Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Diseño, síntesis y evaluación biológica de 1,1-bisfosfonatos como agentes antiparasitarios

Ferrer Casal, Mariana

2017-05-05

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ferrer Casal, Mariana. (2017-05-05). Diseño, síntesis y evaluación biológica de 1,1-bisfosfonatos como agentes antiparasitarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ferrer Casal, Mariana. "Diseño, síntesis y evaluación biológica de 1,1-bisfosfonatos como agentes antiparasitarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-05-05.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Diseño, síntesis y evaluación biológica de 1,1-bisfosfonatos como agentes antiparasitarios

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

Mariana Ferrer Casal

Director de tesis: Dr. Juan Bautista Rodríguez

Director Asistente: Dr. Sergio H. Szajnman

Consejero de estudios: Dr. Juan Bautista Rodríguez

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica

Buenos Aires, 2017

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 1,1-BISFOSFONATOS COMO AGENTES ANTIPARASITARIOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la toxoplasmosis. En este sentido, se diseñó la síntesis de 1,1-bisfosfonatos como potenciales agentes antiparasitarios.

En primer lugar, se diseñó y sintetizó una serie de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos, los cuales fueron evaluados contra *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*. Si bien estos compuestos estuvieron completamente libres de actividad contra *T. cruzi*, fueron eficientes inhibidores de la proliferación de taquizoítos de *T. gondii*. Esta actividad celular estaba asociada a la inhibición de la actividad enzimática de farnesil pirofosfato sintetasa de *T. gondii*, una enzima clave en la biosíntesis de isoprenoides.

Por otra parte, se encontró que vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) actuaba como dipolarófilo en algunas reacciones de cicloadición 1,3-dipolar. Estas reacciones dieron lugar a heterociclos altamente funcionalizados conteniendo la unidad 1,1-bisfosfonato, con alta regioselectividad.

Adicionalmente, se discute el diseño racional de un potencial inhibidor de la actividad enzimática de farnesil pirofosfato sintetasa de *T. cruzi*. Si bien la estrategia sintética llevada a cabo permitió acceder al precursor inmediato de la molécula blanco, se evidenció la necesidad desarrollar una nueva química para hidrolizar ésteres de fósforo contenidos en moléculas funcionalizadas.

Finalmente, se diseñó y sintetizó una serie de 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatoslos cuales fueron evaluados contra *T. cruzi* y *T. gondii*. La evaluación biológica de estos compuestos permitió extender los estudios de relación estructura química-actividad biológica que habían sido realizados hasta el momento.

Palabras clave: mal de Chagas, toxoplasmosis, *Trypanosma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, farnesil pirofosfato sintetasa, bisfosfonatos.

DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 1,1-BISPHOSPHONATES AS ANTIPARASITIC AGENTS

The aim of the present Thesis was the search for new and safe chemotherapeutic agents against Chagas disease and toxoplasmosis. To this end, the synthesis of 1,1-bisphosphonates was envisioned as potential antiparasitic agents.

First, a series of 2-alkylaminoethyl-1-hydroxy-1,1-bisphosphonates was designed, synthesized and evaluated against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. Although these compounds were completely devoid of activity against *T. cruzi*, they were efficient growth inhibitors of *T. gondii* tachyzoites. This activity was associated with a potent inhibition of the enzymatic activity of *T. gondii* farnesyl pyrophosphate synthase, a key enzyme of isoprenoids biosynthesis. .

Furthermore, it was found that tetraethyl vinylidenebisphosphonate (**53**) behaves as a dipolarophile in some 1,3-dipolar cycloaddition reactions. These reactions allowed the preparation of highly functionalized heterocyclic rings bearing the 1,1.bisphosphonate moiety, with high regioselectivity.

Additionally, the rational design of a novel potential inhibitor of the enzymatic activity of *T. cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase is discussed. Although the synthetic approach that was carried out allowed the preparation of the intermediate precursor of the target compound, there is a need for developing a new chemistry for the hydrolysis of phosphorous esters contained in functionalized molecules.

Finally, a series of 2-alkylmercaptoethyl-1,1-bisphosphonates was designed, synthesized and evaluated against *T. cruzi* and *T. gondii*. The biological evaluation of these compounds has served to expand the structure-activity relationship studies that had been done so far.

Key words: Chagas disease, toxoplasmosis, *Trypanosma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, farnesyl pyrophosphate synthase, bisphosphonates.

A Dios, por el maravilloso regalo de la vida.

A Maxi, por compartir su vida conmigo.

A mis padres, por estar a mi lado siempre.

A mi hermano, el mejor regalo.

A mis abuelas, la Hilda y la Charo.

A mis abuelos, Gabriel y Pepe.

Agradezco al Dr. Juan Bautista Rodríguez, mi director de tesis, por recibirme en su laboratorio, compartir su experiencia, y permitirme realizar este trabajo. Gracias por todo lo que aprendí en estos años.

Agradezco al Dr. Sergio Szajnman, mi codirector, por siempre estar dispuesto a darme una mano y por compartir todos sus conocimientos. Gracias por el apoyo brindado.

AGRADECIMIENTOS

A Maxi, por todo su amor y cariño. Por apoyarme siempre.
A mis padres y hermano, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia.
A toda mi familia en Venezuela, a quienes extraño mucho.
A Rubén, Rosa, Esther, José, Marta, Germán, Ana, Javier, Javier Jr., Natalia, Natasha, Andrés, Nadia, Fio, Edu y Nico, por hacer mi familia más grande.
A Celio, Víctor, Giselle y Anabella, porque siempre puedo contar con ustedes.
A Vane y a Rafa, por todos sus consejos y cariño. Gracias por impulsarme a seguir mis metas.
A mis amigos de la Simón, Maru, Andre, Yuri, Nela y César.
A Elisa, Alexandra, Alessia, Monica y Alejandra, por mantenernos en contacto a pesar de estar en cinco países diferentes.
A mis amigos, Leo, May, Silvia, Agus, Dani, Ivi, Marce, Caro y Nahir, por todas las experiencias compartidas.
A mis compañeros del laboratorio, Noelia, Tamila, Bruno y Juan Manuel, por el día a día.
A todos los docentes del departamento de química orgánica, por la excelente formación que recibí.
Al prof. Dr. Carlos Stortz, por los estudios de simulación computacional.
Al Dr. Roberto Docampo, por los ensayos de actividad biológica.
A Gernot Eskuche y a José Gallardo, por los espectros realizados.
A Jorge Aznares y Evelyn Bonifazi, por los espectros de masa.
A María de las Mercedes Rivero, por los microanálisis.
A CONICET, por la beca de doctorado.
A todo el personal no docente del departamento, María del Carmen Ares, Nancy Aguirre, Micaela Cadabón, Gabriela Naranjo, Sergio Jacobo, Diego Quintana y Mabel Delgado, por toda su ayuda y buena disposición.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción

1.1.- BISFOSFONATOS 3

1.1.1.- ESTUDIOS DE CALCIFICACIÓN 3

1.1.2.- APLICACIONES CLÍNICAS 4

1.1.3.- RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA 6

1.1.4.- MECANISMOS DE ACCIÓN 8

1.1.4.1.- Efecto de bisfosfonatos en osteoclastos 8

1.1.4.2.- Inducción de apoptosis 9

1.1.5.- MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN 10

1.1.5.1.- Incorporación de bisfosfonatos en análogos de ATP 10

1.1.5.2.- Inhibición del metabolismo de mevalonato y la prenilación de proteínas 12

1.1.6.- FPPS COMO BLANCO MOLECULAR DE BISFOSFONATOS NITROGENADOS 14

1.1.6.1.- Caracterización estructural de FPPS y elucidación del mecanismo catalítico 14

1.1.6.2.- Inhibición de FPPS mediada por bisfosfonatos nitrogenados 19

1.1.7.-BISFOSFONATOS NITROGENADOS Y ENFERMEDADES PARASITARIAS 25

1.1.7.1.- Bisfosfonatos nitrogenados y tripanosomiasis americana 25

1.1.7.2.- Interacción de bisfosfonatos nitrogenados con *Tc*FPPS 27

1.2.- MAL DE CHAGAS 33

1.2.1.- ETIOLOGÍA 33

1.2.1.1.- El parásito 33

1.2.1.2.- El vector 33

1.2.1.3.- El reservorio animal 34

1.2.1.4.- Ciclo de vida el parásito 34

1.2.1.5.- Transmisión 35

1.2.2.- EPIDEMIOLOGÍA 36

1.2.3.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS 37
1.2.3.1.- Fase aguda 37
1.2.3.2.- Fase crónica 37
1.2.4.- PATOGÉNESIS 38
1.2.5.- TRATAMIENTO 39
1.3.- TOXOPLASMOSIS 41
1.3.1.- ETIOLOGÍA 41
1.3.1.1.- El parásito 41
1.3.1.2.- Ciclo de vida 42
1.3.1.3.- Transmisión 43
1.3.2.- EPIDEMIOLOGÍA 44
1.3.3.- TOXOPLASMOSIS EN EL HUÉSPED INMUNOSUPRIMIDO 45
1.3.4.- TRATAMIENTO 46

Capítulo 2: 2-Alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos

2.1.- ANTECEDENTES 51
2.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN 54
2.3.- EVALUACIÓN BIOLÓGICA 57
2.4.- ESTUDIOS DE SIMULACIÓN COMPUTACIONAL 58
2.4.- ANÁLISIS DE RMN 62

Capítulo 3: Cicloadiciones 1,3-dipolares

3.1.- ANTECEDENTES 69
3.2.- REACCIÓN DE AZIDA DE SODIO CON VINILIDEN-BISFOSFONATO DE TETRAETILO 71
3.3.- VINILIDEN-BISFOSFONATO DE TETRAETILO COMO DIPOLARÓFILO 74
3.3.1.- REACCIÓN CON ÓXIDOS DE NITRILO 74
3.3.1.1.- Síntesis y caracterización de 4,5-dihidroisoxazoles 78
3.3.2.- REACCIÓN CON ILUROS DE AZOMETINO 81

Capítulo 4: 2-Alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos

4.1.- ANTECEDENTES 91

4.2.- APROXIMACIÓN SINTÉTICA 97

Capítulo 5: 2-Alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos

5.1.-ANTECEDENTES 115

5.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN 118

5.3.-EVALUACIÓN BIOLÓGICA 133

Conclusiones 137

Parte experimental 141

GENERALIDADES 143

ENSAYOS BIOLÓGICOS 144

MÉTODOS COMPUTACIONALES 146

2-ALQUILAMINOETIL-1-HIDROXI-1,1-BISFOSFONATOS 147

Síntesis de ácidos 2-(*n*-alquilamino)acéticos 147

Síntesis de ácidos 1-[(*n*-alquilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos 150

CICLOADICIONES 1,3-DIPOLARES 153

Síntesis de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) 153

Síntesis de oximas 154

Síntesis de 4,5-dihidroisoxazoles 157

SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS 160

2-ALQUILAMINOETIL-1,1-BISFOSFONATOS 163

2-ALQUILMERCAPTOETIL-1,1-BISFOSFONATOS 174

Resumen 183

Referencias 191

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Å	Ångström
ac.	Acuoso
Ac_2O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ATP	Adenosíntrifosfato
Bu	Butilo
Bn	Bencilo
°C	Grados centígrados
cat	Catalizador
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
conc.	Concentrado
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
DABCO	1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DFT	*Density Functional Theory* (teoría de funcional de la densidad)
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
DIB	Diacetoxi-iodo benceno
DMA	*N,N*-dimetilacetamida
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMSPP	Pirofosfato de dimetilalil mercaptano
DOXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
ED_{50}	Dosis efectiva 50%
ee	Exceso enantiomérico
eq	Equivalentes
Et	Etilo
EtOH	Etanol

FDA	*Food and Drug Administration* (Agencia de drogas y alimentos de los Estados Unidos)
FPP	Pirofosfato de farnesilo
GGPP	Pirofosfato de geranil-geranilo
h	Horas
Hex	Hexano
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HOMO	*Highest Occupied Molecular Orbital* (orbital molecular ocupado de mayor energía)
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50%
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
J	Constante de acoplamiento
Kcal	Kilocaloría
K_i	Constante de inhibición
LUMO	*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (orbital molecular desocupado de menor energía)
m	Multiplete
MBP	Metilenbisfosfonato
*m*CPBA	Ácido *m*-cloroperbenzoico
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mmoles	Milimoles
NaOEt	Etóxido de sodio
OMF	Orbitales moleculares frontera
PCM	*Polarizable Continuum Model* (modelo del continuo polarizable)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
PDB	*Protein Data Bank* (banco de datos de proteínas)
p.f.	Punto de fusión

Ph	Fenilo
PPi	Pirofosfato inorgánico
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
Rf	Factor de retención
r.m.s.d	*Root-mean-square deviation* (desviación de la media cuadrática)
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoro-acético
THF	Tetrahidrofurano
TMDA	*N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamina
TMS	Trimetilsililo
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Capítulo 1:

Introducción

1.1.- BISFOSFONATOS

1.1.1.- ESTUDIOS DE CALCIFICACIÓN

A principios de la década de los sesenta, Neuman y Fleisch, estudiaron procesos de calcificación inducidos por colágeno y encontraron que el plasma y la orina contenían sustancias capaces de inhibir la precipitación de hidroxiapatita *in vitro*.[1] Como este inhibidor de calcificación era inactivado por la enzima fosfatasa alcalina, se pensó que se trataba de un polifosfato.[1,2] Además, compuestos de este tipo se utilizaban en la industria como ablandadores de agua, ya que previenen la precipitación de sales de calcio.[3] Posteriormente, Fleisch y colaboradores aislaron pirofofato inorgánico (PPi, **1**) de orina y plasma, lo que les llevó a sugerir que el PPi (**1**) era uno de los reguladores naturales del proceso de calcificación bajo condiciones fisiológicas.[4] El PPi (**1**) podría inhibir la mineralización adsorbiéndose sobre la superficie de hidroxiapatita, bloqueando así el crecimiento de los cristales.[5] Se postuló que el PPi (**1**) era el agente que normalmente prevenía la calcificación de tejidos blandos y regulaba la mineralización ósea, por lo que, trastornos patológicos podrían estar ligados a alteraciones en el metabolismo de pirofosfato inorgánico (PPi,**1**).[5]

En base a estos conceptos, se evaluó la capacidad de pirofosfato inorgánico (PPi, **1**) de inhibir ciertos tipos de calcificación inducida experimentalmente en animales. El PPi (**1**) prevenía la calcificación ectópica en vasos sanguíneos y piel, sólo cuando era administrado por vía parenteral. El PPi (**1**) administrado por vía oral era inactivo, probablemente debido a la hidrólisis por pirofosfatasas presentes en el tracto gastrointestinal.[6-8] Esto promovió la búsqueda de análogos de pirofosfato (**1**) resistentes a la hidrólisis, que mantuvieran la propiedad de inhibir la mineralización. De esta forma, los bisfosfonatos de fórmula general **2** surgieron como análogos metabólicamente estables de pirofosfato capaces de inhibir la precipitación de fosfato de calcio tanto *in vitro* como *in vivo*.[9] Los bisfosfonatos (**2**) son compuestos relacionados estructuralmente con pirofosfato inorgánico (PPi, **1**) en los que un grupo metileno reemplaza el átomo de oxígeno puente entre los dos átomos de fósforo (**Figura 1.1**).

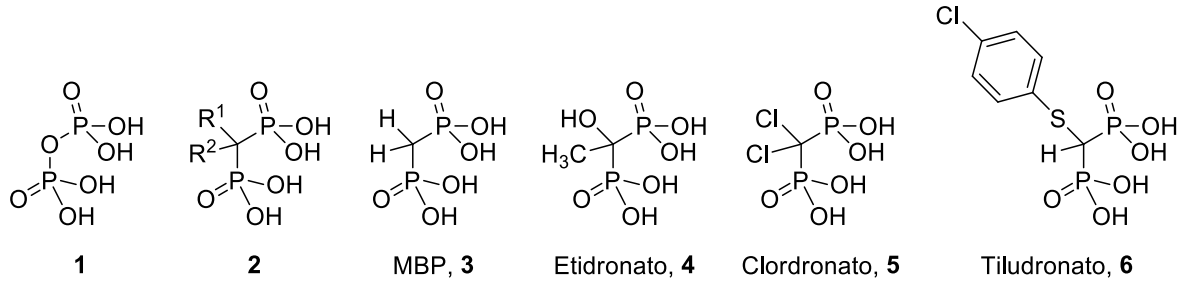


Figura 1.1. Estructura química de los primeros bisfosfonatos desarrollados.

Los primeros bisfosfonatos en ser evaluados como inhibidores de calcificación ectópica fueron metilenbisfosfonato (MBP, **3**) y 1-hidroxi-etil-1,1-bisfosfonato (etidronato, **4**). Estos bisfosfonatos, a diferencia de PPi (**1**) que sólo inhibía la calcificación cuando era administrado por vía parenteral, inhibían la calcificación aórtica y renal en ratas cuando eran administrados por vía oral.[10] Esta característica de los bisfosfonatos (**2**) fue clave para su uso posterior en humanos.[11]

Siguiendo con estudios de calcificación, se descubrió que los bisfosfonatos (**2**) prevenían la disolución de cristales de hidroxiapatita *in vitro*.[5] Este hallazgo llevó a realizar estudios para determinar si los compuestos de este tipo podían inhibir la resorción ósea, inducida por varios métodos, en ratas. De esta forma, metilenbisfosfonato (**3**), etidronato (**4**) y dicloro-metilenbisfosfonato (clordronato, **5**) fueron capaces de inhibir la resorción ósea mediada por osteoclastos en cultivos de células óseas, tanto *in vitro* como *in vivo*.[9]

Etidronato (**4**), clordronato (**5**) y tiludronato (**6**) pertenecen a la familia de bisfosfonatos que no contienen nitrógeno. Estos compuestos difieren de los bisfosfonatos que contienen nitrógeno en su mecanismo de acción. Si bien tiludronato (**6**) surgió como un análogo más potente de etidronato (**4**), fue desplazado por una nueva generación de bisfosfonatos, utilizados actualmente para el tratamiento de trastornos óseos.

1.1.2.- APLICACIONES CLÍNICAS

Los bisfosfonatos (**2**) son un ejemplo representativo de drogas que, por su eficacia y seguridad, fueron implementadas en el tratamiento de trastornos óseos

mucho antes de conocer su mecanismo de acción a nivel molecular. Las primeras aplicaciones de etidronato (**4**) incluyeron el uso en pacientes con miositis osificante (crecimiento anormal de tejido óseo en el músculo) y en pacientes que habían sufrido cirugía de reemplazo de cadera, para prevenir la subsecuente osificación heterotrópica y mejorar la mobilidad.[11] La dosis de etidronato (**4**) que inhibe la calcificación ectópica también afecta la mineralización de tejido calcificado normal como hueso, cartílago, dentina y esmalte. La cantidad necesaria para producir este efecto depende de la especie animal y de la duración del tratamiento. Para la mayoría de las especies la dosis parenteral diaria efectiva se encuentra entre 1-10 mg de bisfosfonato por kilogramo. La inhibición de la calcificación con altas dosis de **2** puede producir fracturas e insuficiencia del organismo para repararlas. El defecto de la mineralización se revierte luego de interrumpir el tratamiento. Sin embargo, la propensión de **2** de inhibir la mineralización de hueso normal ha obstaculizado su uso en el tratamiento de calcificación ectópica. Este no es el caso para su aplicación en resorción ósea ya que se han desarrollado bisfosfonatos (**2**) que inhiben este proceso a dosis 1000 veces menores que las que inhiben la calcificación.[3] Otro de los usos tempranos de bisfosfonatos (**2**) fue como agentes para escáneres óseos, debido a su alta afinidad por el mineral del hueso.[11]

Actualmente, la aplicación más extendida de los bisfosfonatos es como inhibidores de la resorción ósea. Esta aplicación ha sido la más relevante ya que modificó completamente el pronóstico de enfermedades para las cuales no existía un tratamiento efectivo previo. Los bisfosfonatos se convirtieron en el tratamiento de elección para una variedad de trastornos óseos caracterizados por una actividad excesiva de los osteoclastos, como la osteoporosis, la enfermedad ósea de Paget, la metástasis ósea y la hipercalcemia inducida por cáncer.[11,12]

La farmacología de los bisfosfonatos se caracteriza por una baja absorción intestinal y una acumulación altamente selectiva en el mineral óseo. Los efectos secundarios de los bisfosfonatos (**2**) son mínimos, por lo que su uso en tratamientos prolongados es recomendado.[11]

1.1.3.- RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La funcionalidad P-C-P es responsable de la fuerte afinidad de los bisfosfonatos por el mineral óseo. La sustitución en las posiciones R^1 y R^2 del átomo de carbono ha generado una gran familia de compuestos (**Figura 2**). Cuando R^1 es un grupo hidroxilo, como en el caso de etidronato (**4**), aumenta la afinidad del bisfosfonato por el mineral óseo. Se propuso que esto se debía a la capacidad del compuesto de coordinar iones calcio más eficientemente de manera tridentada, en lugar de bidentada.[3]

La propiedad de los bisfosfonatos de prevenir la resorción ósea requiere la funcionalidad P-C-P y no se verifica en monofosfatos o en compuestos con funcionalidad P-C-C-P o P-N-P.[13] El efecto antirresortivo no se puede explicar solamente por la adsorción de los bisfosfonatos al mineral óseo y la prevención de la disolución de hidroxiapatita, ya que, por ejemplo clorodronato (**5**), a pesar de tener menos afinidad por hidroxiapatita que el etidronato (**4**), es un agente antirresortivo más potente. Esto sugiere que los bisfosfonatos inhiben la resorción ósea por efectos celulares en los osteoclastos, en lugar de por puros efectos físicoquímicos.[13]

Siguiendo el uso efectivo de etidronato (**4**) y clordronato (**5**), se estudiaron bisfosfonatos con diferentes cadenas laterales en R^2 pero en los cuales R^1 se mantenía igual (**Figura 1.2**). En particular, se encontró que bisfosfonatos con un átomo de nitrógeno primario básico en una cadena alquílica, como pamidronato (**7**) y alendronato (**8**), eran entre 10 a 100 veces más potentes que etidronato (**4**) y clordronato (**5**). Además, la bisalquilación del átomo de nitrógeno en **7** con grupos metilo y pentilo dio lugar a otro bisfosfonato (ibandronato, **11**) que resultó ser 50 veces más potente que la droga sin alquilar (pamidronato, **7**).[14]

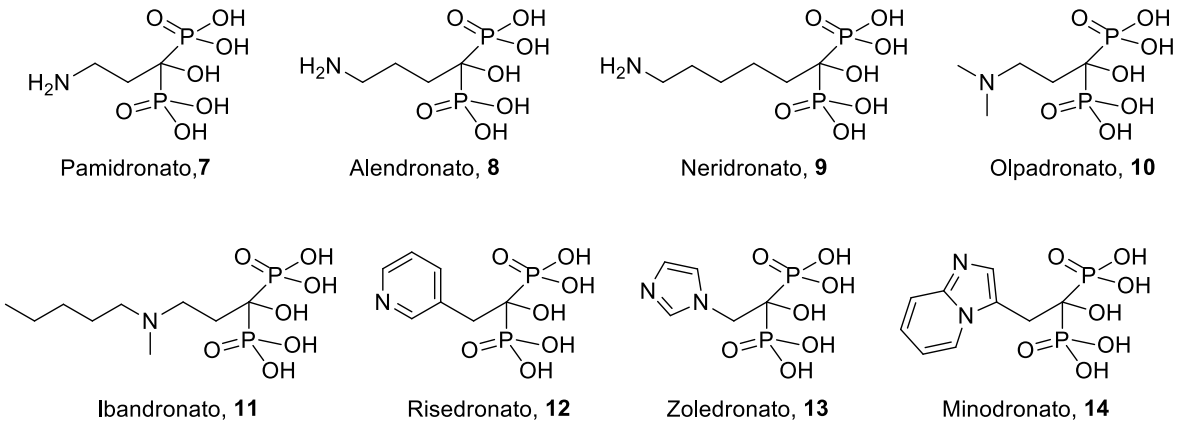


Figura 1.2. Bisfosfonatos usados clínicamente.

