nucleósidos, que puedan penetrar de manera selectiva la membrana celular de células cancerosas y/o infectadas por virus.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar porfirinas sustituidas con grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno tales como un grupo amino y amido como sustancias con actividad antiviral ó anticancerígena.

Otro de los objetivos de la presente invención es proporcionar moléculas porfirínicas novedosas con actividad antiviral ó anticancerígena.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar análogos de nucleósidos unidos con porfirinas (ó porfirinil-nucleótidos neutros) a través de un puente fosforamidato o tiofosforamidato como pro-drogas con actividad antiviral ó anticancerígena.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar análogos de nucleósidos unidos con porfirinas (ó porfirinil-nucleótidos neutros) a través de un puente de acetamido como pro-drogas con actividad antiviral ó anticancerígena.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar pro-drogas con estructura de porfirinil-dinucleótidos en donde la porfirina y el nucleósido se unen a través de un puente de fosfato ó tiofosfato.

Otro de los objetivos de la presente invención es proporcionar métodos eficientes de síntesis para la obtención de análogos de nucleósidos unidos con porfirinas (ó Porfirinil-nucleótidos neutros) a través de puentes de fosforamidato, tiofosforamidato, fosfato, tiofosfato y/o amido.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que contengan los porfirinil-nucleótidos neutros novedosos obtenidos en la presente.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que contengan las porfirinas novedosas obtenidas en la presente.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención usa a las porfirinas como transportadores selectivos de nucleósidos denominados porfirinil-nucleótidos neutros, a células tumorales ó infectadas por virus (pro-drogas). La invención contempla también la explotación de la bioactivación del monofosfato del nucleósido, para lograr la acción requerida de cruzar eficiente y

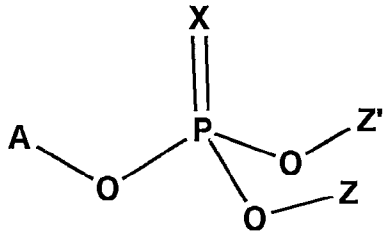
selectivamente la membrana celular, evitando la dependencia inicial de las cinasas y liberando intracelularmente el análogo de nucleósido monofosforilado (nucleótido). Esta acción proporciona un efecto terapéutico efectivo, selectivo y no tóxico debido a las bajas concentraciones que se liberan en el interior de la célula.

Así mismo, los porfirinil-nucleótidos de la invención permiten proporcionar al mismo tiempo al paciente, compuestos fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica (PDT) gracias a que contienen porfirinas que pueden unirse al DNA, y liberar de manera selectiva análogos de nucleósidos a las células blanco. Con ello, éstas moléculas ofrecen una terapia más completa y evitan el uso de la aplicación de drogas y PDT de manera conjunta. Con ello se abaten costos y molestias innecesarias al paciente durante el tratamiento.

Por otra parte, la invención proporciona porfirinas novedosas con actividad antitumoral y antiviral que pueden utilizarse tanto en terapia fotodinámica por sí solas, o bien como acarreadores de análogos de nucleósidos para la formación de pro-drogas.

Los porfirinil-nucleótidos neutros de la presente invención corresponden a compuestos de fórmula I, II y III.

Los compuestos de fórmula I tienen la siguiente estructura:

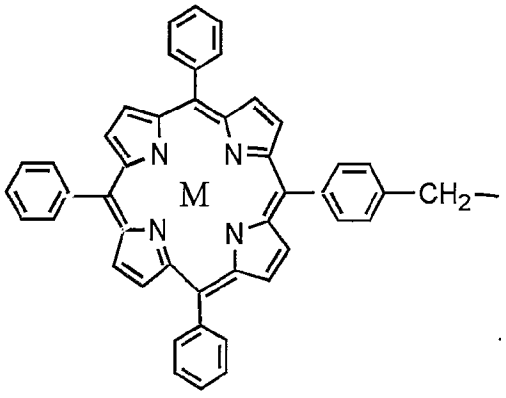


donde:

X es O ó S,

Z' es H ó Z,

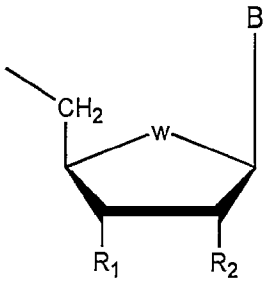
A es una porfirina de fórmula:



donde:

M es H, Zn, Ni, Cu ó Co,

Z es un análogo de nucleósido de fórmula:



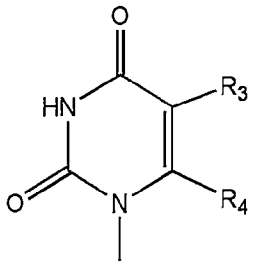
donde:

R_1 es un grupo azida (N_3), OH ó O-isopropilideno con la condición de que cuando R_1 es O-isopropilideno R_2 es O-isopropilideno y viceversa,

R_2 es H, OH ó O-isopropilideno,

w es O, CH_2, ó S,

B es una pirimidina de fórmula:

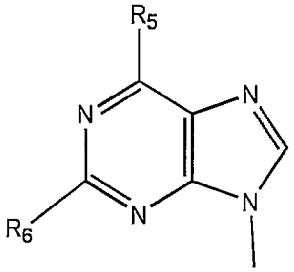


donde:

R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, ó $(CH_3)_2CH$,

R_4 es H ó SC_6H_5,

ó una purina de fórmula:



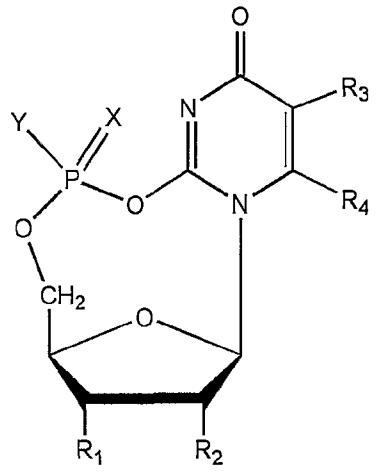
donde:

R_5 es NH_2, O, ó Cl,

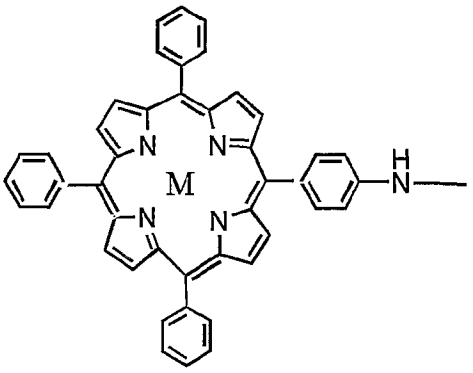
R_6 es H, ó NH_2

Algunos de estos nucleósidos son comerciales y los otros se pueden obtener por métodos conocidos en la literatura, por ejemplo cuando w es CH_2[49] ó cuando es S[50]. Los nucleósidos de purinas se pueden obtener de métodos convencionales de Vorbrüggen[51 52]; es decir, por sustitución nucleófílica sobre el carbono anomérico del azúcar sustituido con OAc como se informa en este proyecto para el caso de pirimidinas (figura 40). Alternativamente, la sustitución directa de las pirimidinas por purinas en los nucleósidos se puede llevar a cabo por la acción de enzimas sintetizadas por *Enterobactor aerogenes* ó *Erwinia herbicola*[53].

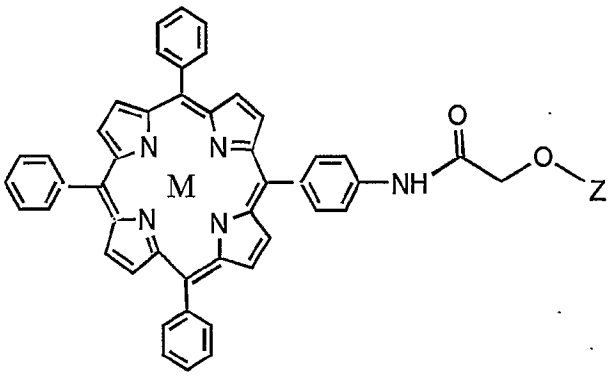
Los compuestos de fórmula II tienen la siguiente estructura:



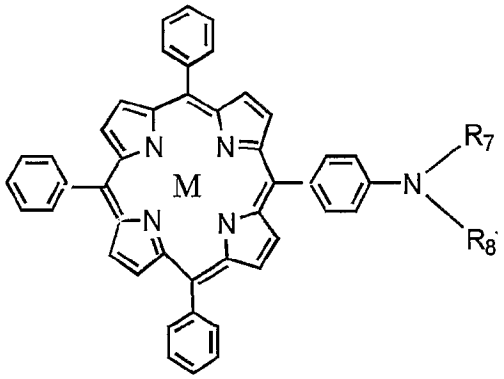
donde Y es una porfirina de fórmula:



Los compuestos de fórmula III tienen la siguiente fórmula:



Por otra parte, las porfirinas de la presente invención corresponden a compuestos de fórmula IV:



donde:

R_7 es H ó $CO\text{-}CH_2\text{-}Br$ y,

R_8 es H.

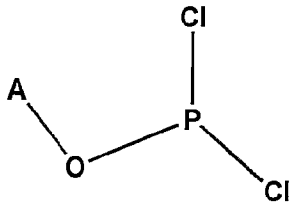
Para la síntesis total de los porfirinil-nucleótidos neutros de la presente invención, se diseñó una estrategia que permitió la obtención de los porfirinil-nucleótidos en donde la porfirina y el nucleósido se unieran a través de un puente fosforamidato (P-N) (ver compuestos de fórmula II) ó mediante un puente de fosfato (P-O) (ver compuestos de fórmula I) ó mediante un puente de acetamido [$N(CO)CH_2$-] (ver compuestos de fórmula III).

Síntesis de compuestos de fórmula I.

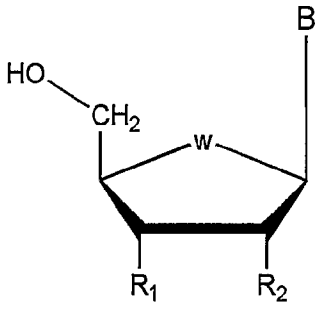
De manera general y para efectos de la presente invención, para la obtención de los compuestos de fórmula I se utiliza la ruta mostrada en la figura 24 y 25, en donde para la obtención de la porfirina 92 se hace reaccionar 4-formil-benzoato de metilo, benzaldehído y pirrol mediante el método de acoplamiento cruzado de Adler y Longo. Posteriormente la porfirina 92 se reduce con $LiAlH_4$ para obtener el compuesto:

A—OH

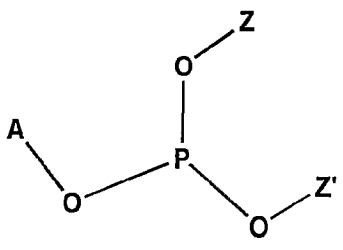
donde M es H en la porfirina A. El compuesto de fórmula A-OH se hace reaccionar con tricloruro de fósforo generando el compuesto:



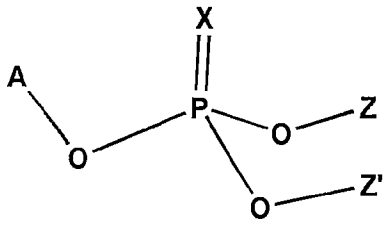
donde M es H en la porfirina A, para posteriormente adicionar 1 o dos equivalentes del nucleósido de fórmula:



generándose el compuesto:



donde M es H en la porfirina A. Posteriormente se hace reaccionar el compuesto anterior con azufre elemental o hidroperóxido de terbutilo para obtener el compuesto:



donde M es H en la porfirina A. Finalmente el compuesto anterior, se hace reaccionar con AcOM obteniéndose los compuestos de fórmula I.

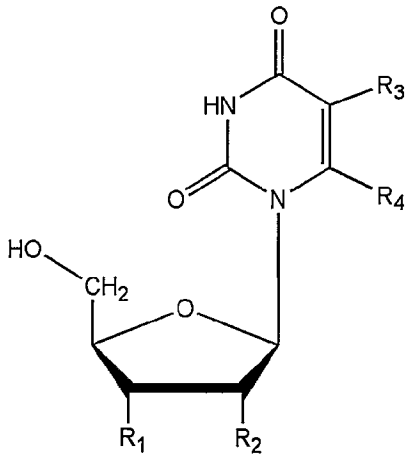
Síntesis de compuestos de fórmula II.

De manera general y para efectos de la presente invención, para la obtención de los compuestos de fórmula II se utiliza la ruta retrosintética de la figura 26 (ejemplificada para el ribofuranósido).

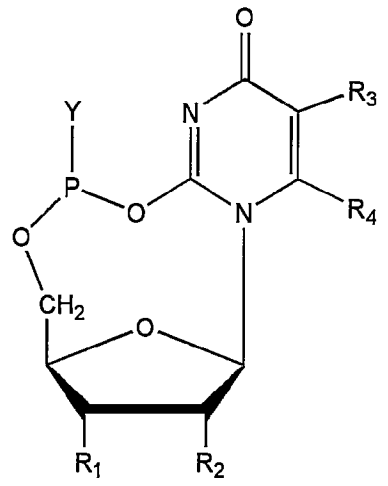
La síntesis del nucleósido **48** (figura 27) derivado de la serie ribosa se lleva a cabo a través de la glicosidación de timina en condiciones de Vorbrüggen[51,52]. Para el caso de la obtención del nucleósido de la serie desoxi (figura 28), se siguió la síntesis de AZT informada por Czernecki[54].

La síntesis de la tetrafenilporfirina **50** (figura 29) se realiza mediante la condensación de pirrol y benzaldehído de acuerdo al procedimiento informado por Linsay[55]. Posteriormente la mononitrotetrafenilporfirina 52 fue obtenida a partir de someter a la porfirina 50 al procedimiento informado por Kruper[56], para introducir un grupo nitro en ella (figura 30). A continuación la porfirina 52 se somete a condiciones reductoras obteniéndose el compuesto:

donde M es H en la porfirina Y. El compuesto anterior se hace reaccionar con el nucleósido de fórmula:

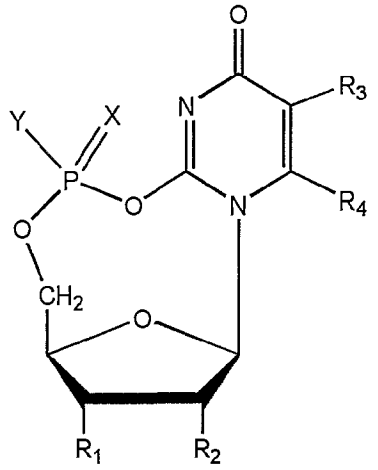


en presencia de un reactivo fosforilante de estructura $RY'P(X)Cl_2$ donde R es tetrafenilporfirina, y Y' es NH, el cual puede provenir de la reacción entre oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) o tricloruro de fósforo (PCl_3) y la p-aminofeniltrifenil porfirina, generando el compuesto:



donde M es H en la porfirina Y.

Posteriormente se hace reaccionar el compuesto anterior con azufre elemental o hidroperóxido de terbutilo para obtener el compuesto:



donde M es H en la porfirina Y.

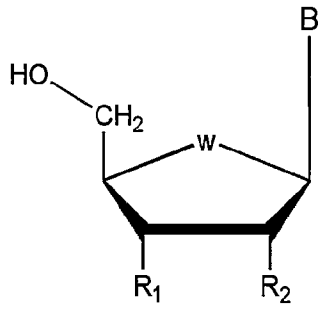
Finalmente el compuesto anterior, se hace reaccionar con AcOM obteniéndose los compuestos de fórmula II.

La formación del enlace tiofosforamidato se produce de manera estereoespecífica a través de la reacción de la aminoporfirina **53** con PCl_3, la posterior adición del nucleósido al intermediario formado **63**, generó un fosforamidato cíclico que se oxidó con azufre de manera estereoespecífica (figuras 31, 32 y 33). El producto **74** se obtiene como una mezcla diasteomérica en donde predominó en un 80% el isómero que tiene al grupo amino en posición axial, en donde el enlace 5'O-P es trans al enlace C2'-O. Los compuestos fueron analizados como mezcla diastereomérica en el crudo de la reacción. Los análisis espectroscópicos de RMN e IR así como la espectrometría de masas utilizando la técnica FAB concuerdan con la estructura propuesta para **74**. La técnica FAB resultó ser particularmente útil en la elucidación estructural. Utilizando la misma técnica de acoplamiento, se unieron mediante un puente de tiofosforamidato diferentes metalo porfirinas con los nucleósidos de AZT y el ribofuranósido **48** generando los porfirinil-nucleótidos **75-77** y **79-82** respectivamente (figuras 34, 35 y 36).

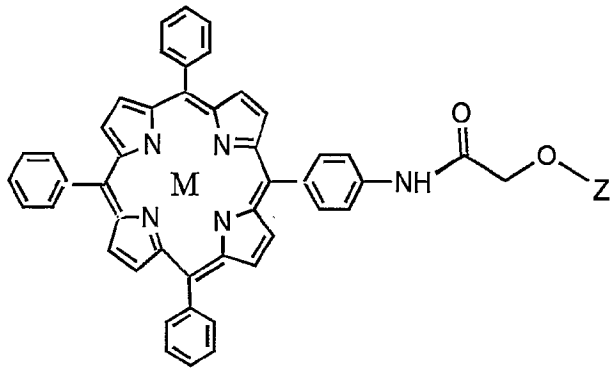
Síntesis de compuestos de fórmula III.

De manera general y para efectos de la presente invención, para la obtención de los compuestos de fórmula III se utilizó la ruta mostrada en la figura 39, en donde para la obtención de la porfirina de fórmula IV se siguió la metodología especificada para dicho

compuesto. La porfirina de fórmula IV cuando R_7 es $-CO-CH_2-Br$ y M es H, se hizo reaccionar en presencia de un nucleósido de fórmula:



obteniéndose el compuesto:



donde M es H.

Finalmente el compuesto anterior, se hace reaccionar con AcOM obteniéndose los compuestos de fórmula III.

Síntesis de compuestos de fórmula IV.

De manera general y para efectos de la presente invención, para la obtención de los compuestos de fórmula IV se utilizaron las mismas condiciones de reacción que para la formación de los compuestos **54-56** (figura 37). Una solución metanólica saturada de AcOM se hace reaccionar con una solución de la porfirina de fórmula:

Y—H

donde M es H en la porfirina Y, obteniéndose el compuesto de fórmula IV cuando R_7 es H (ver compuestos **54-56** y **84**, figura 38). El compuesto anterior se hacen reaccionar con

$BrCH_2COBr$ obteniéndose el compuesto de fórmula IV cuando R_7 es $-CO-CH_2-Br$ (ver compuestos **86-89**, figura 38). Alternativamente, tanto el compuesto de fórmula IV cuando R_7 es H (ver compuesto **53**) ó cuando R_7 es $-CO-CH_2-Br$ (ver compuesto **85**), se hacen reaccionar con AcOM obteniéndose los compuestos de fórmula IV (ver compuestos **54-56**, **84** y **86-89**, figura 38).

Los detalles de la síntesis se mencionan a continuación:

Una solución metanólica saturada de acetato metálico se mezcló con una solución de porfirina **53** en cloruro de metileno, dejándose en agitación durante 12 h (figura 32). La reacción de las porfirinas correspondientes **53-56** con 1.2 equivalentes de bromuro de bromoacetilo usando piridina como base en THF (en tiempos de reacción de 2.5 a 4 h, dieron como resultado los compuestos **86-89**. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en placa fina utilizando sílica gel como soporte. Los compuestos de fórmula IV fueron también obtenidos a partir del compuesto **85** por reacción con una solución metanólica saturada del acetato metálico correspondiente.

Al igual que las porfirinas que se conocen a la fecha, las porfirinas de la presente invención ya sea por si solas, como porfirinil-nucleótidos neutros o como sus complejos metálicos, son altamente fluorescentes; esto provee una ventaja significativa sobre otros acarreadores de nucleósidos ya que es posible la detección de células tumorales utilizando microscopía de fluorescencia y la consecuente detección de la localización del nucleósido en tumores y tejidos que lo rodean. Esto permite dar un seguimiento del tratamiento en pacientes con afecciones tumorales o virales.

Así mismo los porfirinil-nucleótidos neutros de la invención tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno actuando a nivel de los ácidos nucleicos, aumentando con ello el número de contactos con componentes celulares tales como las bases purínicas o pirimidínicas en el DNA blanco.

Otra ventaja de los compuestos de la invención, es que las porfirinas son altamente selectivas hacia células tumorales lo que las hace acarreadores ideales de drogas antivirales o anticancerígenas. Además las porfirinas no son tóxicas en el organismo ya que pueden ser extraidas fácilmente del torrente sanguíneo y tejidos.

Por otra parte, las porfirinas **53-56** y **84-89** de la invención resultan ser por ellas mismas compuestos inhibidores del DNA tumoral. Esto hace que los porfirinil-nucleótidos neutros

de la presente invención sean pro-drogas muy activas y poco tóxicas en terapias contra enfermedades de orígen viral y/o cancerígeno.

Con la finalidad de ilustrar la invención se incluyen los siguientes ejemplos, sin que estos sean limitantes del alcance de la misma.

I. Obtención de nucleósidos de la serie ribosa.

Síntesis del furanósido 48.

Para la síntesis del nucleósido de la serie ribosa **48** se exploraron dos rutas de reacción en donde se emplea como material de partida D-β-ribosa. Ambas rutas conducen a la formación del grupo *O*-isopropilideno entre los *vic*-dioles de las posiciones 2 y 3 de la D-ribosa. Las secuencias de reacciones utilizadas en ambas rutas se muestran en la figura 40.

En la primera ruta, la D-ribosa fue transformada en el ribofuranósido **42**[57] en un 50% de rendimiento por reacción con acetona en medio ácido a reflujo por 12 h. Bajo las condiciones de reacción para la formación de **42**, se observó la epimerización (mutarotación) del carbono anomérico debido la apertura del anillo de cinco miembros. Debido a la mutarotación ocurrida, el compuesto **42** fue obtenido como una mezcla de anómeros α/β en una proporción 3:7.

La subsecuente protección de los grupos OH libres en las posiciones 1 y 5 de la mezcla anomérica **42** con anhídrido acético y piridina permitió obtener el compuesto **43**[58] en su forma *β* en 98% de rendimiento.

La preparación del compuesto **48** se realizó a través del acoplamiento de **43** con timina bajo condiciones de Vorbrüggen[51,52]. Previo al acoplamiento del compuesto **43** con timina, se funcionalizó calentándola a reflujo con un exceso de hexametildisilazano (HMDS) y cloruro de trimetilsilano toda la noche para dar el derivado 2,4-bis(trimetilsililoxi)-5-metilpirimidina o timina persililada (figura 41).

El exceso de HMDS fue removido mediante evaporación al vacío con ligero calentamiento (50 °C).

Por otro lado y como esquema alterno (figura 40) de síntesis del compuesto **48**, la D-ribosa fue tetraacetilada mediante métodos convencionales utilizando anhídrido acético como agente acilante y piridina para dar el compuesto **45** en buen rendimiento (96%). Bajo

condiciones de Vorbrüggen, **45** proporcionó de manera regio y diasteroselectiva el nucleósido beta **46** (89% de rendimiento). El compuesto **46** fue desprotegido con hidróxido de amonio para dar el nucleósido **47** en 96% de rendimiento (figura 40). De esta manera, los grupos 2-OH y 3-OH de **47** fueron protegidos con 2,2-dimetoxipropano para obtener el furanósido **48** requerido en un 85% de rendimiento.

Ejemplo 1. Obtención de 2,3-*O*-isopropiliden-D-ribofuranósido (42).

A una solución de 5 g (33.30 mmol) de D-ribosa en acetona (19 mL) se le adicionaron 0.05 mL de HCl al 35%. La solución fue refluida por 12 h y entonces se enfrió y neutralizó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La solución acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh. y se concentró dando un aceite incoloro que fue purificado por destilación (110 °C, 0.5 mm Hg).

El espectro de RMN de ^1H de **42** en $CDCl_3$ a 300 MHz, mostró la presencia de una mezcla anomérica α/β en una proporción 3:7. Para el anómero β, H-1 aparece como una señal sencilla en 5.43 ppm. Las señales para H-2 y H-3 se muestran como una señal doble en 4.81 y 4.54 ppm respectivamente con constantes de acoplamiento de $J_{2,3}$= 5.9 Hz. Mientras que para el anómero αH-1 se encuentra en 5.28 ppm como una señal sencilla y H-2 y H-3 se encuentran en 4.81y 4.48 ppm respectivamente. No se observó ninguna señal a frecuencias más altas por lo que el espectro de ^1H está de acuerdo con la forma cíclica furanosa **42** que es la termodinámicamente favorable. La estructura asignada para el compuesto **42** es apoyada por el espectro de ^{13}C en donde no se observó señal en la región de grupos carbonilo que indicaría la presencia de una estructura abierta.

Ejemplo 2. Obtención de 2,3-*O*-isopropiliden-1,5-diacetil-β-D-ribofuranósido (43).

A una solución de 0.5 g (2.63 mmol) de **42** en piridina (5 mL) se le adicionaron 2 mL de anhídrido acético (21.22 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 5 h. El disolvente se evaporó a sequedad y el producto se purificó por cromatografía en columna de sílica gel utilizando una mezcla 9:1 Hexano/acetato de etilo para obtener 0.7 g (98%) de **43** como un aceite incoloro.

El espectro de RMN de ^1H de **43** en solución de $CDCl_3$, mostró una señal ddd en 3.97-4.01 (J_{gem} = 11.5 Hz, J_{vic} = 6.6 Hz,) que integra para dos protones y fue asignada a los protones H-5, la señal para H-4 debería de ser una señal compleja debido a los

acoplamientos con los protones diasterotópicos H-5 y el protón H-3; sin embargo, esta señal se encuentra traslapada en forma de un pseudotriple en 4.32 ppm con una constante de acoplamiento vicinal de 6.6 Hz, por lo que se puede decir que el acoplamiento con H-3 no es observado. Las señales para H-2 y H-3 presentaron equivalencia magnética apareciendo como una señal simple en 4.6 ppm y la señal para el protón del carbono anomérico fue identificada como una señal sencilla en 6 ppm. El espectro de ^{13}C fue asignado mediante una correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C utilizando la secuencia de pulsos HETCOR; los que se obtuvieron fueron los siguientes:

EM (*m/z*) 274 [M^+], 215 [M^+-59], 142 [M^+-132], 127 [M^+-147], 112 [M^+-162], 99 [M^+-175]

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.2, 1.4 (2s, 2Me-isopropilideno) 1.9, 1.96 (Me-acetilo), 3.97-4.01 (dd, 2H, J_{gem} = 11.5 Hz, J_{vic} = 6.6 Hz, H-5), 4.32 (pseudo-triplete, 1H, *J* = 6.6, H-4), 4.6 (s, 2H, H-2, H-3), 6.1 (s, 1H, H-1).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 21.0, 21.4 (Me-acetilo), 25.2, 26.8 (Me-isopropilideno), 64.31 (C-5), 81.8 (C-3), 85.3 (C-2), 85.6 (C-4), 102.3 (C-1), 113.3 (C-cuaternario), 169.5-170.4 (CO-acetilo).

Ejemplo 3. Obtención de 5´-acetil-2´, 3´-*O*-isopropiliden-desoxitimidina (44).

A una solución de timina (396 mg, 3.14 mmol) y hexametildisilazano (6 mL, 28.50 mmol) se le adicionó cloruro de trimetilsilano (1 mL, 7.88 mmol) y la mezcla fue refluida toda la noche. El exceso de hexametildisilazano se eliminó al vacío y posteriormente se agregó una solución de 43 (0.86 g, 3.14 mmol) en 1, 2-dicloroetano seco (10 mL). A la solución resultante se le adicionaron 0.68 mL de triflurometansulfonato de trimetilsilo (3.77 mmol) calentándose a continuación a 60 °C durante toda la noche. Después de enfriar, se adicionaron 20 mL de cloruro de metileno y la reacción se lavó con una solución acuosa concentrada de bicarbonato de sodio (3 x 100 mL). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con sulfato de sodio. El disolvente se evaporó y el aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla 7:3 hexano/cloruro de metileno para dar 54 mg (5%) de 44.

Los datos de RMN de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **44** se muestran a continuación:

IR (KBr) υ cm^{-1} 3173 (m), 2851 (m), 1689 (f), 1106 (d), 1086 (d).

EM (*m/z*) 341 [M^++1], 325 [M^+-15], 215 [M^+-99], 157 [M^+-183], 127 [M^+-213], 97 [M^+-243]$^+$, 69 [M^+- 271), 43 [M^+- 297].

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.40 (s, 3H, Me-O-isopropilideno), 1.66 (s, 3H, Me-O-isopropilideno), 1.91 (s, 3H, 5-Me), 2.15 (s, 3H, Me-acetilo), 4.04-4.24 (ddd, 2H, *J* = 5.5, 10. 8 Hz, H-5´), 4.24-4.63 (dd, 1H, *J* = 3.81, 8.6 Hz, H-2´), 4.86 (pseudo-triple, 1H, *J* = 4.2, H-3´), 5.2 (ddd, 1H, *J* = 3.9, 5.9, 10.58 Hz, H-4´), 5.73 (d, 1H, *J* = 8.6, H1´), 7.1 (s, 1H, H-6) 9.55 (señal ancha, 1H, NH).

RMN-^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 12.91 (5-Me), 21.3 (Me-acetilo), 26.7 (Me-O-isopropilideno), 28.0 (Me- O-isopropilideno), 67.51 (C-5´), 66.23 (C-4´), 73.7 (C-3´), 74.8 (C-2´) 81.8 (C-1´), 112.4 (C-5, C-cuaternario), 135.4 (C-6), 151.0 (C-4), 164.0 (C-2), 170.6 (CO-acetilo).

El espectro de RMN de ^{1}H muestra la señal característica de los metilos del grupo isopropilideno en 1.40 y 1.66 ppm mientras que el grupo acetilo se encuentra en 1.91 ppm. Se observaron todas las señales características de la ribosa y es de especial interés puntualizar que la señal para el H1´ se identificó como una señal doble en 5.73 ppm por su acoplamiento con el H2´ con una ^3J(H1´, H2´)= 8.6 que es característico de nucleósidos en su forma β con una conformación C2´-endo[59].

Ejemplo 4. Obtención de 1,2,3,5-Tetraacetil-D-Ribosa (45).

A una solución de 5 g de D-ribosa en piridina (10 mL) se le adicionaron 30 mL de anhídrido acético y se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. La solución se concentró al vacío y el aceite resultante se disolvió en acetona y después de un tiempo el producto cristalizó. Los cristales se lavaron con MeOH para dar 9.4 g (96%) de **45**; pf 98 °C.

Ejemplo 5. Obtención de 2´, 3´, 5´-Triacetil-desoxitimidina (46).

A una solución de timina (396 mg, 3.14 mmol) y hexametildisilazano (6 mL, 28.50 mmol) se le adicionó cloruro de trimetilsilano (1 mL, 7.88 mmol) y la mezcla se puso en reflujo toda la noche (figura 41). El exceso de hexametildisilazano se eliminó al vacío y al residuo se le adicionó una solución de 45 (1 g, 3.14 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (10 mL). A la solución resultante se le adicionaron 0.68 mL (3.77 mmol) de trimetilsiltriflurometansulfonato y la solución se calentó a 60 °C durante toda la noche. Después de enfriar, se le adicionó cloruro de metileno (20 mL) y la reacción se lavó con una solución acuosa concentrada de bicarbonato de sodio (3 x 100 mL). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con sulfato de sodio. El disolvente se removió al vacío y al

aceite obtenido se le adicionaron 5 mL de acetato de etilo y hexano (50 mL). El precipitado se filtró para dar **46** (1.07 g, 89%); pf 109-111°C.