Dentro de esta nueva generación de bisfosfonatos sintetizados, los agentes antirresortivos más potentes fueron aquellos con un átomo de nitrógeno contenido en un anillo aromático, como en el caso de risedronato (**12**) y zoledronato (**13**). Estos compuestos resultaron ser 10000 veces más potentes que etidronato (**4**) en algunos modelos experimentales.[11]

Si bien la estructura de la cadena lateral determina en gran medida la potencia antirresortiva, se requiere de ambos grupos fosfonatos para que la droga sea farmacológicamente activa. El reemplazo del hidroxilo de un fosfonato por un metilo, para formar un fosfosno-fosfinato (**15**), reduce significativamente la afinidad ósea y la potencia antirresortiva. La metilación de los dos fosfonatos, para formar un bisfosfinato (**16**), conlleva a una pérdida de la afinidad y de la actividad antirresortiva *in vivo*. Esto sugiere que la presencia de ambos fosfonatos es necesaria tanto para la acumulación selectiva en el mineral óseo como para la acción antirresortiva, probablemente debido a que los bisfosfonatos mimetizan los compuestos que contienen pirofosfato que ocurren naturalmente en el organismo (**Figura 1.3**).

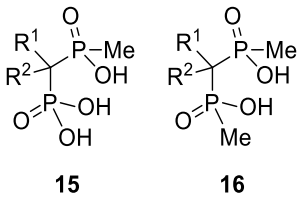


Figura 1.3. Estudios relación estructura-actividad biológica

Estos estudios preliminares de relación estructura química actividad biológica sugieren que la habilidad de los bisfosfonatos de inhibir la resorción ósea depende de dos propiedades de la molécula. En primer lugar, la presencia de ambos fosfonatos, junto con el grupo hidroxilo en la posición R^1, imparte alta afinidad por el mineral óseo y actúa como un "gancho", permitiendo la acumulación rápida y efectiva en la superficie del hueso. Una vez localizado en el hueso, la conformación tridimensional de la cadena lateral en R^2 determina la actividad biológica del compuesto **2**.[15]

1.1.4.- MECANISMOS DE ACCIÓN

1.1.4.1.- Efecto de bisfosfonatos en osteoclastos

Durante el proceso de resorción ósea, el espacio subcelular debajo de los osteoclastos se acidifica por la acción de bombas de protones, ubicadas en el borde arrugado de la membrana del osteoclasto. El p*H* ácido de este microambiente causa la disolución de la hidroxiapatita ósea, mientras que la digestión de la matriz ósea extracelular se produce por la acción de enzimas proteolíticas.[16] Debido a su alta afinidad por hidroxiapatita, los bisfosfonatos son removidos rápidamente de la circulación *in vivo* y adsorbidos al hueso, especialmente en los sitios de resorción ósea donde el mineral está más expuesto.[17,18] Los osteoclastos son las células más propensas a exponerse a altas concentraciones de bisfosfonato libre, como resultado de la liberación de bisfosfonato del mineral óseo en el ambiente ácido debajo de los osteoclastos.[19]

Puesto que los osteoclastos tienen alta actividad endocítica, es probable que los bisfosfonatos presentes en el espacio de resorción sean internalizados por endocitosis. Utilizando alendronato (**8**) marcado isotópicamente, se confirmó que osteoclastos *in vivo* internalizan bisfosfonatos en numerosas vacuolas intracelulares.[19] Luego de la absorción celular, los bisfosfonatos modifican el citoesqueleto de los osteoclastos, alterando su capacidad de llevar a cabo la resorción ósea. Por ejemplo, una de las características morfológicas de osteoclastos tratados con bisfosfonatos es la falta de borde arrugado.[20-22] La modificación del citoesqueleto podría producirse indirectamente por la inhibición

de proteína quinasas o fosfatasas. A este respecto, se encontró que alendronato (**8**) puede inhibir varias tirosina fosfatasas, sin afectar serina o treonina fosfatasas.[23] Como también se encontró que tiludronato (**6**) aumenta el nivel de fosforilación de proteínas en osteoclastos, inhibiendo la actividad de proteína fosfatasas, es posible que la inhibición de la desfosforilación de proteínas por bisfosfonatos contribuya a la pérdida de actividad de los osteoclastos.[24]

1.1.4.2.- Inducción de apoptosis

Varios estudios han demostrado que bisfosfonatos (**2**) pueden inducir apoptosis en osteoclastos. La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por cambios morfológicos, como achicamiento celular, condensación del núcleo, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo, y por eventos bioquímicos, como ruptura internucleosomal de ADN. Las características morfológicas de la apoptosis fueron descriptas en osteoclastos aislados de ratones *in vitro* y en osteoclastos de secciones histológicas de ratones *in vivo* luego del tratamiento con clordronato (**5**), pamidronato (**7**) y risedronato (**12**).[25] La apoptosis inducida por bisfosfonatos no está restringida a osteoclastos, ya que macrófagos, como la línea celular J774 de ratones, y líneas celulares de mieloma humano, también sufren apoptosis luego de tratamiento con bisfosfonatos que contienen nitrógeno (**7**-**14**).[26,27]

Si bien es posible que los bisfosfonatos inhiban la resorción ósea causando la apoptosis de osteoclatos, no existe evidencia suficiente para concluir que el efecto de estos compuestos sobre la resorción ósea puede ser atribuido solamente a un incremento en la apoptosis. Es más probable que los bisfosfonatos inhiban caminos metabólicos importantes para la función y sobrevivencia de los osteoclastos. La alteración de estos caminos metabólicos impide la función normal de los osteoclastos y como consecuencia se produce la muerte celular.[28]

1.1.5.- MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN

1.1.5.1.- Incorporación de bisfosfonatos en análogos de ATP

El crecimiento de la ameba del hongo mucilaginoso *Dictyostelium discoideum* es inhibido por bisfosfonatos.[29] Los estudios posteriores señalaron que algunos bisfosfonatos podían ser incorporados metabólicamente por la ameba en análogos de adenosíntrifosfato (ATP o Appp).[30,31] Los metabolitos resultantes contenían la funcionalidad P-C-P en lugar de los grupos γ-ß-fosfato de ATP, resultando en nucleótidos no hidrolizables (AppCp, **Figura 1.4**).

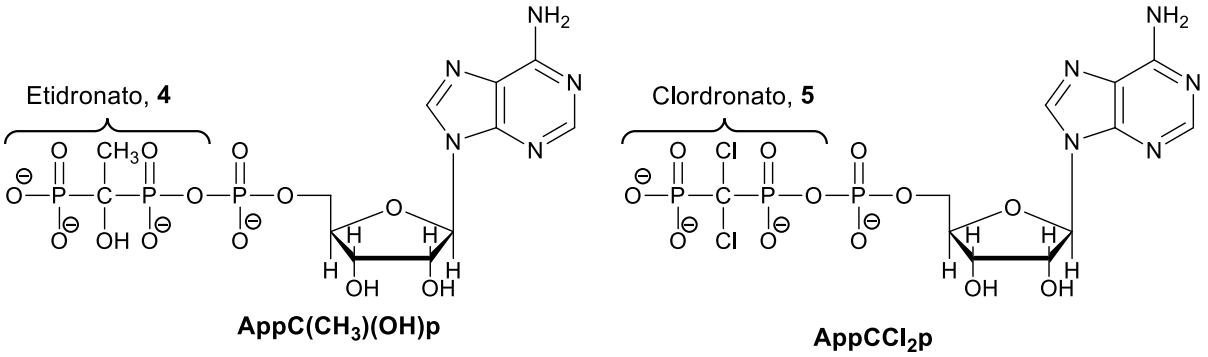


Figura 1.4. Estructura de metabolitos tipo AppCp de etidronato (**4**) y clordronato (**5**).

Todos los bisfosfonatos que fueron metabolizados por la ameba tenían cadenas laterales R^1 y R^2 cortas, con excepción del tiludronato (**6**), y una potencia antirresortiva relativamente baja. En estudios con lisados de células de mamíferos se encontró que la incorporación de bisfosfonatos en análogos de nucleótidos es catalizada por aminoacil-ARNtsintetasas.[32] Estas enzimas catalizan una reacción reversible en la cual un amino ácido condensa con ATP para formar un aminoaciladenilato, junto con la liberación de pirofosfato. Como esta reacción es reversible, parece que los bisfosfonatos con cadenas laterales cortas, que más se asemejan estructuralmente a PPi, pueden reemplazar a pirofosfato en la reacción reversa.

Las aminoacil-ARNtsintetasas que pueden utilizar bisfosfonatos en lugar de PPi pertenecen a la subclase Tipo II (e.g., Asn-, Asp-, Gly-, His-, Lys-, Phe-, Ser-

aminoacil-tRNAsintetasas), que difieren de las enzimas de Tipo I en la estructura del sitio catalítico.[32] Parece que los bisfosfonatos con cadenas laterales cortas, excepto sorprendentemente tiludronato (**6**), pueden reemplazar a pirofosfato y acomodarse en el sitio activo de las aminoacil-ARNtsintetasas Tipo II. En contraste, los bisfosfonatos más potentes, que contienen nitrógeno en la cadena lateral, no son metabolizados. Probablemente esto se deba a que la estructura diferente y en algunos casos más voluminosa de la cadena lateral R^2 impida que estos bisfosfonatos se unan al sitio activo de las aminoacil-ARNtsintetasas.

La formación de metabolitos de bisfosfonatos tipo AppCp se demostró primero en amebas de *Dictyostelium* y en lisados. Posteriormente, se confirmó que células de mamíferos intactas también pueden metabolizar *in vitro* clordronato (**5**) a un análogo de ATP ($AppCCl_2p$, **Figura 1.4**). La identidad de este metabolito fue confirmada por espectrometría de masas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los osteoclastos también metabolizan estos bisfosfonatos, ya que, *in vivo*, son las células más propensas a estar expuestas a altas concentraciones intracelulares de estos compuestos.

Dado que las aminoacil-ARNtsintetasas son enzimas citoplasmáticas, el metabolismo de los bisfosfonatos depende de la absorción celular. De esta forma, los metabolitos AppCp se acumulan en el citoplasma.[33] Debido a la naturaleza no hidrolizable de estos análogos de ATP, es probable que su acumulación inhiba numerosas enzimas metabólicas, ejerciendo efectos adversos sobre la función y supervivencia celular. Para demostrar esta hipótesis, se realizaron experimentos donde células J774 de tipo macrófagos eran cargadas con el metabolito de clordronato (**5**), $AppCCl_2p$, sintetizado químicamente, usando $AppCCl_2p$ encapsulado en liposomas. Estos liposomas son internalizados por las células por fagocitosis. Luego de la ruptura intracelular del liposoma, el metabolito es liberado en el citoplasma. Se encontró que $AppCCl_2p$ tenía una potencia similar a la del clordronato (**5**) reduciendo la viabilidad celular y causaba cambios similares en la morfología. Estos estudios confirmaron que los metabolitos de los derivados bisfosfónicos son citotóxicos y sugiere que algunos bisfosfonatos actúan como prodrogas, siendo convertidos a metabolitos activos luego de la internalización por los osteoclastos *in vivo*.[34]

1.1.5.2.- Inhibición del metabolismo de mevalonato y la prenilación de proteínas

A pesar de que habían sido utilizados como agentes antirresortivos por más de treinta años, el mecanismo molecular de acción de bisfosfonatos no fue identificado sino hasta finales de la década de los noventa.[35] Los primeros bisfosfonatos desarrollados para uso clínico, como etidronato (**4**) y clordronato (**5**), podían ser metabolizados a analógos citotóxicos de ATP.[34] Sin embargo, los bisfosfonatos más potentes (**7**-**14**) no eran metabolizados, por lo que era probable que actuaran por un mecanismo de acción diferente, que llevara a la apoptosis de osteoclastos.[25] Además, se propuso que la apoptosis inducida por bisfosfonatos en osteoclastos ocurría por un mecanismo similar a la apoptosis en macrófagos J774, ya que las relaciones de estructura actividad de bisfosfonatos para la inhibición de la resorción ósea correlacionaban con las de inducción de la apoptosis en macrófagos. Dada la dificultad de aislar grandes cantidades de osteoclastos para estudios bioquímicos, se usaron macrófagos J774 como modelo para identificar blancos moleculares potenciales de bisfosfonatos.[35]

En estudios con macrófagos, se encontró que pamidronato (**7**), alendronato (**8**) e ibandronato (**11**) inhibían la biosíntesis de esteroles a concentraciones similares a las requeridas para inducir la apoptosis. Se propuso que la ruta por la cual los bisfosfonatos nitrogenados (**7-14**) afectaban a macrófagos y osteoclastos era el camino de mevalonato.[35] El camino de mevalonato es el camino biosintético responsable de la producción de colesterol y lípidos isoprenoides, como pirofosfato de isopentenilo (IPP), pirofosfato de farnesilo (FPP) y pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP) (**Figura 1.5**).

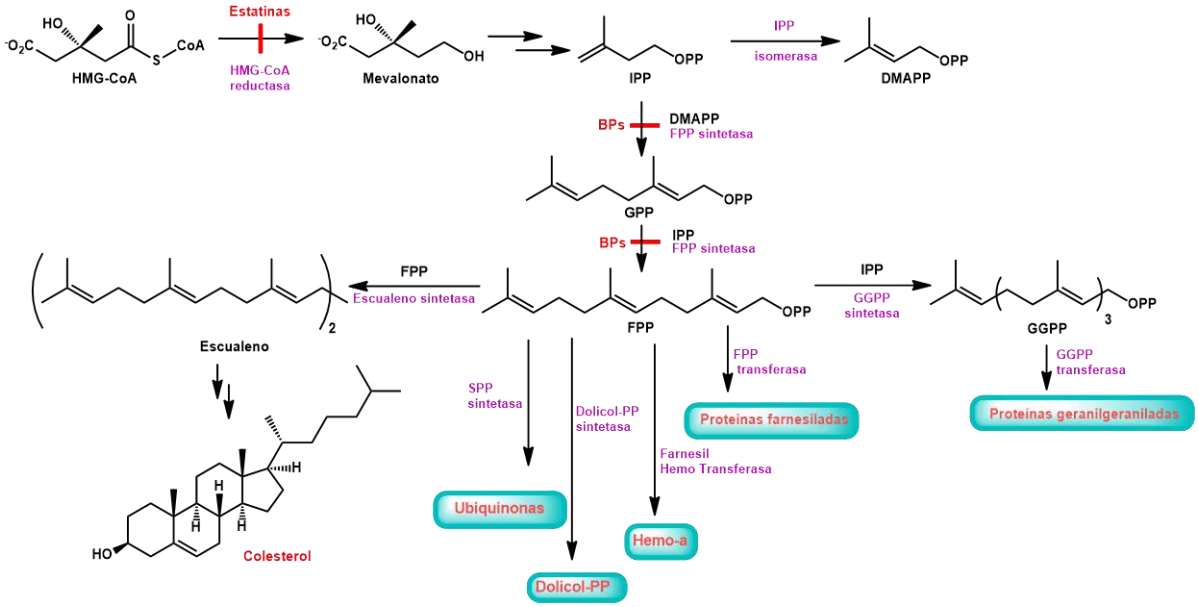


Figura 1.5. Representación esquemática del camino de mevalonato.

FPP y GGPP son necesarios para la modificación post traduccional (prenilación) de GTPasas pequeñas, como Ras, Rho y Rac. La prenilación de estas proteínas es esencial para su actividad biológica, ya que el grupo prenilo sirve para anclar la proteína a membranas y también puede participar en interacciones proteína-proteína.[11]

Posteriormente, se constató que los inhibidores conocidos del camino de mevalonato (estatinas) inducían la apoptosis en macrófagos e inhibían la resorción ósea *in vitro*, confirmando que el camino de mevalonato es esencial para la regulación de procesos celulares en macrófagos y osteoclastos. La apoptosis inducida por estatinas y alendronato (**8**) en macrófagos se podía prevenir co-incubando las células con FPP o GGPP. Este hecho sugería que el blanco molecular de bisfosfonatos **7-14** eran enzimas del camino de mevalonato.[35]

Adicionalmente, se examinó si la apoptosis inducida por bisfosfonatos nitrogenados (**7-14**) en macrófagos estaba asociada a la inhibición de la prenilación de proteínas. A este respecto, se observó que alendronato (**8**), ibandronato (**11**) y risedronato (**12**) inhibían la incorporación de [^{14}C]mevalonato en proteínas preniladas. De manera similar, se encontró que alendronato (**8**) inhibía la prenilación de Ras en macrófagos.[35] La evidencia acumulada permitía suponer que los bisfosfonatos nitrogenados (**7-14**) inhibían la resorción ósea inhibiendo la prenilación de proteínas. Esta propuesta era consistente con la función conocida

de proteínas geranilgeraniladas como Rho, Rac y Rab en procesos fundamentales para la formación y función de los osteoclastos.[11]

En primer lugar, se examinó el efecto de pamidronato (**7**), olpadronato (**10**) e ibandronato (**11**) en la actividad de geranilgeranilpirofosfato sintetasa (GGPPS) y geranilgeraniltransferasa I (PGGTasa I). Estas enzimas catalizan la síntesis de geranilgeranil pirofosfato (GGPP), a partir de FPP e IPP, y la incorporación de grupos geranilgeranilo en GTPasas pequeñas respectivamente. Ninguno de los bisfosfonatos evaluados afectó la actividad de estas enzimas.[36] En estudios posteriores se determinó que el blanco molecular de bisfosfonatos nitrogenados (**7**-**14**) es la enzima farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS). Esta enzima cataliza la condensación secuencial de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) con dos moléculas de IPP. En primer lugar, se obtiene pirofosfato de geranilo (GPP), que luego reacciona con otra molécula de IPP para dar lugar a FPP.[37]

Los estudios de relación estructura química-actividad biológica mostraron una correlación excelente entre la actividad antirresortiva *in vivo* de bisfosfonatos nitrogenados (**7-14**) y la inhibición de FPPS humana (*h*FPPS). Estos resultados sirvieron para validar la enzima FPPS como blanco molecular de los bisfosfonatos nitrogenados.[38]

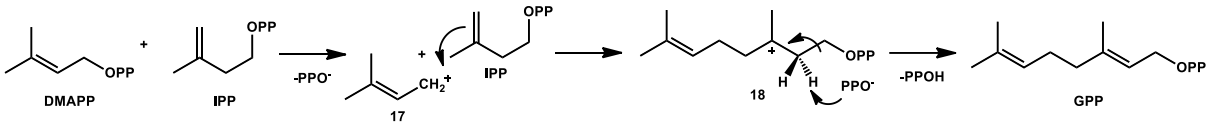
1.1.6.- FPPS COMO BLANCO MOLECULAR DE BISFOSFONATOS NITROGENADOS

1.1.6.1.- Caracterización estructural de FPPS y elucidación del mecanismo catalítico

El gen que codifica a la enzima FPPS parece ser esencial para todos los organismos.[39] FPPS es una enzima clave en el camino biosintético de isoprenoides, ya que cataliza la formación de FPP, precursor obligado para la biosíntesis esteroles, ubiquinonas, dolicoles, hemo A y proteínas preniladas.[40-43] Las farnesil pirofosfato sintetasas pertenecen a la familia de proteínas preniltransferasas que han sido caracterizadas como enzimas homodiméricas que requieren iones metálicos divalentes para su actividad.[39,41,43,44]

Actualmente, se cuenta con evidencia suficiente para suponer que la síntesis de GPP y FPP ocurre a través de un mecanismo de ionización-condensación-

eliminación (**Esquema 1.1**). Las características principales de este mecanismo incluyen: la ionización del pirofosfato alílico, la alquilación del doble enlace C-3–C-5 del pirofosfato de isopentenilo y la eliminación de un protón en la posición C-2 del catión condensado (**18**), para generar el nuevo doble enlace entre C-2 y C-3.[45]



Esquema 1.1. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de GPP a partir de IPP y DMAPP.