El espectro de rmn de ^{1}H muestra tres señales sencillas en 1.86, 7.04 y 8.88 ppm que fueron asignados a los protones 5-Me, H-6 y NH de la timina respectivamente, así como la presencia del protón anomérico a 5.98 ppm que presenta un acoplamiento con el protón H-2´ con una J= 9.7 Hz lo que confirma la presencia del estereoisómero β. Los tres grupos acilo son observados a 1.92, 1.98 y 2.16 ppm.

Ejemplo 6. Obtención de 2´,3´,5´, trihidroxi-desoxitimidina (47).

A 100 mg (0.261 mmol) de **46** se le adicionaron 5 mL de una solución de NH_4OH al 36% y la mezcla se calentó a 60 °C durante toda la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el producto se precipitó con 1 mL de AcOEt y 10 mL de Hexano. El producto se filtró para dar 64.7 mg (96%) de **47**; pf 120°C.

Los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **47** se muestran a continuación:

IR (KBr) υ cm^{-1} 3401 (m, a), 2902 (m) 1701 (f), 1463 (m), 1044 (m), 883 (d), 600 (d).

EM (*m/z*, int. Rel) 258 [M$^+$], 155 [M$^+$-103], 126 [M$^+$-132], 112 [M$^+$-146], 73 [M$^+$-185], 60 [M$^+$-198], 43 [M$^+$-215].

RMN-^{1}H (300 MHz, MeOH-d_4) δ 1.87 (s, 3H, 5-Me), 3.71-3.86 (m, 4H, H-2´, H-4´, H-5´), 4.18-4.19 (m, 1H, H-3´), 5.78 (d, 1H, J = 9.49 Hz, H-1´), 7.51 (s, 1H, H-6).

RMN-^{13}C (300 MHz, MeOH-d_4) δ 11.31 (5-Me), 65.67 (C-5´), 67.13 (C-4´), 68.76 (C-2´), 71.85 (C-3´) 80.53 (C-1´), 110.80 (C-5), 137.29 (C-6), 152.14 (C-4), 165.28 (C-2).

En RMN de ^{1}H el metilo en posición 5´ fue identificado como una señal sencilla en 1.87. Las señales para los protones H-2´, H-4´, y los dos protones H-5´ fueron traslapados en una señal múltiple en la región de 3.71-3.86. La señal para H1´ se identificó como una señal doble en 5.78 ppm por su acoplamiento con el H2´ con una ^3J(H1´, H2´)= 9.5 Hz que es característico de nucleósidos en su forma β con una conformación C2´-endo.

Ejemplo 7. Obtención de 2´,3´-*O*-isopropiliden-desoxitimidina (48).

A una solución de **47** (500 mg, 1.93 mmol) disueltos en MeOH seco (6 mL), se le adicionaron 20 mL de 2,2-dimetoxipropano y dos gotas de HCl. La solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche, se filtró y el sólido remanente se lavó con MeOH. El sólido blanco obtenido se secó al vacío para obtener **48** (489 mg, 85%); pf 264°C.

Las figuras 42 y 43 muestran los espectros de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **48**. En el espectro de ^{1}H se apreciaron todas las señales esperadas, incluyendo las señales en 1.4 y 1.8 que corresponden a los metilos del grupo O-isopropilideno. Mediante un espectro HMBC se observó que los metilos del O-isopropilideno correlacionaron con la señal en 110.7 ppm mientras que el 5-Me correlacionó con la señal en 111.3 ppm (figura 44).

II. Obtención de nucleósidos de la serie desoxirribosa.

Síntesis de 3´-Azido-3´-desoxi-timidina (AZT).

El nucleósido AZT se sintetizó mediante la estrategia de síntesis reportada por Czernecki[54] (figura 45).

Una solución de timidina en DMF se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en presencia de trifenilfosfina y ácido 4-metoxibenzoico por 20 minutos. La trasformación completa al derivado 2,3´-anhidro **49** se logró por la adición de una segunda cantidad equimolar de trifenilfosfina y DIAD. La ciclación ocurrió después de agitar la mezcla de reacción por 40 min. El compuesto cíclico se precipitó poniendo la mezcla de reacción en éter etílico. Después de filtrar y secar, el compuesto cíclico se obtuvo con buena pureza en un 90% de rendimiento.

La apertura del derivado 2,3´-anhidro se logró de manera muy limpia con azida de sodio en dimetil formamida a 125-130 °C en un rendimiento del 88% para dar el compuesto **50** sin rompimiento de la funcionalidad éster del grupo protector. Para la desprotección del grupo 5´-éster se utilizó una reacción de transesterificación con metanol en presencia de metóxido de sodio en el compuesto **50** sin previa purificación. El 4-metoxibenzoato de metilo formado se extrajo con éter etílico después de la adición de agua. Las fases acuosas fueron neutralizadas con amberlist H50 y el AZT se obtuvo en 90% de rendimiento prácticamente puro. Las figuras 46 y 47 muestran los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C respectivamente del AZT.

Ejemplo 8. Obtención de 2,3´-anhidro–3´-desoxi-5-*O*-(4-metoxibenzoil)-timidina (49).

A una solución de timidina (3.63 g, 15 mmol) y Ph_3P (5.9 mg, 22.5 mmol) en DMF (30 mL), se adicionó gota a gota una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (4.4 mL, 22.5 mmol) y ácido 4-metoxibenzoico (3.42 g, 22.5 mmol) en DMF (15 mL). La mezcla se agitó por 20 min. antes de volver a agregar otros 4.4 mL de azodicarboxilato de diisopropilo

(22.5 mmol) y 5.9 mg de Ph_3P (22.5 mmol). Después de agitar por 40 min. adicionales, la solución se transfirió a un matraz que contenía 300 mL de éter etílico y la suspensión resultante se dejó reposar toda la noche a 0°C. El sólido blanco cristalino que se formó, se filtró y lavó con éter para dar 4.9 g de **49** (90%); pf 262 °C.

Ejemplo 9. Obtención de 3´-Azido-3´-desoxi-5´-*O*-(4-metoxibenzoil)timidina (50).

Una solución de **49** (2.0 g, 2.5 mmol) y azida de sodio (545 mg, 8.4 mmol) en DMF (30 mL), se calentó a 130°C por 5 h. La solución se virtió a un matraz que contenía una solución de HCl al 5% (4.1 mL, 2.5 mmol) y se agitó por 10 min. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL) y los extractos orgánicos se lavaron con agua (3 x 100 mL) y con una solución saturada de NaCl (3 x 100 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se secaron con Na_2SO_4.anh. La solución se concentró y seco al vacío. Se obtuvieron 1.9 g (88%) de un sólido blanco amorfo; con punto de descomposición de 165 °C.

Ejemplo 10. Obtención de 3´-Azido-3´-deoxitimidina (AZT).

A una solución de **50** en MeOH seco (20 mL) se le adicionó una solución de MeONa 1 M en MeOH (5.75 mL, 1.15 equiv) y la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 20 mL de H_2O y el MeOH se evaporó al vació. A la solución acuosa se le adicionó Amberlist H50 (5 x 2 g) y la mezcla se extrajo con éter etílico (5 x 50 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se dejaron evaporar hasta sequedad. Los cristales obtenidos se lavaron con agua destilada (100 mL) y la fase acuosa se evaporó al vacío. Se obtuvieron 1.0 g (90%) de AZT; pf 120°C.

III. <u>Síntesis de la porfirina.</u>

Síntesis de 5 (*p*-aminofenil),10,15,20-trifenil-porfina (53) y sus complejos metálicos 54, 55 y 56.

La condensación de pirrol y benzaldehído utilizando BF_3 como catalizador y *p*-cloroanil como agente oxidante, condujo al compuesto **50** en un 55% de rendimiento, el cual fue regioselectivamente nitrado en posición *para* respecto al macrociclo[56], por reacción con 17 equivalentes de ácido nítrico fumante dando el compuesto mononitrado **52** en un 46% de rendimiento. Cuando se aumentó la cantidad de ácido nítrico fumante a 22 equivalentes se obtuvo regio-específicamente el compuesto **52** en un 28% de rendimiento. La reducción

del grupo nitro se llevó a cabo con ácido clorhídrico y cloruro de estaño para dar la *p*-aminofeniltrifenilporfirina **53** en un 94%, la cual fue fácilmente metalada utilizando el acetato de Zn, Ni o Cu para obtener los compuestos **54**, **55** y **56** respectivamente (figura 37).

Ejemplo 11. Obtención de 5, 10, 15, 20-*meso*-tetrafenil-porfina (50).

A una solución de benzaldehído (1.52 mL, 15 mmol), y pirrol (1.04 mL, 15 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1000 mL) se le adicionaron 0.4 mL de etearato de BF_3 (solución 2.5 M en CH_2Cl_2) y se agitó a temperatura ambiente por 1 h protegida de la luz. A la solución roja resultante se le adicionó *p*-cloroanil (2.77 g, 11 mmol) y se calentó a 45 °C por 1 h. El disolvente se evaporó a sequedad y el polvo oscuro resultante se lavó con MeOH (500 mL). El sólido púrpura se purificó por cromatografía en columna sobre sílica gel (eluyente cloroformo) para dar 1.4 g de tetrafenilporfirina (55%).

Ejemplo 12. Obtención de 5 (*p*-nitrofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina (52).

A una solución de tetrafenilporfirina **50** (1 g, 1.63 mmol) en cloroformo (100 mL) se adicionó gota a gota ácido nítrico fumante (1.06 mL, 17 mmol) a 0 °C. La solución se agitó a temperatura ambiente por 2 h tornándose verde oscura. Pasado este tiempo, se lavó con H_2O destilada (3 x 100 mL) y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y concentró hasta un volumen de 20 mL. Al matraz se le adicionó una pequeña cantidad de sílica gel para reducir el volumen hasta sequedad. La nitrofeniltrifenilporfirina se purificó por cromatografía en columna (eluyente cloroformo) para dar 0.54 g (46%) del producto deseado.

Ejemplo 13. Obtención de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina (53).

A una solución de nitrofeniltrifenilporfirina **52** (250 mg, 0.38 mmol) en HCl (10 mL) se adicionó cloruro de estaño dihidratado (260 mg, 1.15 mmol) y la mezcla se agitó a 65-70 °C por 2 h. Después de enfriar, se adicionó a la mezcla agua destilada (30 mL) e hidróxido de amonio hasta un llegar a un pH de 8. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 50 mL) y las fases orgánicas se juntaron y concentraron. El producto se purificó por cromatografía en columna con soporte de sílica gel (eluyente hexano-CH_2Cl_2 7:3) para dar 248 mg (94%) de la aminofeniltrifenilporfirina.

IV. Síntesis de Porfirinil-nucleótidos neutros.

Acoplamiento nucleósido-porfirina a través de agentes fosforilantes del tipo $P(X')(Y')_3$, donde X'=O ó par de electrones, Y'=Cl, OAr, $N(CH_3)_2$.

Una vez llevada a cabo la síntesis del ribofuranósido, el AZT y la porfirina-NH_2, se sintetizaron los porfirinil-nucleótidos mediante el acoplamiento porfirina-nucleósido a través de un agente fosforilante.

Ejemplo 14. Reacción de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenilporfirina (53) con PCl_3.

Se hizo reaccionar una solución de un equivalente de la aminofeniltrifenilporfirina **53** en THF y una solución de un equivalente de PCl_3 en el mismo disolvente utilizando como base piridina obteniéndose la porfirina fosforilada **63** de la figura 31. Dicho compuesto mostró, a través del espectro de RMN de ^{31}P, una señal a 151 ppm que se encuentra desplazada a frecuencias bajas comparadas con el desplazamiento esperado para un sustrato de fórmula Cl_2PNR_2 ($\delta^{31}P$ ~ 165 ppm). Adicionalmente en el espectro de ^{31}P acoplado la señal se observa como un doble con una constante de acoplamiento de $^2J_{P\text{-}NH}$ = 25.7 Hz.

Ejemplo 15. Reacción del compuesto 63 con AZT.

La porfirina fosforilada **63** se hizo reaccionar *in situ* con un equivalente de AZT con la finalidad de obtener el compuesto **64** (figura 32). El producto de esta adición fue analizado por RMN de ^{31}P mostrando en el espectro desacoplado dos señales muy cercanas en 139.81 y 139.68 ppm con una relación 3:7 respectivamente. La presencia de estas dos señales fue indicativa de un compuesto diastereomérico y efectivamente el compuesto **64** se puede presentar como una mezcla de diastereómeros debido a la formación de un centro de quiralidad en el fósforo.

Ejemplo 16. Reacción del compuesto 64 con metanol.

El compuesto **64** se hizo reaccionar a temperatura ambiente con un equivalente de metanol; para evitar la hidrólisis del intermediario diastereomérico **64**, se decidió entonces adicionar metanol seguido de azufre elemental y se incrementó la temperatura de la reacción a 65 °C por un tiempo de 12 h, obteniéndose una mezcla diastereomérica de tiofosforamidatos **74** a partir de **73** que es el compuesto de rearreglo con fósforo

tricoordinado. La mezcla de **74** mostró en RMN de ^{31}P dos señales muy próximas en 69.77 y 69.56 ppm en una proporción 8:2 respectivamente. La señal más intensa se presentó como una señal pseudoquintuple con constantes de acoplamiento 7.4 y 17.4 Hz como se muestran en la figura 33.

En el espectro de RMN de ^{1}H (figura 48) se observó un desplazamiento de casi 0.5 ppm de los protones H-5´ a frecuencias bajas respecto a su desplazamiento químico en el AZT libre, debido al efecto protector de la porfirina y a una posible interacción por puente de hidrógeno débil con el nitrógeno de la porfirina como se observa en la estructura **74a**. El espectro de ^{13}C (figura 49) mostró un acoplamiento entre el C-2 de la timina con el fósforo (^{2}J[P-C2] = 5.3 Hz), mientras que el acoplamiento de C-5´ del azúcar con el fósforo no fue observado; sin embargo, debido a la presencia del fósforo, este último carbono fue desplazado 1 ppm a frecuencias altas referente a su desplazamiento químico en el AZT. Las señales restantes del producto de la reacción permanecieron sin cambio aparente. El espectro de IR mostró la presencia del grupo azida en 2100 cm^{-1}.

Adicionalmente, el compuesto **74** fue analizado por espectrometría de masas utilizando la técnica FAB^{60}. La espectrometría de masas arrojó un ión molecular de 913.9876 que corresponde al fragmento molecular [M^{+}-43], el cual se atribuyó a la pérdida del grupo azida en forma de ácido hidrazóico (HN_3). De igual forma se identificó un ión fragmento de m/z 896 que corresponde a la pérdida de H_2O a partir del ión m/z = 913.

Ejemplo 17. Acoplamiento de los complejos metálicos 54, 55 y 56 con AZT.

Se sintetizaron los complejos metálicos **54**, **55** y **56** de la porfirina **53** y su uso en la formación de pro-drogas análogas a **74**. La secuencia de reacciones se muestra en la figura 34, el acoplamiento de las metalo porfirinas y el AZT con PCl_3 se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de reacción que para la obtención de **74**.

Los productos de cada reacción mostraron ser semejantes a **74** en sus espectros de ^{1}H (figura 48), estando ausente la señal en –2.7 ppm perteneciente a los NH pirrólicos, debido a la coordinación con el metal. En el caso del compuesto con Cu **77** las señales para la porfirina fueron anchas debido al efecto paramagnético del metal. Como puede apreciarse en la figura 48, al igual que en el caso del compuesto **74a,** el desplazamiento químico de los protones H-5' en los compuestos **75**, **76** y **77** fueron desplazados 0.5 ppm a frecuencias bajas respecto a su desplazamiento químico en el AZT. Adicionalmente, cada

uno de estos protones tiene una multiplicidad doble en las pro-drogas correspondientes ya que solo se observó el acoplamiento geminal y no con el fósforo o con el protón H-3'. Sin embargo, para el caso del compuesto **75**, el acoplamiento ^{3}J(P-H5') fue encontrado en el espectro de ^{31}P acoplado y resultó ser de 6.6 Hz. Este acoplamiento es muy semejante al encontrado para el compuesto **74a** y fue indicativo de que la conformación en los compuestos **74a** y **75** es la misma; es decir la conformación en la cual el enlace P-N es trans al enlace C2-O. Por otra parte, los espectros de ^{31}P desacoplados para **75**, **76** y **77** mostraron respectivamente una señal sencilla , indicativo de la presencia de un solo estereoisómero. Los espectros acoplados para los compuestos **76** y **77** mostraron una señal ancha para cada caso. Los espectros de ^{13}C (figura 49) mostraron desplazamientos químicos semejantes a las señales encontradas en **74a**. En el espectro de IR se encontró la señal en 2100 cm^{-1} perteneciente al grupo azida para todos los casos.

En la figura 50 se compara el ión molecular esperado con el fragmento molecular encontrado por la técnica de bombardeo atómico rápido (siglas en inglés FAB) para los compuestos **75, 76** y **77**. Como puede apreciarse, no se observó el ión molecular en ninguno de los casos; sin embargo, el pico más abundante corresponde al fragmento [M^{+}-61] que proviene de la pérdida de HN_3 seguida de la pérdida de H_2O, como se encontró también en el caso de **74**. La figura 50 también resume la masa exacta calculada para el fragmento [M^{+}-61]. La desviación estándar de los valores calculados es de 0.0007 en promedio lo cual soporta la caracterización de las estructuras propuestas.

Ejemplo 18. Síntesis de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina Zn (II), 54; Ni (II), 55; y Cu (II), 56.

A 200 mg de aminofeniltrifenilporfirina en 20 mL de CH_2Cl_2 se adicionó una solución de 400 mg del acetato correspondiente en metanol 20 mL. La solución se agitó 12 h a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina utilizando una mezcla CH_2Cl_2:Hexano 7:3 como eluyente. Durante la evaporación en el rotavapor de la solución de CH_2Cl_2, se fue adicionando gradualmente metanol. De la solución metanólica se obtuvo un precipitado rojo para el caso del compuesto de Cu y azul para el compuesto de Zn que después de su purificación por cromatografía en columna de sílica gel y utilizando una mezcla CH_2Cl_2:Hexano 7:3 como eluyente se obtuvo la porfirina coordinada en 90%-94% de rendimiento.

Ejemplo 19. Síntesis de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina Zn (II), 54.

Se sintetizó tal como se muestra en el ejemplo 18. Los datos espectroscópicos se muestran a continuación:

IR (KBr) v cm^{-1} 3698 (d), 3448 (f, a), 2924 (d), 1619 (m), 1352 (m), 1007 (a), 795 (d), 750 (m), 702 (m).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.79 (ancha, 2H, amino), 6.90 (d, 2H, *J*= 8.1 Hz, aminofenilo), 7.72 (m, 9H, *metalpara* fenilos), 7.87 (d, 2H, *J*= 8.3 Hz, aminofenilo), 8.2 (m, 6H, *orto* fenilos), 8.82 (m, 6H, β-pirrol), 9.0 (d, 2H, *J*= 4.83 Hz, β-pirrol).

FABMS *(m/z)* Calc. 693.1266; Enc. 693.1152.

Ejemplo 20. Síntesis de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina Ni (II), 55.

Se sintetizó de la misma forma que los compuestos de Zn y Cu solo que la solución se dejó refluir por 5 días. Los datos espectroscópicos se muestran a continuación:

IR (KBr) v cm^{-1} 3782 (d), 3719 (d), 3446 (f, a), 3051 (m), 2861 (m), 1616 (m), 1352 (m), 1005 (m), 794 (m), 749 (m), 702 (m)

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.96 (s, 2H, amino) 6.97 (d, 2H, *J*= 8.06 Hz, aminofenilo), 7.69 (m, 9H, *metalpara* fenilos), 7.78 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz, aminofenilo), 8.01 (m, 6H, *orto* fenilos), 8.75 (m, 6H, β-pirrol), 8.84 (d, 2H, *J*= 4.83 Hz, β-pirrol).

FABMS *(m/z)* Calc. 686. 4366; Enc. 686.4352.

Ejemplo 21. Síntesis de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina Cu (II), 56.

Se sintetizó tal como se muestra en el ejemplo 18. Los datos espectroscópicos se muestran a continuación:

IR (KBr) v cm^{-1} 3721 (d), 3447 (f, a), 3053 (d), 2920 (m), 1619 (m), 1346 (m), 1001 (f), 800 (m), 769 (m), 705 (m).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.76 (ancha, 2H, amino), 6.7 (ancha, 2H, aminofenilo), 7.5 (ancha, 11H, aminofenilo, *metalpara* fenilos), 8.22 (ancha, 14H, β-pirrol, *orto* fenilos). Como se observa, todas las señales fueron anchas y no fue posible observar en ninguna, multiplicidad.

FABMS *(m/z)* Calc. 691.2926; Enc. 691.2187.

Ejemplo 22. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 74-77 (figura 34).

A una solución de PCl_3 (0.1272 mmol) y piridina (0.1 mL) en THF seco (2 mL) se agregó una solución de la porfirina **53** o de las metalo porfirinas **54-56** (0.1272 mmol) en THF seco (5 mL). La mezcla así formada se dejó en agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 min., pasados los cuales se agregó una solución de AZT (0.1272 mmol) en THF (3 mL). La mezcla se agitó por 5 min. adicionales y posteriormente se agregaron (0.1272 mmol) de azufre elemental, procediendo a calentar a 65°C por 12 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se agitó en hexano por 15 min. y se filtró. El polvo se disolvió en CH_2Cl_2 y se precipitó varias veces con hexano.

Ejemplo 23. Reacción de acoplamiento de 63 con el furanósido 48.

Se describe la preparación y caracterización de los porfirinil nucleótidos de la serie ribosa, obtenidos en la reacción del compuesto **63** con el furanósido **48**.

Las reacciones realizadas se llevaron a cabo en una mezcla THF-piridina en una proporción 50:50. La secuencia de reacciones que conducen a la obtención del porfirinil-nucleótido **79** se presentan en la figura 35. La reacción del compuesto **63** con el furanósido **48** fue monitoreada por RMN de ^{31}P. La desaparición de la señal en 151 ppm perteneciente a **63** y la aparición de una señal sencilla en 139.44 ppm fue indicativa del consumo total de la porfirina fosforilada y de la presencia de un solo estereoisómero. La multiplicidad de esta señal en el espectro acoplado es ddd, en forma de septeto debido al translape parcial de este sistema, con constantes de acoplamiento J(P-H) 25.1, 13.8, 6.8 Hz. La configuración sobre el átomo de fósforo en el intermediario **78** generado en la reacción, es tal que el enlace P-N es trans al enlace C2-O. Cuando se agregó un equivalente de metanol al producto **78**, no se observó cambio en el desplazamiento químico de la señal en 139.44 ppm, lo que es consistente con los experimentos realizados con el AZT. Después de la reacción estereoespecífica con azufre a 65°C por 5 h, el producto se analizó en el crudo de reacción, después de eliminar el disolvente al vació, por medio de la RMN de ^{31}P, ^{1}H y ^{13}C. En la RMN de ^{31}P se observó una señal sencilla en 68.85 ppm que tiene una multiplicidad dt (seis señales) con constantes de acoplamiento J(P-H) 34.7 y 10.7 Hz. La constante de acoplamiento más grande se encuentra dentro del rango esperado para un acoplamiento P-NH, mientras que el acoplamiento más pequeño

se debe al acoplamiento ^{3}J(P-H) con los protones en posición 5' ya que en compuestos tetracoordinados de fósforo los acoplamientos vecinales ^{3}J(PH) con los protones del anillo son más cercanos. En el espectro de ^{1}H, la integración de la señal doble en 5.62 ppm perteneciente al protón anomérico del nucleósido y la señal perteneciente a los protones pirrólicos en –2.73 ppm de la porfirina, mostraron una relación 1:2 respectivamente, indicando que el compuesto **63** y **48** se acoplaron. Los protones H5' fueron protegidos 0.12 ppm a frecuencias bajas respecto a su desplazamiento químico en el furanósido **48**. El espectro de RMN de ^{13}C mostró una señal doble para C-5 debido a su acoplamiento con el fósforo (J[P-C5]= 4.6 Hz) y se desplazó 2 ppm a frecuencias altas respecto a su desplazamiento químico en el furanósido **48** indicando que el fósforo se encuentra unido al oxígeno en posición 5'.

El análisis por espectrometría de masas mediante la técnica FAB, arrojó un ión molecular abundante en *m/z* 988.0632. La masa de este ión corresponde perfectamente bien con la masa exacta calculada para el ión molecular *m/z* 988.0674. Estos resultados corroboraron la estructura de **79**.

Ejemplo 24. Reacción de acoplamiento de 63 con los compuestos 54-56.

Siguiendo este mismo procedimiento, se ensayaron las reacciones con los complejos metálicos **54-56** (figura 36).

Los espectros de RMN de ^{1}H (figura 51) y ^{13}C (figura 52) para los derivados **80-82** son semejantes a los del compuesto **79**. Como puede apreciarse de la figura 51, la RMN de ^{1}H de los derivados **80-82** no presentan la señal para el NH de pirrol debido a la coordinación con el metal. La figura 52 resume algunos desplazamientos químicos seleccionados de ^{13}C para los compuestos **79-82**. Como puede apreciarse, en el compuesto **79** el átomo de fósforo presenta acoplamiento con los átomos de carbono C-4' y C-5' con valores de 4.6 y 5.6 Hz respectivamente. Para los compuestos **80-81**, se pudo apreciar una señal doble para C-5' que es indicativo de que el átomo de fósforo se encuentra unido al oxígeno en posición 5'. En el compuesto **82** no se observó acoplamiento con C-5'. Los productos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masas utilizando la técnica FAB y fue posible observar el ión molecular en todos los casos como se resume en la figura 53.

Ejemplo 25. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 79-82.

A una solución de PCl_3 (0.1272 mmol) y piridina (0.1 mL) en THF seco (2 mL) se agregó una solución de la porfirina **53** o de las metalo porfirinas **54-56** (0.1272 mmol) en THF seco (5 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 5 min. de agitación, se agregó una solución del furanósido **48** (0.1272 mmol) en piridina seca (5 mL). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por 5 min. adicionales y después de agregar azufre elemental (0.1272 mmol) se calentó a 65°C por 5 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se agitó en hexano por 15 min. y se filtró. El disolvente se evaporó y el sólido resultante precipitó varias veces de Hexano:CH_2Cl_2.

V. Síntesis de porfirinas.

Síntesis de la porfirina 85 y sus derivados 86-89 (figura 38).

De la misma manera que se realizó la síntesis de las porfirinas **53** y sus complejos metálicos **54-56** y **84**, se realizó la síntesis de las porfirinas **86-89** a partir de **85**. Mientras **53-56** y **84** contienen un grupo amino en la periferia de la porfirina capaz de actuar como un grupo donador en interacciones por puente de hidrógeno, las porfirinas **85-89** poseen un enlace amídico que contiene además, un sitio aceptor de puentes de hidrógeno.

La introducción de los derivados **85-89** en este estudio es de importancia debido a la susceptibilidad del átomo de bromo a ser sustituido por un nucleófilo que facilitaría la formación intracelular de metabolitos activos, así como también el conocimiento de que la presencia de un halógeno incrementa notablemente la actividad biológica de algunos compuestos químicos[61], un ejemplo de ello es el 5-flurouracilo que se utiliza en el tratamiento de personas con cáncer.

El complejo de coordinación **84** fue sintetizado en un 98 % utilizando las mismas condiciones de reacción que para la formación de los compuestos **54-56**. Una solución metanólica saturada de acetato de cobalto (II) se mezcló con una solución de la porfirina **53** en cloruro de metileno, dejándose en agitación durante 12 h (figura 38). Los compuestos **85-89** fueron obtenidos a partir de la reacción de la porfirina correspondiente **53-56** con 1.2 equivalentes de bromuro de bromoacetilo usando piridina como base en THF. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en placa fina utilizando sílica gel como soporte. La figura 54 muestra los rendimientos aislados de los productos, todos ellos fueron superiores al 86%, mientras que los tiempos de reacción fluctuaron de 2.5 a 4

h. Los compuestos **86-89** fueron también obtenidos a partir del compuesto **85** por reacción con una solución metanólica saturada del acetato metálico correspondiente.

Los espectros RMN de ^1H para los compuestos **85-89** son similares entre ellos, con la diferencia de que la señal en –2.73 ppm asignada a los protones NH pirrólicos en **85** está ausente en los compuestos **86-89** debido a la coordinación con el metal. Los protones α al carbonilo se observaron a 4.14 ppm como una señal sencilla, la presencia de los metales no tiene ningún efecto sobre el desplazamiento químico de esta señal ya que todos ellas presentaron la misma frecuencia. La correlación de esta señal con el pico a 29.7 ppm en el espectro de dos dimensiones HETCOR permitió la asignación de la señal de ^{13}C al carbono α al carbonilo. El carbono carbonílico se encuentra desplazado aproximadamente a 164 ppm. En 8.4 ppm se observó una señal ancha que es intercambiable con deuterio y fue asignada al NH amídico.

Ejemplo 26. Síntesis de 5 (*p*-aminofenil), 10, 15, 20-trifenil-porfina Co (II) 84.

A 200 mg del compuesto **53** en 20 mL de CH_2Cl_2 se le adicionó una solución de 400 mg de acetato de cobalto (II) en 20 mL de metanol. La solución se agitó por 12 h a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreo por cromatografía en capa fina utilizando una mezcla CH_2Cl_2:Hexano 7:3 como eluyente. El CH_2Cl_2 se evaporó en el rotavapor y al residuo se le agregó metanol. De la solución metanólica se obtuvo un precipitado que después de su filtración y purificación por cromatografía en columna de sílica gel y utilizando una mezcla CH_2Cl_2:Hexano 7:3 como eluyente, se obtuvo la porfirina **84** en 90% de rendimiento. Debido al paramagnetismo de la muestra todas las señales en RMN-^1H fueron anchas y no fue posible observar en ninguna, multiplicidad. IR (KBr) ν cm^{-1} 3421 (f, a), 2930 (m), 1625 (m), 1346 (m), 1001 (m), RMN-^1H ($CDCl_3$, 400 MHz) 9.56-9.87 (a, 8H, pirrol), 8.98-9.12 (a, 6H, orto), 7.33-8.56 (a, 13H, fenilo sustituido, *meta/para)*, 4.21 (a, 2H, NH) . FABMS *m/z* calc. 686.6798, enc. 687.6763.

Ejemplo 27. Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 85-89.

Una solución de 0.16 mmol de la porfirina correspondiente y 0.015 mL (0.19 mmol) de piridina en THF anhidro (3 mL) se enfrió a 0°C. Posteriormente se le adicionó una solución de 0.017 mL (0.19 mmol) de bromuro bromoacetilo en THF anhidro (2 mL) en un periodo de 10 min. La solución verde resultante se agitó a temperatura ambiente por 3 h. La

reacción se detuvo con 5 mL de H_2O y el disolvente se removió bajo presión reducida. El precipitado resultante se disolvió en CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con H_2O destilada (5 x 25 mL). El extracto orgánico se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró bajo presión reducida. El crudo de la reacción fue eluido en una columna cromatográfica utilizando sílica gel como soporte, y una mezcla CH_2Cl_2:MeOH (9:1) como eluyente, para obtener la correspondiente amida analíticamente pura.

VI. Síntesis de porfirinil-dinucleótidos de AZT.

Ejemplo 28. Síntesis de la 5-hidroximetil-trifenilporfirina 93.