Usando mevalonato marcado estereoespecíficamente con deuterio, Cornforth y colaboradores encontraron que la transferencia del grupo prenilo ocurre con inversión de la configuración del carbono C-1 del pirofosfato alílico. Además, se confirmó que la la adición del alilo ocurre por la cara *Si* del doble enlace C-3–C-5 de IPP. Por último, la abstracción del protón pro-R de la posición C-2 del intermediario conlleva a la formación del nuevo doble enlace C-2–C-3, con estereoquímica *E*.[46]

La primera estructura de rayos X que se obtuvo de una preniltransferasa fue la de FPPS aviar (**Figura 1.6**). La característica estructural más relevante de esta enzima es el arreglo de 10 alfa hélices alrededor de una gran cavidad central. Estas alfa hélices aparecen como tres capas o láminas distinguibles. La primera capa está formada por las alfa hélices A y B y es ortogonal a las otras dos. Las hélices D y H están ubicadas en el centro del núcleo de la proteína y contienen dominios ricos en aspartato. Estos dominios están altamente conservados entre las farnesil pirofosfato sintetasas de diferentes organismos. Además, varios experimentos de mutagénesis dirigida mostraron que estos dominios estaban involucrados en la interacción del ligando con la enzima y en la catálisis.[29]

Figura 1.6. Estructura cristalina de FPPS aviar (PDB ID: 1FPS).[47]

Una superficie accesible al solvente (superficie de van der Walls), construída a partir de la estructura de FPPS aviar, reveló dos depresiones hidrofóbicas en la pared de la cavidad central. El bolsillo hidrofóbico más profundo se encuentra cerca del primer dominio rico en aspartato. Se propuso que este bolsillo era el sitio al cual se unía la cadena hidrocarbonada en crecimiento del isoprenoide. Luego de obtener la estructura de FPPS aviar con DMAPP, GPP y FPP, se constató que los pirofosfatos alílicos se unen a este bolsillo, dirigiendo sus cadenas hidrofóbicas hacia el interior de la proteína. Los grupos difosfato de los compuestos alílicos se unen a la cadena lateral de los aspartatos a través de puentes magnesio (**Figura 1.7**).

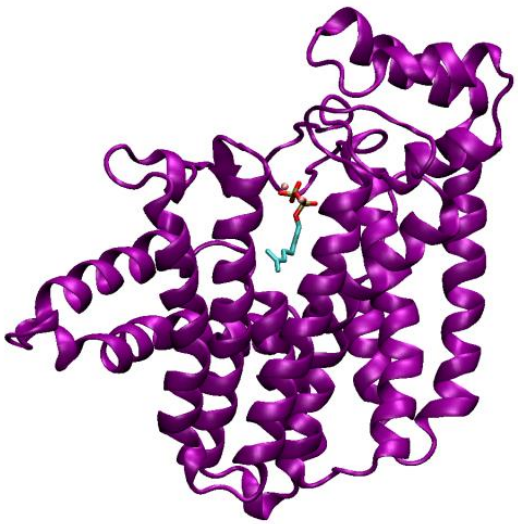
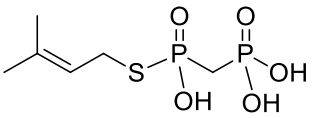


Figura 1.7. Estructura cristalina de FPPS aviar con GPP (PDB ID: 1UBW).[48]

Para determinar las características estructurales que rigen la unión del sustrato a FPPS y la catálisis, se elucidó la estructura cristalina del complejo ternario *E. coli*FPPS·IPP·DMSPP. El pirofosfato de dimetilalil mercaptano (DMSPP) es un análogo no hidrolizable de DMAPP (**Figura 1.8**).[49]



19

Figura 1.8. Estructura de DMSPP.

Se observó que FPPS sufre una reestructuración significativa del sitio activo inducida por el sustrato. Esta reorganización impide la entrada de solvente a la cavidad central y ubica a residuos del sitio activo en una conformación idónea para la catálisis. El DMSPP se une a FPPS a través de un *cluster* de tres núcleos de Mg^{2+}, enlazado por tres aspartatos localizados en paredes opuestas del sitio activo (**Figura 1.9**). Los tres átomos de Mg^{2+} están coordinados octaédricamente por la proteína, el grupo pirofosfato y oxígenos de moléculas de agua. Además, se observa que DMSPP interacciona con las cadenas laterales de residuos básicos conservados. Esta última interacción juega un rol clave en la liberación de pirofosfato y en la recarga de sustrato.[49]

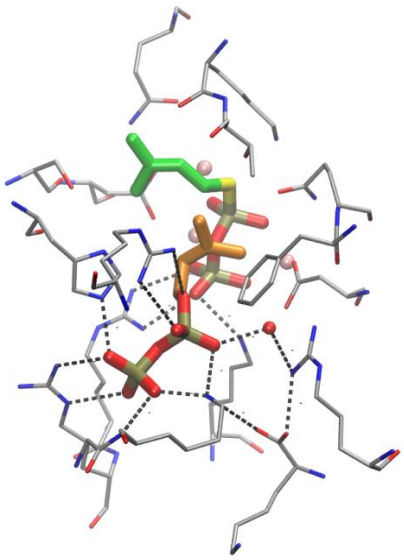


Figura 1.9. Interacciones de IPP y DMSPP con FPPS (PDB ID: 1RQI).[49]

La cadena hidrocarbonada de DMSPP se extiende dentro del bolsillo que aloja a la cadena del producto isoprenoide. Las interacciones hidrofóbicas con Gln^{179}, Lys^{201}, Ser^{101}, Leu^{102} y Thr^{203}, ubican a la cadena hidrocarbonada de DMSPP a distancia de van der Walls de los carbonos C-1, C-2, C-3 y C-4 de IPP.[49]

La unión de IPP a la proteína está mediada por el extremo *C*-terminal. Un puente salino entre el COOH-terminal y Lys^{66} ubica la cadena lateral de forma que el Nε interacciona directamente con dos oxígenos del pirofosfato. De manera análoga, Arg^{318} tiene una interacción mediada por agua con un oxígeno del pirofosfato. La cadena hidrocarbonada de IPP está contenida entre un residuo Phe^{240} y la cadena hidrocarbonada de DMSPP. Las interacciones de la enzima con IPP ubican al doble enlace nucleofílico C-3–C-5 a 3,2 Å del carbono C-1 de DMSPP (**Figura 1.10**).[49]

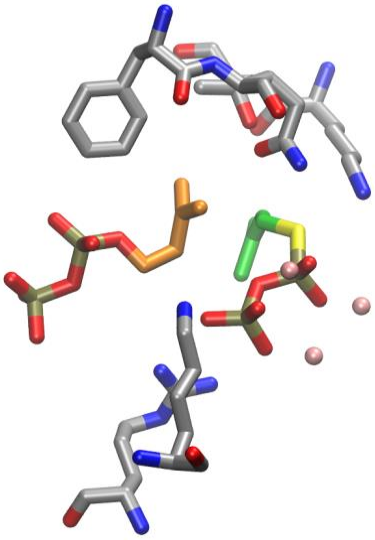


Figura 1.10. Conformación reactiva de IPP y DMSPP.

La estructura del complejo ternario *E. coli*FPPS·IPP·DMSPP permite esbozar el siguiente mecanismo para la síntesis de FPP catalizada por FPPS. En primer lugar, las cadenas hidrocarbonadas de IPP y DMAPP son ubicadas en una conformación adecuada para la catálisis. Luego, la ionización del pirofosfato alílico, desencadenada por los centros metálicos, genera un carbocatión alílico cuya carga positiva está ubicada sobre C-1, C-2 y C-3. A medida que se libera el pirofosfato, la carga negativa que se desarrolla estaría estabilizada por interacciones con el centro metálico trinuclear. De igual forma, el catión alílico es

estabilizado por interacciones electrostáticas con el pirofosfato liberado y por interacciones con la proteína. El oxígeno del carbonilo de la cadena principal de Lys^{202} y los oxígenos de las cadenas laterales de Thr^{203} y Gln^{241} forman un sitio de unión del carbocatión dirigiendo sus dipolos negativos hacia los carbonos C-1, C-2 y C-3 del sustrato alílico. La estructura obtenida del complejo ternario sugiere que el carbocatión alílico condensaría rápidamente con el doble enlace nucleofílico de IPP, que está a sólo 3,2 Å de la posición C-1 de DMSPP. Esta estructura también revela que un oxígeno del pirofosfato, que no está unido a ningún centro metálico, es la base catalítica que desprotona el intermediario condensado para generar el producto de la reacción. Este oxígeno está ubicado correctamente para abstraer el protón pro-R de la posición C-2 de IPP. La abstracción del protón debilita las interacciones del pirofosfato con residuos de la enzima, afectando la estructura de algunos bucles y facilitando la liberación de pirofosfato y la recarga de IPP.[49]

1.1.6.2.- Inhibición de FPPS mediada por bisfosfonatos nitrogenados

Antes de que la enzima FPPS fuese identificada como el blanco molecular de los bisfosfonatos nitrogenados, Oldfield y colaboradores, basados en analogías estructurales, cálculos *ab initio* y estudios de modelado molecular, habían propuesto que los bisfosfonatos **7-14** ejercían su acción antirresortiva actuando como análogos del estado de transición de isoprenil isomerasas o sintetasas.[50]

Luego de confirmar que los bisfosfonatos nitrogenados inhibían la resorción ósea inhibiendo la actividad de FPPS, la primera estructura de rayos X que se obtuvo con un bisfosfonato unido al sitio activo de la enzima fue la del complejo ternario *E. coli*FPPS·IPP·Risedronato (**Figura 1.11**).[49]

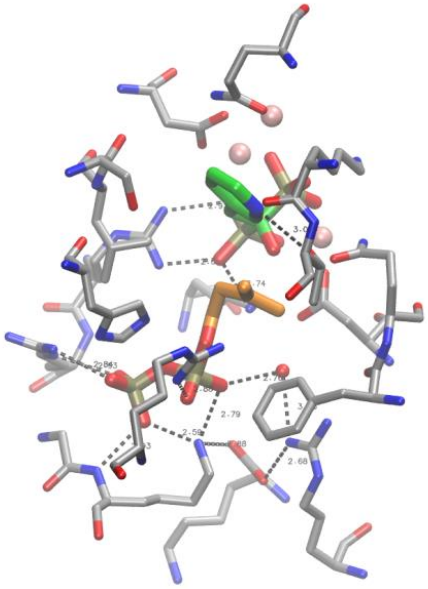


Figura 1.11. Estructura cristalina del complejo ternario *E. coli*FPPS·IPP·Risedronato (PDB ID: 1RQJ).[49]

En esta estructura, risedronato (**12**) se unía al sitio alílico (sitio de unión de los sustratos naturales DMAPP y GPP) usando su funcionalidad bisfosfonato para coordinar tres iones Mg^{2+}, enlazados a su vez por tres residuos aspartato a la proteína. La cadena lateral de risedronato (**12**) se unía al bolsillo hidrofóbico que acomodaba la cadena hidrocarbonada de DMSPP. La interacciones hidrofóbicas con Gln^{179}, Lys^{202}, Ser^{101} y Leu^{102}, así como un enlace hidrógeno entre el nitrógeno de la piridina y el Oγ de Thr^{203} ubicaban al inhibidor a distancia de van der Walls de la cadena hidrocarbonada de IPP. Al igual que en el complejo *E. coli*FPPS·IPP·DMSPP, el difosfato de IPP se unía a la enzima a través de una serie de puentes salinos con residuos básicos como lisinas, argininas e histidinas. La estructura de este complejo ternario apoyaba la hipótesis de que los bisfosfonatos nitrogenados actuaban como análogos del estado de transición carbocatiónico de FPPS.[49]

Si bien la estructura del complejo ternario *E. coli*FPPS·IPP·Risedronato aportaba indicios sobre las bases estructurales que regían la inhibición de la enzima, aún no estaba claro hasta qué punto estos resultados se podían extrapolar a la FPPS humana.[43] Por ejemplo, los estudios cinéticos preliminares de la enzima *h*FPPS recombinante mostraban que risedronato (**12**) era un inhibidor competitivo con respecto a GPP y no competitivo con respecto a IPP. Además, la constante de

inhibición (K_i) de risedronato (**12**) disminuía a medida que su concentración aumentaba. Esta conducta sugería que dos moléculas de bisfosfonato podían unirse simultáneamente al sitio activo de *h*FPPS, de manera contraria a lo obtenido para *E. coli*FPPS.[51] Posteriormente, la obtención de la estructura cristalina de *h*FPPS en su estado sin ligando y en complejos con bisfosfonatos nitrogenados, permitió esclarecer el mecanismo de inhibición.

Figura 1.12. Estructura cristalina de *h*FPPS (PDB ID: 2F7M).[44]

La enzima FPPS humana sin ligando adopta una conformación abierta similar a la observada con FPPS aviar (**Figura 1.12**).[43] Sin embargo, los complejos de *h*FPPS con risedronato (**12**) y zoledronato (**13**) exhiben conformaciones cerradas. Este cambio conformacional en la enzima humana se puede aproximar a un movimiento de cuerpo rígido de los últimos 130 residuos del extremo *C*-terminal, e implica un mecanismo de dos pasos. Primero, luego de la ocupación del sitio alílico, los dos dominios ricos en aspartato se acercan para participar en la unión del ligando, y dos bucles (H-I y D-E) forman una "puerta" que cierra la entrada al sitio de unión del sustrato alílico. Esta transición estructural también requiere un cambio drástico en la orientación de la cadena lateral de Tyr^{349} (conformación parcialmente cerrada. **Figura 1.13**).[43,44]

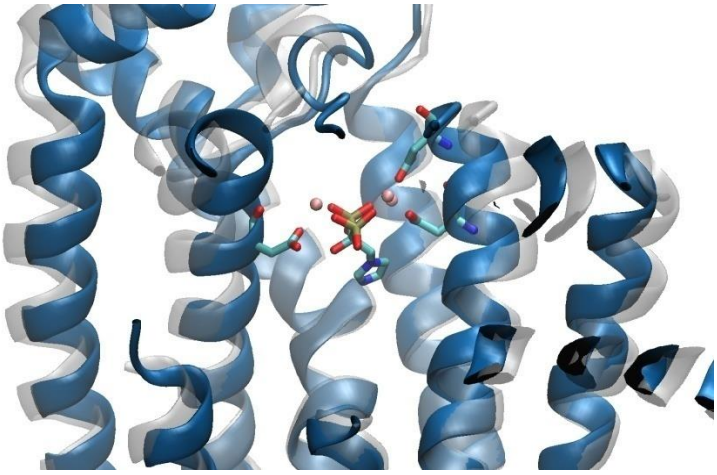


Figura 1.13. Estructura del complejo *h*FPPS·Zoledronato (azul, PDB ID: 2F8C)[43] superpuesta con la estructura de *h*FPPS sin ligando (gris).

En segundo lugar, luego de la unión de IPP, los residuos básicos del extremo *C*-terminal (Lys^{350}, Arg^{351}, Arg^{352} y Lys^{353}) se ordenan y comprimen para cerrar el sitio de unión de IPP (conformación totalmente cerrada. **Figura 14**).

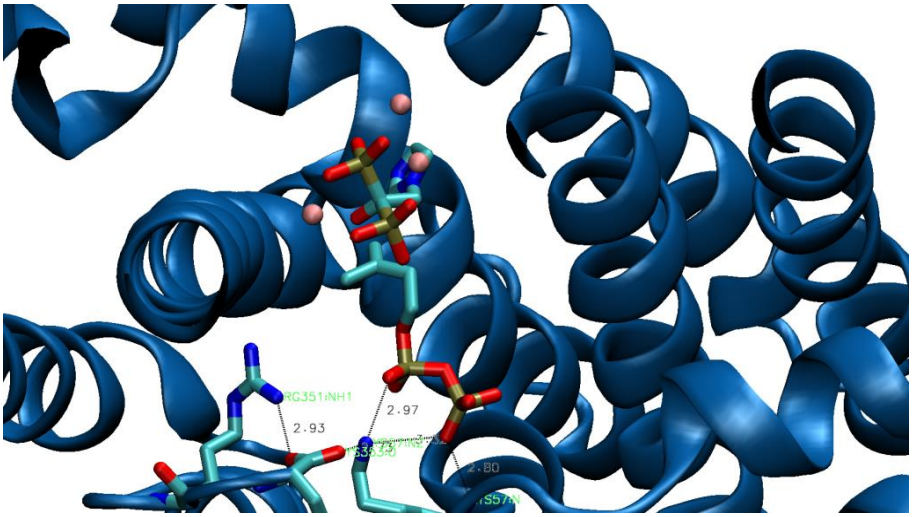


Figura 1.14. Estructura del complejo ternario *h*FPPS·IPP·Zoledronato (PDB ID: 2F8Z).[43]

En resumen, la conformación abierta facilita la liberación del producto y promueve la elongación de la cadena, permitiendo el traslado de GPP al sitio alílico y la unión de una nueva molécula de IPP. La conformación parcialmente cerrada, inducida por la ocupación del sitio alílico, forma completamente el sitio de unión de IPP y, por tanto, controla el orden de unión de los ligandos. La

conformación totalmente cerrada, promovida por la unión del sustrato homoalílico, ubica la cadena hidrocarbonada de IPP de manera tal que interactúe con el anillo aromático del inhibidor. Notablemente, la interfase del dímero no es afectada por el cambio conformacional y constituye un núcleo rígido.[43]

El bloqueo de la actividad de FPPS por bisfosfonatos nitrogenados lleva a la acumulación intracelular del sustrato IPP. Por tanto, los complejos ternarios *h*FPPS·IPP·bisfosfonato representan la forma inhibida de *h*FPPS *in vivo*. Como muestran las estructuras cristalinas, IPP se une al complejo enzima·bisfosfonato y le confiere una estabilización adicional en su conformación totalmente cerrada, en lugar de competir con el inhibidor, como en el caso simple y más frecuente de inhibición competitiva clásica.[43]

En la conformación totalmente cerrada, DMAPP/GPP no pueden competir con el inhibidor por el sitio alílico, ya que el bisfosfonato está atrapado dentro de la enzima y el sitio alílico es inaccesible. La alta eficacia *in vivo* y la acción prolongada de los bisfosfonatos resultan del mecanismo de tercer orden de FPPS y del modo de inhibición no competitivo de los bisfosfonatos con respecto al segundo sustrato (**Figura 1.15**).

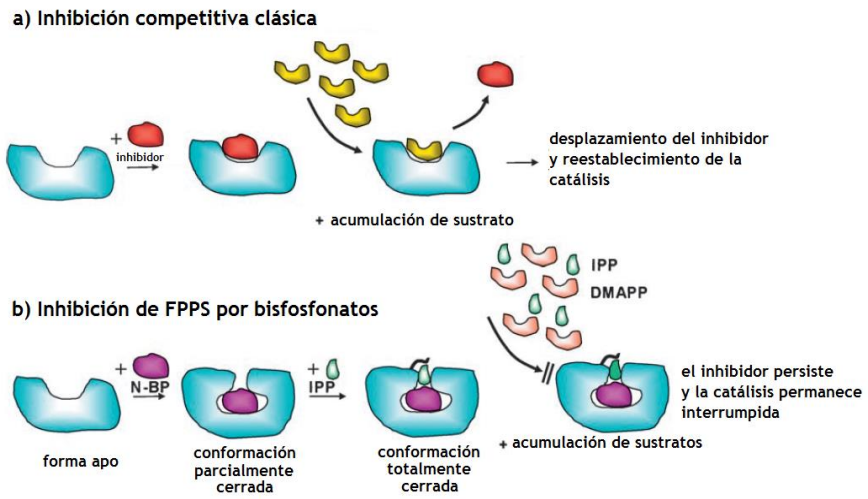


Figura 1.15. Mecanismo de inhibición de *h*FPPS por bisfosfonatos nitrogenados (Adaptado de Rondeau, 2006).[43]

Los estudios cinéticos realizados anteriormente sobre la FPPS humana habían mostrado que el valor de K_i de risedronato (**12**) no era constante. A medida que se aumentaba la concentración de risedronato, disminuía el valor de la

constante de inhibición. Esta conducta, interpretada como una inhibición lineal clásica, sugería que dos moléculas de bisfosfonato se unían de forma cooperativa al sitio activo de *h*FPPS.[51] Sin embargo, las estructuras de rayos X obtenidas permitieron considerar a los bisfosfonatos nitrogenados como inhibidores de unión lenta y fuerte en lugar de inhibidores competitivos clásicos.[44]

Dado que los bisfosfonatos risedronato (**12**) y zoledronato (**13**) pueden actuar como inhibidores competitivos clásicos en las primeras etapas de la reacción enzimática, y aumentar la potencia con el tiempo, se consideró un esquema de dos pasos de reacción, con una isomerización como paso determinante, para analizar la cinética de inhibición de *h*FPPS (**Esquema 1.2**).[44]

$$\mathbf{E + I} \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} \mathbf{EI} \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} \mathbf{EI^*}$$

Esquema 1.2. Inhibición de FPPS por bisfosfonatos.