La síntesis de la porfirina sustituida con un alcohol (porfirina **93**) en lugar de una amina se realizó a través de la reducción de la porfirina **92**, que contiene como sustituyente un éster aromático, la cuál se muestra en la figura 24. La porfirina **92** se obtuvo por el método de acoplamiento cruzado de tipo Adler y Longo[62] refluyendo un equivalente de 4-formil-benzoato de metilo, 3 equivalentes de benzaldehído, y 4 equivalentes de pirrol en medio ácido[63]. De la reacción se obtuvo una mezcla de porfirinas las cuales fueron separadas por cromatografía en columna. En una de las fracciones poco polares se encontró la porfirina **92** cuyos datos espectroscópicos concordaron con los informados previamente[64]. El rendimiento final del producto después de volverlo a pasar por columna cromatográfica, resultó ser del 7%. La porfirina **92** se redujo al alcohol **93** por reacción con $LiAlH_4$ en 95% de rendimiento (figura 24). El espectro de RMN de ^1H, mostró una señal sencilla que integra para dos protones en 4.84 ppm que fue atribuida al grupo metileno, mientras que para el grupo hidroxilo su señal se desplazó a campo alto en 1.75 ppm apareciendo como una señal ancha que es intercambiable con deuterio tras la adición de D_2O. Las señales en la región aromática resultaron ser las esperadas para el compuesto **93**. Por otro lado, la resonancia magnética nuclear de ^{13}C para el grupo metileno fue asignada a la señal que apareció en 65.27 ppm.

Ejemplo 29. Síntesis de 5-(4´-metoxicarbonilfenil)-10,15,20-trifenilporfirina 92[64].

A una mezcla de 4.10 g (25 mmol) de *p*-formilbenzoato de metilo, 7.62 mL (75 mmol) de benzaldehído y 5.48 g (25 mmol) de $Zn(OAc)_2$ en ácido propiónico (500 mL) a 100°C, se adicionó 6.94 mL (100 mmol) de pirrol durante 1 h bajo agitación vigorosa. La solución negra resultante fue refluida por 4 h adicionales y después se enfrió a temperatura

ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida (0.5 mmHg, 80 °C) y el sólido resultante se pasó por una columna cromatográfica usando cloruro de metileno como eluyente para eliminar los componentes polares. Se colectaron todas las fracciones y el volumen se redujo a 100 mL y se adicionó piridina (2 mL) y un exceso de *p*-cloroanil (2, 3, 5, 6-tetraclorobenzoquinona) (2 g) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se dejó en reflujo durante 1 h y después de enfriar a temperatura ambiente, la solución se filtró, se extrajo con una solución acuosa de HCl al 18% (3 x 100 mL) y se neutralizó con una solución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anh. y se evaporó para dar 11.5 g de un sólido púrpura. La segunda porfirina recuperada por cromatografía en columna de sílica gel (CH_2Cl_2) resultó ser la porfirina **92**. Debido a que el compuesto no estaba puro, se volvió a pasar por columna cromatográfica tres veces (SiO_2, CH_2Cl_2) obteniendo 1.10 g de **92** (6.7% de rendimiento).

Ejemplo 30. Síntesis de 5-(4´-hidroximetilfenil)-10,15,20-trifenilporfirina 93.

A una solución de 0.14 g (3.566 mmol) de $LiAlH_4$ en THF seco (5 mL) a 0°C, se le adicionó lentamente una solución de 0.6 g (0.892 mmol) de la porfirina **92** en THF seco (5 mL). El baño de hielo se removió y la mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente por 3 h. La reacción se detuvo en un baño de hielo por adición de agua destilada hasta que el $LiAlH_4$ sin reaccionar se neutralizó. El crudo de reacción se extrajo con $CHCl_3$ y se lavó con agua destilada (3 x 100 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El sólido resultante se purificó por cromatografía en sílica gel usando CH_2Cl_2 como eluyente para obtener 0.55 g (95% de rendimiento) de la porfirina **93**.

Ejemplo 31. Reacción de 93 con dos equivalentes de AZT.

El acoplamiento de **93** y AZT ocurrió mediante la secuencia de reacciones presentadas en la figura 25. En primer término, la reacción de un equivalente de **93** con un equivalente de tricloruro de fósforo proporcionó el derivado **94** el cuál fue identificado en el crudo de reacción por medio de RMN de ^{31}P arrojando una señal sencilla en 178.4 ppm. La estructura de **94** fue determinada por correlación con un fosforodiclorhidrito derivado del *p*-hidroxianisol obtenido anteriormente[65].

La adición de dos equivalentes de AZT al compuesto **94** proporcionó el fosfito intermediario **95** cuya resonancia magnética nuclear de ^{31}P en el crudo de reacción mostró una señal en 140.7 ppm. El compuesto **95** se estabilizó agitando la solución con azufre elemental durante 12 h a temperatura ambiente, para dar el compuesto **96** en un 85% de rendimiento. Se sintetizó el análogo oxidado de **96** con oxígeno. Para ello se preparó de nueva cuenta el intermediario **95** y se le adicionó 1.3 equivalentes de hidroperóxido de terbutilo, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h (figura 55). Como producto de esta reacción se obtuvo el compuesto **97** en un 80% de rendimiento.

Ejemplo 32. Síntesis del compuesto 96 (figura 25).

A una solución de 0.013 mL (0.1467 mmol) de PCl_3 y piridina (0.1 mL) en THF seco (2 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno se le agregó bajo agitación una solución de 0.0945 g (0.1467 mmol) de la porfirina **92** en THF seco (5 mL). Después de 5 min., se agregó una solución de 0.0979 g (0.3668 mmol, 2 equiv.) de AZT en THF seco (3 mL). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por 5 min. adicionales. Después de agregar azufre elemental (0.01g, 0.2934 mmol.), la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 12 h bajo atmósfera de nitrógeno. El disolvente se removió bajo presión reducida, el sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con agua destilada (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna de sílica gel usando la siguiente secuencia de disolventes como eluyente [Hexano-CH_2Cl_2-(CH_2Cl_2:MeOH 9:1)] para obtener 0.15 g (85 % de rendimiento) de **96**.

Ejemplo 33. Síntesis del compuesto 97 (figura 55).

Se preparó siguiendo el mismo procedimiento que para **96** utilizando 0.020 mL (0.176 mmol, 1.2 equiv.) de hidroperóxido de *tert*-butilo como agente oxidante de fósforo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 12 h. Se obtuvieron 0.15 g (80 % de rendimiento) de **97**.

Ejemplo 34. Evidencias espectroscópicas de los compuestos 96 y 97.

La estructura de los compuestos **96** y **97** se determinó basándose en sus espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, IR y espectrometría de masas de alta

resolución. Ambos compuestos presentan espectros de RMN de ^1H muy similares. Uno de los protones en posición 5´ del fragmento de AZT, se identificó como una señal múltiple en 3.73 ppm y 4.06 ppm para **96** y **97** respectivamente, mientras que el otro protón 5´ se traslapó con la señal de los protones H-3´ y H-4´ en una señal múltiple en 4.14 y 4.39 ppm para **96** y **97** respectivamente. La señal para los protones del grupo metileno de la porfirina resultó ser una señal doble en ambos casos debido a su acoplamiento con el fósforo en 5.40 ppm ($^3J_{P-H}$ = 8.7 Hz). La señal se desplazó 0.54 ppm a frecuencias altas respecto al desplazamiento químico de la porfirina de partida **93**[66]. Cabe señalar que la relación de las señales de la porfirina:AZT en ambos compuestos es de 1:2 en la integración del espectro de RMN de ^1H.

Por otro lado, el espectro de RMN de ^{13}C de **96** y el de **97** mostró que la resonancia atribuible a C5´ del fragmento del AZT y CH_2 de la porfirina se desplazan a 6 y 5 ppm respectivamente a frecuencias altas con respecto a las materias primas. Adicionalmente la resonancia magnética nuclear de ^{31}P es como se espera, una señal sencilla en 70.4 y 0.5 ppm para **96** y **97** respectivamente, mientras que en el espectro acoplado estas señales aparecen como un septuplete con una constante de acoplamiento $^3J_{P-H}$ = 8.0 Hz. El espectro de infrarrojo para ambos compuestos muestra una señal intensa en 2100 cm^{-1} atribuible a la frecuencia de estiramiento del grupo azida. Por otra parte, el análisis para **96** y **97** por espectrometría de masas de alta resolución (FAB) muestra el ión molecular m/z 1239.2657 y 1223.1965 respectivamente.

Ejemplo 35. Reacción de la porfirina 85 con AZT (figura 39).

En éste ejemplo se describe un método para la síntesis del porfirinilnucleósido **98** derivado del AZT, bajo condiciones más suaves en menor tiempo y mayor rendimiento. La síntesis de **98** ocurrió mediante una reacción de tipo Williamson entre el compuesto **85** y AZT utilizando como base carbonato de potasio en una solución de DMF con agitación a 40 °C por 6 h. El rendimiento de esta reacción fue del 95% después de la purificación por cromatografía en columna con soporte de sílica gel.

El análisis del producto obtenido por RMN de ^1H, ^{13}C, IR y espectrometría de masas de alta resolución (FAB) es consistente con la estructura propuesta para el compuesto **98**. En RMN de ^1H se identificaron todas las señales esperadas; contrario a lo que puede esperarse la resonancia para el grupo metileno alfa al carbonilo fue identificada como una

señal sencilla en 4.14 ppm. La correlación en dos dimensiones ^{13}C-^{1}H usando la secuencia de pulsos HETCOR para **98**, confirmó la asignación hecha para este grupo metileno. El espectro de infrarrojo mostró una señal intensa en 2100 cm^{-1} asignada a la frecuencia de estiramiento para el grupo azida del fragmento de AZT. La estructura **98** fue totalmente confirmada por la observación del ión molecular m/z 937.0239 en espectrometría de masas de alta resolución.

Ejemplo 36. Síntesis de 98.

A una solución de 0.03 g (0.04 mmol) de **85** y 0.017 g (0.12 mmol, 3 equiv.) de K_2CO_3 en DMF (3 mL) se adicionó 0.012 g (0.044 mmol. 1.1 equiv.) de AZT y la mezcla se calentó a 40 °C por 6 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se vertió sobre agua destilada (50 mL) y se extrajo con cloroformo (3 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con agua destilada (3 x 50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna utilizando sílica gel como soporte y CH_2Cl_2 como eluyente hasta que todo el compuesto **85** sin reaccionar se recuperó. La polaridad del eluyente se aumentó utilizando una mezcla CH_2Cl_2:MeOH 9:1, obteniendo 0.036 g (95% de rendimiento) de **98** analíticamente puro.

VI. Ensayos biológicos.

El principal objetivo en el desarrollo de una droga es encontrar una molécula adecuada que posea la actividad farmacológica deseada reduciendo al mínimo la posibilidad de efectos colaterales o secundarios; es por ello que la evaluación de la actividad farmacológica ó efectividad de la droga es relacionada con el efecto biológico que esta provoca *in vitro* ó *in vivo*, tal como la inhibición selectiva de la síntesis de DNA en células con cáncer y células infectadas con virus propuesta para los compuestos sintetizados en el presente trabajo. En este sentido, la efectividad de los Porfirinil-nucleótidos neutros se determinó por la cantidad de DNA que ellos inhibieron expresada como el porcentaje de inhibición. Si el porcentaje de inhibición es alto, la efectividad de la droga es buena y sería un buen candidato para su uso terapéutico.

Ejemplo 37. Fluorescencia.

La localización celular de los compuestos probados fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia-confocal aprovechando las características fluorescentes de las porfirinas. Para este estudio se utilizaron células tumorales B16 de piel de ratón debido a su facilidad de cultivo y adherencia a portaobjetos, lo que facilita el proceso de obtención de imágenes. Para ello fue necesario marcar las células con el colorante Sytox que tiñe exclusivamente los núcleos celulares dando una coloración verde, a diferencia de las porfirinas cuya fluorescencia emitida es roja. La incidencia de ambos colores en la misma región celular proporciona una coloración amarilla.

Las células de melanoma B16 de ratón se obtuvieron de la colección de cultivo tipo americano (MDCK, CCL34). Las células entre 60 y 90^{th} pases se crecieron a 36.5 °C en botellas de plástico (Costar 3151, Cambridge, MA) con una atmósfera de 95% aire, 5% CO_2 (Stericult 200, Forma Scientific, Marrieta, OH) y 20 mL of Dulbecco's modified Eagle's basal medium (DMEM; D1152 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) con penicilina (100 IU/ml; Eli Lilly, México) y 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, 10371-029, Grand Island, NY). Las células se recolectaron con tripsina-EDTA (In Vitro, México) y se esparcieron sobre portaobjetos ($1x10^5$ cells/cm^2).

Las células esparcidas sobre portaobjetos se incubaron por 12 h con 20 μM de las correspondientes porfirinas, se lavaron en PBS y se fijaron en *p*-formaldehído al 2% por 30 min. a 4 °C. Las monocapas se tiñeron por 20 min. a 4 °C con una solución 1 μM del colorante Sytox (S-720, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) y se lavaron 5 veces con PBS y agua destilada y filtrada. Las monocapas sobre los portaobjetos se montaron con el reactivo antidecolorante "Vectashield" (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). La fluorescencia de las monocapas se examinó usando un microscopio confocal (MRC-600, Bio-Rad) con un láser de Kriptón-argón.

Ejemplo 38. Determinación de la cantidad de DNA en cultivos celulares.

La determinación de la cantidad de DNA presente en un cultivo celular pudo ser obtenida por el método normalizado desarrollado por Leyva y Burton[67]. Esta técnica se basa en la separación de DNA de los núcleos celulares y su cuantificación colorimétrica con difenilamina. Para estandarizar la técnica se midió la absorbancia de diferentes alícuotas de DNA estándar de ternera en presencia de difenilamina (cromóforo). La cantidad de

DNA presente en cada alícuota fue determinada mediante la fórmula empírica µgDNA = absorbancia X 0.05 X factor de dilución. El factor 0.05 es una constante universal utilizada para DNA de doble cadena. Los datos de absorbancia se graficaron en función de la cantidad en µg de DNA resultando una recta con coeficiente de correlación de 0.99 (figura 56).

Ejemplo 39. Determinación del porcentaje de inhibición.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante el método de incorporación de timidina-^{3}H, el cual se basa en el siguiente fundamento. Las células se crecen en un medio de cultivo adecuado, posteriormente se agregan los compuestos candidatos a drogas. Después de un tiempo, se agrega timidina-^{3}H. Los compuestos que inhibieron en mayor proporción la replicación de DNA incorporarán menos timidina-^{3}H que aquellos que inhibieron en menor proporción. El DNA se hidroliza con ácido perclórico; la cantidad de nucleótidos presentes en una alícuota de DNA hidrolizado se determina mediante la absorbancia de la muestra en presencia de difenilamina. Por otro lado, la cantidad de timidina-^{3}H incorporada se determina en un contador de radiaciones ß que son emitidas en la desintegración de $^3T \rightarrow {}^2D$ por lo que las cuentas obtenidas son expresadas en unidades DPM (desintegraciones por minuto). La cantidad de DNA determinada por el método de la difenilamina y las cuentas de radiaciones ß se ajustan a la relación DPM/µg de DNA mediante una regla de tres. Con estos datos se obtiene el porcentaje de eficiencia de incorporación de timidina-^{3}H mediante la ecuación 1, mientras que el porcentaje de inhibición o eficiencia de la droga se obtiene mediante la ecuación 2,

$$\%eficiencia = \frac{DPMcompuesto}{DPMcontrol} X100 \qquad [1]$$

$$\%inhibición = 100 - \%eficiencia \qquad [2]$$

Las células de melanoma B16 de ratón se crecieron a semiconfluencia en cajas P-15 con 2 mL de "Dulbecco's medium eagle modified" con 10 % de suero fetal bovino. Las células se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino de fosfatos) y los derivados de porfirina se colocaron en una concentración de 20 µM en DMSO durante 12 horas. Las células se

lavaron 2 veces con PBS y se agregó a cada una de las cajas 1.5 mL de medio de cultivo con timidina-tritio (1.5 mCi/mL). Las células se incubaron durante 4 horas y se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS y después se desprendieron con 500 μL de tripsina; éstas fueron empaquetadas con la ayuda de una centrifuga eppendorf a 5000 rpm durante 5 minutos, la pastilla se lavó con 1 mL de PBS. Enseguida, esta pastilla se incubó con 200 μL de ácido perclórico 0.4 M y 15 μL de PBS con 0.1 % de suero fetal bovino a –20 °C por una hora. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos, y se realizó una hidrólisis con 250 μL de ácido perclórico 1 M. Cada una de las muestras se sonicó (tres pulsos de 30 segundos) y se incubaron durante 30 minutos a 70 °C. Después de centrifugar las muestras a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante dos minutos, se tomaron 200 μL de cada una de ellas más 200 μL del cromógeno y se incubaron por 18 horas. Se tomaron 300 μL de cada una de estas muestras y se sacó su absorbancia a 600 nm. Posteriormente se colocaron 200 μL de cada una de las muestras en viales que contenían líquido de centelleo y se cuantificó la incorporación de timidina-^{3}H .

Para preparar el cromógeno, se disolvieron 1.5 g de difenilamina en 100 mL de ácido acético glacial y 1.5 mL de ácido sulfúrico (solución A). Por otro lado se disolvieron 0.5 mL de acetaldehído en 25 mL de agua (solución B). Se colocaron 0.1 mL de la solución B por cada 20 mL de la solución A.

Ejemplo 40. Ensayos biológicos con los compuestos 74, 75, 79 y 80.

A. Fluorescencia (localización celular).

Para todos los compuestos estudiados las pruebas se hicieron en concentraciones de 20 μM a diferentes tiempos de incubación. De estos estudios cinéticos, se obtuvo un tiempo óptimo de 12 h para obtener la máxima concentración de fluorescencia intracelular. Las imágenes presentadas en la figura 57 muestran la fluorescencia para las células control teñidas con Sytox y células incubadas con el compuesto **74**, **75**, **79**, y **80**, todos ellos arrojaron resultados similares. La fluorescencia puntual fue predominantemente perinuclear con trazas de concentración que parecen ser adyacentes a la membrana nuclear. Las imágenes de fluorescencia para los compuestos **74** y **79** mostraron que entre 96-98% de las células lograron acumular estos compuestos en el citoplasma, mientras que

el porcentaje de incorporación para los compuestos coordinados a zinc **75** y **80** indicaron que sólo el 80% de las células lograron acumular estos compuestos en el citoplasma.

B. Incorporación de Timidina-^{3}H (porcentaje de inhibición).

La figura 58 muestra los resultados de los ensayos de inhibición en la replicación de DNA en presencia de los compuestos **74**, **75**, **79** y **80**. El AZT inhibió el crecimiento de DNA; la inhibición se presentó en un 23.5%. Todos los Porfirinil-nucleótidos neutros (**74**, **75**, **79** y **80**) inhibieron el crecimiento de DNA más que el AZT, siendo el compuesto **74** el más activo con un porcentaje de inhibición de 41.77% (figura 58). Los Porfirinil-nucleótidos neutros presentaron una actividad significativa y mayor que AZT y se encontró que la porfirina **53** fue el compuesto más activo en este estudio.

Como puede observarse de los estudios de inhibición del crecimiento del DNA de células tumorales de ratón, los porfirinil-nucleótidos son mejores como drogas anticancerígenas. Inesperadamente se encontró que la porfirina **53** inhibe por sí sola el crecimiento del DNA tumoral con un doble de eficiencia que el AZT.

Ejemplo 41. Actividad biológica de las porfirinas 53-56, 84 y 85-89.

Se muestran las propiedades inhibitorias de DNA en células tumorales B16 de melanoma de ratón de las porfirinas **53** y sus complejos metálicos **54-56** y **84**, así como de las porfirinas **85-89**.

A. Fluorescencia (localización celular).

Los ensayos biológicos de las porfirinas **53**, **54-56**, y **84-89** se llevaron a cabo mediante microscopía de fluorescencia-confocal para determinar su localización celular. Para ello fue necesario marcar las células con el colorante Sytox que tiñe exclusivamente los núcleos dando una coloración verde a diferencia de las porfirinas cuya fluorescencia emitida es roja. La incidencia de ambos colores en la misma región celular proporciona una coloración amarilla. En la figura 59 se muestran las imágenes de fluorescencia para los compuestos con menor y mayor actividad inhibitoria de DNA en células tumorales (compuesto **53** y compuesto **86** respectivamente) deducida en los experimentos de incorporación de timidina-tritio. Como puede apreciarse de las micrografías, la acumulación de la florescencia para ambos compuestos fue predominantemente perinuclear, teniendo un área local adicional de concentración adyacente a la membrana nuclear (color amarillo) lo cual es indicativo de la incorporación de ambas porfirinas al

núcleo celular. La acumulación de la porfirina **86** en el núcleo celular es aparentemente mejor que la de la porfirina **53**.

B. Incorporación de Timidina-^{3}H (porcentaje de inhibición).

Todos los derivados de porfirinas (a concentración de 20 μm) mostraron efecto inhibitorio respecto al control, sobre la síntesis de DNA en células B16 de melanoma de ratón. Esto se observa por la cantidad de timidina-^{3}H presente en la síntesis de ácidos nucleicos (figura 60). El grado de inhibición en la síntesis de DNA para cada compuesto, así como la geometría más común observada en los complejos de los metales se presenta en la figura 60. Para la serie de los derivados metálicos de **53**, los de los metales de transición **55**, **56** y **84** son más activos que el compuesto de Zinc **54**. En las micrografías mostradas en la figura 59, efectivamente se nota que las porfirina **86** derivada de **85** tiene mejor penetración al núcleo celular que la porfirina **53**.

Ejemplo 42. Actividad biológica de los compuestos 96, 97 y 98.

A. Fluorescencia (localización celular).

Los ensayos de localización intracelular realizados con los compuestos **96, 97,** y **98** se presentan en la figura 61. A manera de comparación, estos estudios fueron realizados también con los compuestos **85** y **93** incubando células B16 (cáncer de piel de ratón) por 12 h con los compuestos respectivos. La incorporación de estos compuestos a la célula fue determinada mediante microscopía de fluorescencia. Como puede apreciarse todos los compuestos probados, en especial **96**, **97** y **98** pueden incorporarse en altas concentraciones en el citoplasma celular alrededor del núcleo como lo muestran las imágenes de fluorescencia (color rojo) respectivas. Estos resultados indican que la presencia del nucleósido no afecta la incorporación de la porfirina en la célula. Como es notable de las imágenes, todos los compuestos lograron incorporarse a los núcleos celulares como lo muestra la presencia de color amarillo en ellos. Para confirmar si estos compuestos realmente se habían incorporado al núcleo celular y no estaban dando un falso positivo, fue necesario observarlos longitudinalmente como se ejemplifica en las imágenes e' y f', que son núcleos de células incubadas con los compuestos **93** y **98**, los cuales muestran claramente la presencia de estos compuestos en el núcleo.

B. Incorporación de Timidina-^{3}H (porcentaje de inhibición).

La figura 62 resume los resultados obtenidos en los estudios de la eficiencia de los compuestos **96-97** en la inhibición de la replicación de DNA de la línea celular B16 de melanoma de ratón. Como es apreciable, el compuesto **97** resultó ser 5 veces más eficiente que el compuesto **98**. El compuesto **96** resultó ser 4 veces más activo que **98** pero menos activo que **97**.

En resumen, la figura 63 hace una recopilación de la actividad biológica de los compuestos probados en los ensayos con timina tritiada. Los compuestos con mayor efecto inhibitorio de la síntesis de DNA en células B16 de melanoma de ratón son las porfirinas **84**, **86**, el porfirinil-nucleótido **74**, y el porfirinil-dinucleótido **97**. Estos cinco compuestos inhibieron la replicación de DNA en una proporción igual o mayor al 40%. Otros compuestos tales como **79**, **80**, **89** y **96** tuvieron una actividad antitumoral en un rango de 30-40%. Los compuestos **74**, **79**, **80**, **96** y **97** poseen estructuras de porfirinil-nucleótidos neutros y representan el 62.5% de los compuestos con mayor actividad biológica observada.

REFERENCIAS.

1. (a) Ichikawa, E.; Kato, K.; *Curr. Med. Chem.* **8**, 385 (2001). b) *Current Pharmaceutical Design* **3**, 240 (1997). c) Isono, K.; *J. Antibiot.* **41**, 1711 (1988).
2. (a) Balzarini, J.; De Clercq, E. J. Biol. Chem. 1989, 264, 6127. (b) Reardon, J.; Miller, W. H. J. Biol. Chem. 1990, 265.
3. (a) Jean, K. T. Advance in Pharmacology, 2000, 29, 109. (b) Tan, X. Advance Drugs Delivery Reviews, 1999, 39, 117.
4. (a) Barre-Sinoussi, F.; Cherman, J. C.; Rey, R.; Mongatnier, Science, 1983, 220, 868. (b) Broder, S.; Gallo, N. C. N. Engl. J. Med. 1984, 311, 1292.
5. Zimmerman, T. P.; Mahony, W. B.; Prus, K. L. J. Biol. Chem. 1987, 262, 5748. Chan, T. C.; Shafer, L.; Redmond, R.; Pennington, K. L. Biochem. Pharm. 1993, 46, 273.
6. Kraupp, M.; Marz, R. Gen. Pharmac. 1995, 26, 1185. Plagemann, P. G.; Wohlhueter, R. M.; Woffendin, C. Biochim. Biophys. Acta. 1988, 947, 405.
7. Bourdais, J.; Biondi, R.; Guerreiro, C.; Lascu, I.; Janin, J.; Verón, M.; J. Biol. Chem. 1996, 271, 7887.
8. Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. Science, 1990, 249, 1533.

9. Benzing, T.; Tijivikua, T.; Wolfe, J.; Rebek, J. Jr. Science, 1988, 242, 266. Deslongchamps, G.; Galan, A.; de Mendoza, J.; Rebek, Jr. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 61. Andreu, C.; Galan, A.; Kobiro, K.; de Mendoza, J.; Park, T. K.; Rebek, J.; Salmerón, A.; Usman, N. J. Am. Chem, Soc. 1994, 116, 5501
10. Fukura, H.; Fukura, K.; Sessler, J. L. J. Am. Chem, Soc. 1991, 113, 4706.
11. Fukura, H.; Magda, D.; Sessler, J. L. . J. Am. Chem, Soc. 1991, 113, 478. Král, V.; Sessler, J. L.; Fukura, H. . J. Am. Chem, Soc. 1992, 114, 8704. Iverson, B. L.; Thomas, R. E.; Král, V.; Sessler, J. L. J. Am. Chem, Soc. 1994, 116, 2663. Král, A.; Sessler, J. L. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995, 2349.
12. Nowick, J. S.; Cao, T.; Norongha, G. J. Am. Chem, Soc. 1994, 116, 3285.
13. Riggs, J. A.; Hossler, K. A.; Smith, B. D.; Karpa, M. J.; Griffin, G.; Duggan, P. J. Tetrahedron Letters, 1996, 37, 6303.
14. Hostetler, K. Y.; Strhmiller, L. M.; Lenting, H. B.; Van der Bosh, H.; Rishman, D. D.; J. Biol. Chem. 1990, 265, 6112.
15. Aggarwal, S. K.; Gogu, S. R.; Rangan, S. R. J. Med. Chem. 1991, 34, 1408.
16. Chu, C. K.; Bhadti, V. S.; Dishi, K. J.; Etse, J. T.; Gallo, J. M.; Boudinot, F. D.; Scinazi, R. F. J. Med. Chem. 1990, 33, 2188.
17. Piantadosi, C.; Marasco, C.; Morris-Natschke, S. L. J. Med. Chem. 1990, 33, 1505.
18. Namame, A.; Gouyette, C.; Fillion, M.; Fillion, G.; Huynh-Dinh, T. J. Med. Chem. 1992, 35, 3039.
19. Aoki, S.; Honda, Y.; Kimura, E. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 10018.
20. Namame, A.; Bonnaffé, D.; Henin, Y.; Huynh-Dinh, T. J. Org. Chem. 1996, 61, 895.
21. Peyrottes, S.; Schlienger, N.; Beltran, T.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Gosselin, G.; Aubertin, M.; Imbach, L.; Perigaud, C. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001, 20, 315
22. McGuigan, C.; Pathirana, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. . J. Med. Chem. 1993, 36, 1048.
23. Detty, M. R.; Hilmay, D. G.; Nelen, M. I. J. Med. Chem. 2000, 43, 2403.
24. Raab, O. Z. Biol. 1900, 39, 524.
25. Meyer Betz, F. Dtsch. Arch. Klin. Med. 1913, 112, 476.
26. Auler, H.; Banzer, G. Z. Krebsforschung 1942, 53, 65.
27. Lipson, R. L.; Baldes, E. J.; Olsen, A. M. J. Natl. Cancer Inst. 1961, 26, 1.

28. Diamond, I.; Granelli, S.; McDonagh, A. F.; Nielsen, S.; Wilson, C. B. Lancet 1972, ii, 1175.

29. Kelly, J. F.; Snell, M. E. J. Urol. 1976, 115, 150.

30. (a) Dougherty, T. J. Photochem. Photobiol. 1993, 58, 890. (b) Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb,. A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D. G. Cancer Res. 1978, 38, 2628.

31. Boneett, R. Chem. Soc. Rev, 1995, 19.

32. Hamblin, M. R.; Newman, E. L. J. Photochem. Phtobiol. B: Biol. 1994, 23, 3. Richelli, F. J. Photochem. Phtobiol. B: Biol. 1995, 29, 109.

33. Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. A.; Ho, W. P.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L. Shay. J. W. Science, 1994, 266, 2011.

34. Nussbaum, M. J. Biochemistry, 1996, 35, 12061.

35. Ishikawa, Y.; Uno, T.; Aoki, K.; Shikimi, T.; Hiranima, Y.; Tomisugi, Y. Biochemistry, 2002, 41, 13059.

36. Niedbala. Bioorg. Med. Chem Lett., 1992, 12, 1645.

37. Lauceri, R.; Purrello, R.; Shetty, A. J.; Vicente, M. G. H. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 5835.

38. Vicente, M. G. H.; Edwards, B. J.; Shetty, S. J.; Hou, Y.; Boggen, J. E. Bioorg. Med. Chem. 2002, 10, 481.

39. Barth, R. F.; Soloway, A. H.; Fairchild, R. G.; Brugger, R. M. Cancer, 1992, 70, 2995.

40. Barth, R. F.; Soloway, A. H.; Goodman, J. H.; Gahbauer, R. A.; Gupta, N.; Blue, T. E.; Yang, E.; Tjarks, W. Neuro-surg, 1999, 44, 433.

41. Maillard, P.; Momentau, M. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 9125.

42. James, D. A.; Swamy, N.; Paz, N.; Hanson, R. N.; Ray, R. Bioorg. Med. Chem. Lett 1999, 9, 2379.

43. MacMahon, S.; Fong, R.; Baran, P. S.; Safonov, I.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I. J. Org. Chem. 2001, 66, 5449.

44. Kus, P.; Knerr, G.; Czuchajowski. Tetrahedron Letters, 1990, 36, 5133.

45. Habdas, J.; Niedbala, H.; Wandrekar, V.; Czuchajowski. Tetrahedron Letters, 1991, 51, 7511.

46. Niedbala, H.; Czuchajowski. Bioorg. Med. Chem. Lett 1992, 2, 1645.

47. Solladié, N.; Gross, M. Tetrahedron Letters, 1999, 40, 3359.

48. Silverman, R.; en The organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Academic Press, Inc., N. Y., Cap 1 y 2 (1992).

49. Pérez, N.; Gordillo, B. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 671.

50. (a) Koole, L. H.; Plavec, J.; Hongying, L.; Vincent, B. R.; Dyson, M. R.; Coe, P. L.; Walker, R. T.; Hardy, G. W.; Rahim, S. G.; Chattopadhyaya, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9936. (b) Mann, J.; Tench, A. J.; Weymouth-Wilson, A. C.; Shaw-Ponter, S.; Young, R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1995**, 677. (c) Jeong, L. S.; Nicklaus, M. C.; George, C.; Marquez, V. E. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7569.

51. Vorbrüggen, H., Krolikiewicz K.; Bennua B. Chem. Ber. 1981, 114, 1234 .

52. Vorbrüggen, H.; Höfle, G. Chem. Ber. 1981, 114, 1256.

53. Wilson, L. J. Hager, M. W.; El-Kattan, Y. A.; Liotta, D. C. *Synthesis* **1995**, 1465

54. Czernecki, S.; Valéry, J-M. Synthesis, 239.

55. Lindsay, J. S.; Schereiman, I. C.; Hsu, H. C; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. J. Org. Chem. 1987, 52, 827.