En primer lugar, el inhibidor compite directamente por el sitio activo con GPP, para formar un complejo enzima-inhibidor. Este paso ocurre rápidamente y produce la inhibición de FPPS. Un segundo paso, que involucra la isomerización del complejo enzima-inhibidor, ocurre lentamente y aumenta la inhibición de la enzima en el tiempo. La constante de inhibición (K_i) para el primer paso es la constante de disociación del complejo E·I. La constante de disociación general es K^*_i, y k_6 es la constante de velocidad para la conversión de (FPPS·bisfosfonato)* de regreso a FPPS·bisfosfonato.

Los valores calculados de K_i para risedronato (72 nM) y zoledronato (76 nM) sugieren que ambos se unen inicialmente a la enzima con una afinidad similar. Los valores para K^*_i indican que dado el tiempo suficiente para permitir la formación del complejo E·I*, la inhibición aumenta significativamente, siendo zoledronato más potente que risedronato (K^*_i=0,07 nM y 0,34 nM respectivamente). La constante de isomerización k_5/k_6 indica qué tan propenso es el complejo (FPPS·bisfosfonato)* a regresar al estado FPPS·bisfosfonato. Se encontró que el valor de k_5/k_6 era de 210:1 para risedronato y 1080:1 para zoledronato, lo que sugiere que el equilibrio está desplazado hacia (FPPS·bisfosfonato)*, mucho más para zoledronato que para risedronato, lo que explica su mayor potencia.[44]

1.1.7.-BISFOSFONATOS NITROGENADOS Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

1.1.7.1.- Bisfosfonatos nitrogenados y tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis americana, también conocida como mal de Chagas, es una enfermedad parasitaria endémica desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, y constituye un grave problema de salud pública.[52,53] El agente etiológico es el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y se estima que entre 6 y 7 millones de personas en el mundo están infectadas con este parásito.[54]

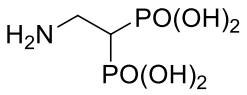
Dado que *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, está sujeto a cambios drásticos en su microambiente durante su ciclo de vida.[55] Por ejemplo, las formas intracelulares de *T. cruzi* viven, proliferan y se diferencian en un ambiente donde la concentración libre de Ca^{2+} es muy baja (del orden de 0,1 μM) en comparación a la experimentada por las formas extracelulares del parásito (del orden de 1,0 mM). Esta marcada diferencia, en las concentraciones de Ca^{2+} a las cuales se pueden adaptar las células de *T. cruzi,* sugería que el parásito cuenta con mecanismos adicionales a los de la célula huésped para mantener su concentración intracelular de Ca^{2+}.[56] Posteriormente, se descubrió que las diferentes etapas de *T. cruzi* poseen compartimientos acídicos en los cuales se localiza la mayoría del Ca^{2+} celular. A esta vacuola acídica se la llamó acidocalcisoma.[56] Además de servir como fuente de Ca^{2+}, los acidocalcisomas son ricos en fósforo, magnesio, sodio y zinc.[55]

Para investigar la naturaleza de los compuestos de fósforo presentes en los acidocalcisomas, se utilizó resonancia magnética nuclear de ^{31}P. Se determinó que la mayor parte del fósforo contenido en los acidocalcisomas se encuentra como pirofosfato inorgánico (PPi). Además, se observó que PPi era más abundante que ATP en las formas replicativas del parásito.[55]

Los estudios de microscopía electrónica confirmaron la presencia de PPi en los acidocalcisomas. Adicionalmente, los experimentos de marcado isotópico con ^{32}P y los estudios de fraccionamiento mostraron que había cantidades significativas de PPi en otros compartimientos, incluyendo la fracción citosólica, lo que contribuía al nivel total de PPi. Dado que PPi resultó ser el compuesto fosforilado

más abundante en *T. cruzi*, era probable que tuviera un rol esencial en el metabolismo del parásito.[55]

En estudios anteriores, se había comprobado la presencia de acidocalsisomas en otros tripanosomátidos, como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania amazonensis*,[57,58,59] y en parásitos Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii*.[60] En la mayoría de estos organismos, PPi resultó ser más abundante que ATP.[55] Además, se encontraron varias enzimas que utilizan PPi, en lugar de ATP. Se postuló que estas enzimas podían servir como nuevos blancos moleculares para el tratamiento de enfermedades parasitarias.[55] A este respecto, se había descubierto que la pirofosfatasa acidocalcisomal de *T. cruzi* era inhibida *in vitro* por un análogo no metabolizable de pirofosfato, 2-aminoetilen-1,1-bisfosfonato (**20**). (**Figura 1.16**).[61] La evidencia acumulada llevó a proponer que los bisfosfonatos de formula general **2** podían interferir con el crecimiento de *T. cruzi*.[55]



20

Figura 1.16. Inhibidor de pirofosfata acidocalcisomal de *T. cruzi*.

Para evaluar esta hipótesis, se monitoreó el crecimiento de amastigotes de *T. cruzi* en mioblastos, en presencia de diferentes concentraciones del bisfosfonato nitrogenado pamidronato (**7**). Se encontró que pamidronato inhibía significativamente la proliferación de amastigotes *in vitro* (IC_{50} = 65μM) sin toxicidad para las células huésped. Otros bisfosfonatos también fueron efectivos inhibiendo la proliferación intracelular de *T. cruzi*. Por ejemplo, alendronato (**8**) fue tan efectivo como pamidronato (IC_{50} = 65μM), mientras que risedronato (**12**) fue menos efectivo (IC_{50} = 300μM). Adicionalmente, se evaluó la actividad de pamidronato (**7**) en un modelo de la enfermedad de Chagas en ratones. Se encontró que pamidronato, administrado por vía endovenosa, frenaba el desarrollo de la parasitemia en ratones con infección aguda por *T. cruzi*. Sin embargo, esta actividad inhibitoria de la proliferación de amastigotes no correlacionaba con la inhibición de la actividad de la pirofosfatasa acidocalsisomal, por lo que estas drogas estarían actuando contra otros procesos celulares que involucraran PPi.[55]

Los bisfosfonatos nitrogenados habían sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, para el tratamiento de trastornos óseos a largo plazo. Sin embargo, su modo de acción a nivel molecular se determinó muchos años después de haber comenzado a utilizarse clínicamente. Inicialmente, se había encontrado que los bisfosfonatos nitrogenados, que inducían la apoptosis en macrófagos y osteoclastos, también inhibían la biosíntesis de esteroles en macrófagos. Esto restringía el modo de acción al camino de mevalonato.[35] En tripanosomátidos, como *T. cruzi*, esta ruta biosintética es responsable de la síntesis de una variedad de esteroles y compuestos poli isoprenoides que son de vital importancia para la supervivencia del parásito, como se discutió anteriormente [62]

En la actualidad, se sabe que los bisfosfonatos nitrogenados inhiben la resorción ósea inhibiendo la actividad enzimática de FPPS humana.[37,50,63] La inhibición de *h*FPPS produce un déficit en la prenilación de proteínas que conlleva a la apoptosis de osteoclastos.[35] De manera similar, la prenilación de proteínas ocurre en *T. cruzi* y se comprobó que el crecimiento de amastigotes de *T. cruzi* es afectado por inhibidores de farnesiltransferasas.[64] Finalmente, la expresión de un gen de *T. cruzi* que codificaba una enzima FPPS funcional, permitió comprobar que los bisfosfonatos nitrogenados inhibían la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* inhibiendo la actividad de *Tc*FPPS.[65]

Se propuso que la actividad de los bisfosfonatos nitrogenados en *T. cruzi* resultaba de la acumulación preferencial en los parásitos, debido a la presencia de acidocalcisomas, ricos en Ca^{2+} y PPi. Estas organelas serían equivalentes a la hidroxiapatita de calcio ósea, a la cual se unen los bisfosfonatos con alta afinidad.[65]

1.1.7.2.- Interacción de bisfosfonatos nitrogenados con *Tc*FPPS

La expresión heteróloga del gen *TcFPPS* en *E. coli* produjo una enzima que catalizaba la síntesis de FPP en presencia de los sustratos DMAPP e IPP. Esta enzima recombinante era similar a la enzima FPPS humana en cuanto a los requerimientos de Mg^{2+} y al p*H* óptimo. Para determinar los parámetros cinéticos de *Tc*FPPS se siguieron procedimientos estándar. Por ejemplo, los valores de *Km* y

Vmáx se obtuvieron por regresión no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis Menten. Se midió la velocidad de síntesis de FPP por *Tc*FPPS, a concentración saturante de IPP, variando la concentración de GPP, y se obtuvo un valor de *Km* de 7,48 ± 1,25 μM y una *Vmáx* de 214 ± 12 μM min^{-1} mg^{-1}. Cuando se mantuvo la concentración de GPP y se varió la concentración de IPP, el valor de *Km* fue 2,96 ± 0,74 μM y la *Vmáx* fue 325 ± 5 μM min^{-1} mg^{-1}.[65]

Una vez calculados los parámetros cinéticos, se evaluó la capacidad de varios bisfosfonatos de inhibir la actividad enzimática de *Tc*FPPS. Para los bisfosfonatos pamidronato (**7**) y alendronato (**8**) se obtuvieron valores de *Ki* de 2,02 y 1,04 μM respectivamente, mientras que para risedronato (**12**) se obtuvo una *Ki* de ~30nM. El valor de *Ki* obtenido para risedronato, lo convierte en un inhibidor muy potente, ya que *Ki* << *Km*. En general, los valores obtenidos de *Ki* fueron mayores que los reportados para *h*FPPS.[65]

Para entender las bases estructurales que rigen la unión de los bisfosfonatos al sitio activo de *Tc*FPPS, se determinó la estructura cristalina de *Tc*FPPS sin ligandos (forma apo) y la del complejo ternario *Tc*FPPS·Alendronato·IPP.[66] La estructura cristalina de *Tc*FPPS se puede describir como una horquilla de dos hélices, en el extremo *N*-terminal, seguida por un arreglo de ocho hélices. Los dominios ricos en aspartato están contenidos en las hélices D y H de la cavidad central (**Figura 1.17**). Las ocho hélices del arreglo central están conectadas por bucles, excepto las hélices H e I que están conectadas por tres hélices cortas. Entre las hélices F y G la enzima contiene una inserción de 11 residuos, exclusiva de tripanosomátidos. Esta inserción, que comprende los residuos 179-189, contribuye al área de contacto entre los monómeros en el dímero de *Tc*FPPS (**Figura 1.18**).[66]

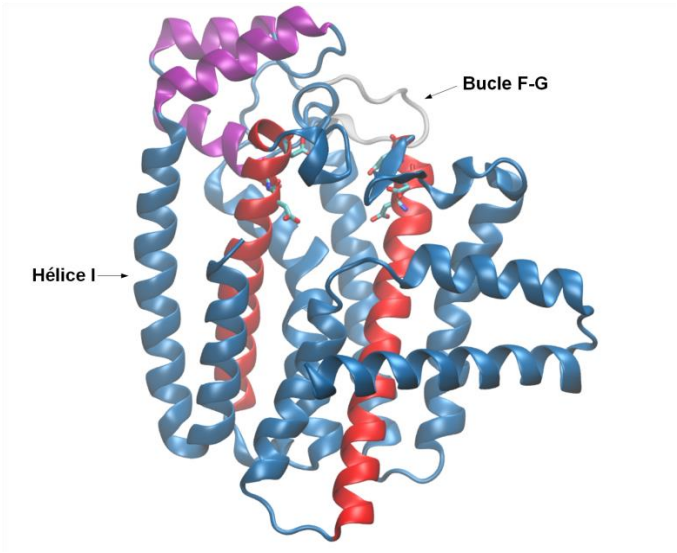


Figura 1.17. Estructura cristalina de *Tc*FPPS. Las hélices D y H (rojo) contienen los dominios ricos en aspartato. Las hélices H e I están conectadas por tres hélices cortas (violeta). El bucle F-G (gris) es característico de tripanosomátidos (PDB ID: 1YHK).[66]

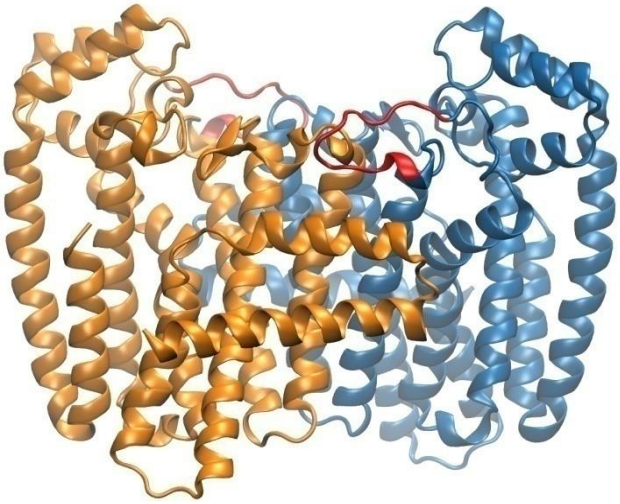


Figura 1.18. Dímero de *Tc*FPPS. La inserción exclusiva de tripanosomátidos (rojo) contribuye al área de contacto entre monómeros.

Por otra parte, la estructura cristalina del complejo ternario *Tc*FPPS·Alendronato·IPP revela que la enzima sufre un cambio conformacional significativo luego de la unión de los ligandos. Este cambio conformacional es evidente en la posición del bucle que conecta las hélices D y E (residuos 103-113) y en las hélices G y H. También se observa que el extremo *C*-terminal se ordena, como resultado de interacciones tipo enlace hidrógeno con el difosfato de IPP

(**Figura 1.19**). Para acomodar la unión del metal, las cadenas laterales de Asp^{98} y Asp^{250} rotan, alrededor de 90º con respecto a la forma apo. Alendronato se une al sitio alílico de la enzima a través de tres iones Mg^{2+}, coordinados a su vez por residuos aspartato.[66]

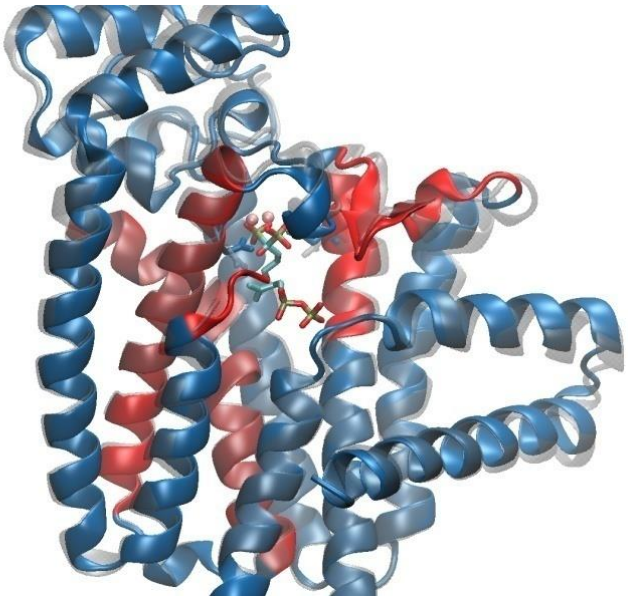


Figura 1.19. Estructura del complejo *Tc*FPPS·Alendronato·IPP (azul, PDB ID: 1YHM)[66] superpuesta con la estructura de *Tc*FPPS sin ligando (gris). Las posiciones donde el cambio conformacional es significativo se resaltan en color rojo.

Adicionalmente, se determinaron las estructuras cristalinas de *Tc*FPPS en complejos con risedronato (**12**), zoledronato (**13**) y minodronato (**14**).[66,67] Los bisfosfonatos se unen al sitio alílico de *Tc*FPPS de manera similar a lo informado para *h*FPPS. Al superponer las estructuras de los complejos de *Tc*FPPS con risedronato, zoledronato y minodronato, se obtiene que el solapamiento de los carbonos geminales y de los fosfonatos es casi perfecto (r.m.s.d < 0,47 Å), con pequeñas variaciones en los planos de los anillos heterocíclicos (**Figura 1.20**).[67]

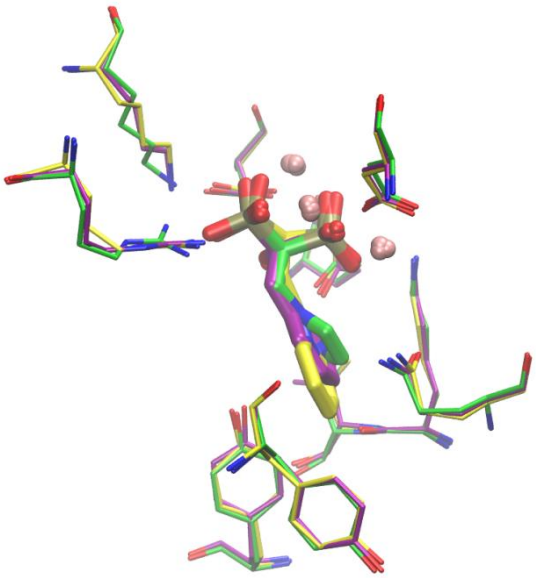


Figura 1.20. Superposición de los complejos de *Tc*FPPS con risedronato (púrpura, PDB ID: 1YHL),[66] zoledronato (verde, PDB ID: 3IBA)[67] y minodronato (amarillo, PDB ID: 3ICK).[67]

Para evaluar si los cambios conformacionales que ocurren en el primer monómero, luego de la unión de los ligandos, afectan la conformación, y la afinidad por bisfosfonatos, del segundo monómero, se estudió la termodinámica de la unión de los bisfosfonatos a *Tc*FPPS. Se determinó que risedronato (**12**), zoledronato (**13**) y minodronato (**14**) se unen a *Tc*FPPS con un cambio positivo en la entalpía. Además, para todos los bisfosfonatos estudiados, las isotermas de unión mostraron una pendiente pronunciada al principio, que no podía ser ajustada con un modelo de dos sitios idénticos por dímero. Estos resultados sólo eran compatibles con un modelo que involucrara dos sitios. Se propuso por tanto, que el cambio conformacional inducido, en la primera subunidad del dímero era transmitido al segundo monómero, alterando su afinidad por bisfosfonatos.[67]

En base a estos resultados se propuso el siguiente modelo termodinámico de unión de bisfosfonatos al dímero de *Tc*FPPS. (1) Antes de la adición del inhibidor, *Tc*FPPS existe mayoritariamente como un dímero simétrico. (2) La unión de una molécula de bisfosfonato, a uno de los monómeros de *Tc*FPPS, produce el cierre de la enzima alrededor del sitio activo. (3) Este cambio conformacional se transmite al segundo monómero, alterando su afinidad por los bisfosfonatos. (4) Otra molécula de bisfosfonato se une a la segunda unidad del dímero, formando un

dímero asimétrico de *Tc*FPPS que puede estar en equilibrio con el dímero simétrico.[67]

Notablemente, la unión de risedronato (**12**) y zoledronato (**13**) a *h*FPPS se ajusta bien al modelo de un sitio de unión, en marcado contraste con la unión de estos bisfosfonatos a *Tc*FPPS. Esta diferencia entre la enzima humana y la tripanosomal podría proveer pistas para el desarrollo de inhibidores específicos de *Tc*FPPS, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.[67]

1.2.- MAL DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades parasitarias más desatendidas del mundo, constituye un grave problema de salud pública en Latinoamérica.[53,68] Esta infección crónica es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y fue descubierta en 1909 por el médico brasilero Carlos Chagas. El trabajo de Chagas es representativo en la historia de la medicina, ya que un solo investigador describió en gran detalle tanto el ciclo de transmisión del parásito como las manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos.[68,69]

1.2.1.- ETIOLOGÍA

1.2.1.1.- El parásito

Trypanosoma cruzi pertenece al género *Trypanosoma*, que consiste de aproximadamente 20 especies de protozoarios flagelados. Dentro de este género, sólo *T. cruzi* y dos subespecies africanas, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, causan enfermedades en humanos. Los organismos del género *Trypanosoma* pertenecen a la familia Tripanosomatida, orden Kinetoplastida, y pasan a través de diferentes etapas morfológicas en sus huéspedes vertebrados e invertebrados.[69]

1.2.1.2.- El vector

La enfermedad de Chagas es trasmitida a seres humanos a través de insectos redúvidos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*. Se han identificado más de 130 especies de insectos triatominos, sin embargo, sólo unas cuantas son vectores competentes de *T. cruzi*.[68]

Las especies más importantes implicadas en la transmisión de *T. cruzi* a humanos son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Estas especies suelen vivir en grietas y rincones de casas precarias, comunes en las zonas rurales de Latinoamérica.[68,70] *T. infestans* es el vector principal en las regiones

endémicas sub amazónicas (países del cono sur) mientras que, *R. prolixus* es típico de Centroamérica y del norte de Suramérica. Por otra parte, la especie *T. dimidiata* ocupa un área similar a *R. prolixus,* pero además se extiende hacia el norte hasta México.[68]

1.2.1.3.- El reservorio animal

El parásito *T. cruzi* ha sido aislado de más de 150 especies de mamíferos salvajes y domésticos, en zonas que abarcan desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina.[68,69] Los huéspedes silvestres típicos son comadrejas, armadillos y roedores. En el ámbito doméstico, los perros constituyen un excelente reservorio. Los gatos, los cobayos y los conejos también pueden estar infectados. A diferencia de los humanos, estos animales pueden adquirir *T. cruzi* por comer insectos infectados.[71]

La falta de especificidad por el huésped, y el hecho de que los mamíferos infectados tienen parasitemias de por vida, resulta en un inmenso reservorio selvático y doméstico en las áreas enzoóticas.[69]

1.2.1.4.- Ciclo de vida el parásito

El agente etiológico del mal de Chagas tiene un ciclo de vida complejo, que involucra un huésped vertebrado y un insecto redúvido hematófago. El vector se infecta cuando ingiere tripomastigotes circulantes, contenidos en la sangre de mamíferos infectados. Los tripomastigotes son formas infectivas, no divisibles, del parásito. Una vez en el intestino medio del vector, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes, forma morfológica flagelada que se multiplica extracelularmente. Los epimastigotes migran al intestino posterior del insecto y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son diseminados con las heces al momento de una picadura.[68-70]

Los tripomastigotes metacíclicos, no divisibles, entran al huésped mamífero a través de la herida producida por la picadura del vector, o a través de membranas mucosas intactas. Una vez dentro del huésped, los tripomastigotes invaden las células cercanas al sitio de inoculación, y se diferencian en

amastigotes. Esta forma intracelular se replica por fisión binaria. Luego de aproximadamente 72 horas de infección los amastigotes se empiezan a transformar en tripomastigotes. Posteriormente, luego de 96 horas de infección, se completa el primer ciclo intracelular del parásito, y el gran número de tripomastigotes en la célula produce la ruptura de la misma. De esta forma, los tripomastigotes liberados pueden invadir nuevas células, e iniciar nuevos ciclos de replicación, o bien infectar a los vectores que se alimenten del huésped (**Figura 1.21**).[68-70,72]

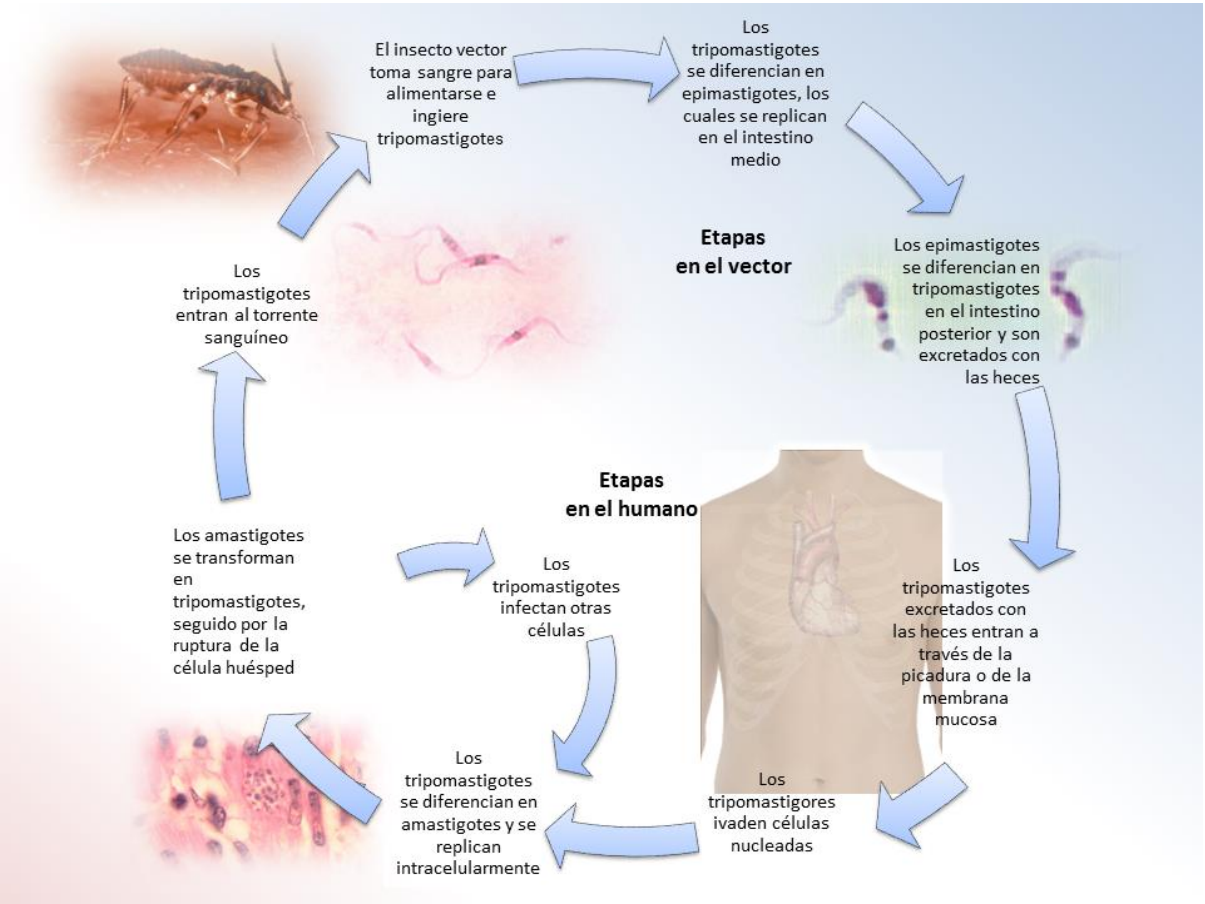


Figura 1.21. Ciclo de vida de *T. cruzi* (Adaptado de Bern, 2015).[70]

1.2.1.5.- Transmisión

La transmisión de *T. cruzi*, a un huésped mamífero, ocurre cuando las heces del vector, que contienen la forma infectiva del parásito, entran en contacto con membranas mucosas, o heridas en la piel del huésped. Cuando el insecto vector pica a un humano para alimentarse, defeca cerca del sitio de la picadura y deposita sus heces, sobre la piel del sujeto. Por lo general, la persona se frota

instintivamente, empujando las heces del insecto hacia la herida producida por la picadura, los ojos o la boca. Este mecanismo, es la principal vía de transmisión del parásito en América Latina.[54]

La enfermedad de Chagas también se puede transmitir al hombre por mecanismos no vectoriales, como transfusión sanguínea y transmisión congénita. Estos mecanismos son las principales formas de infestación de seres humanos, en zonas urbanas y en países no endémicos.[68] Ocasionalmente, la enfermedad de Chagas se puede contraer por ingestión de comida o líquidos contaminados con *T. cruzi*, o por accidentes de laboratorio. Usualmente, la transmisión oral del parásito es responsable de brotes regionales de infección aguda, en áreas desprovistas de insectos vectores domiciliarios.[68,73]

1.2.2.- EPIDEMIOLOGÍA

Originalmente, la enfermedad de Chagas estaba restringida a las zonas rurales pobres, de América Latina. Durante las últimas décadas, millones de personas infectadas migraron de las áreas rurales endémicas a las ciudades, y cientos de miles viven ahora en Estados Unidos, España y otros países fuera de Latinoamérica. El destino más común de quienes migran de América Latina es Estados Unidos, donde se estima que 300 mil individuos están infectados con *T. cruzi*. España tiene el segundo mayor número de inmigrantes infectados, un estimado de 70 mil, la mayoría provenientes de países como Ecuador, Argentina, Bolivia y Perú.[70]

En 1985, de acuerdo a estudios epidemiológicos realizados en 18 países endémicos, se estimó que 100 millones de personas (25% de la población de América Latina) estaban en riesgo de contraer la infección y que 17,4 millones de personas estaban infectadas. Gracias a iniciativas regionales, basadas en el control del vector y en el despistaje de *T. cruzi* en los bancos de sangre, la prevalencia de la infección disminuyó significativamente a 5,7 millones de personas en 2010. Sin embargo, la enfermedad de Chagas continúa siendo la enfermedad parasitaria más importante en el hemisferio occidental, con una carga de enfermedad, calculada en base a los años de discapacidad, 8 veces mayor a la de la malaria.[68]

1.2.3.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.2.3.1.- Fase aguda

Luego de la transmisión de *T. cruzi* por el insecto vector**,** el período de incubación es de 1 a 2 semanas. El sello distintivo de la fase aguda es la parasitemia detectable al microscopio. Usualmente, los síntomas son leves y no específicos y pueden incluir fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica.[70] Si el parásito entra a través de una conjuntiva, el paciente puede desarrollar un edema periorbital indoloro, conocido como el signo de Romaña. Por otra parte, también se puede producir una lesión inflamatoria en el sitio de inoculación, conocida como chagoma.[69]

La gran mayoría de las infecciones agudas no son detectadas. En menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es severa y potencialmente mortal debido a meningoencefalitis o miocarditis. La transmisión oral de *T. cruzi*, por la ingestión de comidas o bebidas contaminadas con las heces del vector, parece estar asociada con una mayor incidencia de miocarditis y una mayor tasa de mortalidad en la fase aguda, que la transmisión vectorial.[70]

En la mayoría de los pacientes (90% de los individuos infectados) los síntomas de la fase aguda se resuelven espontáneamente, al cabo de 4 u 8 semanas.[70] Estos individuos pasan a la fase indeterminada de la enfermedad, caracterizada por la falta de síntomas y la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi*.[69,70]

1.2.3.2.- Fase crónica

La mayoría de los pacientes con infecciones crónicas permanecen en la fase indeterminada (asintomática) de por vida. Sin embargo, entre 10 y 30% de estos pacientes desarrollan una forma sintomática de la enfermedad.[69] Por lo general, los síntomas aparecen años o incluso décadas después de haber adquirido la infección. La consecuencia más frecuente de la infección crónica por *T. cruzi* son los problemas cardíacos, que resultan de la infiltración de células mononucleares y de la fibrosis difusa. Este proceso inflamatorio crónico afecta el sistema de

conducción y el músculo cardíaco.[69] La destrucción progresiva de las fibras cardíacas y la fibrosis intensa predispone al paciente a la falla cardíaca y a arritmias ventriculares.[68] Las arritmias pueden causar mareos, síncopes y muerte súbita, siendo esta última la principal causa de muerte en pacientes con miocardiopatía chagásica.[68,69]

La segunda consecuencia más común, de la infección crónica por *T. cruzi*, es la disfunción del tracto gastrointestinal.[69] Esta variante de la enfermedad de Chagas afecta principalmente el esófago, el colon, o ambos.[70] En los pacientes con disfunción esofágica severa, o megaesófago, son comunes los episodios recurrentes de neumonía por aspiración. Una infección pulmonar, combinada con desnutrición o caquexia, puede producir la muerte.[69] Además, en estos pacientes, se ha informado una mayor incidencia de cáncer de esófago.[68-70]

Los pacientes con colopatía chagásica (megacolon) sufren de estreñimiento crónico y dolor abdominal. La obstrucción aguda del intestino, en pacientes con megacolon avanzado, puede producir perforación, septicemia y, subsecuentemente, la muerte.[69]

La forma digestiva de la enfermedad de Chagas se observa casi exclusivamente en los países del sur de la cuenca amazónica (Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y partes de Brasil). Es probable que esta distribución geográfica se deba a las diferencias en el genotipo predominante de *T. cruzi*.[68,70]

1.2.4.- PATOGÉNESIS

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, el daño de los órganos y tejidos es causado por la respuesta inmunoinflamatoria del huésped, desencadenada por la presencia del parásito.[69,70] Si bien el rol del parásito en la patología de la fase aguda está establecido, la patogénesis de la fase crónica no se conoce completamente. Originalmente, la ausencia aparente de parásitos en las lesiones inflamatorias del corazón y del tracto gastrointestinal, y la presencia de respuestas autoinmunes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, llevaron a postular que el factor principal implicado en la patogénesis de la fase crónica era el fenómeno autoinmune.[53,69] De acuerdo a esta hipótesis, una vez establecida la respuesta autoinmune en el huésped, la persistencia del parásito no jugaría un rol

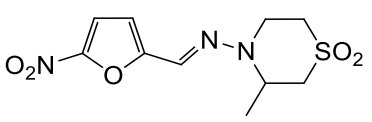
fundamental en el desarrollo de la patología. Inclusive, un tratamiento antiparasitario exitoso no mejoraría los síntomas de los pacientes. Esta hipótesis postergó por muchos años el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad, por ser considerado irrelevante.[53]

Posteriormente, se fue acumulando evidencia que cuestionaba la hipótesis autoinmune de la patología de la enfermedad de Chagas. Por ejemplo, usando métodos basados en PCR, se comprobó la presencia del parásito en las lesiones inflamatorias de pacientes con cardiopatía chagásica y enfermedad de Chagas gastrointestinal. Además, se observó una correlación entre la carga del parásito, la intensidad del proceso inflamatorio y la severidad de la enfermedad. Por otra parte, se verificó la exacerbación de la infección por *T. cruzi*, y de la subsecuente enfermedad, en pacientes inmunosuprimidos.[74]

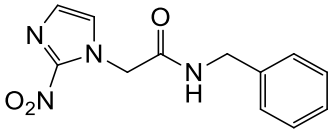
Actualmente, se considera que la persistencia del parásito, aunada a una respuesta inmune desequilibrada, que podría incluir reacciones autoinmunes, conduce a la inflamación persistente, responsable de las lesiones características de la fase crónica de la enfermedad. Por lo tanto, la erradicación del parásito debe ser un prerrequisito para detener la evolución de la enfermedad de Chagas, y evitar sus consecuencias a largo plazo.[74]

1.2.5.- TRATAMIENTO

La quimioterapia para la enfermedad de Chagas se basa principalmente en dos compuestos nitroheterocíclicos, nifurtimox (Lampit®, Bayer-E1, **21**) y benznidazol (Abarax®, ELEA-Argentina, **22**). La actividad anti *T. cruzi* de estas drogas fue descubierta empíricamente, hace más de cuatro décadas (**Figura 1.22**).[74] Desde 2012, benznidazol se produce por laboratorios ELEA y Maprimed, Argentina y se comercializa como Abarax®.[75]



Nifurtimox, **21**



Benznidazol, **22**

Figura 1.22. Estructura de compuestos con actividad anti *T. cruzi*.

Varios estudios han esclarecido las bases moleculares de la actividad anti *T. cruzi* de ambos compuestos. Nifurtimox (**21**), ahora descontinuado, actúa *via* la reducción del grupo nitro a radicales inestables, que reaccionan a su vez para producir metabolitos de oxígeno reducido, como anión superóxido y peróxido de hidrógeno, altamente tóxicos. Se ha mostrado que el parásito *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación de metabolitos tóxicos de oxígeno, por lo que es más sensible al estrés oxidativo que las células de vertebrados. Benznidazol (**22**), en cambio, parece actuar por un mecanismo diferente, que implica la modificación covalente de macromoléculas por intermediarios de nitro reducción. Ambos compuestos tienen actividad significativa en la fase aguda, con hasta 80% de cura parasitológica en los pacientes tratados.[74]

Nifurtimox y benznidazol tienen efectos secundarios significativos, probablemente como consecuencia del daño oxidativo, o reductivo, en los tejidos del huésped. Estos efectos secundarios (anorexia, vómito, polineuropatía periférica y dermopatía alérgica) pueden llevar a la interrupción del tratamiento. Sin embargo, la mayor limitación de estos compuestos es su baja actividad antiparasitaria en la fase crónica de la enfermedad, ya que la cura parasitológica se observa en menos de 20% de los pacientes.[69,74]

Dado que es necesario eliminar el parásito para frenar el progreso de la enfermedad, y que las drogas disponibles no son efectivas en la fase crónica, la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios, basada en el conocimiento actual de la biología de *T. cruzi*, es un tópico de enorme interés.

1.3.- TOXOPLASMOSIS

El agente responsable de la toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, es considerado uno de los organismos parasitarios más exitosos en el mundo, puesto que es capaz de infectar a todos los animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos. En efecto, se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *T. gondii*. En la mayoría de los casos la infección es asíntomática, sin embargo, puede ser fatal para el feto en desarrollo e individuos inmunosuprimidos. En 1980, la toxoplasmosis surgió como la principal causa de muerte en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfatizando la importancia del sistema inmune en el control de la infección.[76]

1.3.1.- ETIOLOGÍA

1.3.1.1.- El parásito

T. gondii fue descripto por primera vez en 1908. Nicolle y Manceaux identificaron el parásito en el roedor norafricano *Ctenodactylus gundi*. Los gundis viven en las laderas de las montañas al sur de Túnez, y eran comúnmente utilizados en el Instituto Pasteur para estudiar *Leishmaniasis*. Ese mismo año, en Sao Paulo, Splendore identificó el parásito en conejos. Posteriormente, el nombre *Toxoplasma gondii* (*toxo*: arco, *plasma*: vida) fue propuesto por Nicolle y Manceaux, de acuerdo a la morfología de las etapas infectivas del parásito, observadas en el roedor.[76-78]

En 1960, el uso de microscopía electrónica permitió identificar una variedad de organelas singulares en *T. gondii*. Otros estudios, realizados independientemente, identificaron organelas similares en parásitos que, hasta el momento, se consideraba que no estaban relacionados con *T. gondii*, como especies de *Plasmodium* y *Eimeria*. El descubrimiento del ciclo de vida de *T. gondii*, combinado con estudios ultraestructurales comparativos, llevó a proponer un cambio importante en la clasificación de los protozoarios, con la creación de un nuevo filo. De esta forma se propuso el filo Apicomplexa, que contiene parásitos de interés médico y veterinario como los géneros *Babesia*,

Theilera, *Plasmodium*, *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Neospora* y *Cryptosporidium*. A partir de este momento, fue posible mostrar una estrecha relación entre parásitos que causan enfermedades graves en humanos, como malaria, toxoplasmosis y criptosporidiosis.[77]

1.3.1.2.- Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es complejo y no fue elucidado por completo sino hasta 1970 (**Figura 1.23**).[79] Las etapas asexuales de *T. gondii* pueden causar enfermedad en humanos y otros animales de sangre caliente. Existen dos formas asexuales. La primera, llamada taquizoito, puede invadir todo tipo de células y se divide rápidamente, produciendo la muerte celular. La segunda forma, conocida como bradizoito, se divide lentamente y forma quistes, mayoritariamente en los músculos y en el cerebro. La replicación de los taquizoitos causa la toxoplasmosis aguda, mientras que los bradizoitos enquistados son los responsables de mantener la infección latente. Los quistes en los tejidos no producen inflamación y, presumiblemente, tienen poco efecto en la función celular circundante hasta que se rompen y liberan los bradizoitos, que se pueden convertir en taquizoitos y causar necrosis e inflamación. La reactivación de los bradizoitos de los quistes produce la reactivación de la enfermedad, en pacientes inmunosuprimidos.[80]

Todos los animales de sangre caliente, incluyendo las aves, constituyen el reservorio de la infección en la naturaleza.[76] Los animales de consumo humano, especialmente las ovejas, los cerdos y las cabras, pueden hospedar quistes en los músculos, que son infecciosos para las personas, y otros carnívoros, cuando son ingeridos en carne cruda o poco cocida. Por otra parte, los roedores y los pájaros ingeridos por los gatos mantienen el ciclo sexual.[80]

Si bien la especificidad de *T. gondii* por el huésped intermediario es muy baja, la especificidad por el huésped definitivo (donde ocurre la reproducción sexual) está restringida a los félidos.[81] Cuando los gatos cazan ratones, o pájaros, infectados, ingieren los quistes con bradizoitos. Subsecuentemente, la pared del quiste se disuelve y los bradizoitos son liberados en el intestino delgado del felino. El parásito infecta las células epiteliales del intestino delgado, y se reproduce asexualmente. Después de varios ciclos de proliferación asexual, los parásitos se

diferencian en microgametocitos y macrogametocitos. Luego de la maduración de los gametocitos y la fertilización del macrogameto, se forma una pared alrededor del parásito, que le confiere resistencia química y física al ooquiste. Posteriormente, las células infectadas se rompen y los ooquistes son liberados al exterior, en las heces del gato.[77,79,81]

Luego de ser liberados, los ooquistes requieren exponerse al aire, para esporular completamente. Los ooquistes de *T. gondii* son bastante robustos, y pueden sobrevivir en suelos húmedos o arena hasta por 18 meses.[76,80]