56. Kruper, W. J.; Chamberlin, T. A.; Kochany, M. J.Org. Chem. 1989, 54, 2753.

57. Wartchow, C. A.; Wang, P.; Bednarski, M. D.; Callstrom. J. Org. Chem. 1995, 60, 2216.

58. Barbat, J.; Gelas, J.; Horton, D.; Carbohydr.Res. 1991, 219, 115.

59. Marino, P. J.; Schwalbe, H.; Griesinger C. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 614.

60. Wilson, S. R.; Perez, J.; Pasternak, A. J. Am.Chem. Soc. 1993, 115, 1994.

61. (a) Yasumoto, M.; Yamawaki, I.; Marunaka, T.; Hashimoto, S. J. Med. Chem. 1978, 21, 738. (b) Cook, A. F.; Holman, M. J. J. Med. Chem. 1979, 22, 11. (c) Rosowosky, R.; Kim, S. H.; Wick, M. J. Med. Chem. 1981, 24, 1177. (d) Siddiqui, A.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Srinivasan, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 381.

62. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Shergalis, W. J. Am. Chem. Soc. 1964, 86, 3145. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. J. Org. Chem. 1967, 32, 476.

63. (a) Anton, J. A.; Loach, P. A. J. Heterocycl. Chem. 1975, 12, 573. (b) Stäubli, B.; Fretz, H.; Piantini, U.; Woggon, W. D. Helv. Chem. Acta. 1987, 70, 1173.

64. (a) Huang, D.; Matile, S.; Berova, N.; Nakanishi, K. Heterocycles, 1996, 42, 723. (b) Linsay, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. J. Org. Chem. 1987, 52, 827.

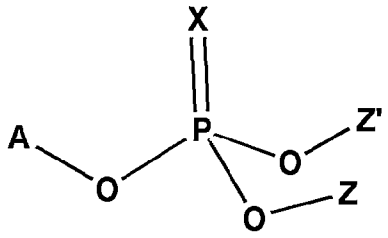
65. Rodriguez-Pérez, M. L. Tesis de licenciatura, *"Síntesis y Análisis Conformacional de 1-Ariloxi-1-Tio-Fosforinanos"*, CINVESTAV-IPN, México, D.F, 1999.

66. Katalenic, D.; Skaric, V.; Klaic, B. Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2743.

67. (a) Leyva, A.; Williams, N. K. Analitycal Biochemistry, 1974, 62, 173. (b) Burton K. Biochem J. 1956, 62, 315.

Reivindicaciones.

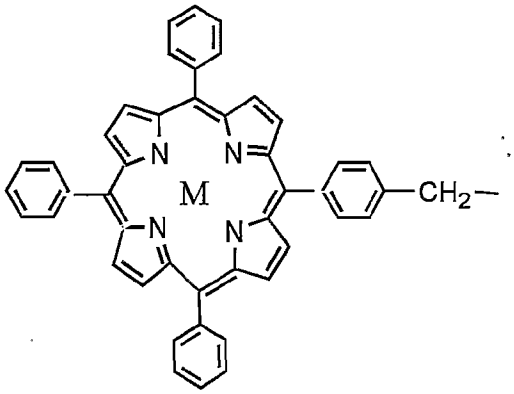
1. Un porfirinil-nucléotido de fórmula



caracterizado porque X es O ó S,

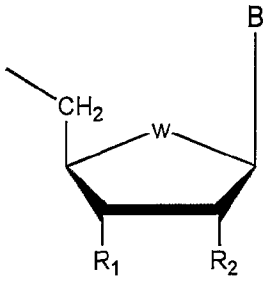
Z' es H ó Z,

A es una porfirina de fórmula:



donde M es H, Zn, Ni, Cu ó Co,

Z es un análogo de nucleósido de fórmula:

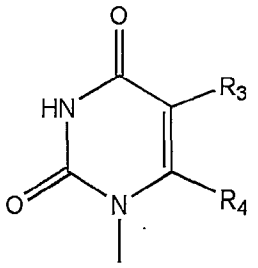


donde R_1 es un grupo azida (N_3), H, OH ó O-isopropilideno con la condición de que cuando R_1 es O-isopropilideno R_2 es O-isopropilideno y viceversa,

R_2 es H, OH ó O-isopropilideno,

w es O, CH_2, ó S,

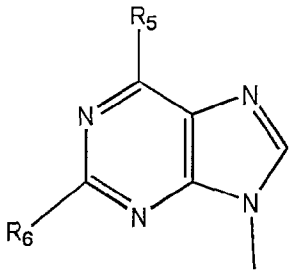
B es una pirimidina de fórmula:



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$,

R_4 es H ó SC_6H_5,

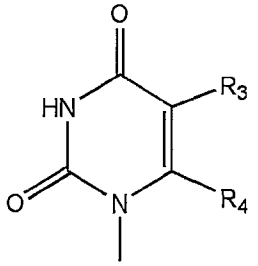
ó una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2.

2. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 1 caracterizado porque Z' es H.
3. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 2 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula

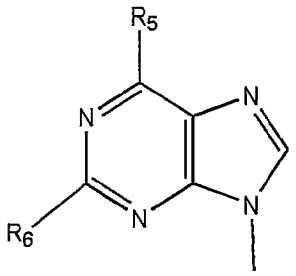


donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$, y

R_4 es H ó SC_6H_5,

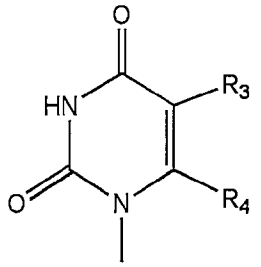
4. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 3 caracterizado porque w es O.
5. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 4 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.
6. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 5 caracterizado porque X es O.
7. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 5 caracterizado porque X es S.
8. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 6 a 7 caracterizado porque M es H.

9. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 2 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y
R_6 es H, ó NH_2.

10. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 9 caracterizado porque w es CH_2.
11. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 10 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.
12. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 10 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.
13. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 11 a 12 caracterizado porque X es O.
14. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 11 a 12 caracterizado porque X es S.
15. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 13 a 14 caracterizado porque M es H.
16. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 1 caracterizado porque Z' es Z.
17. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 16 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula:

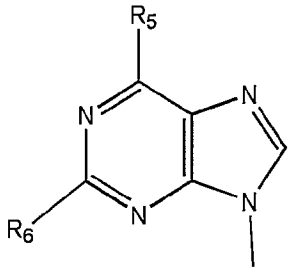


donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$, y
R_4 es H ó SC_6H_5,

18. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 17 caracterizado porque w es O.
19. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 18 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.
20. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 19 caracterizado porque X es O.
21. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 19 caracterizado porque X es S.

22. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 20 a 21 caracterizado porque M es H.

23. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 16 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2.

24. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 23 caracterizado porque w es CH_2.

25. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 24 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.

26. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 24 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.

27. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 25 a 26 caracterizado porque X es O.

28. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 25 a 26 caracterizado porque X es S.

29. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 27 a 28 caracterizado porque M es H.

30. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 3 caracterizado porque w es CH_2.

31. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 30 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.

32. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 31 caracterizado porque X es O.

33. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 31 caracterizado porque X es S.

34. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 32 a 33 caracterizado porque M es H.

35. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 17 caracterizado porque w es CH_2

36. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 35 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.

37. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 36 caracterizado porque X es O.

38. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 36 caracterizado porque X es S.

39. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 37 a 38 caracterizado porque M es H.

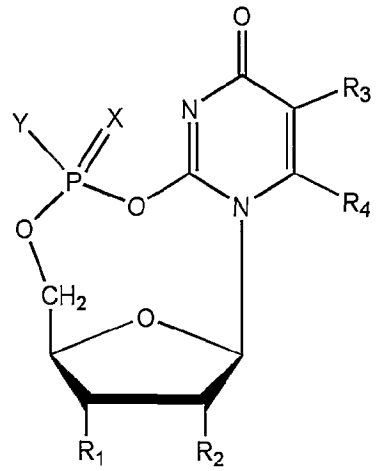
40. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1 a 39 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

41. El uso del compuesto de la reivindicación 1 a 39 como agente antiviral y antitumoral.

42. El uso del compuesto de la reivindicación 1 a 39 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades virales.

43. El uso del compuesto de la reivindicación 1 a 39 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

44. Un porfirinil-nucléotido de fórmula



caracterizado porque X es O ó S,

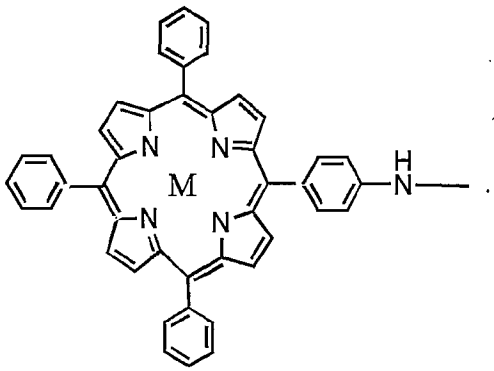
R_1 es un grupo azida (N_3), H, OH ó O-isopropilideno con la condición de que cuando R_1 es O-isopropilideno R_2 es O-isopropilideno y viceversa,

R_2 es H, OH ó O-isopropilideno,

R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$,

R_4 es H ó SC_6H_5, y

Y es una porfirina de fórmula:



donde M es H, Zn, Ni, Cu ó Co.

45. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 44 caracterizado porque X es S.

46. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 45 caracterizado porque R_3 es CH_3 y R_4 es H.

47. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 46 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3) y R_2 es H.

48. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 47 caracterizado porque M es H.

49. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 47 caracterizado porque M es Zn.

50. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 47 caracterizado porque M es Ni.

51. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 47 caracterizado porque M es Cu.

52. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 46 caracterizado porque R_1 es O-isopropilideno y R_2 es O-isopropilideno.

53. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 52 caracterizado porque M es H.

54. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 52 caracterizado porque M es Zn.

55. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 52 caracterizado porque M es Ni.

56. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 52 caracterizado porque M es Cu.

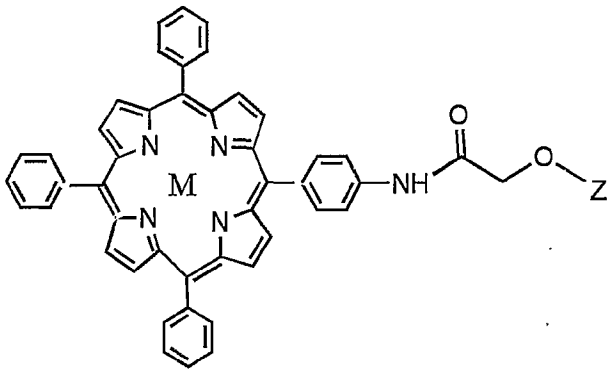
57. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 44 a 56 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

58. El uso del compuesto de la reivindicación 44 a 56 como agente antiviral y antitumoral.

59. El uso del compuesto de la reivindicación 44 a 56 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades virales.

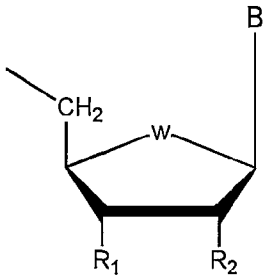
60. El uso del compuesto de la reivindicación 44 a 56 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

61. Un porfirinil-nucléotido de fórmula



caracterizado porque M es H, Zn, Ni, Cu ó Co, y

Z es un análogo de nucleósido de fórmula:

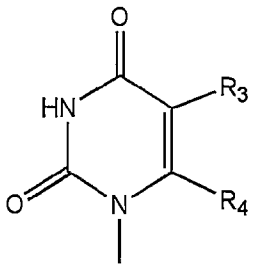


donde R_1 es un grupo azida (N_3), H, OH ó O-isopropilideno con la condición de que cuando R_1 es O-isopropilideno R_2 es O-isopropilideno y viceversa,

R_2 es H, OH ó O-isopropilideno,

w es O, CH_2, ó S,

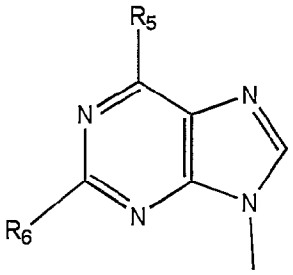
B es una pirimidina de fórmula:



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$,

R_4 es H ó SC_6H_5,

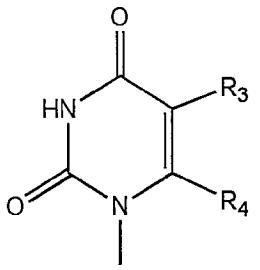
ó una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2

62. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 61 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula:



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, ó $(CH_3)_2CH$, y

R_4 es H ó SC_6H_5,

63. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 62 caracterizado porque w es O.

64. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 63 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.

65. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 64 caracterizado porque M es H.

66. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 62 caracterizado porque w es CH_2.

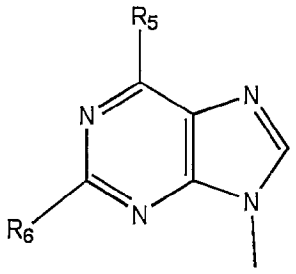
67. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 66 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.

68. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 67 caracterizado porque X es O.

69. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 67 caracterizado porque X es S.

70. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 68 a 69 caracterizado porque M es H.

71. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 61 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2.

72. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 71 caracterizado porque w es CH_2.

73. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 72 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.

74. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 72 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.

75. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 73 a 74 caracterizado porque X es O.

76. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 73 a 74 caracterizado porque X es S.

77. El porfirinil-nucleótido de la reivindicación 75 a 76 caracterizado porque M es H.

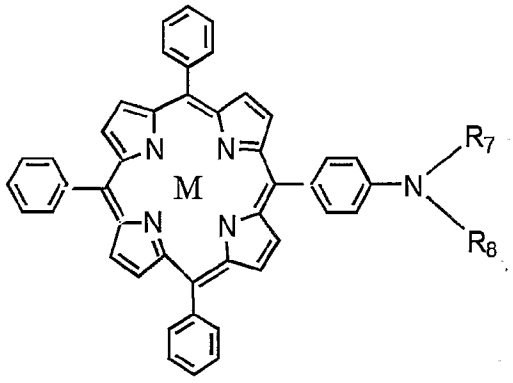
78. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 61 a 77 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

79. El uso del compuesto de la reivindicación 61 a 77 como agente antiviral y antitumoral.

80. El uso del compuesto de la reivindicación 61 a 77 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades virales.

81. El uso del compuesto de la reivindicación 61 a 77 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

82. Una porfirina de fórmula:



caracterizada porque:

R_7 es H ó $CO-CH_2-Br$,

R_8 es H, y

M es H, Zn, Ni, Cu ó Co.

83. La porfirina de la reivindicación 82, caracterizada porque R_8 es H.

84. La porfirina de la reivindicación 83, caracterizada porque R_7 es H

85. La porfirina de la reivindicación 84 caracterizada porque M es H.

86. La porfirina de la reivindicación 84 caracterizada porque M es Zn.

87. La porfirina de la reivindicación 84 caracterizada porque M es Ni.

88. La porfirina de la reivindicación 84 caracterizada porque M es Cu.

89. La porfirina de la reivindicación 84 caracterizada porque M es Co.

90. La porfirina de la reivindicación 83, caracterizada porque R_7 es $CO\text{-}CH_2\text{-}Br$.

91. La porfirina de la reivindicación 90 caracterizada porque M es H.

92. La porfirina de la reivindicación 90 caracterizada porque M es Zn.

93. La porfirina de la reivindicación 90 caracterizada porque M es Ni.

94. La porfirina de la reivindicación 90 caracterizada porque M es Cu.

95. La porfirina de la reivindicación 90 caracterizada porque M es Co.

96. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 82 a 95 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

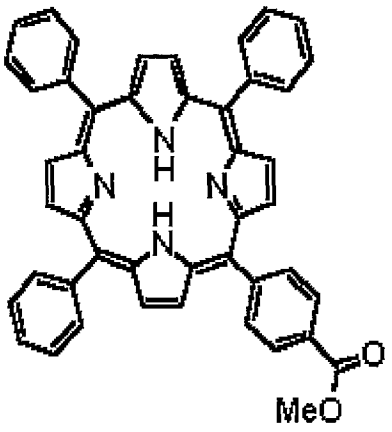
97. El uso del compuesto de la reivindicación 82 a 95 como agente antiviral y antitumoral.

98. El uso del compuesto de la reivindicación 82 a 95 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades virales.

99. El uso del compuesto de la reivindicación 82 a 95 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

100. Un método para la obtención de los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende los pasos de:

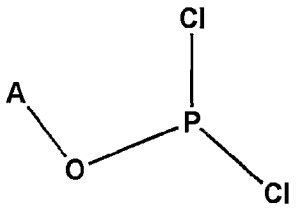
a) Hacer reaccionar 4-formil-benzoato de metilo, benzaldehído y pirrol mediante acoplamiento, obteniéndose el compuesto de fórmula:



b) Reducir el compuesto obtenido en el inciso a) con $LiAlH_4$ para obtener el compuesto de fórmula:

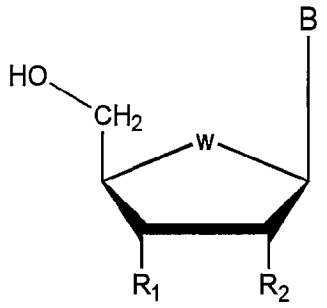
donde M es H en la porfirina A.

c) Hacer reaccionar el compuesto de fórmula A-OH con tricloruro de fósforo para obtener el compuesto de fórmula:

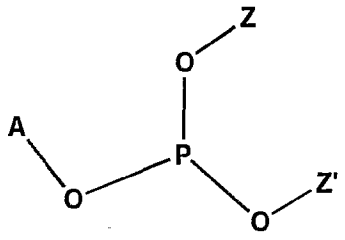


donde M es H en la porfirina A.

d) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso c) con uno o dos equivalentes del nucleósido de fórmula:

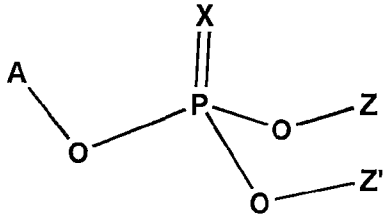


para obtener el compuesto de fórmula:



donde M es H en la porfirina A.

e) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso d) con azufre elemental o hidroperóxido de terbutilo para obtener el compuesto de fórmula:

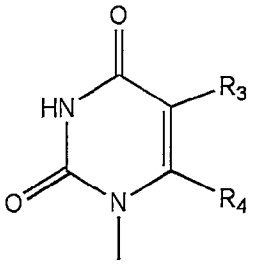


donde M es H en la porfirina A.

f) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso e) con AcOM obteniéndose los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 1.

101. El método de la reivindicación 100 caracterizado porque Z' es H.

102. El método de la reivindicación 101 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$, y R_4 es H ó SC_6H_5,

103. El método de la reivindicación 102 caracterizado porque w es O.

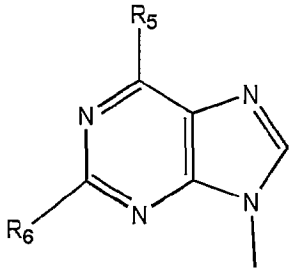
104. El método de la reivindicación 103 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.

105. El método de la reivindicación 104 caracterizado porque X es O.

106. El método de la reivindicación 104 caracterizado porque X es S.

107. El método de la reivindicación 105 a 106 caracterizado porque M es H.

108. El método de la reivindicación 101 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2.

109. El método de la reivindicación 108 caracterizado porque w es CH_2.

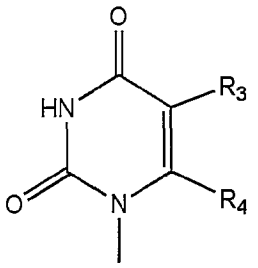
110. El método de la reivindicación 109 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.

111. El método de la reivindicación 109 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.

112. El método de la reivindicación 110 a 111 caracterizado porque X es O.

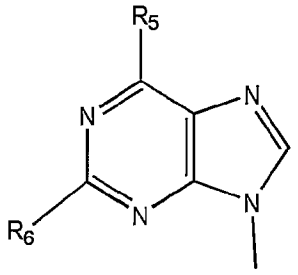
113. El método de la reivindicación 110 a 111 caracterizado porque X es S.

114. El método de la reivindicación 112 a 113 caracterizado porque M es H.
115. El método de la reivindicación 100 caracterizado porque Z' es Z.
116. El método de la reivindicación 115 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula:



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7, ó $(CH_3)_2CH$, y
R_4 es H ó SC_6H_5,

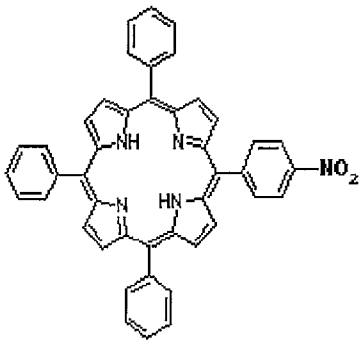
117. El método de la reivindicación 116 caracterizado porque w es O.
118. El método de la reivindicación 117 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.
119. El método de la reivindicación 118 caracterizado porque X es O.
120. El método de la reivindicación 118 caracterizado porque X es S.
121. El método de la reivindicación 119 a 120 caracterizado porque M es H.
122. El método de la reivindicación 115 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y
R_6 es H, ó NH_2.

123. El método de la reivindicación 122 caracterizado porque w es CH_2.
124. El método de la reivindicación 123 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.
125. El método de la reivindicación 123 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.
126. El método de la reivindicación 124 a 125 caracterizado porque X es O.
127. El método de la reivindicación 124 a 125 caracterizado porque X es S.

128. El método de la reivindicación 126 a 127 caracterizado porque M es H.
129. El método de la reivindicación 102 caracterizado porque w es CH_2.
130. El método de la reivindicación 129 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.
131. El método de la reivindicación 130 caracterizado porque X es O.
132. El método de la reivindicación 130 caracterizado porque X es S.
133. El método de la reivindicación 131 a 132 caracterizado porque M es H.
134. El método de la reivindicación 116 caracterizado porque w es CH_2
135. El método de la reivindicación 134 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.
136. El método de la reivindicación 135 caracterizado porque X es O.
137. El método de la reivindicación 135 caracterizado porque X es S.
138. El método de la reivindicación 136 a 137 caracterizado porque M es H.
139. Un método para la obtención de los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 44, caracterizado porque comprende los pasos de:
    a) Someter a condiciones reductoras el compuesto de fórmula:

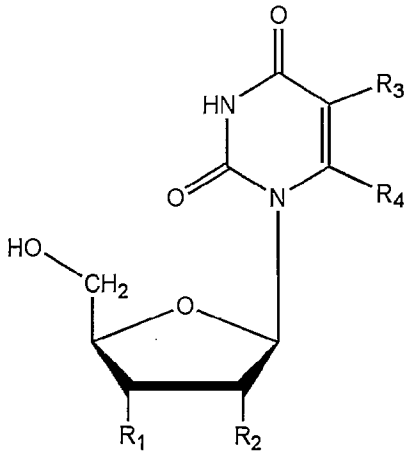


para obtener el compuesto de fórmula:

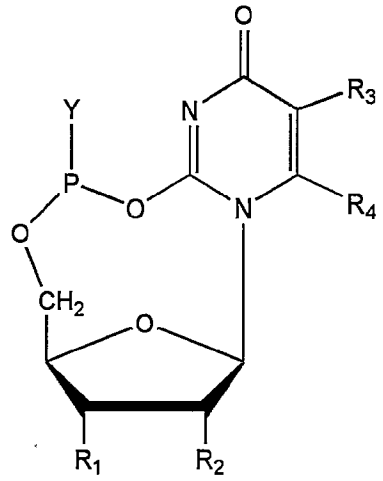
Y—H

donde M es H en la porfirina Y.

    b) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso a) con el nucleósido de fórmula

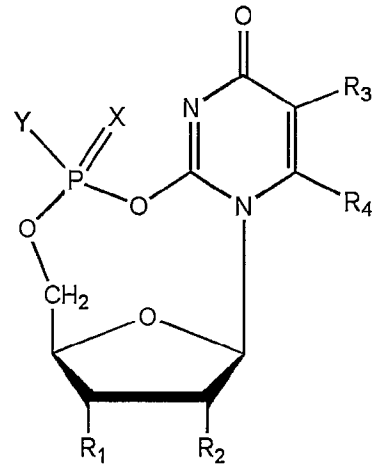


con un reactivo fosforilante de estructura $RY'P(X)Cl_2$ donde R es tetrafenilporfirina, y Y' es NH para obtener el compuesto de fórmula:



donde M es H en la porfirina Y.

c) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso b) con azufre elemental o hidroperóxido de terbutilo para obtener el compuesto de fórmula:



donde M es H en la porfirina Y.

d) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso c) con AcOM obteniéndose los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 44.

140. El método de la reivindicación 139 caracterizado porque X es S.

141. El método de la reivindicación 140 caracterizado porque R_3 es CH_3 y R_4 es H.

142. El método de la reivindicación 141 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3) y R_2 es H.

143. El método de la reivindicación 142 caracterizado porque M es H.

144. El método de la reivindicación 142 caracterizado porque M es Zn.

145. El método de la reivindicación 142 caracterizado porque M es Ni.

146. El método de la reivindicación 142 caracterizado porque M es Cu.

147. El método de la reivindicación 141 caracterizado porque R_1 es O-isopropilideno y R_2 es O-isopropilideno.

148. El método de la reivindicación 147 caracterizado porque M es H.

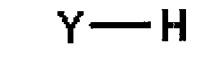
149. El método de la reivindicación 147 caracterizado porque M es Zn.

150. El método de la reivindicación 147 caracterizado porque M es Ni.

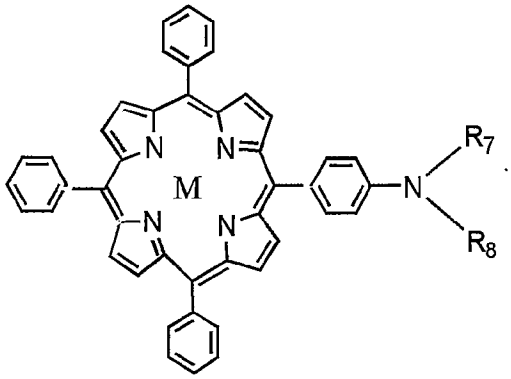
151. El método de la reivindicación 147 caracterizado porque M es Cu.

152. Un método para la obtención de las porfirinas de la reivindicación 82, caracterizado porque comprende los pasos de:

a) Hacer reaccionar con una solución metanólica saturada de AcOM, el compuesto de fórmula:



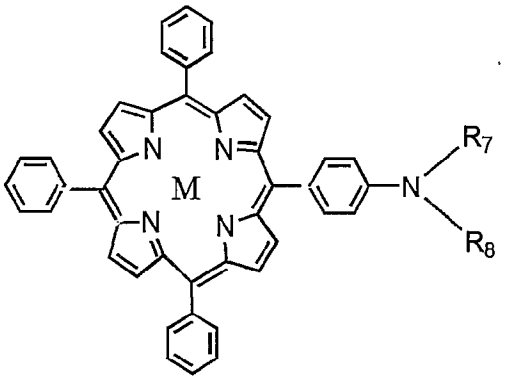
donde M es H en la porfirina Y, para obtener el compuesto de fórmula:



donde R_7 es H y

M es Zn, Ni, Cu ó Co.

b) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso a) con $BrCH_2COBr$ para obtener el compuesto de fórmula:



donde R_7 es $-CO-CH_2-Br$, y

M es Zn, Ni, Cu ó Co.

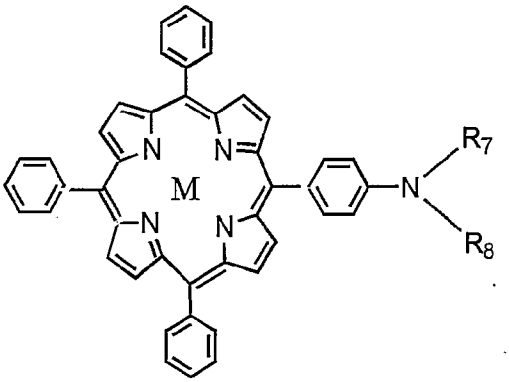
obteniéndose las porfirinas de la reivindicación 82.

153. Un método para la obtención de las porfirinas de la reivindicación 82, caracterizado porque comprende los pasos de:

a) Hacer reaccionar con $BrCH_2COBr$, el compuesto de fórmula:

Y—H

para obtener el compuesto de fórmula:



donde R_7 es $-CO-CH_2-Br$, y

M es H.

b) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso a) con una solución metanólica saturada de AcOM obteniéndose las porfirinas de la reivindicación 82.

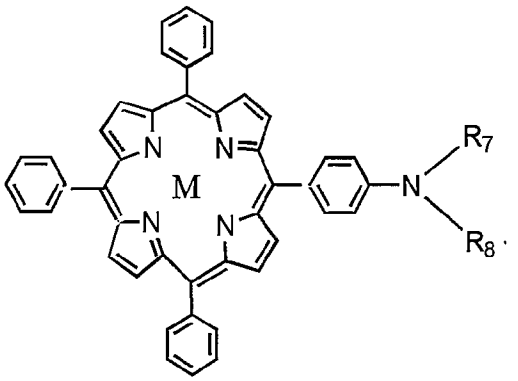
154. El método de la reivindicación 152 a 153 caracterizado porque R_8 es H.

155. El método de la reivindicación 154, caracterizado porque R_7 es H

156. El método de la reivindicación 155 caracterizado porque M es H.

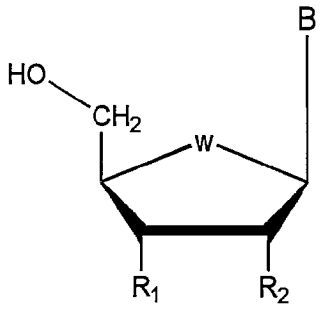
157. El método de la reivindicación 155 caracterizado porque M es Zn.
158. El método de la reivindicación 155 caracterizado porque M es Ni.
159. El método de la reivindicación 155 caracterizado porque M es Cu.
160. El método de la reivindicación 155 caracterizado porque M es Co.
161. El método de la reivindicación 154, caracterizado porque R_7 es $CO\text{-}CH_2\text{-}Br$.
162. El método de la reivindicación 161 caracterizado porque M es H.
163. El método de la reivindicación 161 caracterizado porque M es Zn.
164. El método de la reivindicación 161 caracterizado porque M es Ni.
165. El método de la reivindicación 161 caracterizado porque M es Cu.
166. El método de la reivindicación 161 caracterizado porque M es Co.
167. Un método para la obtención de los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 61, caracterizado porque comprende los pasos de:

a) Hacer reaccionar la porfirina de fórmula:

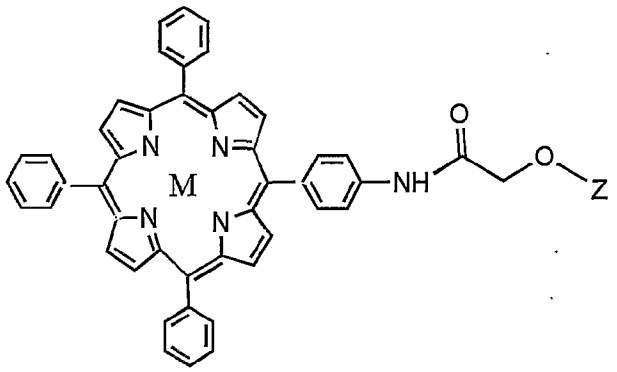


donde R_7 es $-CO\text{-}CH_2\text{-}Br$, y M es H.

con un nucleósido de fórmula:



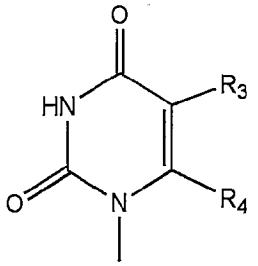
para obtener el compuesto de fórmula:



donde M es H.

b) Hacer reaccionar el compuesto obtenido en el inciso a) con AcOM obteniéndose los porfirinil-nucleótidos de la reivindicación 61.

168. El método de la reivindicación 167 caracterizado porque B es una pirimidina de fórmula:



donde R_3 es H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7,ó $(CH_3)_2CH$, y
R_4 es H ó SC_6H_5,

169. El método de la reivindicación 168 caracterizado porque w es O.

170. El método de la reivindicación 169 caracterizado porque R_1 es un grupo azida (N_3), R_2 es H, R_3 es CH_3, y R_4 es H.

171. El método de la reivindicación 170 caracterizado porque M es H.

172. El método de la reivindicación 168 caracterizado porque w es CH_2.

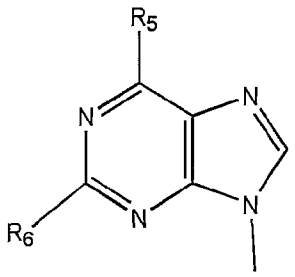
173. El método de la reivindicación 172 caracterizado porque R_1 es H y R_2 es OH.

174. El método de la reivindicación 173 caracterizado porque X es O.

175. El método de la reivindicación 173 caracterizado porque X es S.

176. El método de la reivindicación 174 a 175 caracterizado porque M es H.

177. El método de la reivindicación 167 caracterizado porque B es una purina de fórmula:



donde R_5 es NH_2, O, ó Cl, y

R_6 es H, ó NH_2.

178. El método de la reivindicación 177 caracterizado porque w es CH_2.

179. El método de la reivindicación 178 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es NH_2 y R_6 es H.

180. El método de la reivindicación 178 caracterizado porque R_1 es OH, R_2 es H, R_5 es Cl y R_6 es H.

181. El método de la reivindicación 179 a 180 caracterizado porque X es O.

182. El método de la reivindicación 179 a 180 caracterizado porque X es S.

183. El método de la reivindicación 181 a 182 caracterizado porque M es H.

Resumen.

La invención describe porfirinil-nucleótidos neutros como pro-drogas que permiten transportar de manera selectiva nucleósidos con actividad terapéutica a células tumorales ó infectadas por virus. Los porfirinil-nucleótidos contienen puentes de fosfato, fosforamidato o tiofosfato que permiten unir una o varias moléculas idénticas del análogo de nucleósido de interés o bien una combinación de distintas moléculas de nucleósidos. Así mismo la invención proporciona porfirinas novedosas con actividad antitumoral y/o antiviral que pueden utilizarse tanto en terapia fotodinámica por sí solas, o bien como acarreadores de análogos de nucleósidos para la formación de pro-drogas.

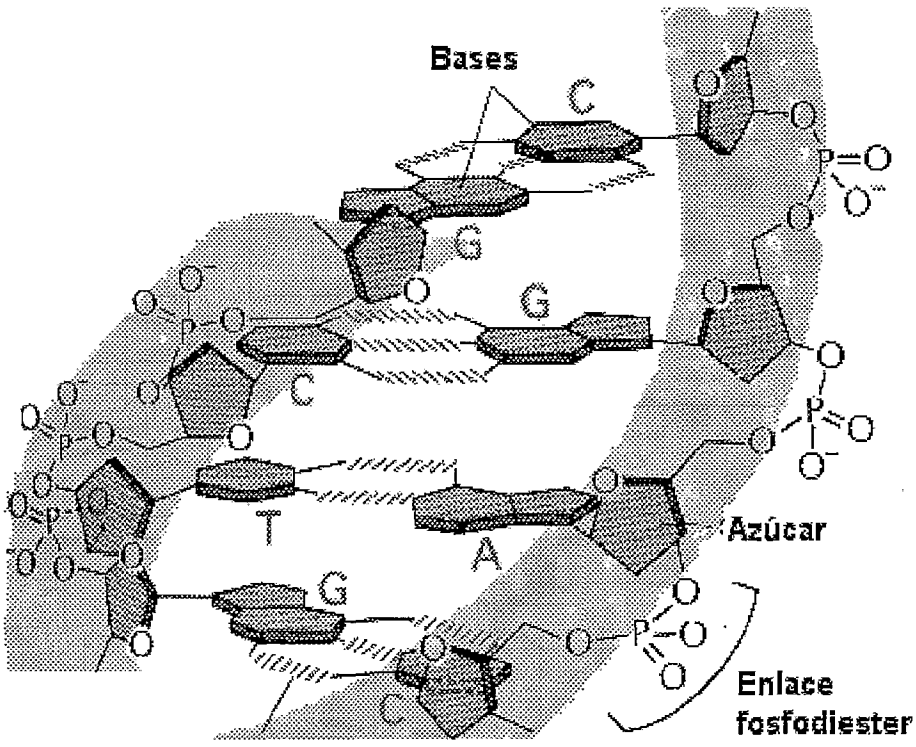
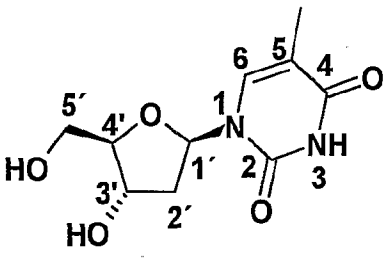
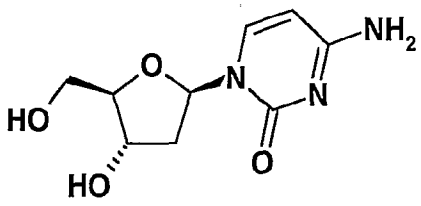


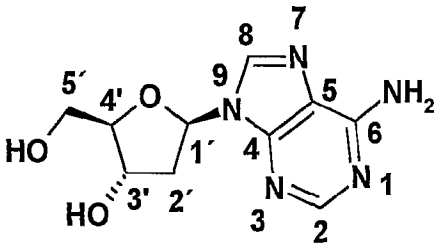
FIGURA 1



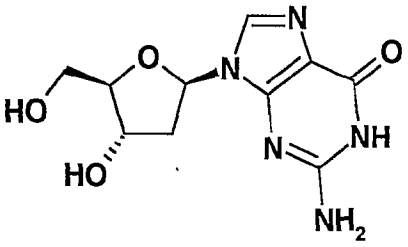
2´-desoxitimidina



2´-desoxicitidina



2´-desoxiadenosina



2´-desoxiguanosina

FIGURA 2

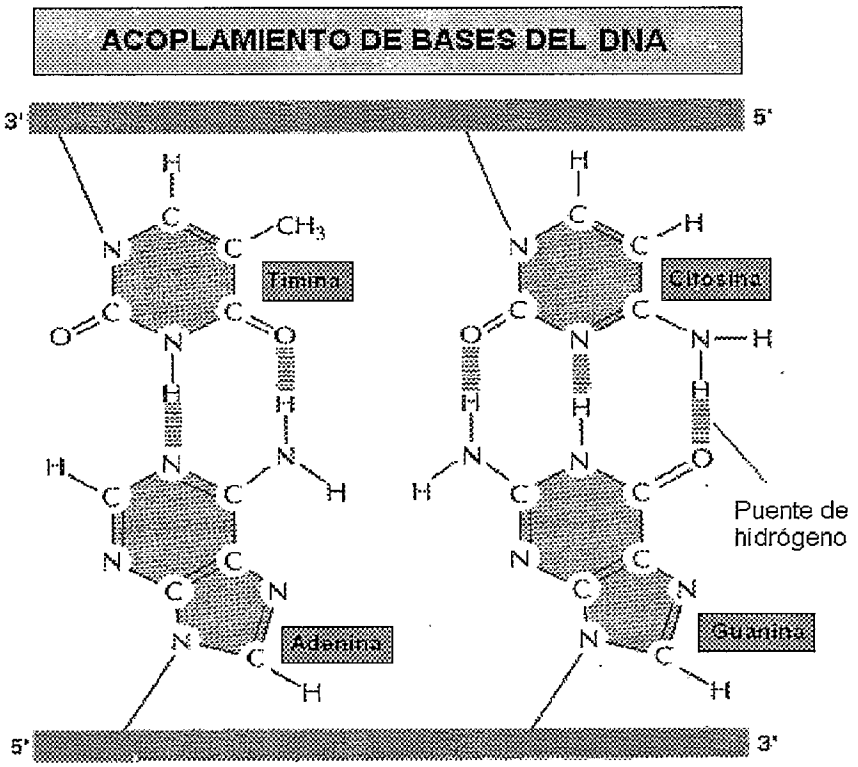


FIGURA 3

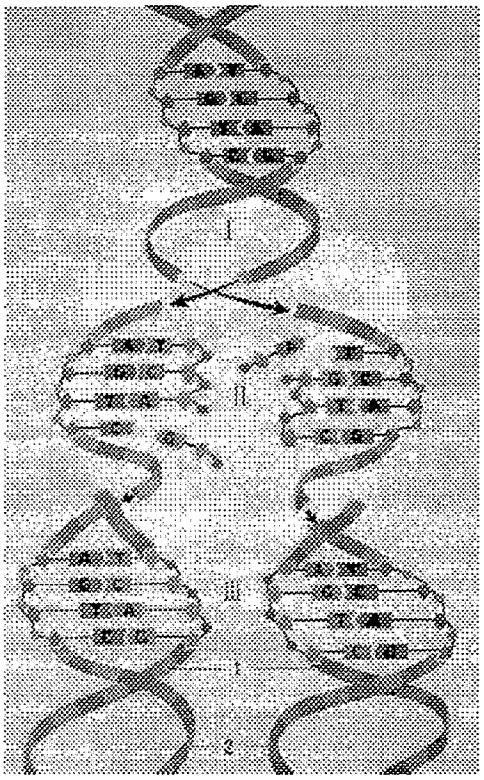


FIGURA 4

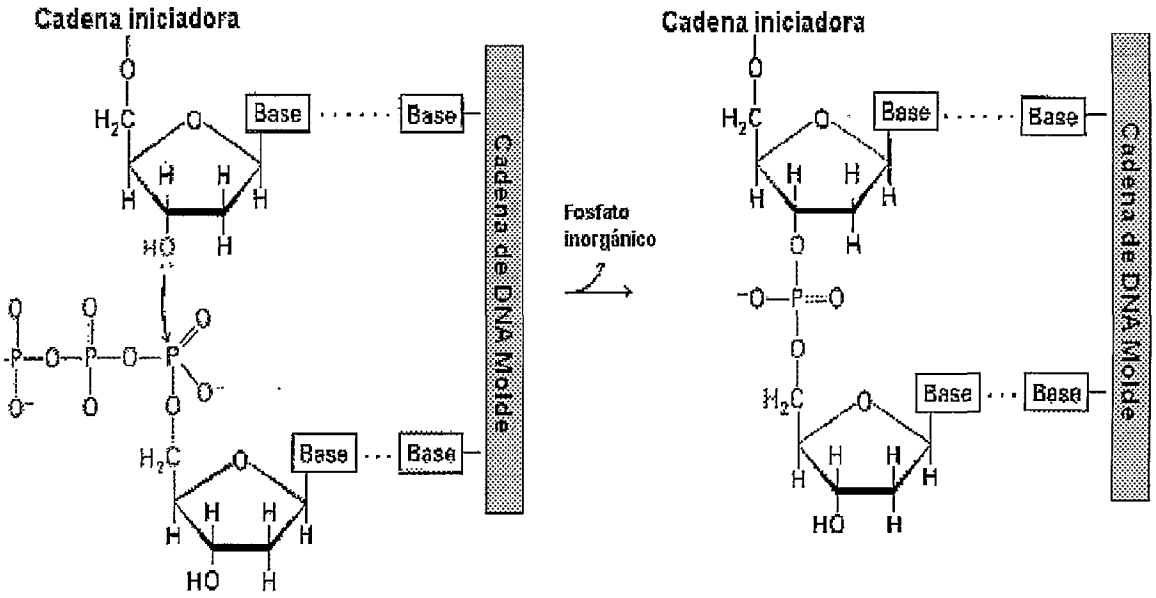


FIGURA 5

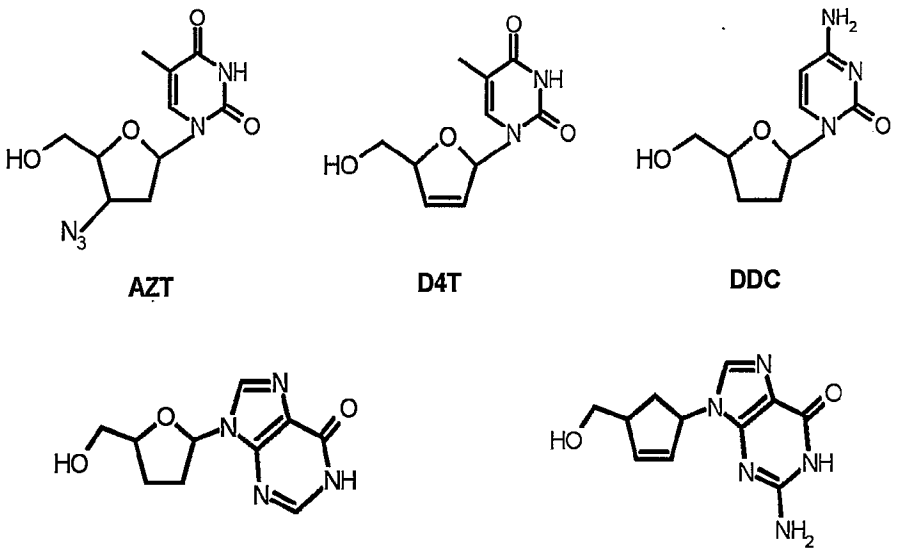


FIGURA 6

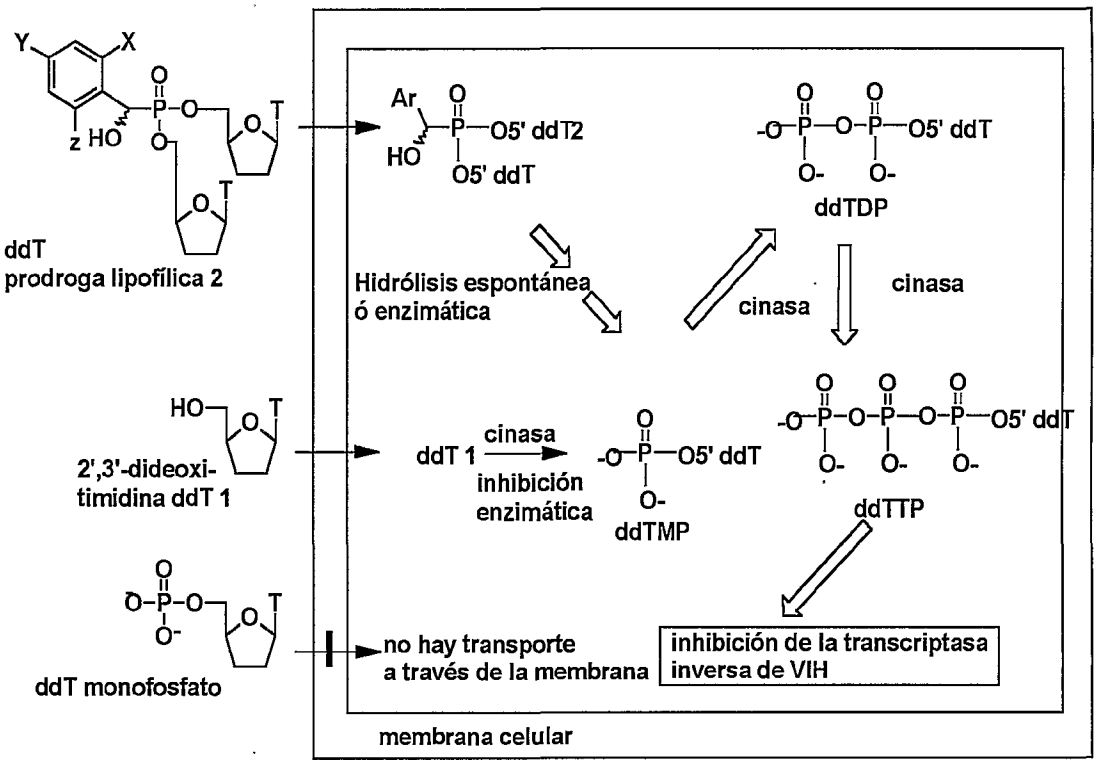
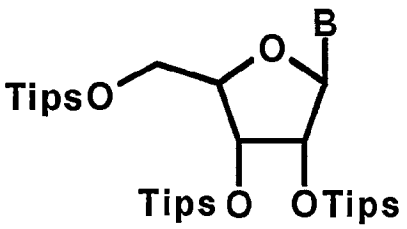
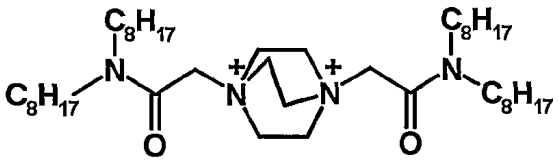


FIGURA 7

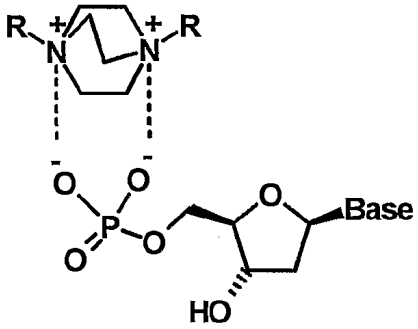


(A-Tips) B= Adenina
(U-Tips) B= Uracilo
(C-Tips) B= Citosina
(G-Tips) B= Guanosina

FIGURA 8



(A)



(B)

FIGURA 9

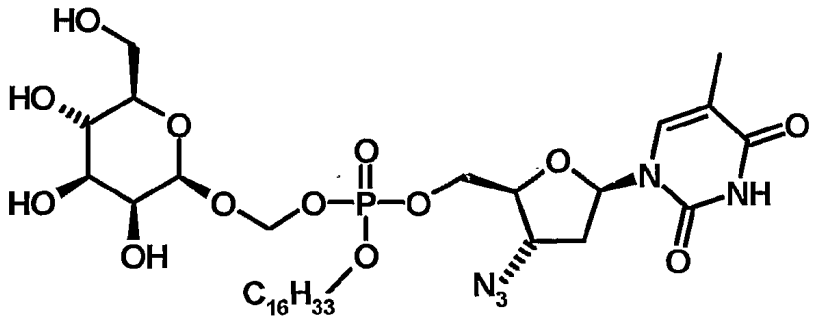


FIGURA 10

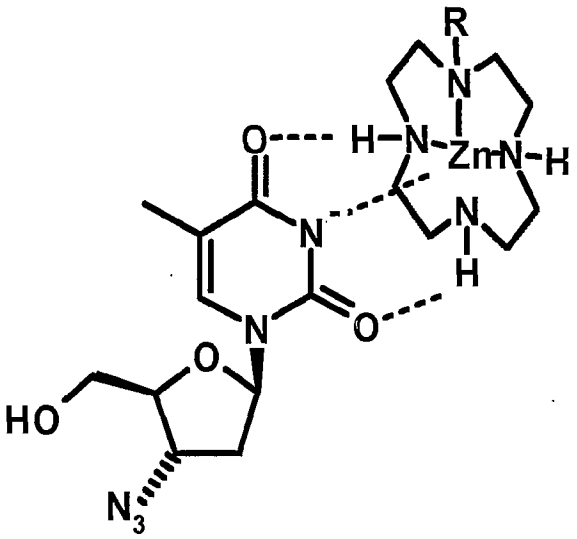


FIGURA 11

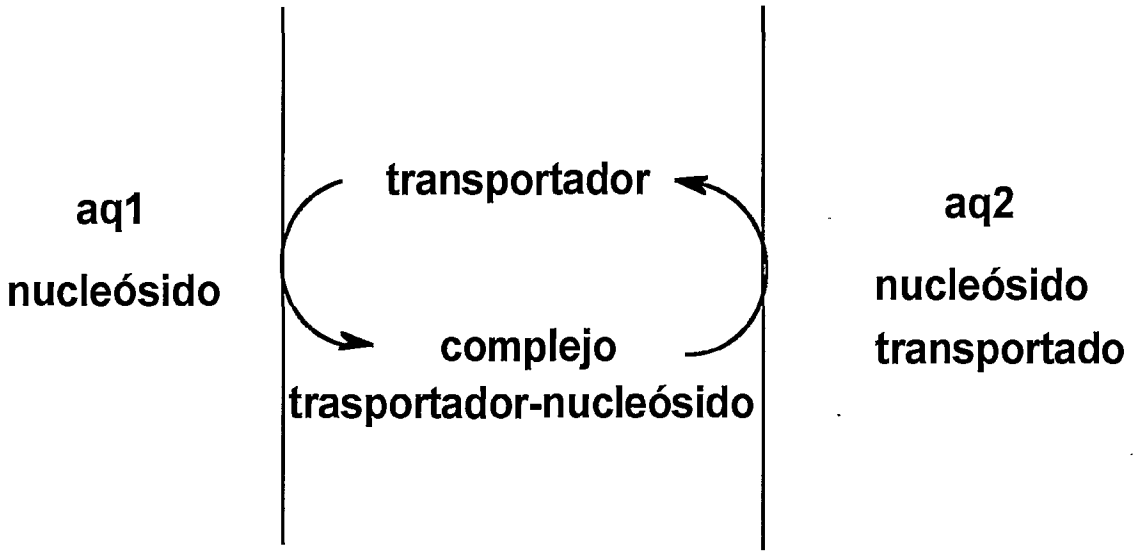
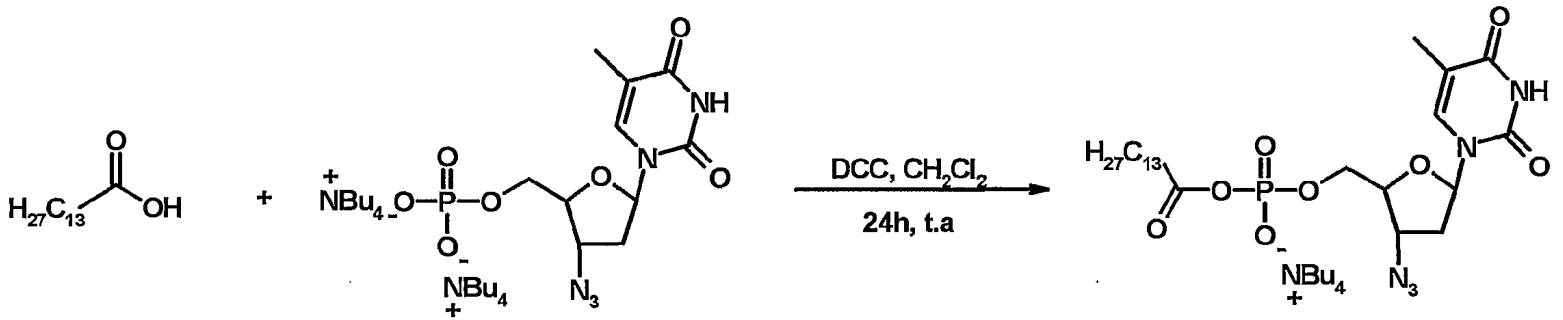
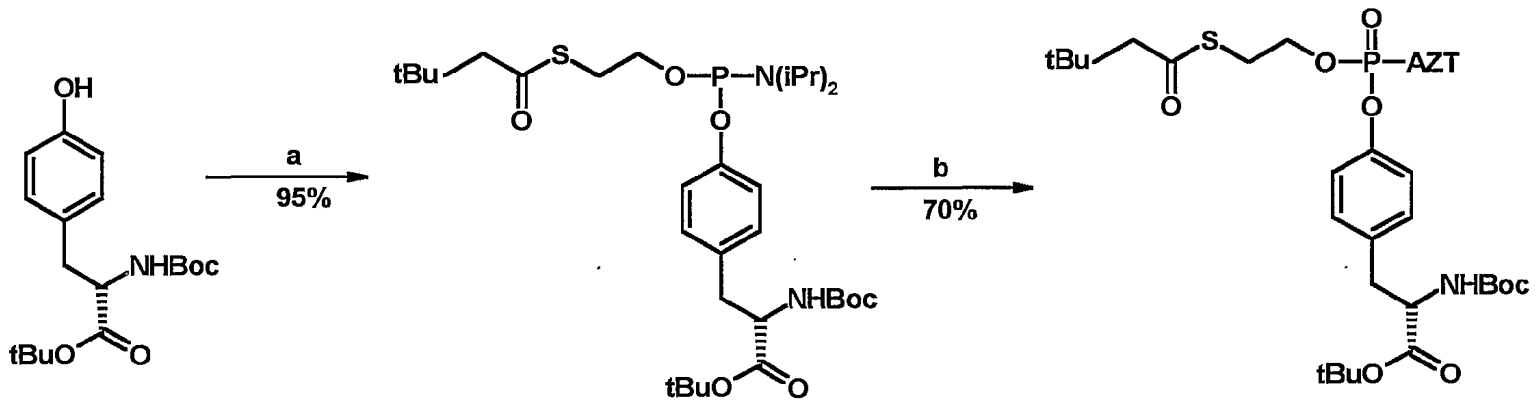


FIGURA 12



30 31

FIGURA 13



32 33 34

FIGURA 14

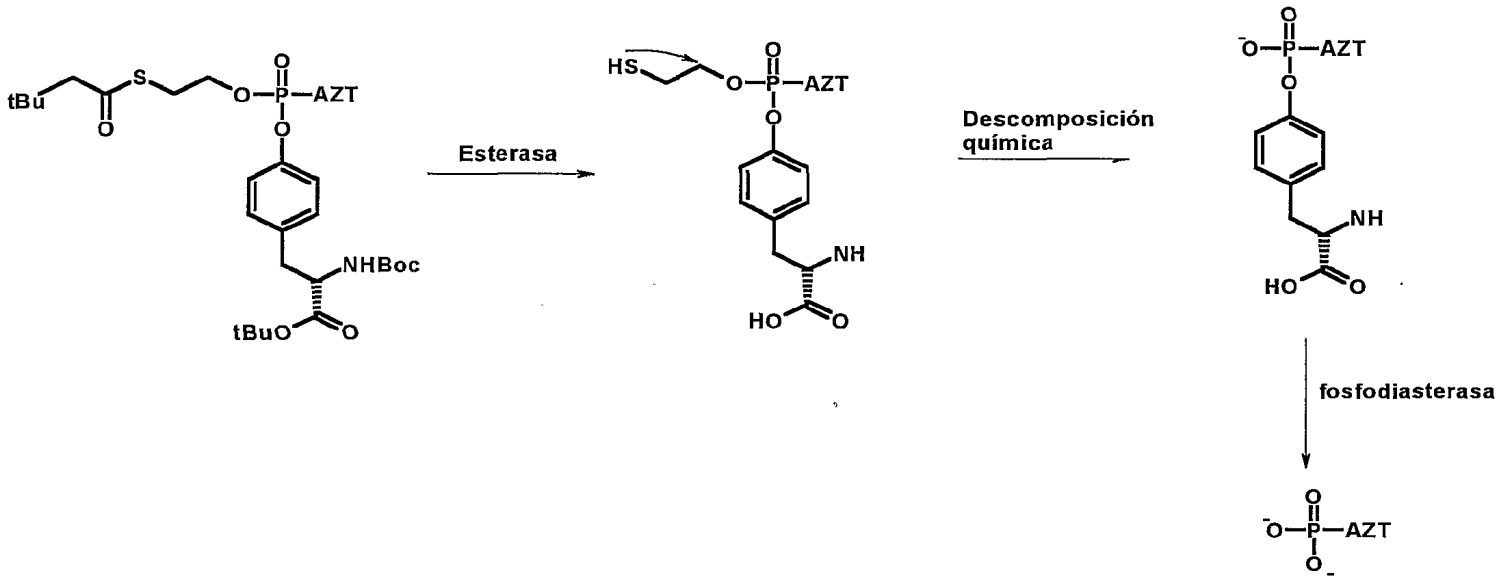
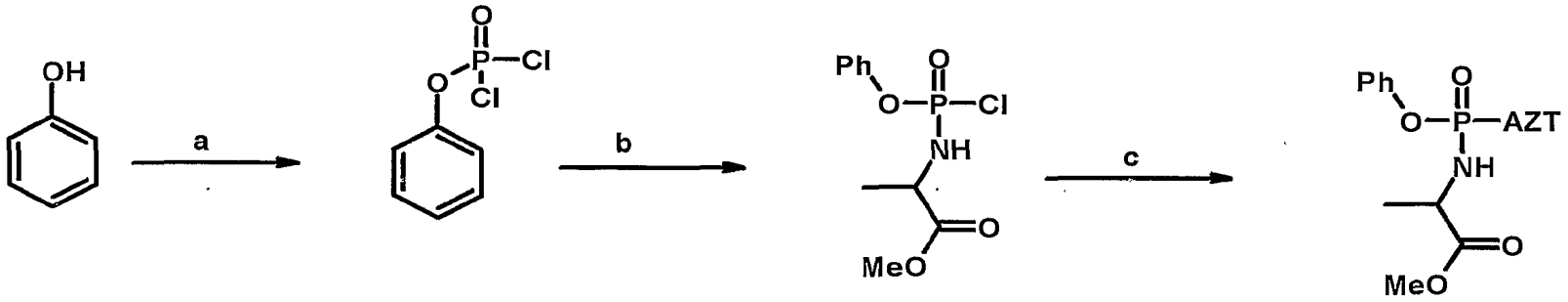