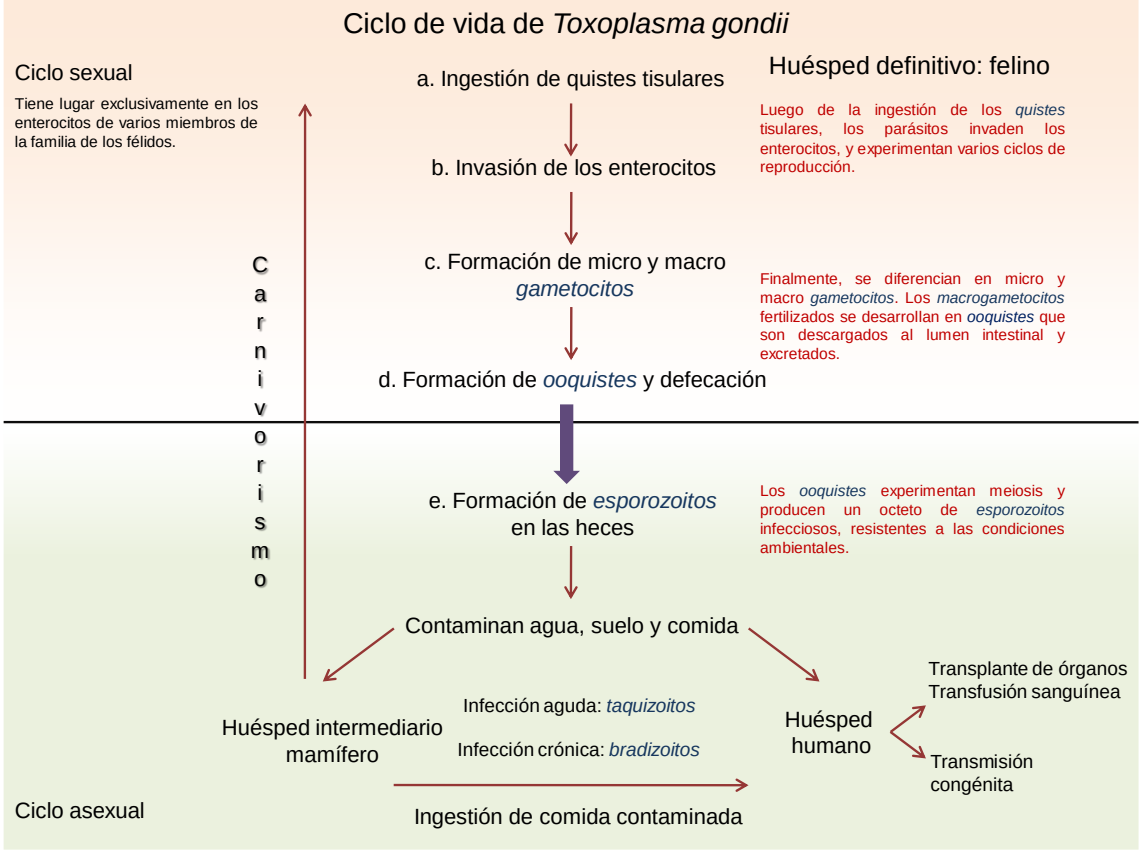


Figura 1.23. Ciclo de vida de *T. gondii* (Adaptado de Rodríguez, 2012).[82]

1.3.1.3.- Transmisión

La infección por *T. gondii* puede ser congénita, o adquirida después del nacimiento. La infección congénita ocurre sólo cuando una mujer se infecta durante el embarazo.[83] La habilidad del parásito de cruzar la placenta depende las características anatómicas de la misma, que cambian dependiendo de la etapa de gestación. En efecto, las infecciones congénitas adquiridas durante el primer

trimestre son más severas que las adquiridas en el segundo y tercer trimestre.[80] Si bien es poco común que la madre presente síntomas, el parásito puede desarrollar lesiones focales en la placenta, e infectar al feto. Los niños con infección congénita pueden presentar una variedad de síntomas. Los síntomas leves incluyen visión disminuida, mientras que, los niños con enfermedad severa pueden presentar retinocoroiditis, hidrocefalia, convulsiones y calcificación intracelular. Si bien la hidrocefalia es poco común, es la consecuencia más dramática de la toxoplasmosis congénita.[83]

La transmisión congénita de *T. gondii* también puede ocurrir en varias especies de animales, particularmente ovejas y roedores.[81] De hecho, la infección por *T. gondii* ha sido reconocida como la principal causa de aborto en ovejas, alrededor del mundo.[76]

Puesto que los bradizoitos, contenidos en los quistes tisulares, persisten indefinidamente en el huésped intermediario, *T. gondii* se puede transmitir a través del consumo de carne de animales infectados.[77,81] Los animales de consumo humano con mayor seroprevalencia de *T. gondii* incluyen cerdos, ovejas y cabras. Además, se ha demostrado que la incidencia de toxoplasmosis es mayor en países donde es común comer carne cruda o poco cocida.[76,77,81]

El consumo de carne de animales infectados explicaba la incidencia de la infección en carnívoros. Sin embargo, este mecanismo de transmisión no justificaba la prevalencia de la enfermedad en animales herbívoros, o en personas estrictamente vegetarianas. Luego de la identificación de ooquistes de *T. gondii*, en las heces de gatos infectados, se propuso que la infección podía ser adquirida a través del consumo de agua o alimentos contaminados.[76,77,81]

1.3.2.- EPIDEMIOLOGÍA

En 1948, Sabin y Feldman desarrollaron un test serológico, basado en la identificación de anticuerpos específicos contra *T. gondii* en el suero del paciente.[76,77] La implementación de este test permitió identificar la presencia del parásito, en una gran cantidad de humanos y animales domésticos. La infección por *T. gondii* pasó de ser considerada inusual, a ser una de las infecciones parasitarias más comunes en humanos.[77]

La capacidad de *T. gondii* de infectar a varias especies de animales, y su distribución a nivel mundial, lo diferencian de otros miembros del filo Apicomplexa, que se caracterizan por tener alta especificidad por el huésped, y estar limitados a una zona geográfica.[80] La presencia de *T. gondii* ha sido verificada en todos los continentes. Sin embargo, la ausencia del parásito en algunas islas del pacífico, donde no hay gatos, ha confirmado la importancia del felino en la transmisión natural de *T. gondii*.[81] La capacidad de infectar pájaros, animales domésticos y personas, por varias rutas posibles, y la amplia distribución del parásito, son las causas más probables de la alta prevalencia de la infección en humanos.[80]

Aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *T. gondii*. La mayoría de las infecciones son asíntomaticas, sin embargo, los síntomas pueden ser severos en pacientes inmunosuprimidos, y en niños con infección congénita.[80] El impacto socio económico de la toxoplasmosis, en cuanto al sufrimiento humano y el costo de cuidar a niños enfermos, especialmente a aquellos con retraso mental y ceguera, es enorme.[83]

La alta prevalencia de la infección por *T. gondii* a nivel mundial, en una gran variedad de huéspedes, indica un alto grado de contaminación ambiental con este parásito.[76] En efecto, se han informado varios casos de brotes de infección regional, causados por la ingesta de agua contaminada.[76,80] Adicionalmente, se ha comprobado la presencia de *T. gondii* en mamíferos marinos como nutrias, delfines y ballenas.[76,81] Esto sugiere que los ooquistes de *T. gondii* han estado siendo arrastrados al océano, por corrientes de agua dulce contaminada con heces de gatos infectados. Por lo tanto, es de extrema importancia concientizar a la población sobre el manejo adecuado de las heces de los gatos, para evitar la contaminación del ambiente.[76]

1.3.3.- TOXOPLASMOSIS EN EL HUÉSPED INMUNOSUPRIMIDO

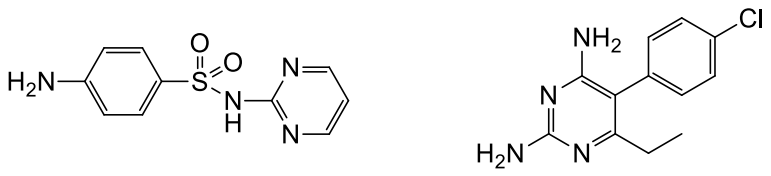
Entre los años sesenta y setenta, se encontró que los individuos inmunocomprometidos, como el feto en desarrollo, las personas con cáncer linfático y las personas bajo tratamiento inmunosupresor, eran más vulnerables a experimentar los síntomas severos atribuibles a la infección por *T. gondii*. La

importancia del sistema inmune, en la protección del huésped contra el parásito, fue enfatizada notablemente con la aparición, en 1980, del síndrome de inmuno deficiencia adquirida (SIDA). Puesto que el parásito persiste en los quistes tisulares, durante toda la vida del huésped, cuando el sistema inmune se ve comprometido, como resultado de una infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la infección puede recrudecer, y el parásito puede volver a multiplicarse activamente en los sitios de infección persistente. En los pacientes con SIDA, la toxoplasmosis se manifiesta principalmente como encefalitis severa.[76]

Con la aparición de terapias anti retro virales altamente activas, la mortalidad asociada a *T. gondii* en pacientes con SIDA ha disminuido notablemente. Sin embargo, la toxoplasmosis continúa siendo una de las principales infecciones oportunistas en pacientes con HIV.[76]

1.3.4.- TRATAMIENTO

El tratamiento actual de la toxoplasmosis, efectivo en 75 a 89% de los casos, consiste en una combinación de los antifolatos sulfadiazina (**23**) y pirimetamina (**24**).[84] Estos compuestos son efectivos contra la forma intracelular del parásito, en la etapa aguda de la enfermedad. Sin embargo, estas drogas no son efectivas contra los bradizoitos, asociados a la etapa crónica de la enfermedad (**Figura 1.24**).[76,77,84]

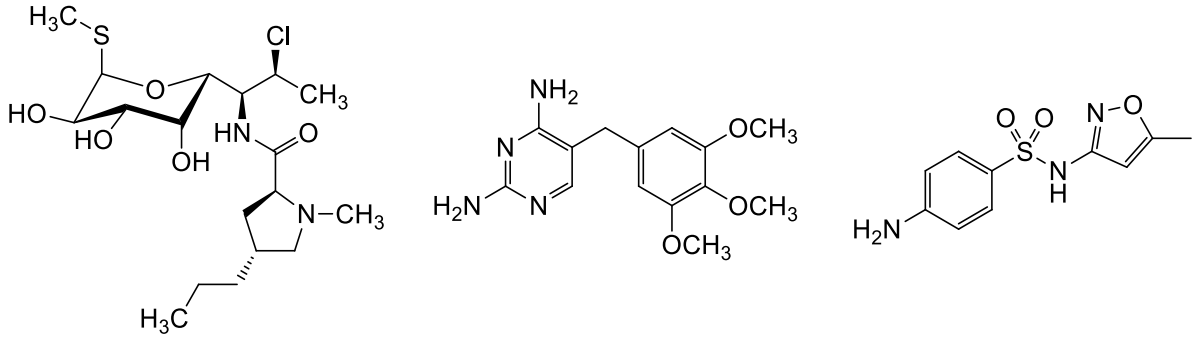


Sulfadiazina, **23** Pirimetamina, **24**

Figura 1.24. Estructura de drogas utilizadas para el tratamiento de la toxoplasmosis.

El tratamiento combinado de sulfadiazina y pirimetamina exhibe numerosas limitaciones, como por ejemplo, baja tolerabilidad, efectos secundarios graves, acceso limitado en algunos países, altos costos, y la falta de una forma de administración endovenosa.[84] Otras combinaciones de drogas, como

pirimetamina (**24**) – clindamicina (**25**) y trimetoprima (**26**) – sulfametoxazol (**27**), han sido evaluadas contra toxoplasmosis (**Figura 1.25**). Sin embargo, ninguna de estas combinaciones es efectiva contra los quistes tisulares por lo que, luego de la interrupción del tratamiento, puede ocurrir un recrudecimiento de la infección.[76,77]



Clindamicina, **25** Trimetoprima, **26** Sulfametoxazol, **27**

Figura 1.25. Otros agentes utilizados para el tratamiento de la toxoplasmosis.

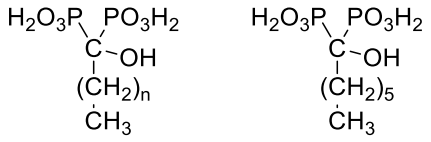
En pacientes inmunocompetentes, los bradizoitos liberados por la ruptura de un quiste tisular son atacados de manera efectiva por el sistema inmune. Sin embargo, en pacientes inmunosuprimidos, los bradizoitos se pueden convertir en taquizoitos, e invadir nuevas células.[77] La persistencia del parásito en los tejidos, en forma de quistes, determina la necesidad de encontrar nuevos agentes anti *T. gondii* que puedan ser utilizados en tratamientos a largo plazo.

Capítulo 2:

2-Alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos

2.1.- ANTECEDENTES

En 1999, luego de verificar que PPi (**1**) era el compuesto con fósforo más abundante en las formas replicativas de *T. cruzi*, se evaluó el efecto de algunos bisfosfonatos, utilizados para el tratamiento de trastornos óseos, en el crecimiento de la forma intracelular del parásito. Se encontró que pamidronato (**7**), alendronato (**8**) y risedronato (**12**) inhibían la proliferación de amastigotes de *T. cruzi in vitro* (ED_{50} = 65 μM, 65 μM y 300 μM respectivamente), sin toxicidad para las células huésped. Además, pamidronato resultó ser efectivo *in vivo*, disminuyendo la parasitemia en ratones con infección aguda de *T. cruzi*.[55] Se propuso que estos bisfosfonatos ejercían su acción antiparasitaria, acumulándose selectivamente en los acidocalsisomas, equivalentes en composición a la hidroxiapatita ósea.[65] Puesto que, los estudios de relación estructura química actividad biológica habían señalado que la presencia del grupo hidroxilo en C-1 aumentaba la afinidad por el mineral óseo,[15] se sintetizó una serie de 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos **28**, y se evaluó su actividad contra amastigotes de *T. cruzi*. Estos compuestos resultaron potentes inhibidores contra la forma intracelular del parásito. En efecto, el compuesto **29** exhibió un valor de ED_{50} de 18 μM, siendo más potente que pamidronato y alendronato (**Figura 2.1**).[85]

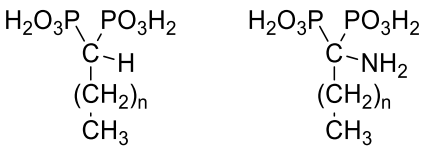


28 **29**

Figura 2.1. Estructura de 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos.

Posteriormente, se encontró que los bisfosfonatos de fórmula general **28** ejercían su acción antiparasitaria inhibiendo la actividad enzimática de *Tc*FPPS.[52] Este hallazgo fue muy importante porque los 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos carecen de átomos de nitrógeno. Por lo tanto, no podrían actuar como análogos del estado de transición carbocatiónico de la enzima, como se había propuesto previamente por Oldfield y colaboradores, para los bisfosfonatos nitrogenados de uso clínico **7**-**14**.[50] Para evaluar el efecto del grupo hidroxilo en la actividad biológica, se sintetizó una serie de 1,1-bisfosfonatos de fórmula **30**, donde el hidroxilo en C-1

había sido reemplazado por un átomo de hidrógeno. Estos compuestos fueron mucho menos efectivos contra la forma intracelular del parásito. Por tanto, se propuso que la actividad contra amastigotes de *T. cruzi* se debía a la capacidad de los bisfosfonatos **28** de coordinar iones Mg^{2+} de manera tridentada, debido a la presencia del grupo hidroxilo en C-1 (**Figura 2.2**).[52]

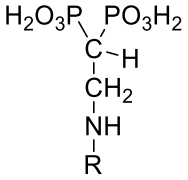


30 **31**

Figura 2.2. Estructura de 1,1-bisfosfonatos y 1-amino-1,1-bisfosfonatos.

Para seguir evaluando el efecto del sustituyente en C-1, se sintetizó una serie de 1-amino-1,1-bisfosfonatos **31** (**Figura 2.2**). Estos compuestos mantendrían la capacidad de coordinar iones Mg^{2+} de manera tridentada. En efecto, estos compuestos fueron más potentes que los 1,1-bisfosfonatos de fórmula **30** contra amastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, seguían siendo menos efectivos que los 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos de fórmula **28**.[86]

Por otra parte, los derivados 2-alquilaminoetil bisfosfónicos son muy interesantes desde el punto de vista de la química de coordinación. En efecto, la evaluación biológica de estos derivados ha señalado que son potentísimos inhibidores de la proliferación de *T. cruzi* (amastigotes) y de la actividad enzimática de *Tc*FPPS.[87,88] Por ejemplo, **34** (R = *n*-hexilo) exhibió un ED_{50} de 0,84 μM contra *T. cruzi* (amastigotes) y un IC_{50} de 0,49 μM hacia *Tc*FPPS, mientras que **35** (R = *n*-heptilo) presentó un IC_{50} de 0,058 μM contra la enzima blanco (**Figura 2.3**).[87] Estos 2-alquilaminoetil bisfosfonatos habían sido diseñados originalmente para mantener la capacidad de coordinación con Mg^{2+} de manera tridentada, en el sitio activo de *Tc*FPPS y *Tb*FPPS, como se creía que ocurría con 1-hidroxi y 1-amino-bisfosfonatos.[52,86] Sin embargo, los estudios cristalográficos de **35** (R = *n*-heptilo) con *Tc*FPPS indicaron que el átomo de nitrógeno no coordinaba iones Mg^{2+} en el sitio activo.[12,39] La estructura de coordinación tridentada está circunscripta a los grupos hidroxilo unidos a los átomos de fósforo, tanto en 2-alquilaminoetil- como en 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos.[67,89]

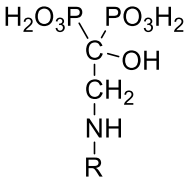


32, R = *n*-propil
33, R = *n*-pentil
34, R = *n*-hexil
35, R = *n*-heptil

Figura 2.3. Estructura de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos.

Se conoce que los grupos atractores de electrones en C-1 afectan los valores de pK_a de los fosfonatos, influenciando la capacidad de la unidad *gem*-bifosfonato de coordinar cationes divalentes, como Ca^{2+} y Mg^{2+}.[90-93] Particularmente, el grupo hidroxilo en C-1 puede incrementar los valores de acidez hasta un orden de magnitud.[94-97] Por lo general, la selección del sustituyente en C-1 es ajustada para mimetizar el valor de pK_a del ácido pirofosfórico. Hasta el momento, no se ha esclarecido la influencia del grupo hidroxilo en C-1 en la actividad biológica. Como este grupo no participa activamente en la coordinación con iones Mg^{2+}, su rol podría ser modificar la capacidad de la funcionalidad bisfosfonato adyacente de quelar Mg^{2+}, al disminuír el pK_a de la unidad *gem*-bisfosfonato.[39]

Dado que los bisfosfonatos más potentes, obtenidos por nuestro grupo de investigación, habían sido los derivados 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfónicos, y que la mayoría de los bisfosfonatos de importancia farmacológica, empleados para tratamientos prolongados en trastornos óseos, poseen un hidroxilo en C-1, en este trabajo de tesis se propuso sintetizar 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos de fórmula **36**, esperando un efecto beneficioso para la actividad biológica entre el grupo hidroxilo en C-1 y el grupo amino en C-2 (**Figura 2.4**).

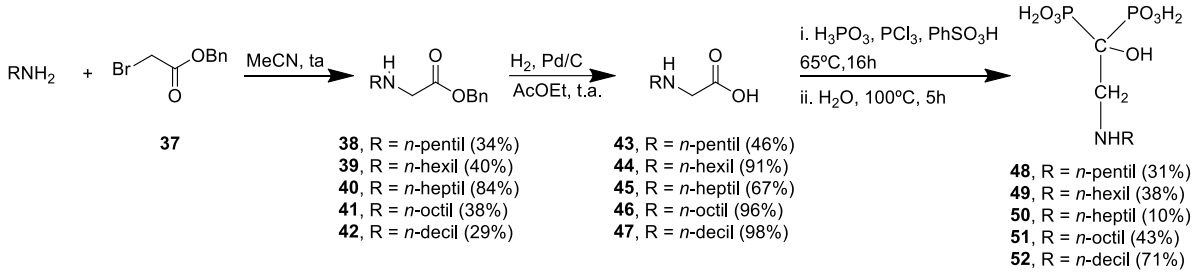


36

Figura 2.4. Estructura de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos.

2.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Para la síntesis de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos se siguió la ruta sintética ilustrada en el **Esquema 2.1**. En primer lugar, se obtuvieron los *n*-alquilaminoacetatos de bencilo **38**-**42** a partir de las aminas primarias correspondientes y bromoacetato de etilo (**37**), con rendimientos entre 29 y 84%. La reacción de sustitución nucleofílica se llevó a cabo en acetonitrilo, siguiendo procedimientos descriptos para la síntesis de *n*-alquilaminoacetatos similares.[98,99]



Esquema 2.1. Síntesis de 2-alquilamino-1-hidroxi-bisfosfonatos.

Los aminoácidos libres **43**-**47** se obtuvieron con rendimientos entre 46 y 98%, por hidrogenación catalítica de los *n*-alquilaminoacetatos correspondientes. Por último, los aminoácidos libres **43**-**47** fueron sometidos a las condiciones descriptas por Kieczykowski y colaboradores, para la síntesis de 1-hidroxi-bisfosfonatos a partir de ácidos carboxílicos.[100,101] Esta reacción consiste en la inserción de dos átomos de fósforo en el carbonilo de un ácido carboxílico, el cual por reacción con ácido fosforoso y tricloruro de fósforo, en medio anhidro y empleando como solvente ácido bencensulfónico, da lugar a los derivados 1,1-bisfosfónicos. Si bien el rendimiento es moderado, el uso de reactivos accesibles y de bajo costo hacen de esta reacción una alternativa sintética muy interesante. Los aminoácidos **43**-**47** se trataron con ácido fosforoso y tricloruro de fósforo en ácido bencénsulfónico a reflujo. Luego de 16 horas, se llevó a cabo la hidrólisis por tratamiento con agua a reflujo durante 5 horas, para obtener los compuestos **48**-**52**.

Todos los ácidos 1-[(*n*-alquilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos **48**-**52** fueron caracterizados por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. La pureza de estos compuestos se determinó por análisis elemental. A modo de ejemplo, en el espectro de RMN de

^{31}P de ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (**50**) sólo se observó un singulete a 15,31 ppm, ya que los dos átomos de fósforo presentes en la estructura son equivalentes (**Figura 2.5**).

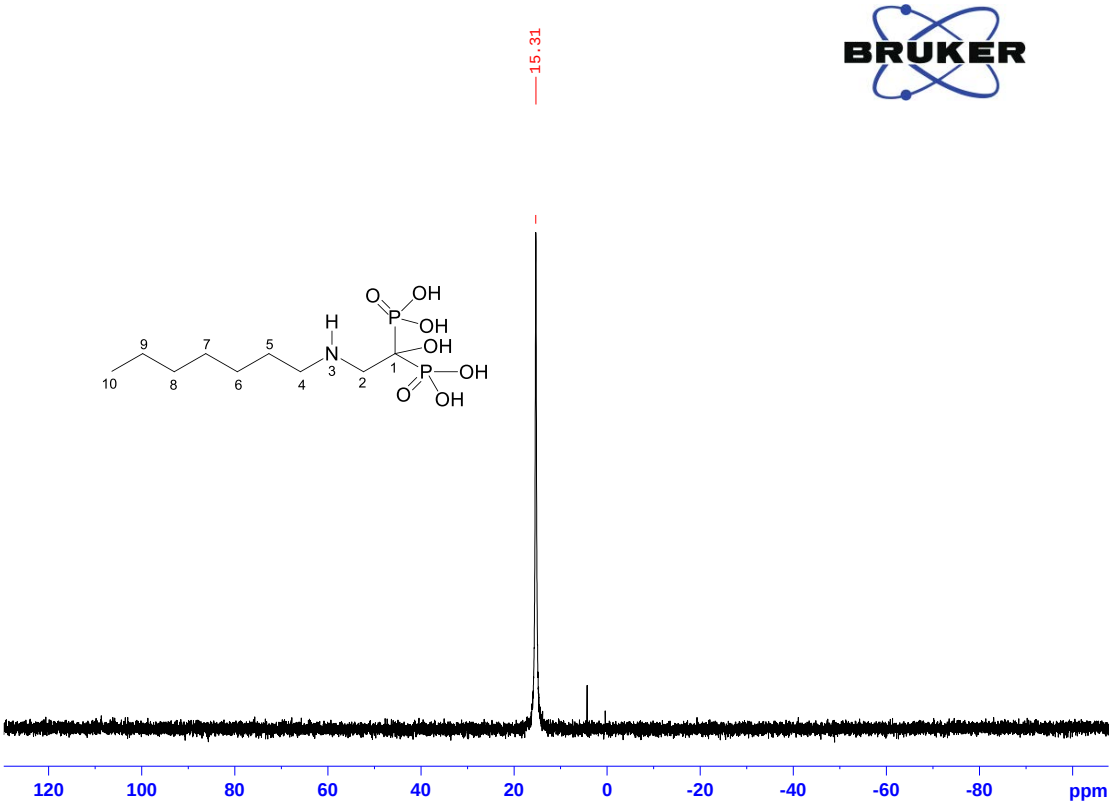


Figura 2.5. Espectro de RMN ^{31}P de ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (**50**).

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C de este compuesto, se observó un triplete centrado a 70,3 ppm, con una constante de acoplamiento de 137,7 Hz ($^{1}J_{C\text{-}P}$), correspondiente a la posición C-1, lo cual es típico para este arreglo de una unión *gem*-bisfosfónica. Además, se observaron otras ocho señales correspondientes a la cadena alifática. Las más representativas son a 49,9 ppm (C-2), 48,3 ppm (C-4) y 30,7 (C-5) (**Figura 2.6**).

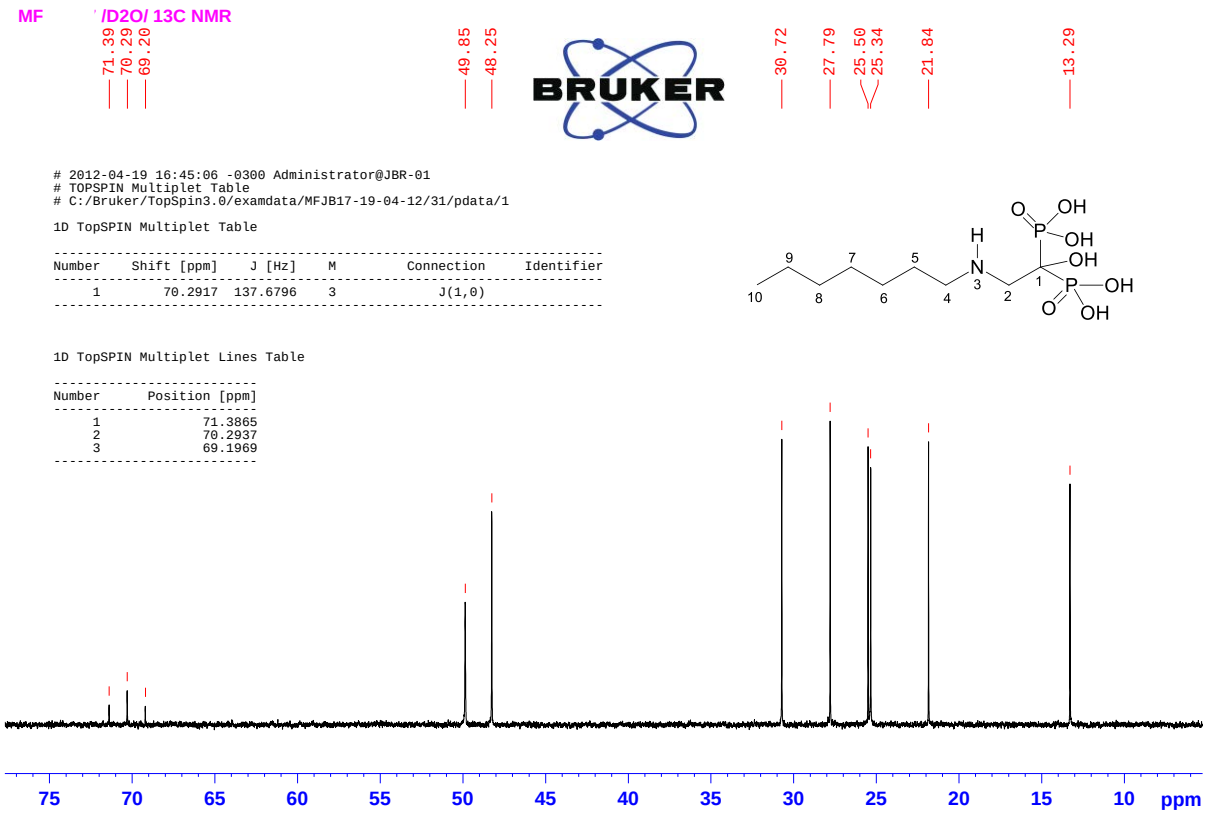


Figura 2.6. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (**50**).

En el espectro de RMN de ^{1}H los protones correspondientes al H-2 se observaban como un triplete centrado a 3,39 ppm, con una constante de acoplamiento de 11,7 Hz ($^{3}J_{H\text{-}P}$). Los protones asignados como H-4 aparecían como un triplete centrado a 3,01 ppm, con una constante de acoplamiento de 7,6 Hz ($^{3}J_{H\text{-}H}$). Los protones H-5 aparecían como un pseudoquintuplete, (δ = 1,60 ppm) ya que se acoplaban con los protones H-4 y H-6 con constantes de acoplamiento muy similares. La multiplicidad de esta señal no se puede definir como un quintuplete ya que, formalmente, los protones a los que se acopla H-5 no son químicamente equivalentes (**Figura 2.7**).

Por otra parte, los protones H-9 se observaban como un multiplete centrado a 1,24 ppm, mientras que los protones H-6, H-7 y H-8 aparecían como un multiplete centrado a 1,18ppm. Los protones H-10 se observaban como un triplete centrado a 0,90 ppm, con una constante de acoplamiento de 7,0 Hz ($^{3}J_{H\text{-}H}$) (**Figura 2.7**).

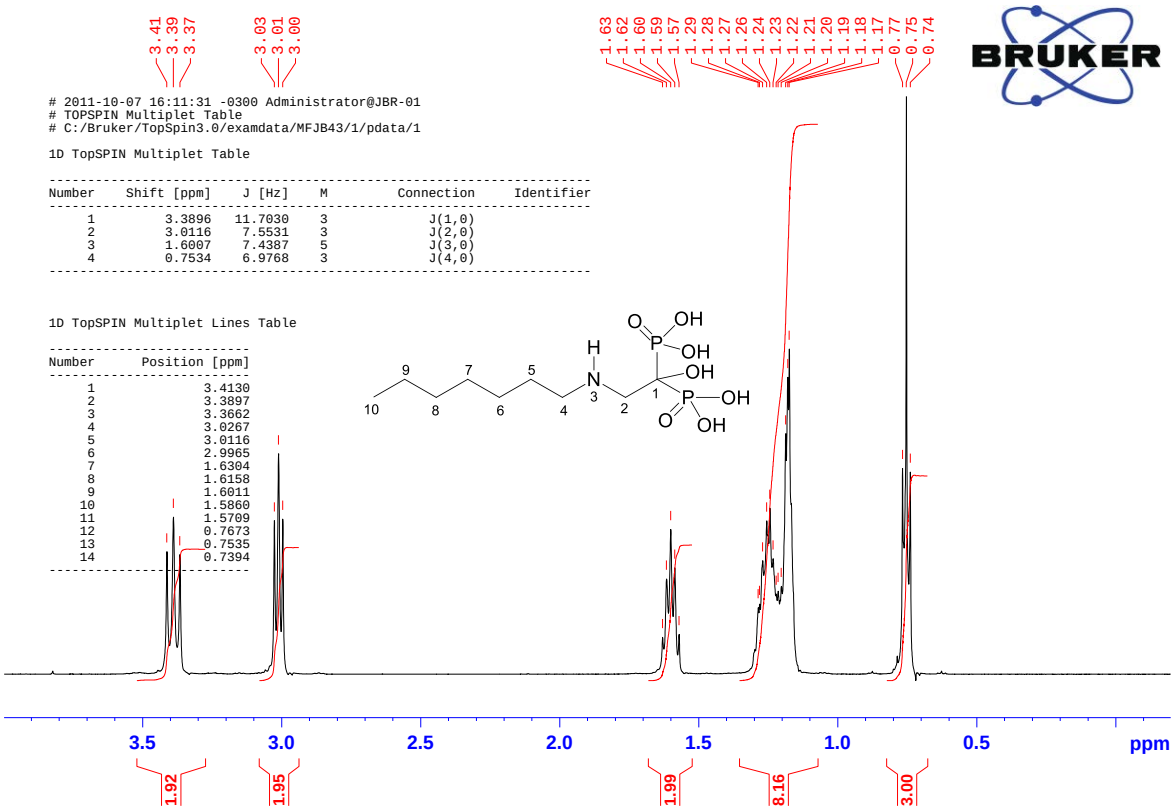


Figura 2.6. Espectro de RMN ^{1}H de ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (**50**).

2.3.- EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los conceptos de IC_{50} y ED_{50} son fundamentales en farmacología. La ED_{50} es la concentración requerida de un fármaco para reducir una respuesta máxima a la mitad, en general vinculada a una actividad no específica como inhibición del crecimiento celular, mientras que el término IC_{50} se define como la concentración requerida de un inhibidor en la respuesta (o enlace) para reducir una actividad específica a la mitad como la inhibición de una actividad enzimática.

La evaluación biológica de los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos dio lugar a resultados muy interesantes. Contrariamente a lo esperado, ninguno de los compuestos **48**-**52** resultó ser efectivo como inhibidor de la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*, ni como inhibidor de la actividad enzimática de la enzima blanco *Tc*FPPS. Sin embargo, algunos de estos compuestos resultaron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo, los bisfosfonatos **49** y **51** inhiben la actividad enzimática de *Tg*FPPS, exhibiendo valores de IC_{50} de 0,051 μM y 0,039 μM, respectivamente. Esta actividad enzimática estaba asociada

a una eficiente actividad celular, con valores de ED_{50} de 4,7 μM y 2,0 μM, respectivamente (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Evaluación biológica de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos contra *Tc*FPPS, *Tg*FPPS, amastigotes de *T.cruzi* y taquizoítos de *T. gondii*.

Compuesto	***Tc*FPPS** **IC_{50} (μM)**	**amastigotes de** *T.cruzi* **ED_{50} (μM)**	***Tg*FPPS** **IC_{50} (μM)**	**taquizoítos de** *T. gondii* **ED_{50} (μM)**
48	>10	>20	0,067 ± 0,064	>10
49	>10	>20	0,051 ± 0,006	4,68 ± 1,19
50	>10	>20	>1,0	≥10
51	>10	46 % a 10 μM, citotóxico a 10 μM	0,039 ± 0,033	2,00 ± 0,95
52	>10	42 % a 10 μM	0,125 ± 0,023	14,9 % a 10 μM
Benznidazol		1,44 ± 0,97		
Risedronato	0,027 ± 0,01	55,0 ± 5,0	0,074 ± 0,017	2,4 ± 0,7

La alta selectividad de los compuestos **48**-**52** hacia *Tg*FPPS, frente a *Tc*FPPS, se puede justificar por el hecho de que las secuencias de estas enzimas tienen menos de 50% de similitud.[102] Además, si se tiene en cuenta que *Tg*FPPS es una enzima bifuncional, que cataliza tanto la formación de FPP (15 átomos de C) como la formación de GGPP (20 átomos de C),[103,104] es razonable asumir que la actividad de esta enzima pueda ser inhibida por compuestos con cadenas carbonadas largas, estructuralmente similares a GGPP, a diferencia de *Tc*FPPS, que cataliza la formación de FPPS como único producto final.

2.4.- ESTUDIOS DE SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

La falta de actividad biológica de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos contra *T. cruzi* fue inesperada y no puede atribuirse simplemente a la presencia del grupo hidroxilo en C-1. De hecho, tanto el compuesto **29** como risedronato **12** tienen un grupo hidroxilo en C-1, y son activos contra *Tc*FPPS.[52,85,105] En risedronato, el átomo de nitrógeno está unido a C-4 mientras que en nuestros compuestos (**48**-**52**) está unido a C-2. Evidentemente, la posición de este átomo de nitrógeno tiene una fuerte influencia en la actividad biológica observada. La

remoción del grupo hidroxilo, manteniendo la posición del átomo de nitrógeno, resulta en 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos (**32**-**35**) extremadamente potentes contra *Tc*FPPS y amastigotes. Por tanto, la combinación estos dos grupos no produjo el efecto sinérgico esperado, sino, por el contrario, redujo drásticamente la actividad biológica.

Para intentar racionalizar esta conducta se hicieron estudios de simulación computacional, usando cálculos de teoría de funcional de la densidad (DFT). Para simplificar los cálculos, las estructuras **32a** y **36a** fueron consideradas como análogos de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos (**32**-**35**) y 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos **36**, respectivamente (**Figura 2.7**). Los análogos **32a** y **36a** fueron sometidos a minimizaciones de energía a nivel B3LYP/6-311+G(d,p), simulando la presencia de agua como solvente con el modelo del continuo polarizable (PCM). Para reproducir lo mejor posible las conformaciones de estos compuestos en el entorno biológico, se consideró que las moléculas **32a** y **36a** tenían los protones acídicos esperados a p*H* fisiológico (≈ 6,5). Es decir, dos átomos de hidrógeno acídicos para **32a** y uno sólo para **36a**.[95,96] Se adicionó un átomo de magnesio para completar cada molécula.

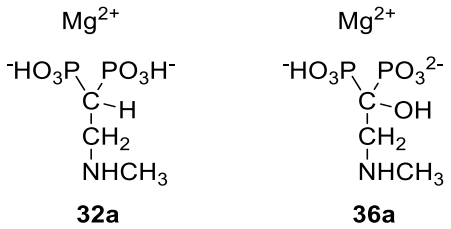


Figura 2.7. Modelos simplificados de **32** y **36** para estudios de modelado molecular.

Los resultados muestran que la minimización siempre lleva a la formación de un anillo de seis miembros que contiene a C-1, a los dos átomos de fósforo, a dos átomos de oxígeno y al átomo de magnesio, siendo la distancia entre cada O y el Mg de 1,91 – 1,96 Å. Sin embargo, los átomos "exocíclicos" generan diferentes patrones de enlace hidrógeno (incluso en el entorno acuoso simulado) con distintas geometrías y energías. Se sabe que la fuerza del enlace hidrógeno depende de la distancia entre el aceptor y el hidrógeno, y del ángulo donor-hidrógeno-aceptor; cuanto menor sea la distancia aceptor-hidrógeno, y más parecido a 180º el ángulo

donor-hidrógeno-aceptor, más fuerte será el enlace hidrógeno.[106,107] La **Tabla 2.2** muestra los resultados para los principales confórmeros de cada análogo.

Tabla 2.2. Principales confórmeros de **32a** y **36a**, calculados por B3LYP/6-311+G(d,p) con PCM en agua: energías y características geométricas de los enlaces hidrógeno.

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	Cadena carbonada (*N*-metil)	Átomos implicados en el enlace hidrógeno	$d_{H\text{-}aceptor}$ (Å)	$\theta_{donor\text{-}H\text{-}aceptor}$ (º)
32a					
32a(1)	0,00	Ecuatorial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,82	154
			$H(PO_{ec})$-N	1,68	157
32a(2)	0,59	Axial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,89	154
			$H(PO_{ec})$-N	1,73	155
32a(3)	6,50	Ecuatorial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,86	154
			H(N)-$O_{ec}(P)$	2,25	139
32a(4)	8,49	Ecuatorial	H(N)-$O_{ec}(P)$	2,19	139
36a					
36a(1)	0,00	Ecuatorial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,62	161
			$H(O_{ax})$-N	2,01	124
			H(N)-$O_{ec}(P)$	2,24	134
36a(2)	1,77	Ecuatorial	$H(O_{ax})$-$O_{ec}(P)$	1,91	135
			$H(PO_{ec})$-N	1,78	153
36a(3)	2,17	Axial	$H(O_{ec})$-$O_{ax}(P)$	1,95	133
			$H(PO_{ec})$-N	1,67	157
36a(4)	3,75	Ecuatorial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,62	162
			$H(O_{ax})$-$O_{ec}(P)$	2,82	108
			H(N)-$O_{ec}(P)$	2,14	142
36a(5)	4,86	Axial	$H(PO_{ax})$-$O_{ax}(P')$	1,59	160
			$H(O_{ec})$-$O_{ec}(P)$	2,25	127

Para **32a**, la geometría más estable muestra un enlace hidrógeno "1,3-diaxial", entre un O-H axial y un O axial ($d_{H\text{-}O}$ = 1,82 Å), y otro enlace hidrógeno fuerte entre un protón acídico ecuatorial y el átomo de nitrógeno ($d_{H\text{-}N}$ = 1,68 Å), que fija la conformación de la cadena lateral (**Figura 2.8**). Otro confórmero, con energía similar, tiene los mismos enlaces hidrógeno pero con una conformación diferente de la cadena carbonada. Por otro lado, el compuesto **36a** sólo tiene un

protón acídico, por lo que éste debe estar implicado en el enlace hidrógeno 1,3-diaxial, o en la interacción con nitrógeno. En efecto, la geometría más estable muestra sólo una interacción fuerte (interacción 1,3-diaxial) y dos interacciones débiles (**Figura 2.8**, **Tabla 2.2**). Otras conformaciones de **36a**, con mayores energías, muestran otros patrones de enlace hidrógeno. El confórmero **36a(4)** muestra un patrón similar a **36a(1)**, mientras que los confórmeros **36a(2)** y **36a(3)** muestran un enlace hidrógeno fuerte entre el único protón acídico y el átomo de N, como ocurría con **32a**. Sin embargo, las energías de estos confórmeros sobrepasan en más de 2 kcal/mol la energía del confórmero más estable (**Tabla 2.2**).

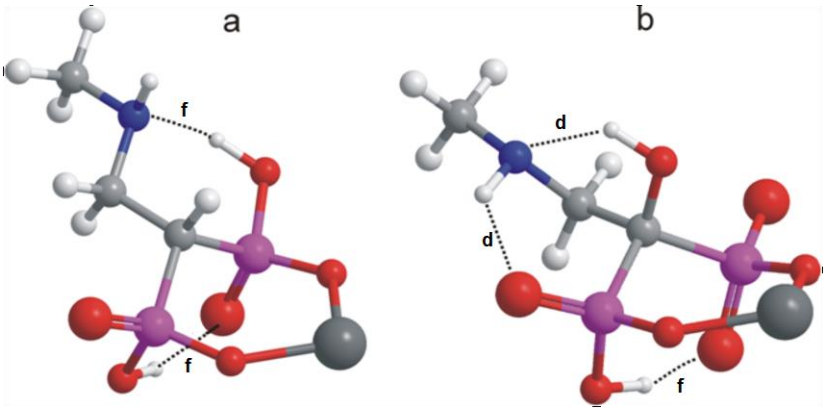


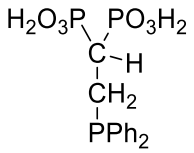
Figura 2.8. Geometrías más estables de los modelos simplificados **32a** (a) y **36a** (b). Los enlaces hidrógeno fueron catalogados como fuerte (f) cuando $d_{H\text{-}aceptor} < 2$ Å y $\theta_{donor\text{-}H\text{-}aceptor} > 145^{o}$, o débil (d) si no se cumplían ambos criterios.

Estos resultados sugieren que en los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos (**32**-**35**), con dos átomos de hidrógeno acídicos, la flexibilidad de la cadena carbonada está muy reducida, al punto de dar una conformación casi rígida, con el átomo de nitrógeno en un arreglo favorable para la acción biológica. Por otra parte, los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos **36** tienen una mayor flexibilidad de la cadena carbonada, generando así una variedad de conformaciones, de las cuales unas pocas (las menos estables) muestran el arreglo necesario para un reconocimiento molecular óptimo.

Estos estudios de simulación computacional fueron realizados con la colaboración del profesor Dr. Carlos Stortz, del departamento de química orgánica de la Universidad de Buenos Aires.