FIGURA 15



35 36 37

FIGURA 16

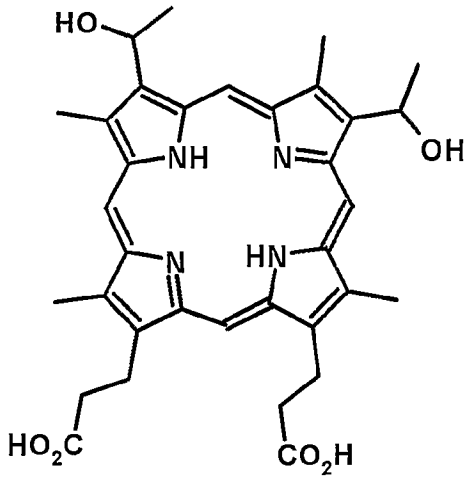


FIGURA 17

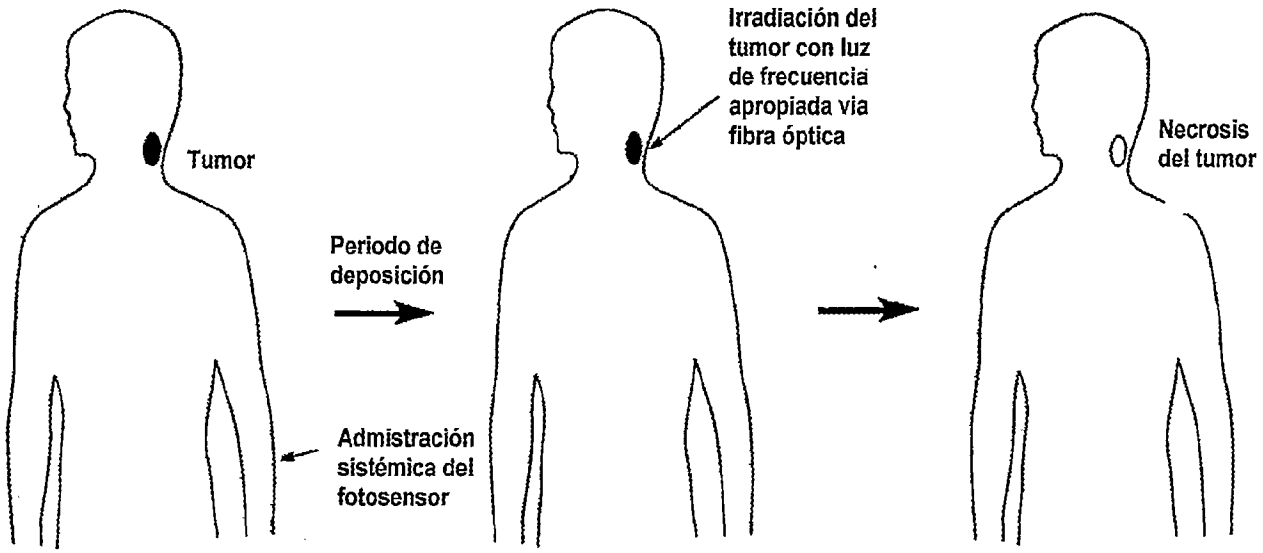


FIGURA 18

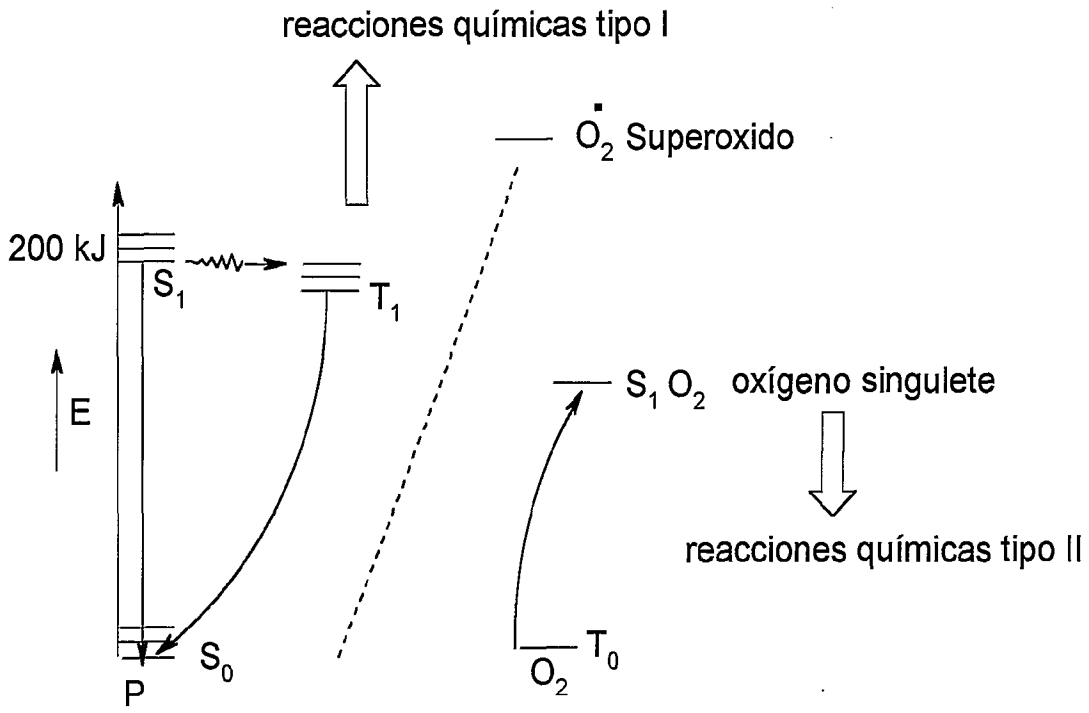


FIGURA 19

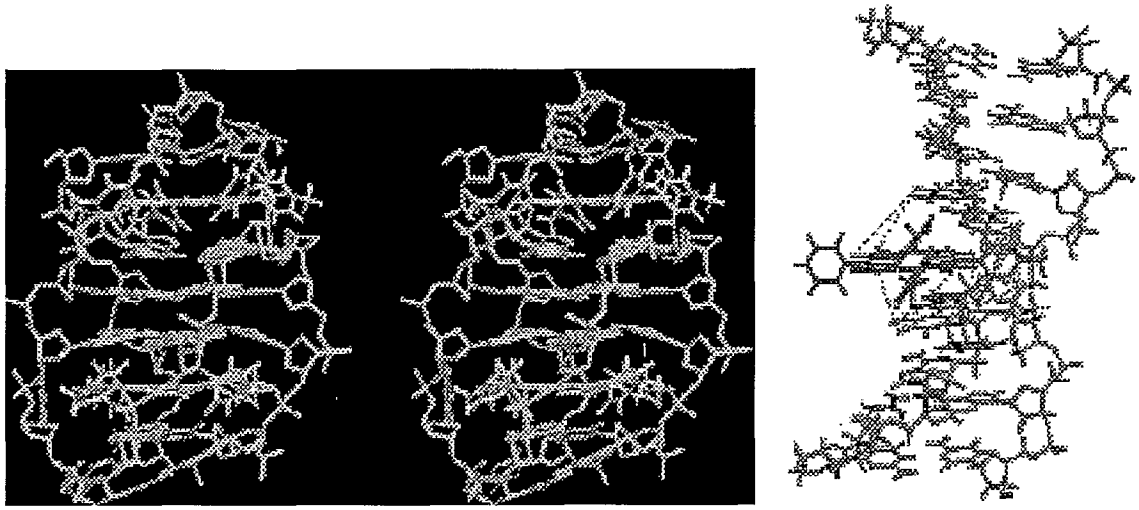


FIGURA 20

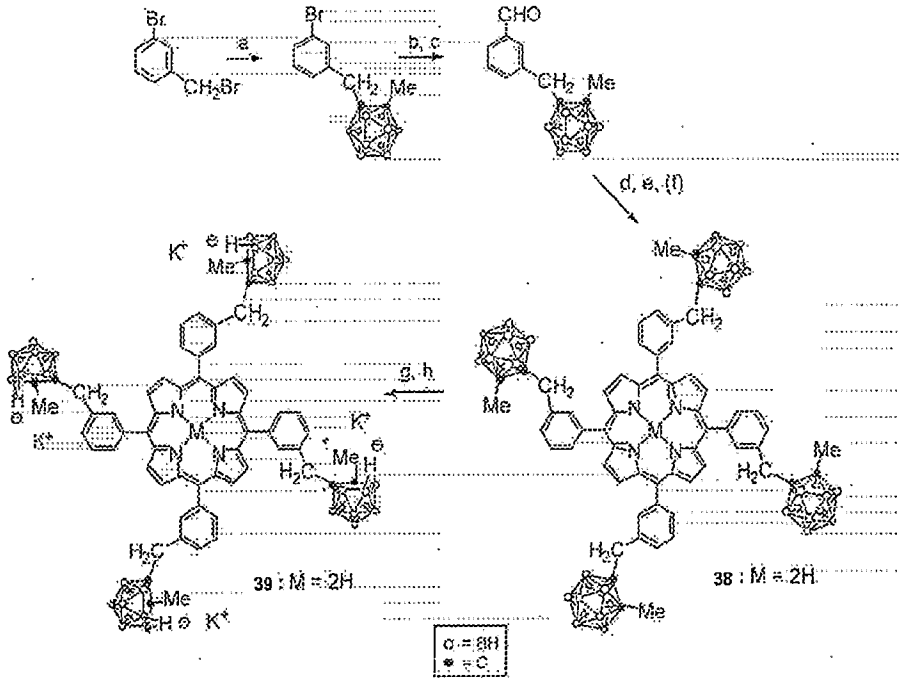
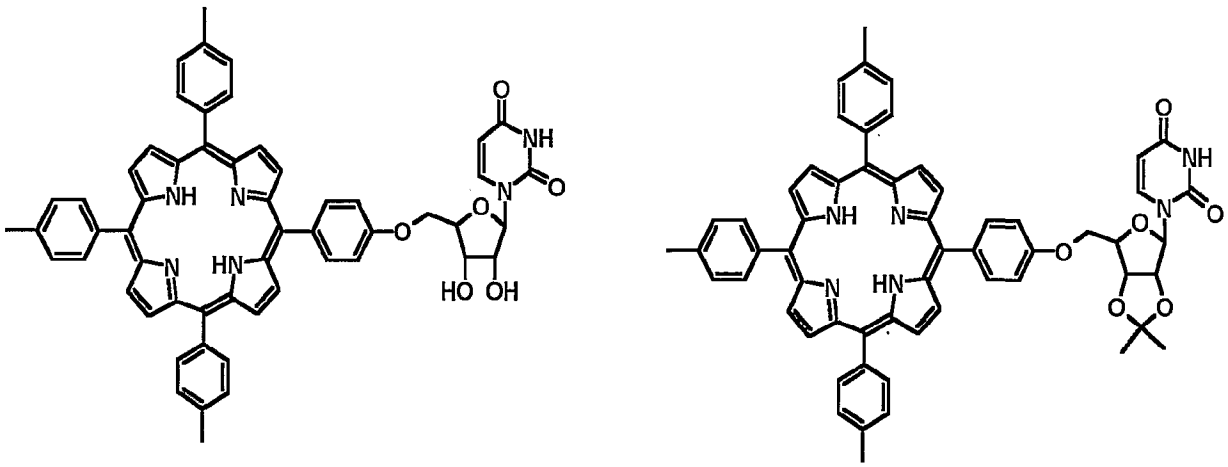


FIGURA 21



40

41

FIGURA 22

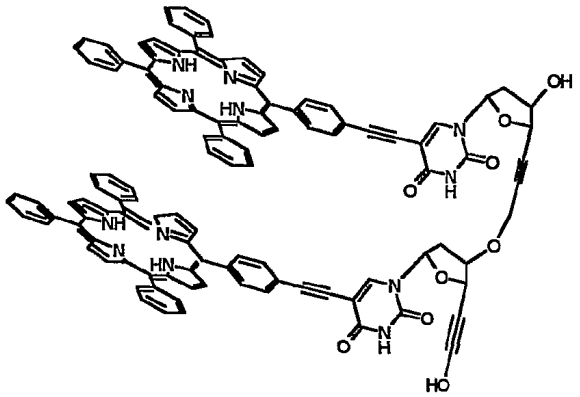
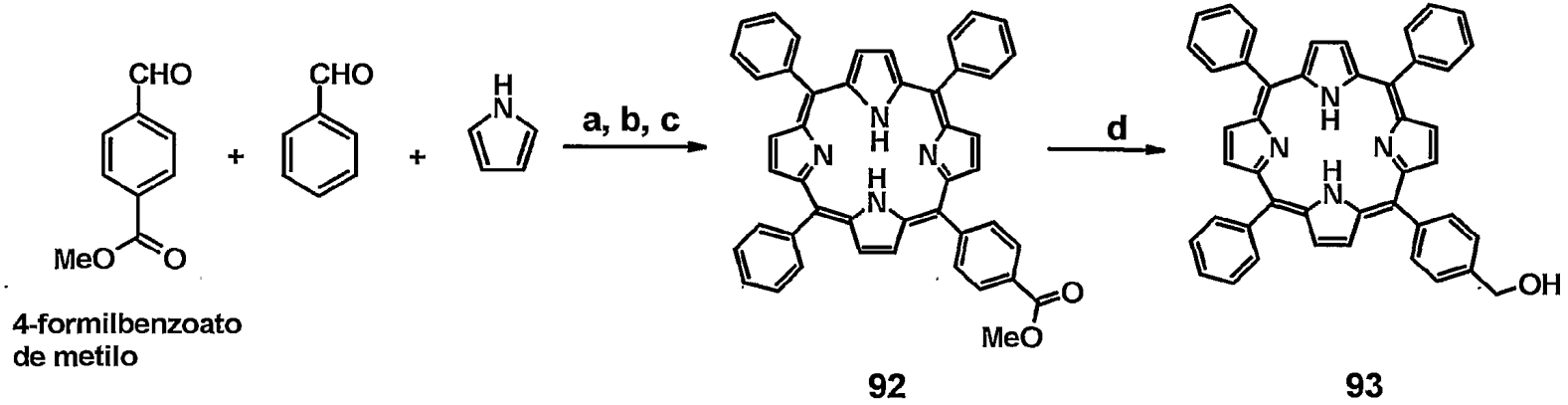


FIGURA 23

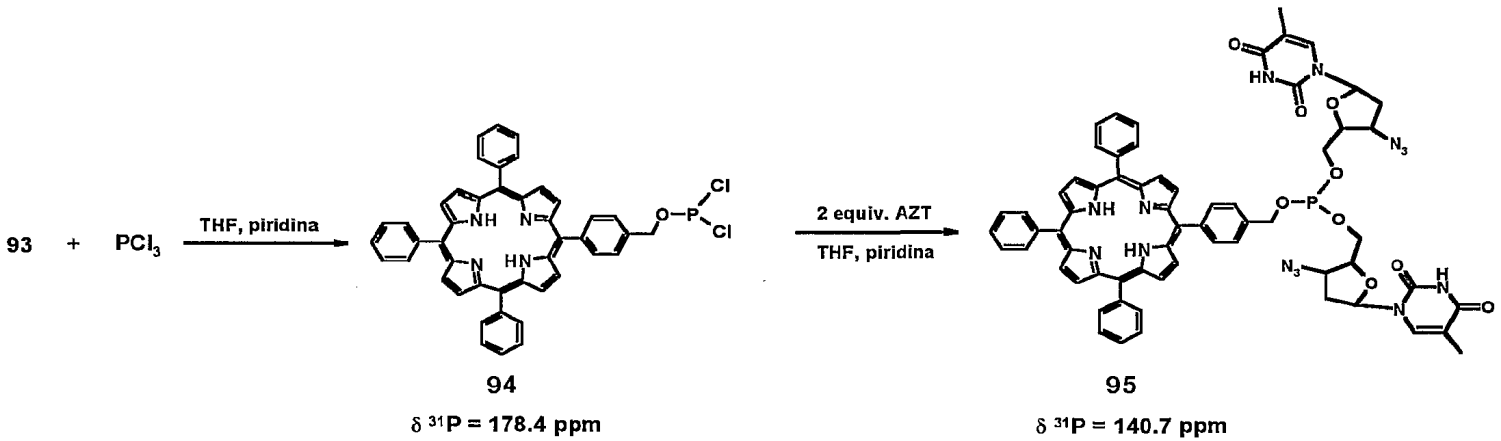


4-formilbenzoato de metilo

92

93

FIGURA 24

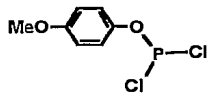


94

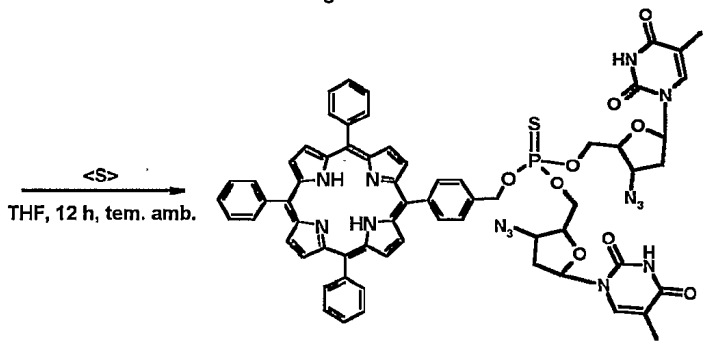
δ ^{31}P = 178.4 ppm

95

δ ^{31}P = 140.7 ppm



δ ^{31}P = 178 ppm
Rodriguez-Perez M. L[107a]

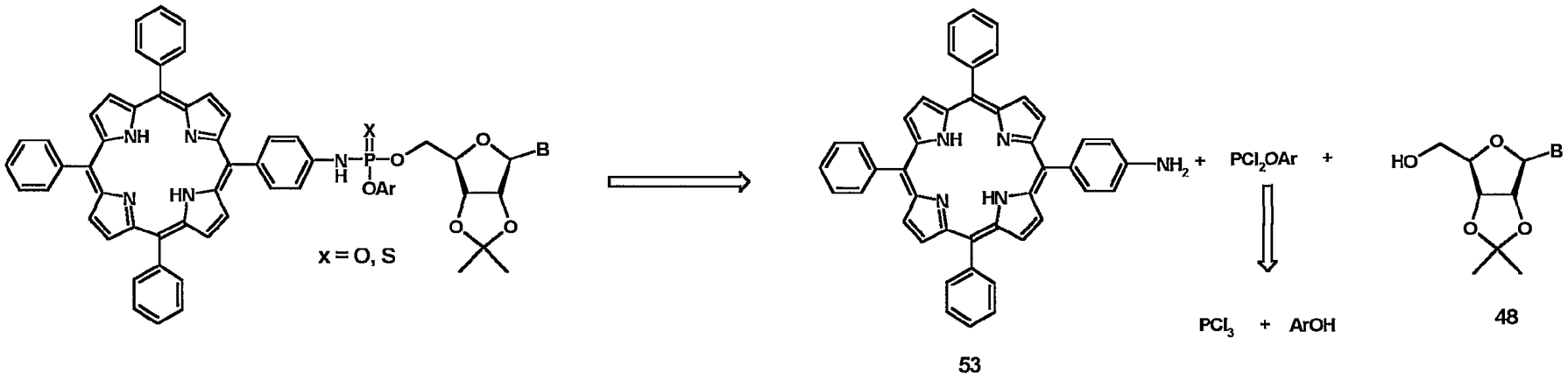


96

δ ^{31}P = 70.4 ppm

FIGURA 25

FIGURA 26



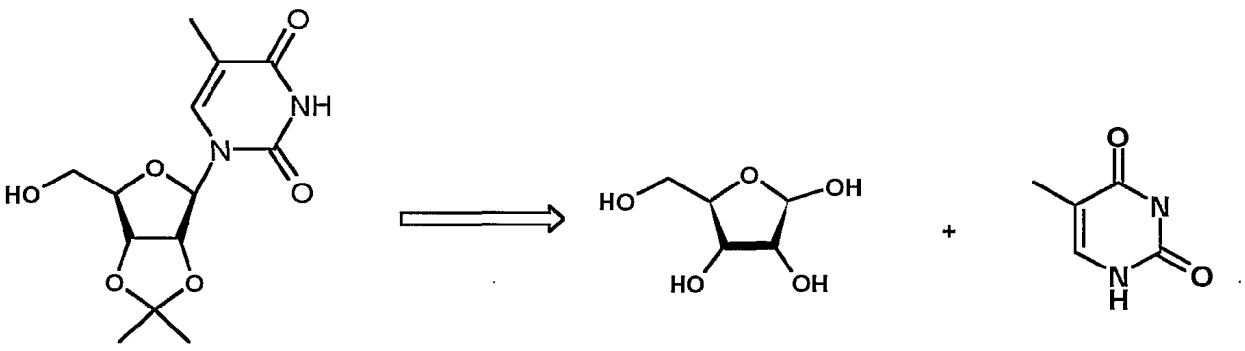


FIGURA 27

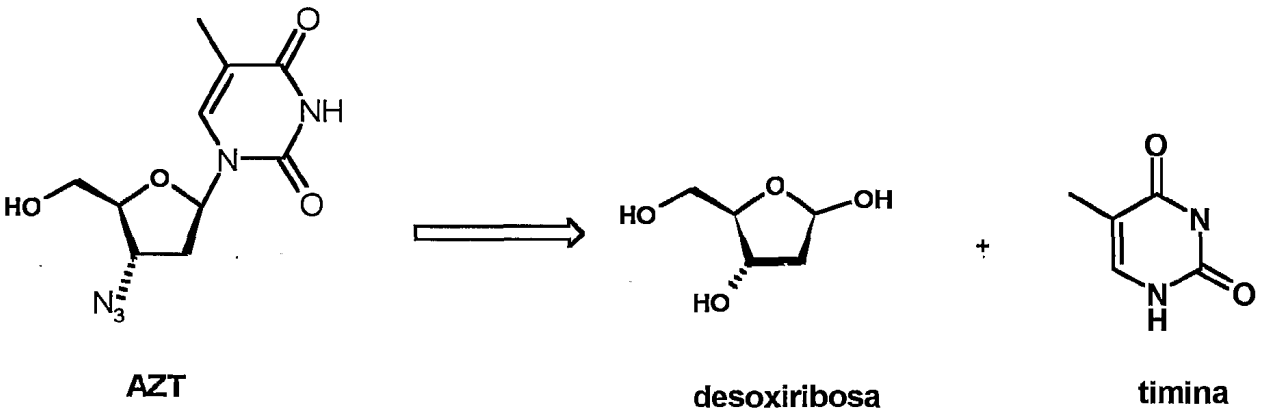
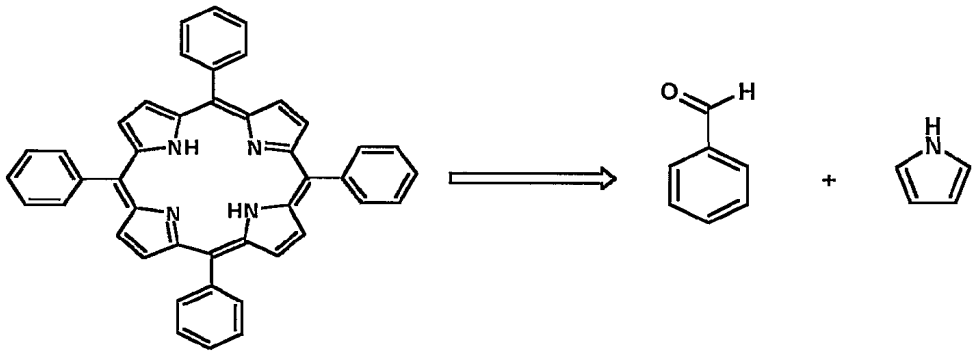
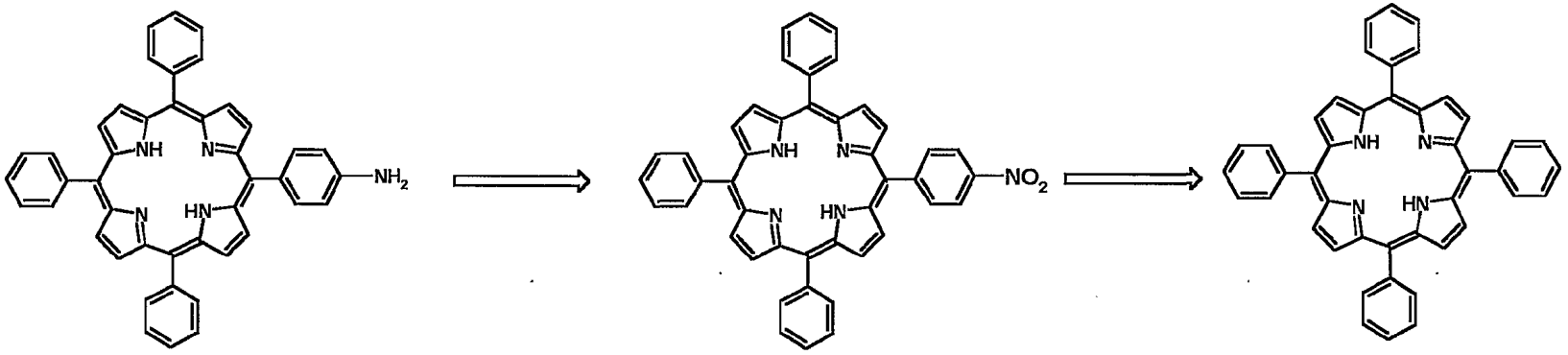


FIGURA 28



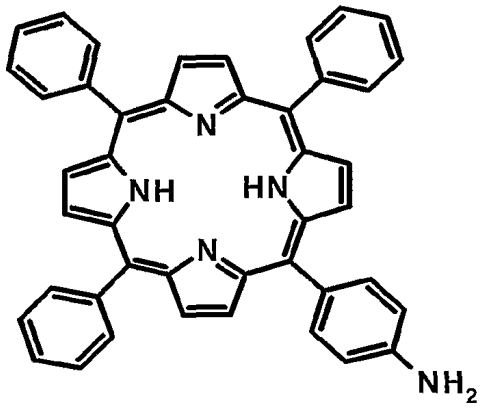
50

FIGURA 29



53 52 50

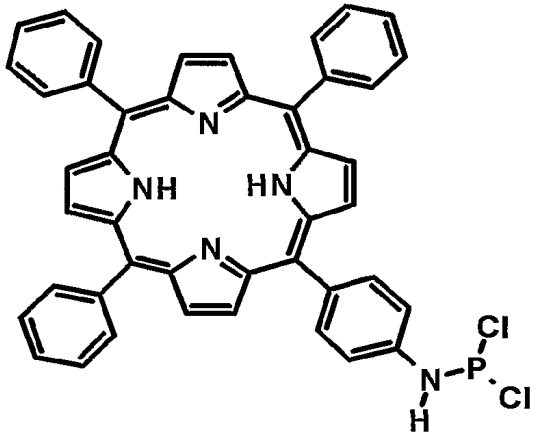
FIGURA 30



53

PCl_3, THF, Py

Tem. Amb.



63

$\delta\ ^{31}P = 151$ ppm

$^{2}J_{P\text{-}NH} = 25.7$ Hz

FIGURA 31

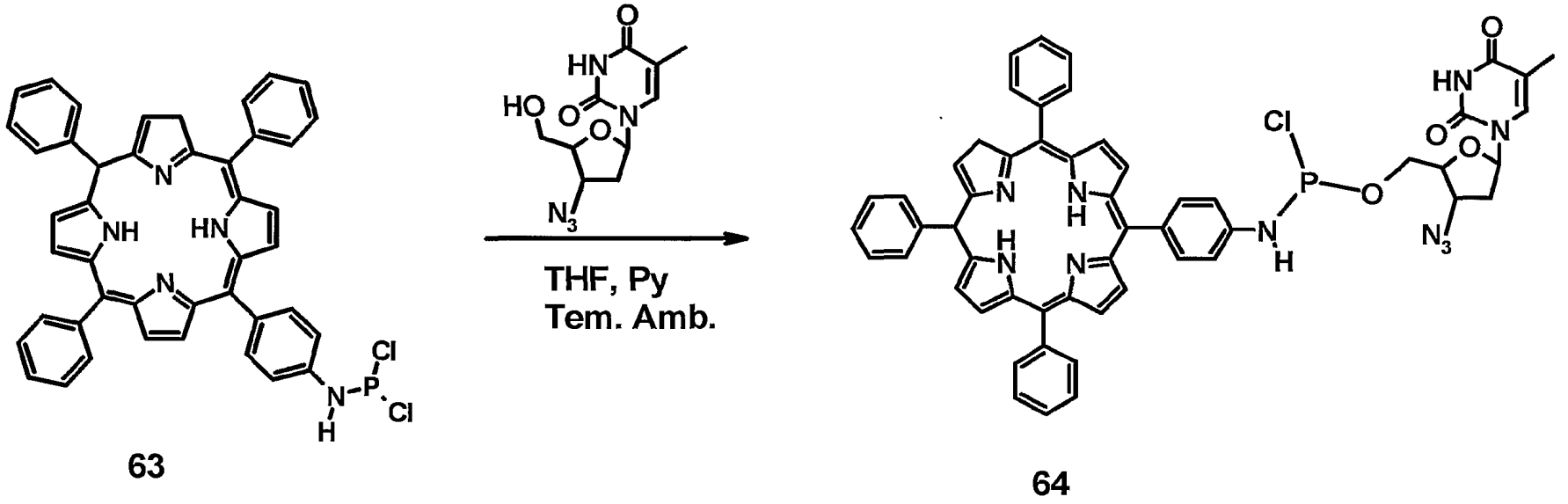
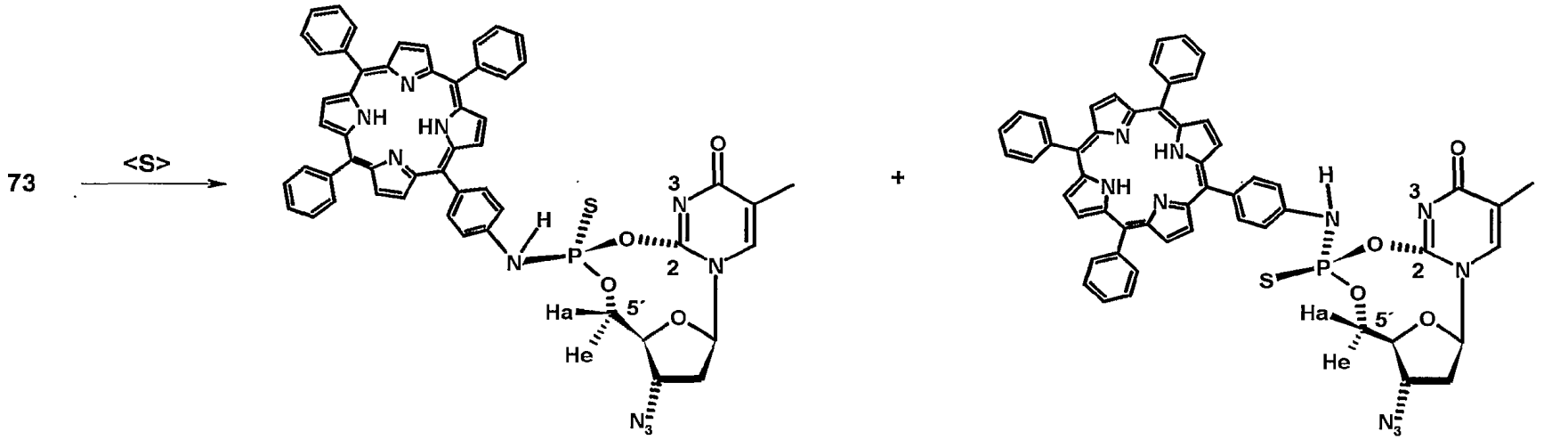


FIGURA 32



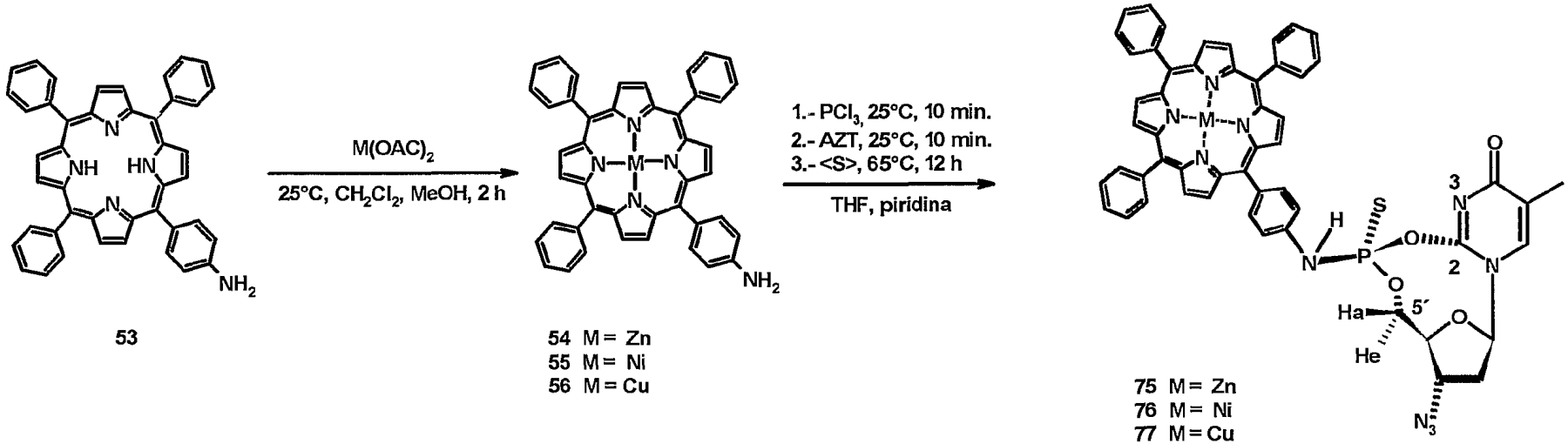
74a

δ ^{31}P= 69.77 ppm (mayoritario)
^{2}J =17.4 Hz
^{3}J = 7.4 Hz

74e

δ ^{31}P= 69.66 ppm (minoritario)

FIGURA 33



53

54 M = Zn
55 M = Ni
56 M = Cu

75 M = Zn
76 M = Ni
77 M = Cu

FIGURA 34

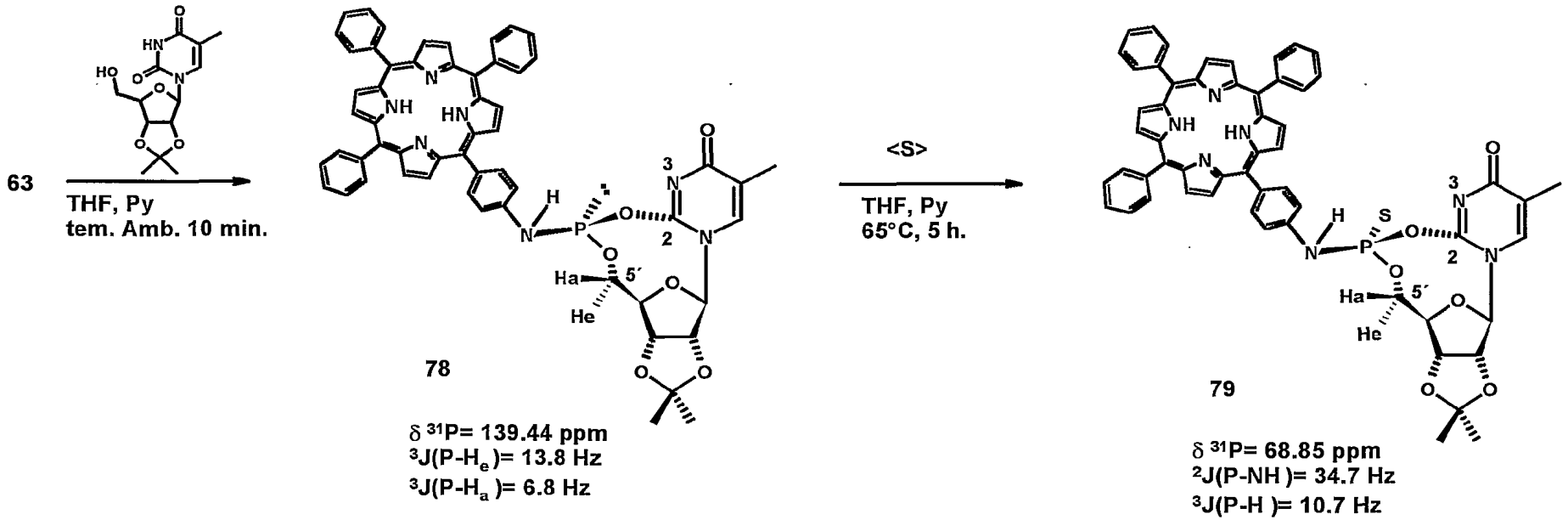

63
THF, Py
tem. Amb. 10 min.
78
δ 31P= 139.44 ppm
3J(P-He)= 13.8 Hz
3J(P-Ha)= 6.8 Hz
<S>
THF, Py
65°C, 5 h.
79
δ 31P= 68.85 ppm
2J(P-NH)= 34.7 Hz
3J(P-H)= 10.7 Hz

FIGURA 35

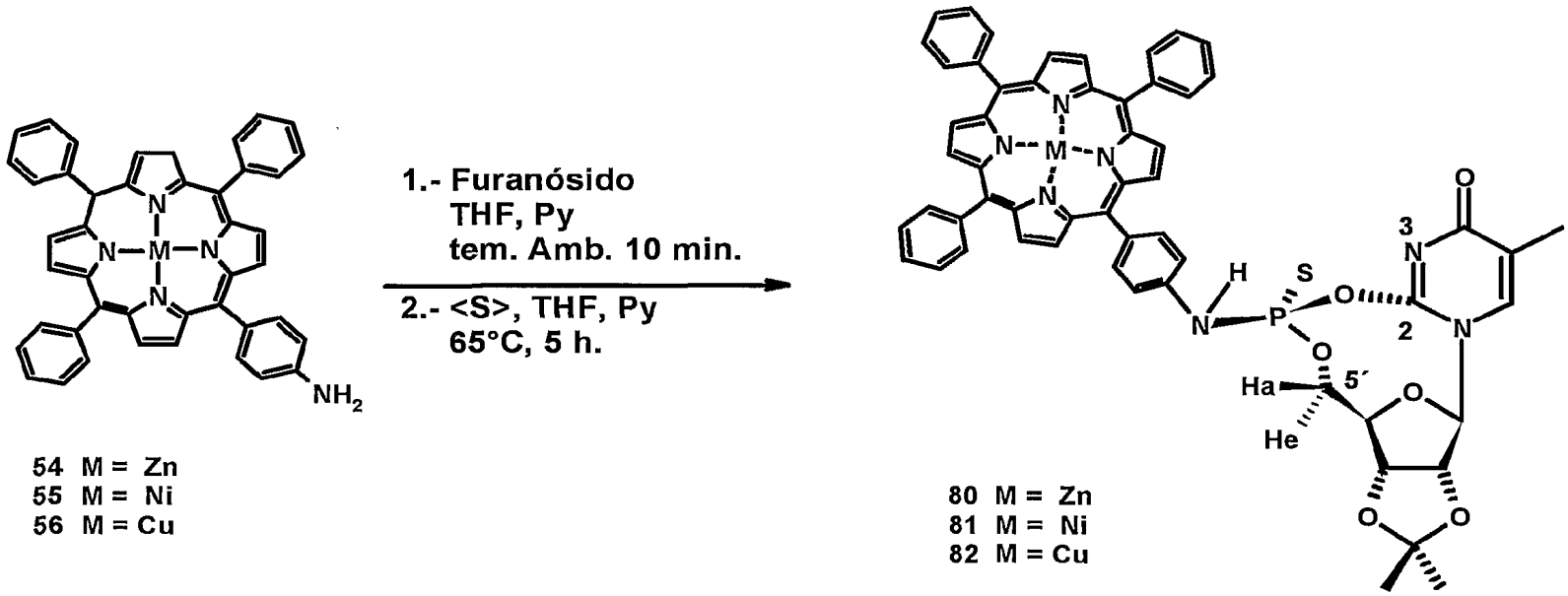
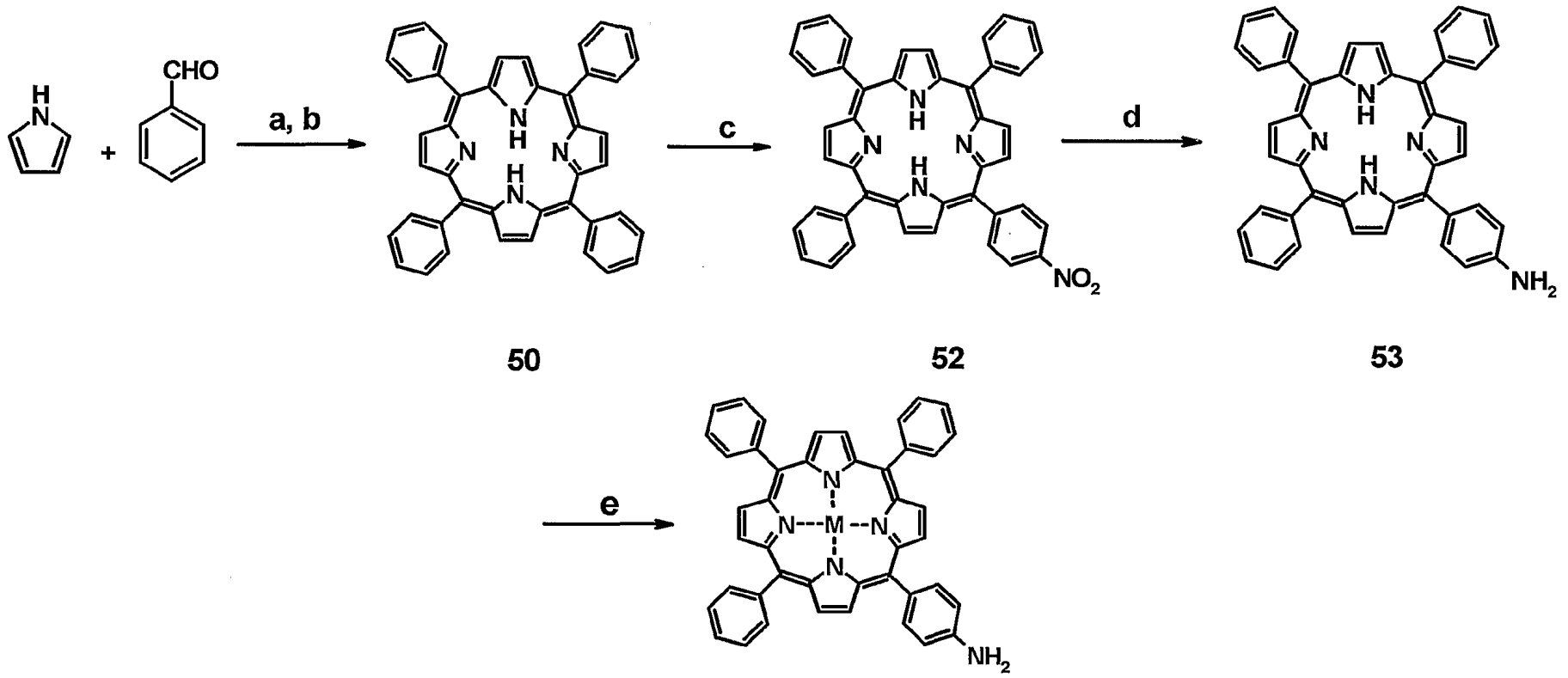

1.- Furanósido
THF, Py
tem. Amb. 10 min.
2.- <S>, THF, Py
65°C, 5 h.
NH2
54 M = Zn
55 M = Ni
56 M = Cu
80 M = Zn
81 M = Ni
82 M = Cu
Ha
He
5´

FIGURA 36



50 52 53

14

54 M= Zn
55 M= Ni
56 M= Cu

FIGURA 37

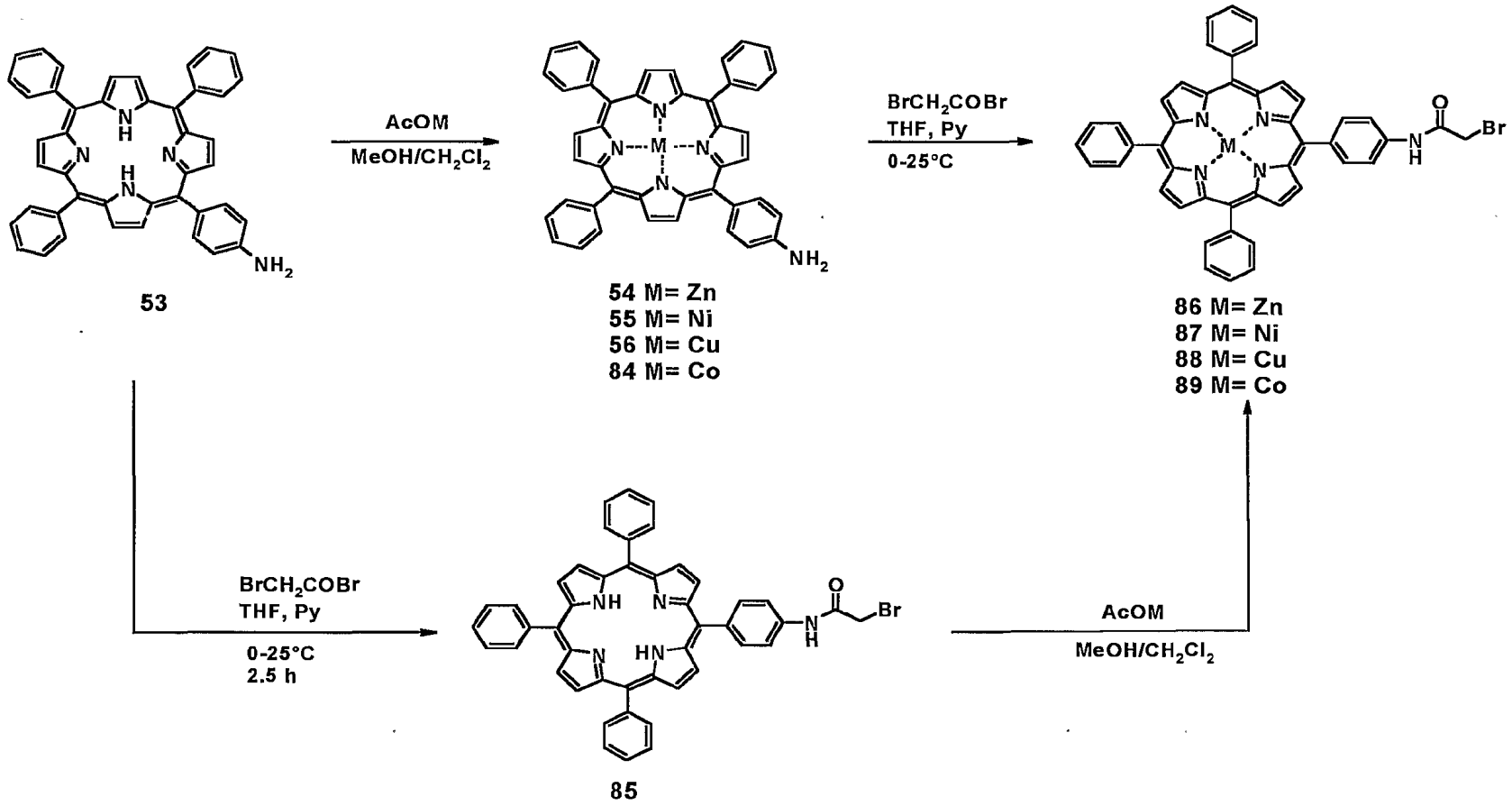
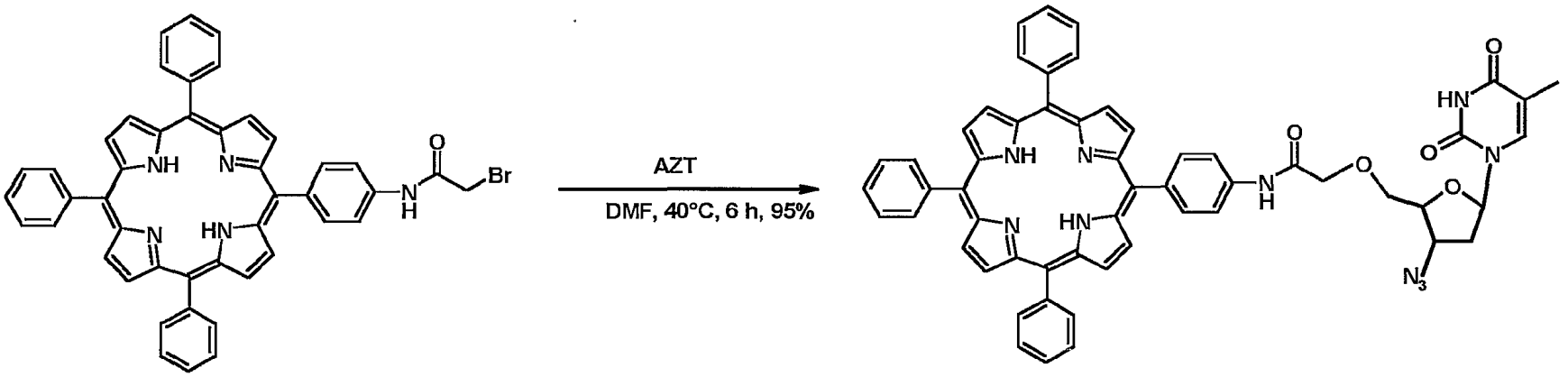

AcOM
MeOH/CH2Cl2
BrCH2COBr
THF, Py
0-25°C
53
54 M= Zn
55 M= Ni
56 M= Cu
84 M= Co
86 M= Zn
87 M= Ni
88 M= Cu
89 M= Co
BrCH2COBr
THF, Py
0-25°C
2.5 h
85
AcOM
MeOH/CH2Cl2

FIGURA 38



85 98

FIGURA 39

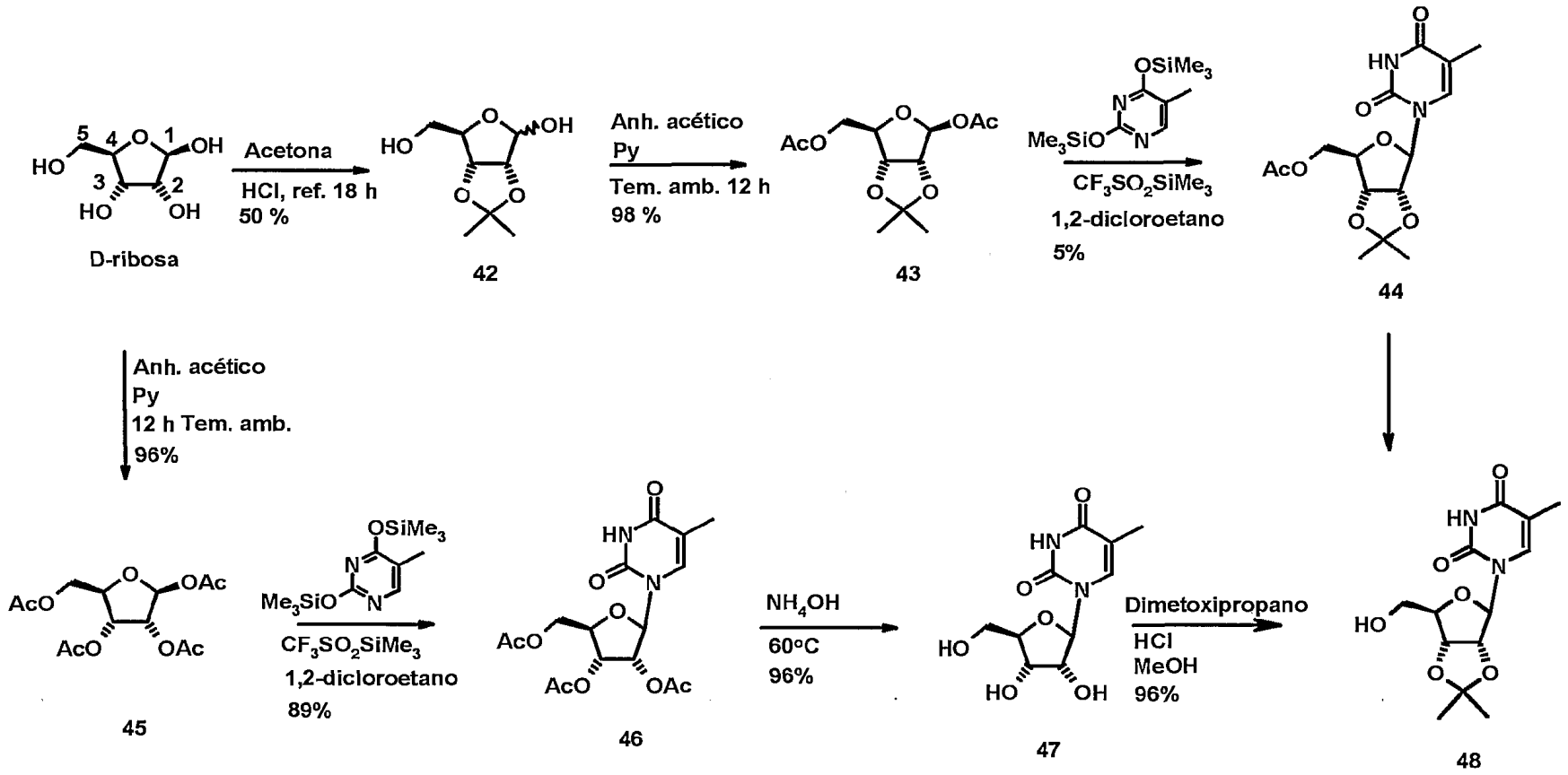
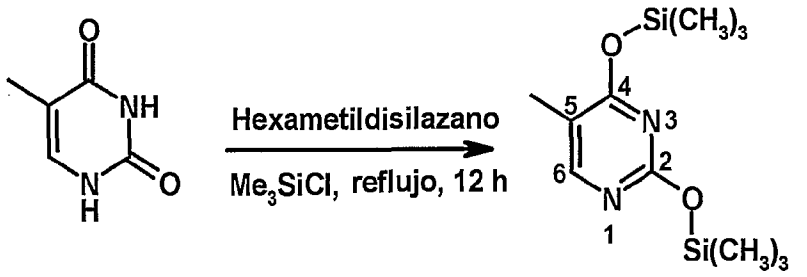

D-ribosa
Acetona
HCl, ref. 18 h
50 %
42
Anh. acético
Py
Tem. amb. 12 h
98 %
43
CF3SO2SiMe3
1,2-dicloroetano
5%
44
Anh. acético
Py
12 h Tem. amb.
96%
45
CF3SO2SiMe3
1,2-dicloroetano
89%
46
NH4OH
60°C
96%
47
Dimetoxipropano
HCl
MeOH
96%
48

FIGURA 40



Timina

Timina persililada

FIGURA 41

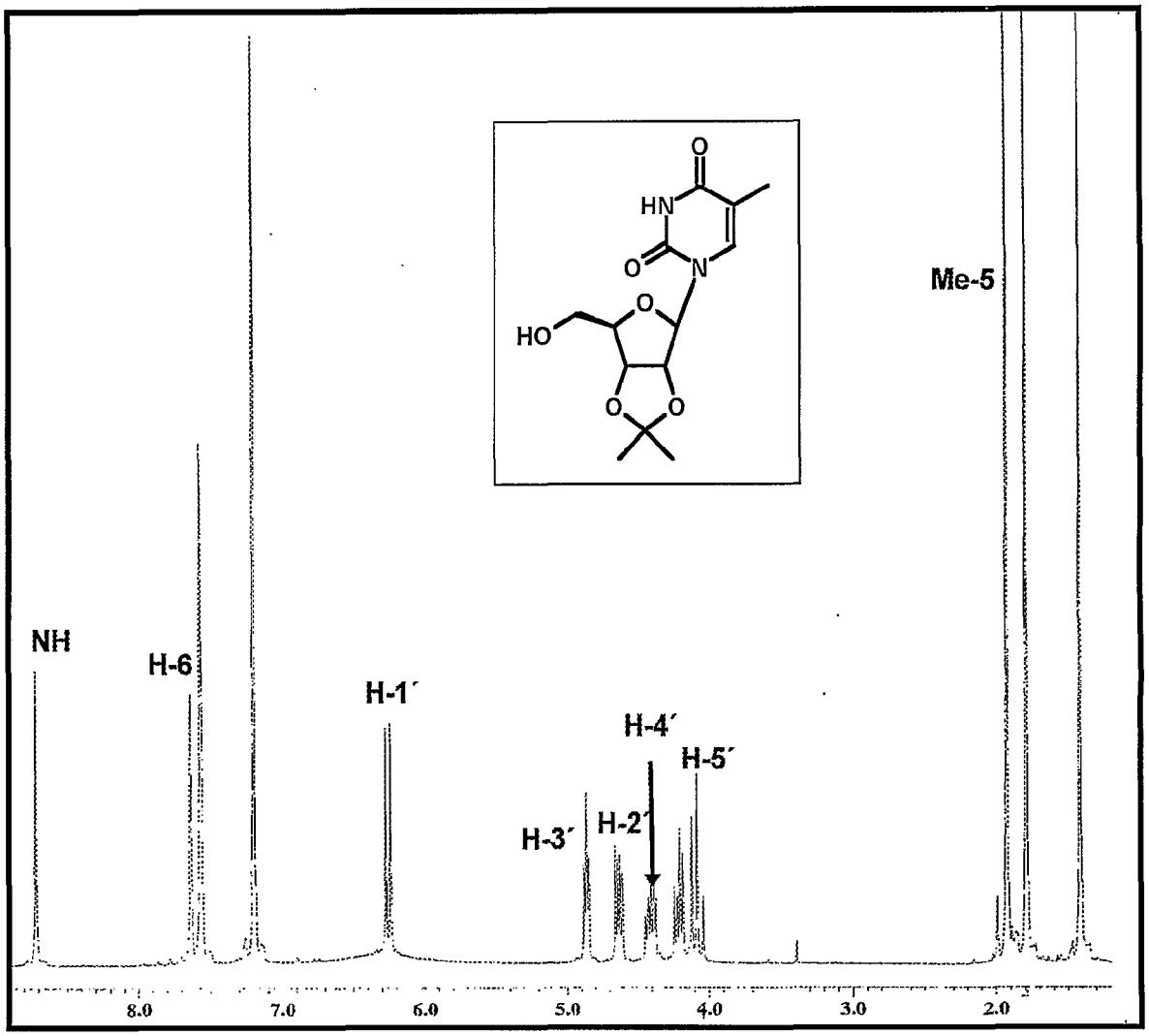


FIGURA 42

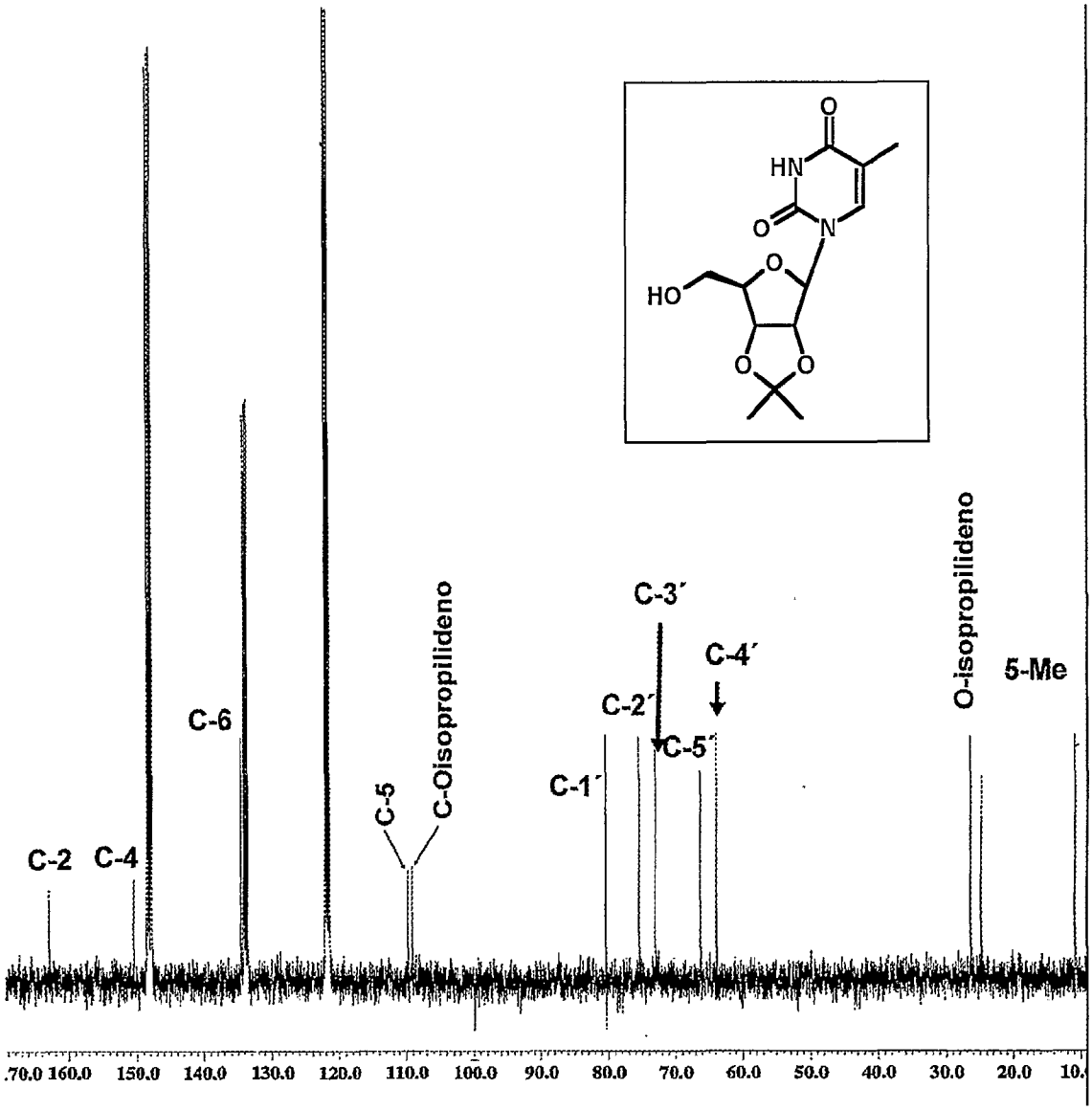

HN
O
O
N
O
HO
O
O
C-2
C-4
C-6
C-5
C-Oisopropilideno
C-1´
C-2´
C-3´
C-4´
C-5´
O-isopropilideno
5-Me
160.0
150.0
140.0
130.0
120.0
110.0
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0

FIGURA 43

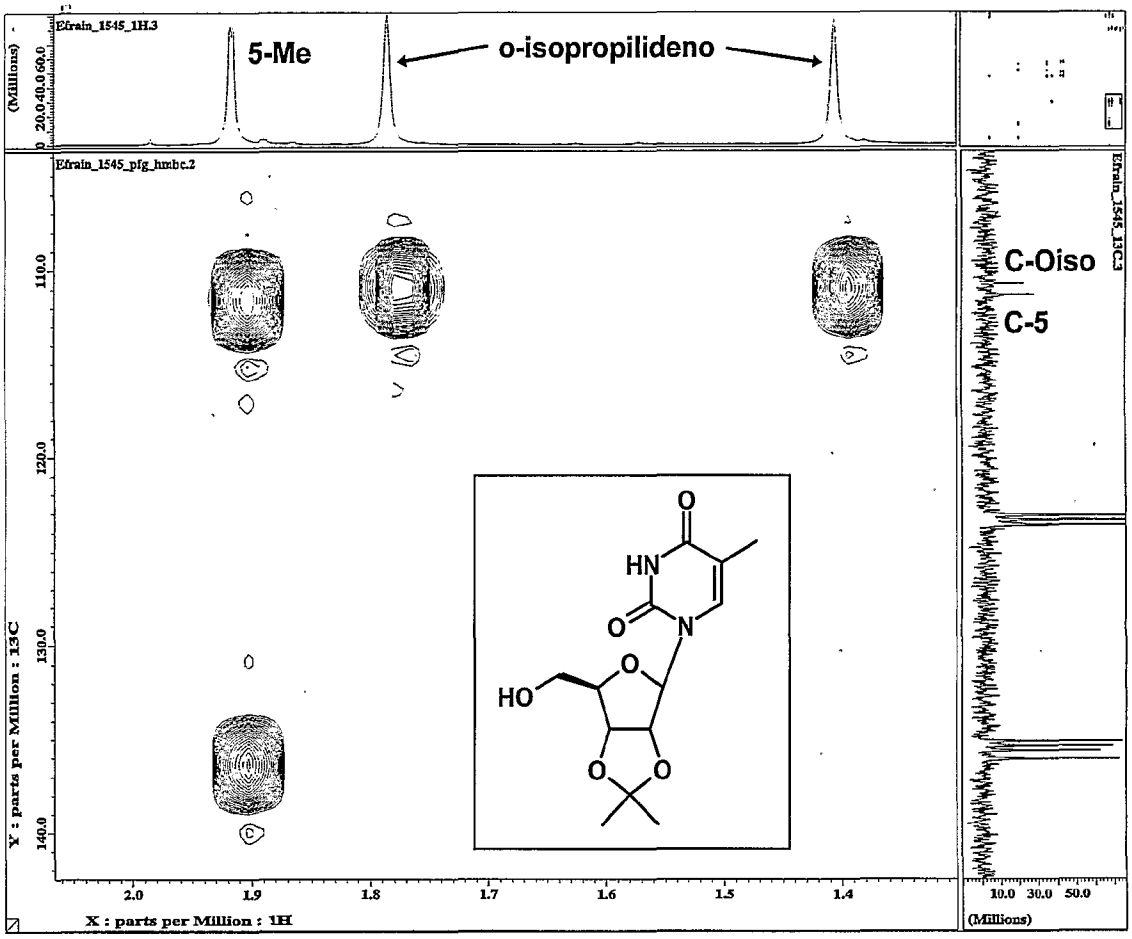

Efrain_1545_1H.3
5-Me
o-isopropilideno
(Millions)
Efrain_1545_pfg_hmbc.2
C-Oiso
C-5
Efrain_1545_13C.3
HN
O
N
HO
O
Y : parts per Million : 13C
X : parts per Million : 1H
(Millions)

FIGURA 44

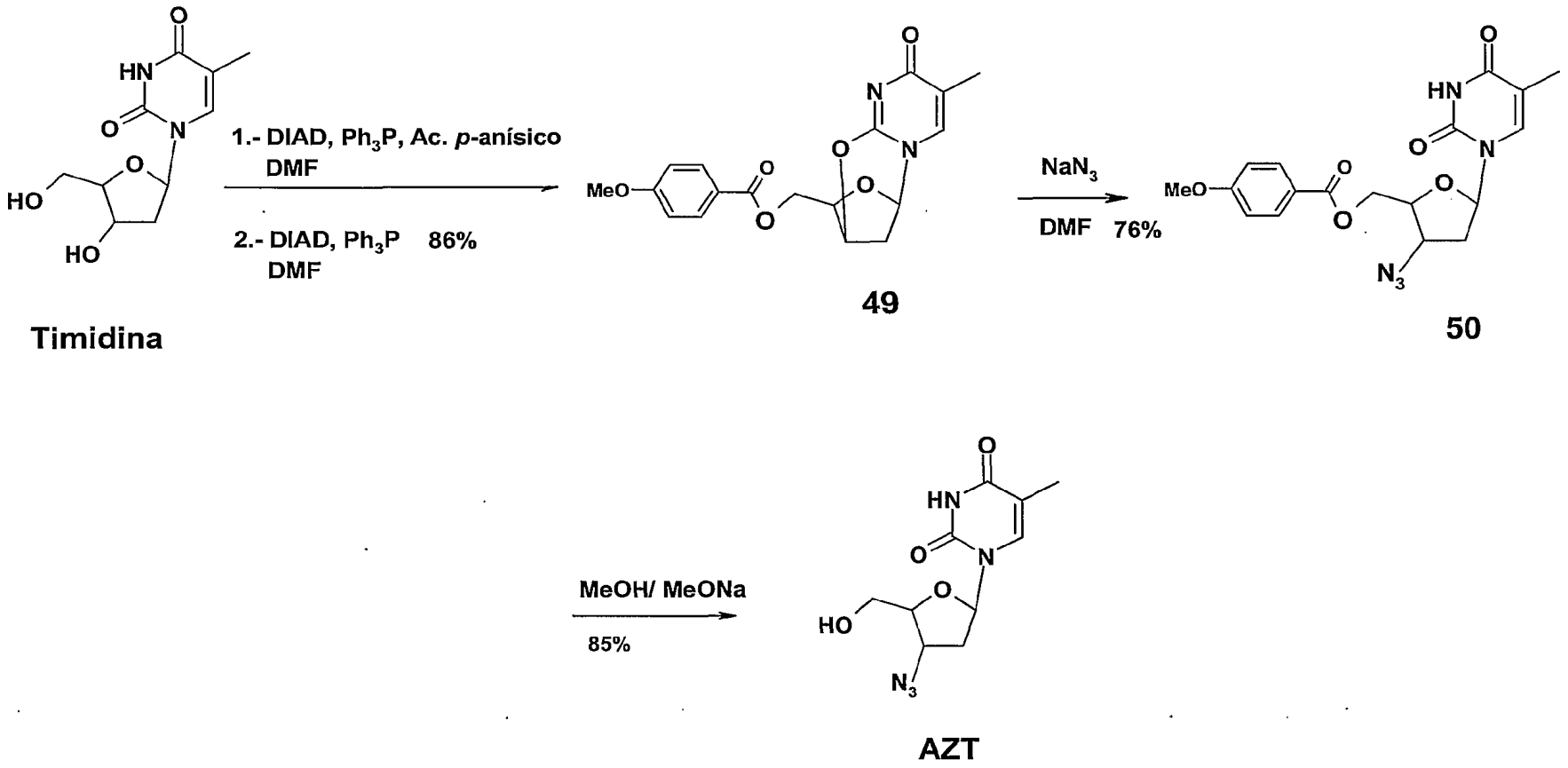

1.- DIAD, Ph3P, Ac. p-anísico
DMF
2.- DIAD, Ph3P 86%
DMF
NaN3
DMF 76%
MeOH/ MeONa
85%
Timidina
49
50
AZT

FIGURA 45

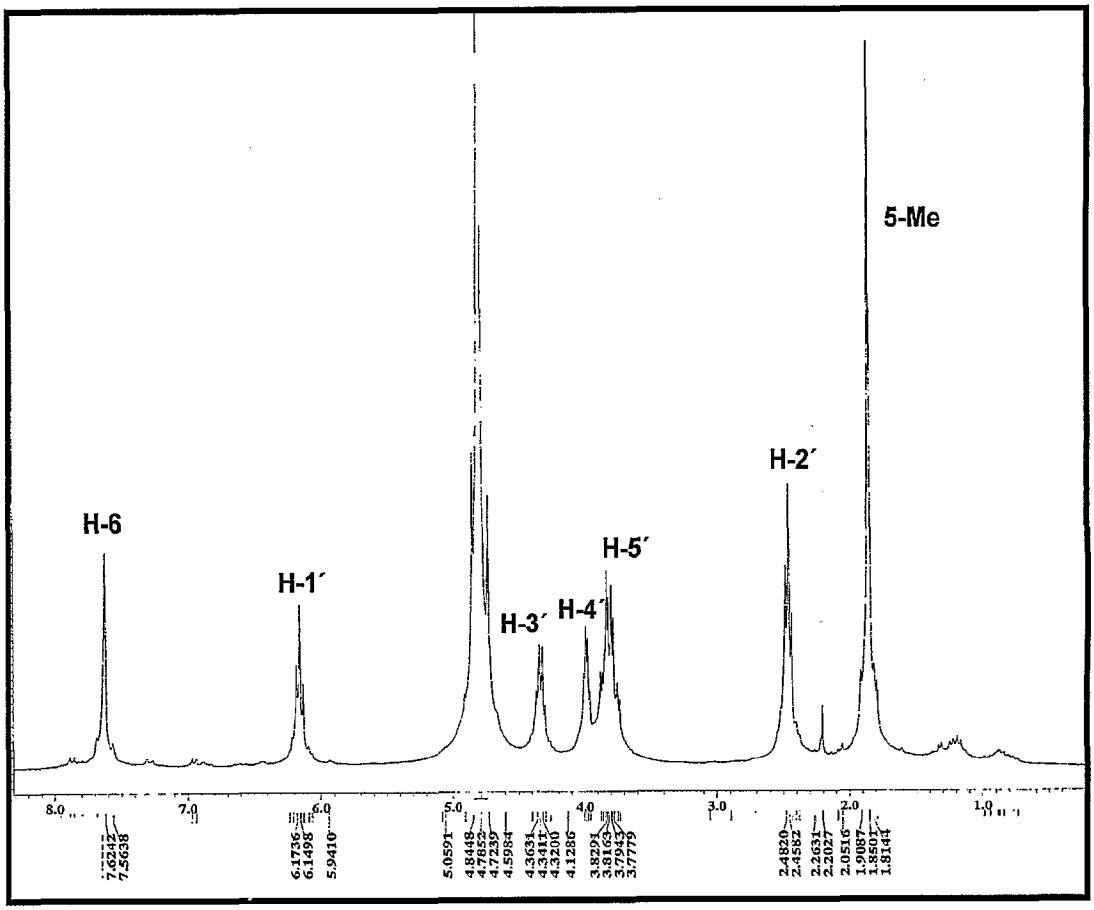

H-6
H-1´
H-3´
H-4´
H-5´
H-2´
5-Me
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
7.6245
7.5638
6.1736
6.1498
5.9410
5.0591
4.8448
4.7852
4.7239
4.5984
4.3631
4.3411
4.3200
4.1286
3.8291
3.8163
3.7943
3.7779
2.4820
2.4582
2.2631
2.2027
2.0516
1.9087
1.8501
1.8144

FIGURA 46

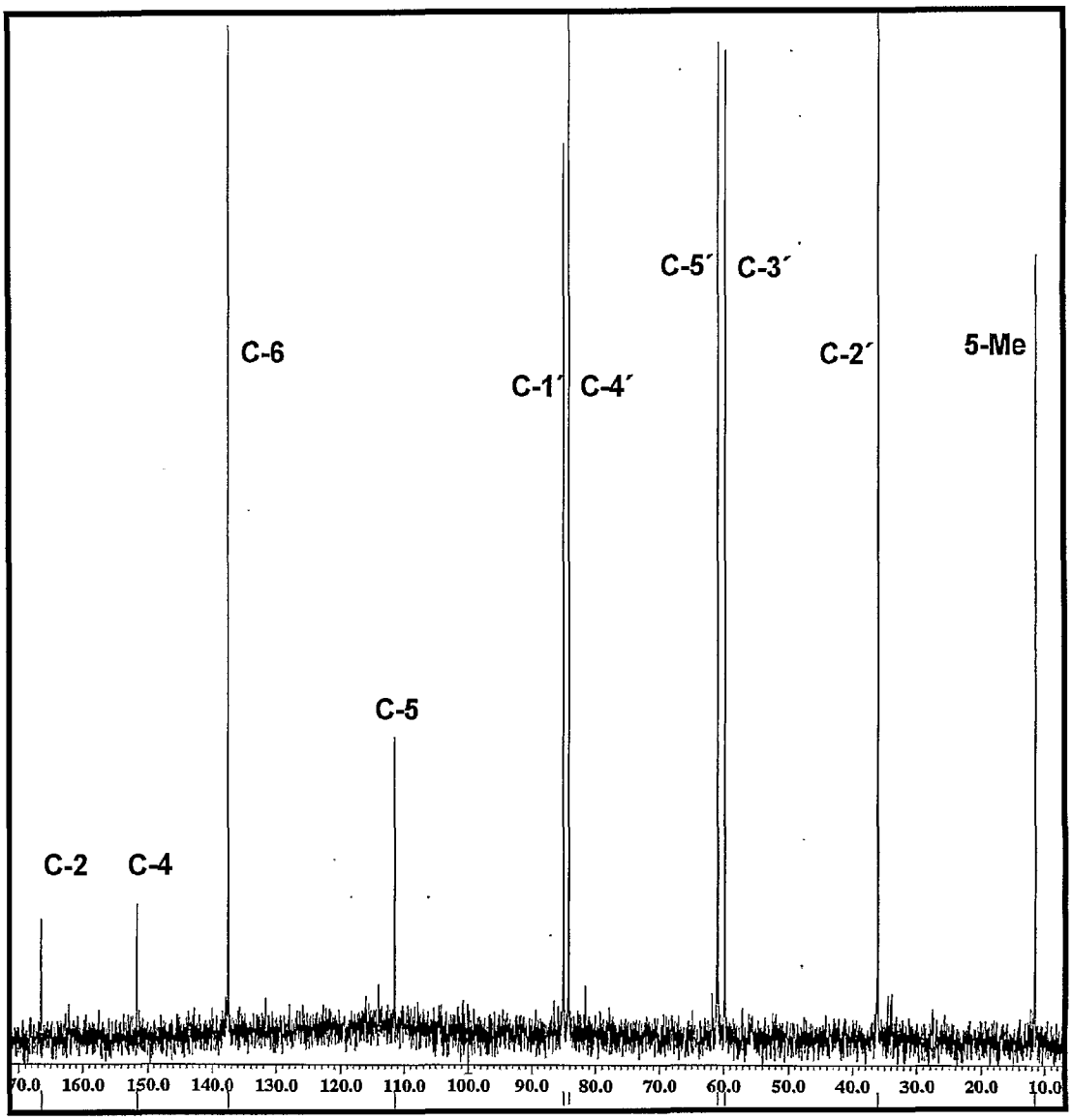

C-2
C-4
C-6
C-5
C-1´
C-4´
C-5´
C-3´
C-2´
5-Me
160.0
150.0
140.0
130.0
120.0
110.0
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0

FIGURA 47

Compuesto	NH Pirrol	5-Me	H-2'	H-5'	H-4'	H-3'	H-1'	H-6	^{31}P
74a	-2.68	1.88 (s)	2.35 (m)	5'a=3.31 (d) J= 11.4 Hz 5'e=3.50 (d) J= 11.7 Hz	3.87 (m)	4.26 (m)	6.02(pseu-t) ^{3}J= 6.2 Hz	7.37 (s)	69.77 (pseu-q) J=7.4, 17.4 Hz
75	–	1.79 (s)	2.26 (m)	5'a=3.51 (d) J= 11.98 Hz 5'e=3.69 (d) J= 12.1 Hz	3.85 (m)	4.16 (m)	6.05(pseu-t) ^{3}J= 6.4 Hz	7.40 (s)	69.81 (dt) J=6.6, 18.5 Hz
76	–	1.75 (s)	2.32 (m)	5'a=3.53 (d) J= 11.6 Hz 5'e=3.65 (d) J= 11.8 Hz	3.87 (m)	4.54 (m)	6.34(pseu-t) ^{3}J= 6.2 Hz	7.53 (s)	69.11 (ancha)
77	–	1.81 (s)	2.42 (m)	5'a=3.48 (d) J= 11.97 Hz 5'e= 3.58(d) J= 12.0Hz	3.84 (m)	4.24 (m)	6.24(pseu-t) ^{3}J= 6.2 Hz	7.49 (s)	69.98 (ancha)

FIGURA 48

Compuesto	5-Me	C-2'	C-3'	C-5'	C-4'	C-5	C-6	C-4	C-2
74a	12.45	37.41	60.14	62.34	84.59	110.91	136.90	150.32	164.0 (d) JP-C2= 5.3 Hz
75	12.87	37.79	60.48	62.85	85.06	111.50	136.90	150.32	163.87
76	11.95	36.86	60.64	62.76	84.96	112.39	137.0	151.25	163.99
77	12.84	37.03	60.67	62.85	84.92	112.23	136.94	151.32	163.76

FIGURA 49

Compuesto	Ión molecular calculado	Ión fragmento calculado	Ión fragmento encontrado	Desviación estándar
75	1020.3804	959.3372	959.3369	0.0003
76	1013.6904	952.6472	952.6467	0.0005
77	1018.5464	957.5032	957.5018	0.0014

FIGURA 50

Compuesto	NH Pirrol	H-5'	H-4'	H-2'	H-3'	H-1'	^{31}P
79	-2.70	5'a=3.31 (dd) 5'e=4.12 (dd) J= 10.5 5.7, 4.4 Hz	4.33 (m)	4.72 (m)	4.89 (m)	5.73 (d) J= 8.5 Hz	68.85 (dt) J=34.7, 10.7 Hz
80	–	5'a=3.74 (pseu-t) 5'e=3.93 (m) J= 10.62 Hz	4.03 (m)	4.17 (m)	4.54 (pseu-t) J= 4.4 Hz	5.64 (d) J= 8.0 Hz	68.82 (q) J= 9.7 Hz
81	–	5'a=3.41 (m) 5'e= 3.96 (m)	4.32 (m)	4.68 (m)	4.86 (m)	5.68 (d) J= 8.0 Hz	68.85 (q) J = 9.9 Hz
82	–	5'a= 3.33 (m) 5'e= 3.85(m)	4.21 (m)	4.27(m)	4.37 (m)	5.70 (d) J= 8.0 Hz	68.76 (ancha)

FIGURA 51

Compuesto	C-4'	C-5'	C-3'	C-2'	C-1'	C-5	C-4	C-2
79	64.74 (d) J= 3.6 Hz	70.93 (d) J= 4.6 Hz	73.97	74.98	81.92	112.20	150.44	163.58
80	64.44	67.22 (d) J= 4.8 Hz	74.28	75.79	81.74	111.74	150.95	164.01
81	64.72	70.93 (d) J= 4.7 Hz	73.95	74.50	82.36	112.23	150.78	163.98
82	64.32	67.88	74.96	76.12	81.73	111.74	150.95	163.86

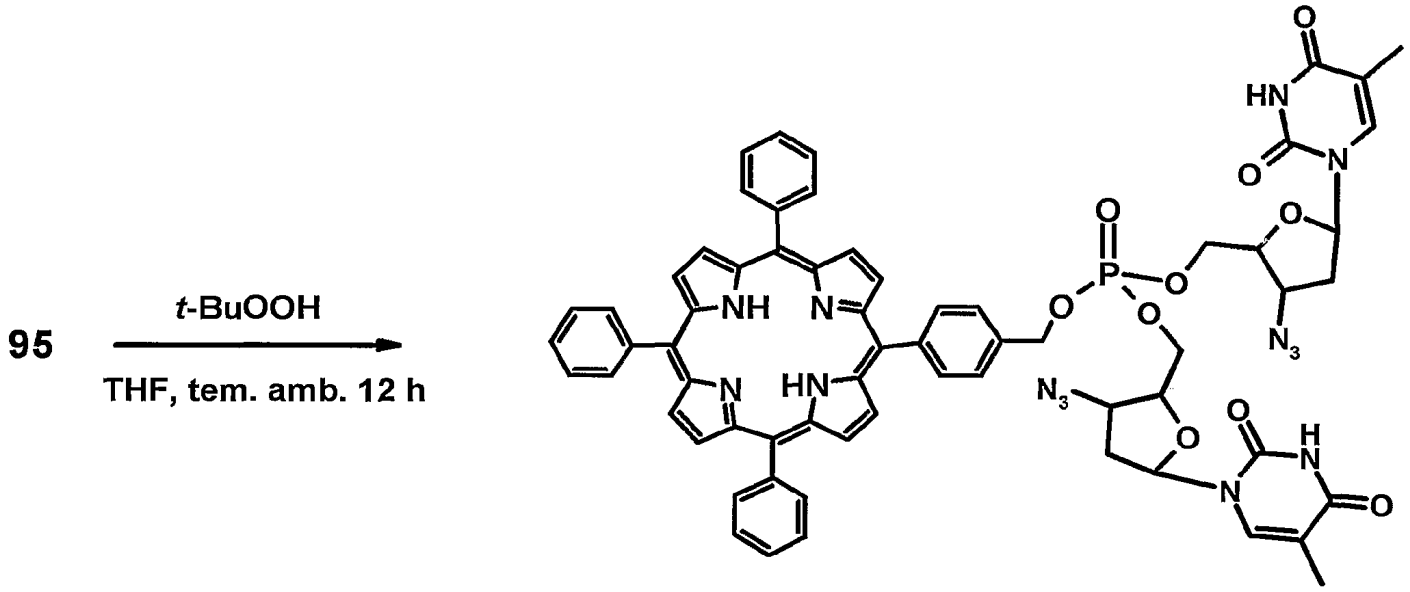
FIGURA 52

Compuesto	Ión molecular calculado	Ión molecular encontrado
80	1051.4312	1051.2256
81	1044.7412	1044.6985
82	1049.5972	1049.5428

FIGURA 53

Porfirina	Tiempo de reacción	Producto	Rendimiento
53	2.5 h	**85**	92 %
54	3.5 h	**86**	86 %
55	3 h	**87**	88 %
56	4 h	**88**	90 %
84	3.5 h	**89**	90%

FIGURA 54



97

δ ^{31}P = 0.5 ppm

FIGURA 55

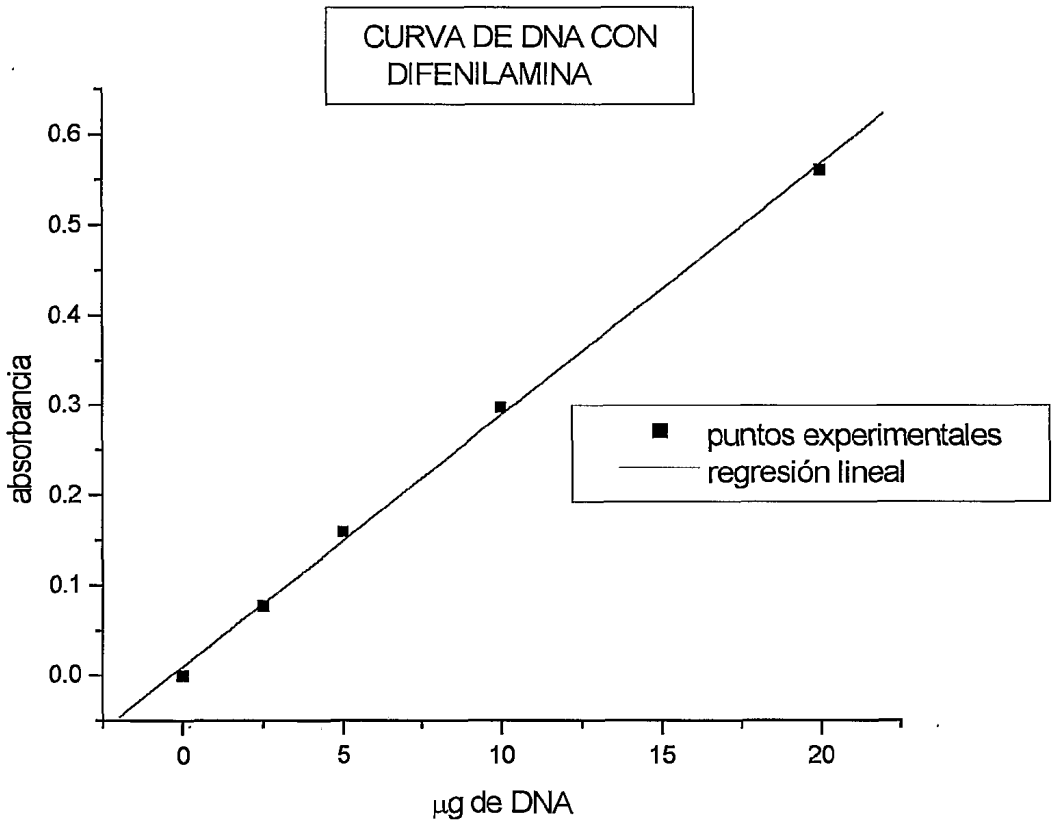

CURVA DE DNA CON DIFENILAMINA
absorbancia
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0
5
10
15
20
µg de DNA
puntos experimentales
regresión lineal

FIGURA 56

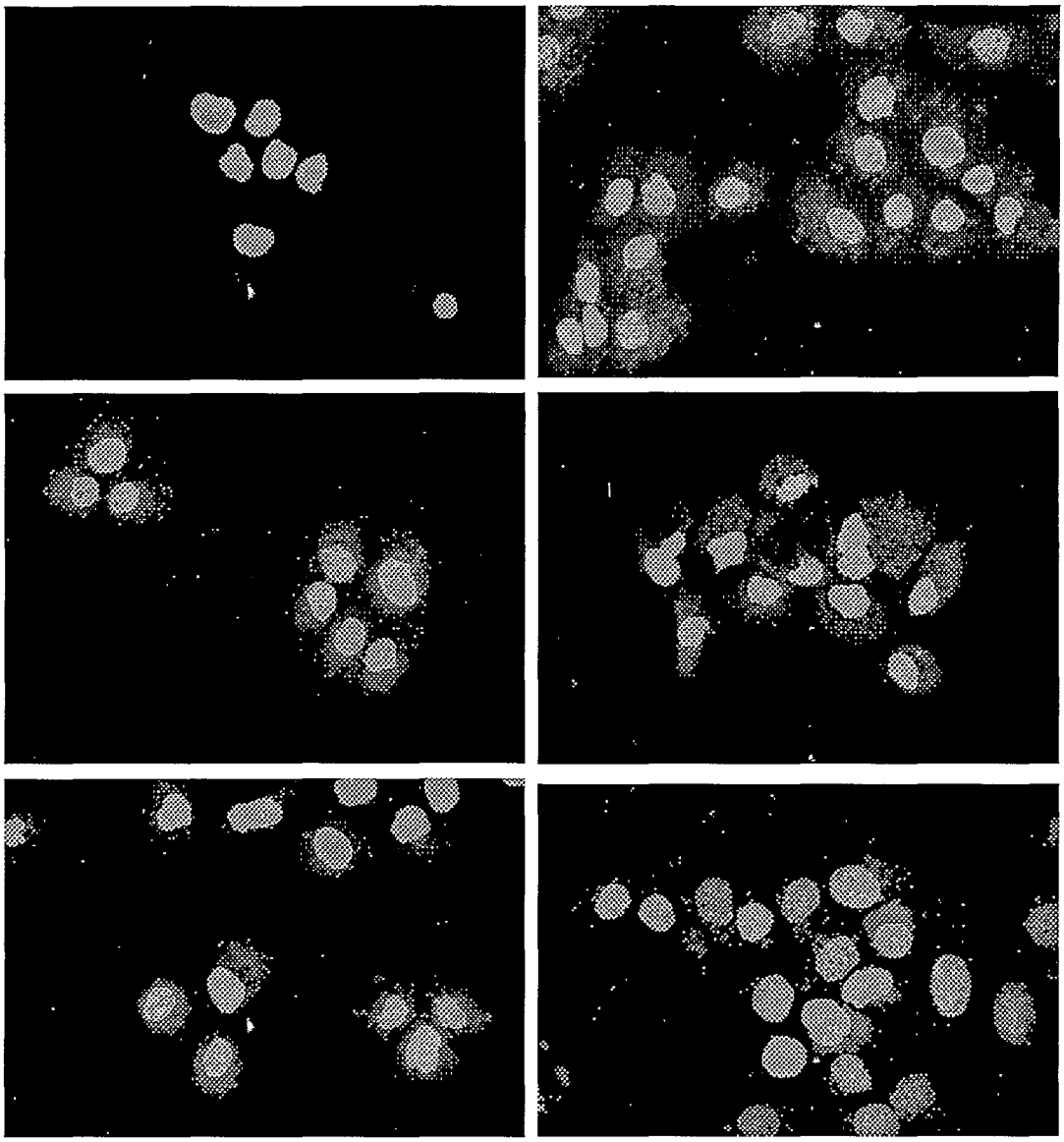


FIGURA 57

Compuesto	Absorbancia	□g ADN	DPM	DPM/□g	%eficiencia	%inhibición
Control	0.1683	7.01	274813.8	39203.11	100%	0
AZT	0.209	8.71	261206.56	29989.27	76.50	23.50
48	0.1776	7.4	360661	48737.97	124.32	-
53	0.166	6.92	137970	19937.86	50.86	49.14
74	0.163	6.79	155000	22827.69	58.23	41.77
75	0.1466	6.11	174663	28586.42	72.92	27.08
79	0.204	8.5	227828	26803.29	68.37	31.63
80	0.208	8.67	229068	26420.76	67.39	32.61

FIGURA 58

FIGURA 59

Porfirina	Geometría del ión metálico	% de incorporación de timidina-^{3}H	% de Inhibición (20 μM)
Control	—	100.00	0.00
53 NH_2	—	92.94	7.06
54 Zn	Pi	93.47	6.53
55 Ni	cupl, oc	76.69	23.31
56 Cu	cupl	88.10	11.90
84 Co	cupl, pi, oc	56.64	43.36
85 $NHCOCH_2Br$	—	84.81	15.19
86 Zn	pi	46.93	53.07
87 Ni	cupl, oc	88.84	11.16
88 Cu	cupl	89.20	10.80
89 Co	cupl, pi, oc	65.91	34.09

FIGURA 60

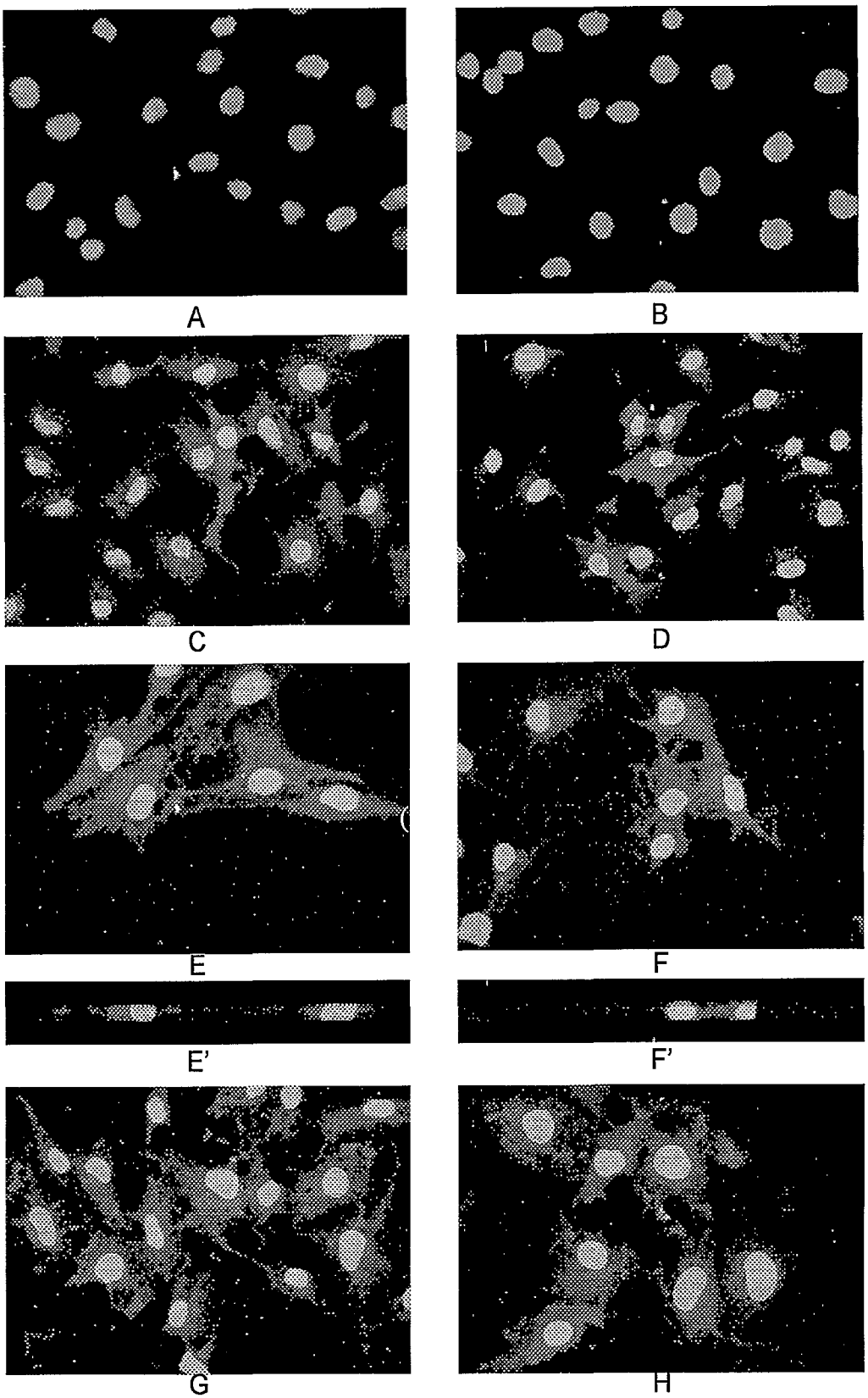


FIGURA 61

Compuesto	% de incorporación de timidina-^{3}H	% de inhibición (20 μM)
93	93.29	6.71
96	66.72	33.28
97	59.29	40.71
98	91.62	8.38

FIGURA 62

Compuesto	% de incorporación de timidina-^{3}H	% de inhibición (20 μM)
AZT	76.50	23.50
53	50.86	28.1
54 Zn	93.47	6.53
55 Ni	76.69	23.31
56 Cu	88.10	11.90
74	58.23	41.77
75 Zn	72.92	27.08
79	68.37	31.63
80 Zn	67.39	32.61
84 Co	56.64	43.36
85 $NHCOCH_2Br$	84.81	15.19
86 Zn	46.93	53.07
87 Ni	88.84	11.16
88 Cu	89.20	10.80
89 Co	65.91	34.09
93	93.29	6.71
96	66.72	33.28
97	59.29	40.71
98	91.62	8.38

FIGURA 63