2.5.- ANÁLISIS DE RMN

El compuesto **37** es un ejemplo interesante de un análogo isostérico de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos (**Figura 2.9**). El espectro de RMN de ^{31}P del compuesto **37** indica la existencia de un enlace hidrógeno, o la presencia de un zwiterión, proveniente de un intercambio de protones entre la función fosfonato y la función fosfina (**Figura 2.10**). Este intercambio es dinámico ya que, en el espectro de RMN de ^{31}P, sólo se observa una señal correspondiente a la funcionalidad bisfosfonato, indicando que ambos fosfonatos son equivalentes.



37

Figura 2.9. Isóstero de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos.

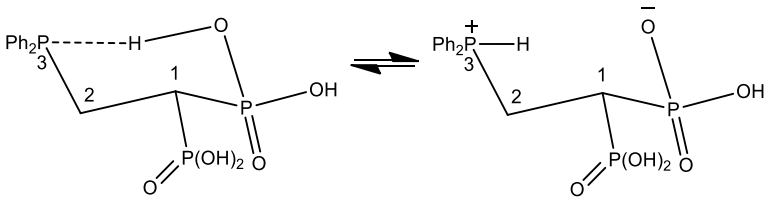


Figura 2.10. Transferencia de protón fosfonato-fosfina.

De manera análoga, se encontró que en el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **32**, realizado en DMSO anhidro deuterado, se podían distinguir dos tipos de protones unidos a heteroátomos. Los protones unidos a nitrógeno aparecían a 8,90 ppm, mientras que los protones correspondientes a los grupos OH unidos a fósforo aparecían a 8,06 ppm (**Figura 2.11**). Cuando se adicionó un equivalente de Mg^{2+}, la señal correspondiente al ácido bisfosfónico se desplazó a campos altos (5,40 ppm), mientras que la señal correspondiente a los protones unidos a nitrógeno permaneció a 8,91 ppm (**Figura 2.12**). Estos resultados indicaban que el átomo de nitrógeno no está involucrado en la coordinación con Mg^{2+}, avalando lo observado en los estudios cristalográficos de los complejos 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos·*Tc*FPPS.

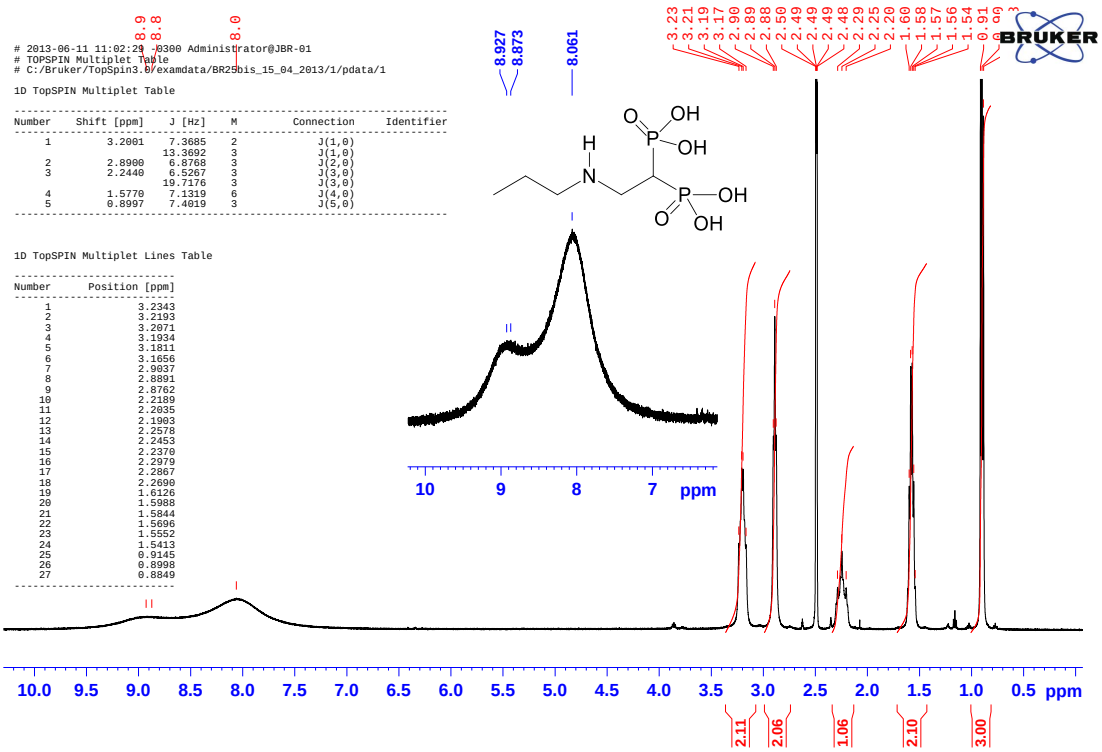


Figura 2.11. Espectro de RMN de ^{1}H de compuesto **32** en DMSO-d_6 anhidro.

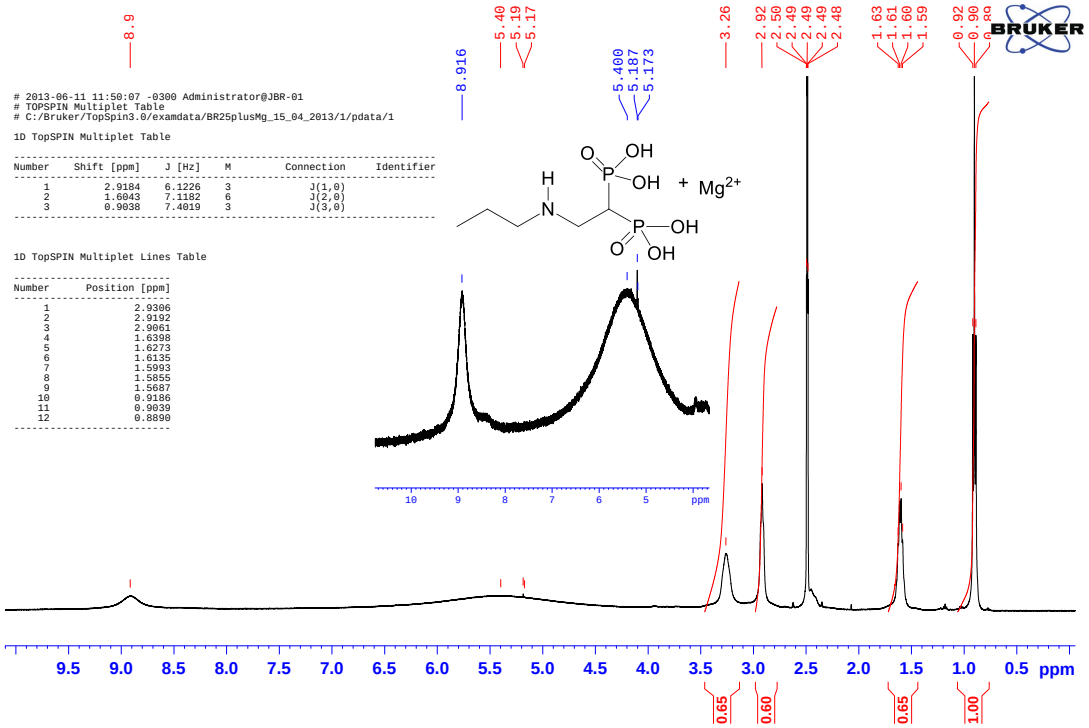


Figura 2.12. Espectro de RMN de ^{1}H de compuesto **32** + Mg^{2+} en DMSO-d_6 anhidro.

En el espectro de RMN de ^{1}H de ácido 1-[(*n*-hexilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (**49**), en DMSO anhidro deuterado, los protones unidos a nitrógeno se observaban a 9,11 ppm, mientras que los protones de los grupos OH del ácido bisfosfónico aparecían a 6,69 ppm (**Figura 2.13**). Esta última señal se desplazó a campos altos (4,41 ppm) cuando se adicionó un equivalente de Mg^{2+} (**Figura 2.14**). De manera similar a lo observado para el compuesto **32**, estos resultados indicaban que sólo la funcionalidad bisfosfonato está involucrada en la coordinación con Mg^{2+}.

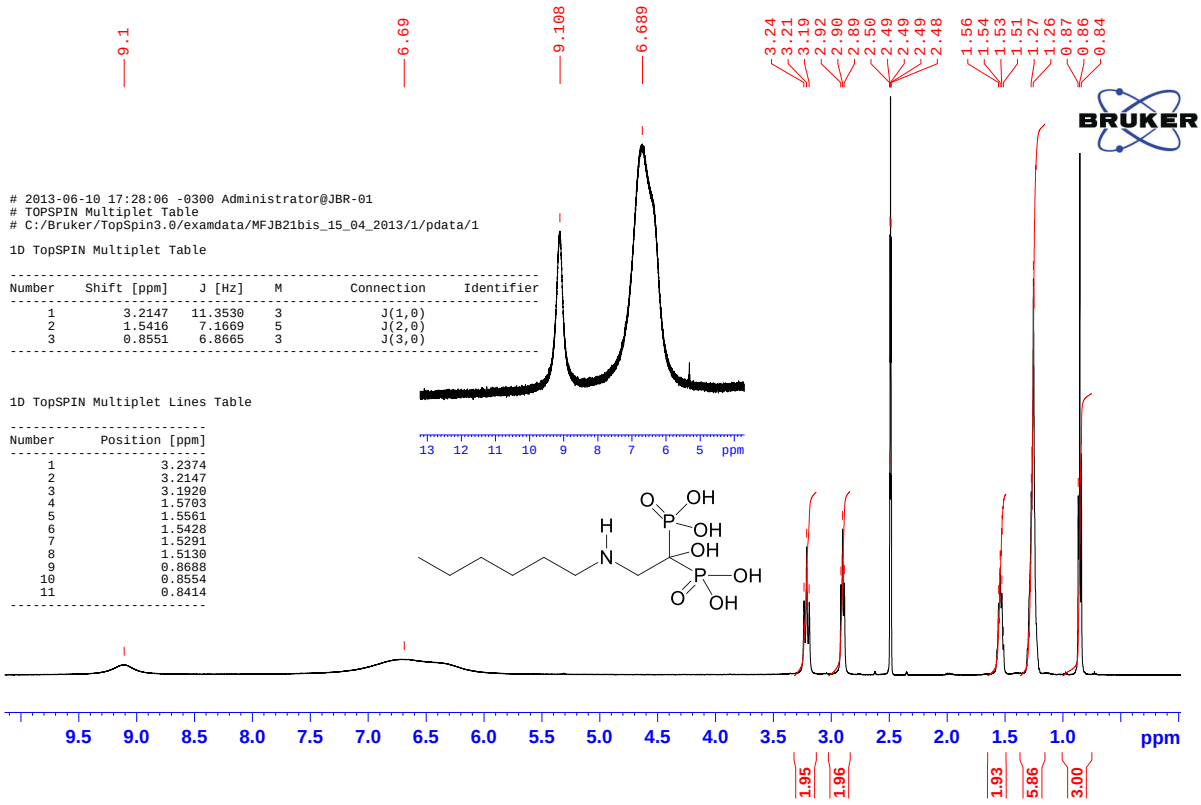


Figura 2.13. Espectro de RMN de ^{1}H de compuesto **49** en DMSO-d_6 anhidro.

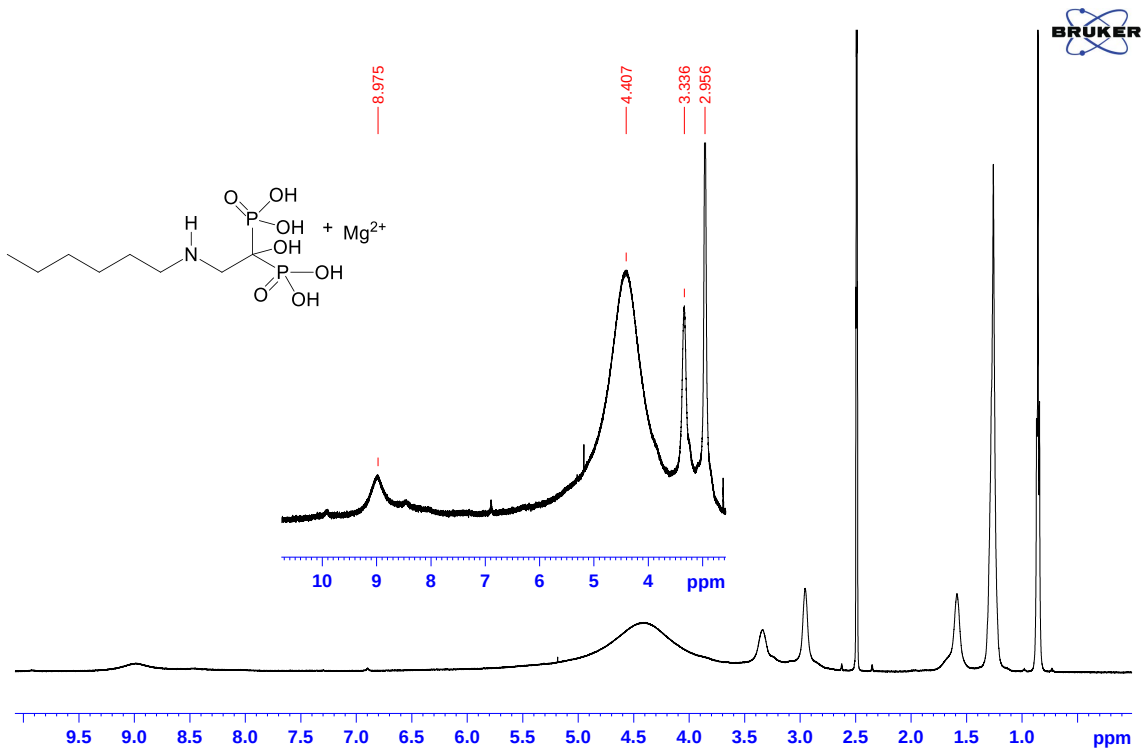


Figura 2.14. Espectro de RMN de ^{1}H de compuesto **49** + Mg^{2+} en DMSO-d_6 anhidro.

En resumen, la actividad anti *T. cruzi* de los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos puede deberse a que estos compuestos, de acuerdo a los estudios de simulación computacional, adoptan una conformación restringida, sin tensiones torsionales, que podría ser beneficiosa para el reconocimiento molecular, mientras que los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos (**48**-**52**) presentan una variedad de conformaciones que no conducirían a una interacción exitosa con la enzima blanco. Sin embargo, los bisfosfonatos **48**-**52** exhibieron una selectiva y potente acción inhibitoria contra *Tg*FPPS. Los esfuerzos posteriores se centraron en la optimización de las estructuras **32**-**35**, para la obtención de compuestos con potente actividad anti *T.cruzi*.

Capítulo 3:

Cicloadiciones 1,3-dipolares

3.1.- ANTECEDENTES

Como se discutió anteriormente, los bisfosfonatos geminales **2**, los cuales contienen la funcionalidad P-C-P, son análogos metabólicamente estables de PPi (**1**) y constituyen una clase de compuestos de importancia farmacológica que han sido utilizados para la prevención y el tratamiento de diversos trastornos óseos, como la enfermedad de Paget, la metástasis ósea, la osteoporosis y la artritis reumatoide.[108,109] Este grupo de compuestos ha adquirido importancia adicional ya que, recientemente, se encontró que los bisfosfonatos nitrogenados pamidronato (**7**), alendronato (**8**), olpadronato (**10**), ibandronato (**11**) y zoledronato (**13**) inhiben los procesos de adhesión e invasión de células humanas de cáncer de mama y de próstata, así como también la proliferación de las mismas *in vitro*. De manera análoga, se encontró que zoledronato y pamidronato disminuyen la proliferación, e inducen la apopotosis, de células de mieloma *in vitro*.[110] Si bien se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad antitumoral de los bisfosfonatos nitrogenados, seguramente la inhibición de la actividad enzimática de FPPS juegue un papel importante.[111]

La inhibición de la actividad enzimática de FPPS reduce la prenilación de una variedad de proteínas, que funcionan como mediadores en cascadas de señalización. También se produce la acumulación de isoprenoides, como IPP, el cual induce la expansión de células *γδ* T. En la actualidad, existen diferentes estudios biológicos que han demostrado que las células *γδ* T son efectivas contra varios tipos de cáncer, como melanoma, carcinoma renal, linfoma y mieloma múltiple. Por lo tanto, las células *γδ* T o los agonistas de células *γδ* T, como los bisfosfonatos nitrogenados, podrían jugar un papel importante en el control de cáncer en humanos y podrían ser utilizados terapéuticamente en combinación con otros agentes antineoplásicos.[111]

Además de su aplicación potencial en el tratamiento del cáncer en humanos, se ha encontrado que algunos bisfosfonatos geminales son potentes inhibidores del crecimiento de parásitos patógenos como *T. cruzi*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania spp*, *T. gondii* y *Plasmodium falciparum*.[112]

Debido a las importantes actividades biológicas que exhiben los bisfosfonatos geminales, en las últimas décadas se han investigado intensivamente

los métodos sintéticos para su obtención. La adición de Michael de nucleófilos a vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**), el cual es un alqueno electrodeficiente y altamente reactivo, se ha consolidado como uno de los métodos más eficientes para acceder a una variedad de bisfosfonatos geminales.[108] El tetraetil éster **53** es capaz de reaccionar con nucléofilos fuertes, como reactivos de Grignard,[52,112] o con nucleófilos más débiles, como aminas y mercaptanos,[88,113,114] para dar los productos de adición 1,4 correspondientes con rendimientos altos y reproducibles (**Figura 3.1**). El compuesto **53** también ha sido utilizado en adiciones conjugadas asimétricas, debido a su potencial de ofrecer sintones quirales versátiles y a su fácil acceso a partir de fuentes comerciales (**Esquema 3.1**).[115,116]

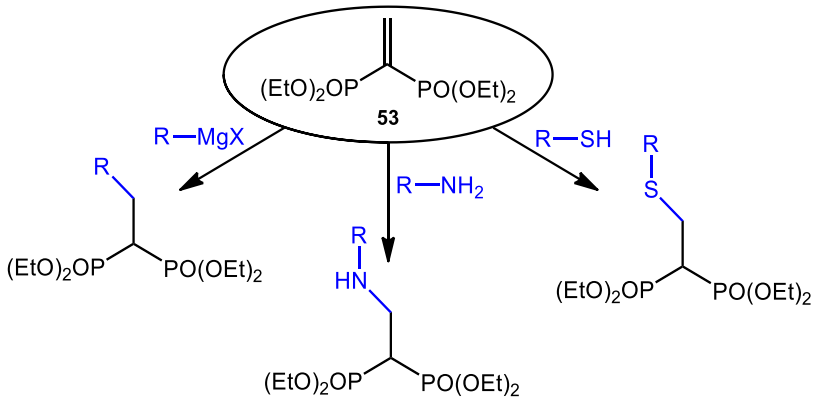
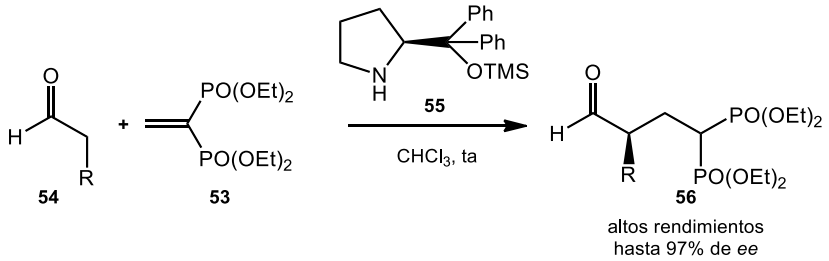


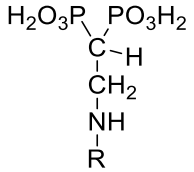
Figura 3.1. Adiciones conjugadas a vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**).



Esquema 3.1. Adición conjugada asimétrica de aldehídos al compuesto **53**.[115,116]

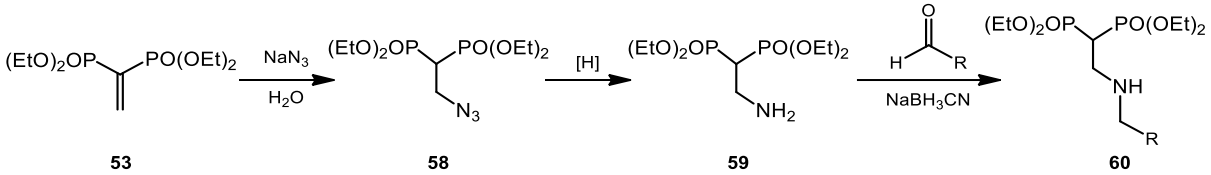
Resulta interesante mencionar que los derivados 2-alquilaminoetil bisfosfónicos habían sido obtenidos en nuestro laboratorio a partir de la adición de Michael de aminas alifáticas a vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**). Estos compuestos habían resultado ser potentes inhibidores de la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*, y de la actividad enzimática de *Tc*FPPS. Por ejemplo, el compuesto **34** exhibió un ED_{50} de 0,84 μM contra *T. cruzi* (amastigotes) y un IC_{50} de

0,49 μM hacia *Tc*FPPS, mientras que el compuesto **35** presentó un IC_{50} de 0,058 μM contra la enzima blanco. Además, algunos 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos inhibieron la proliferación de taquizoítos de *T. gondii*, y la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo, el compuesto **57** exhibió un ED_{50} de 2,60 μM contra taquizoítos de *T. gondii* y un IC_{50} de 0,087 μM hacia *Tg*FPPS (**Figura 3.2**).[87] Dada la aplicación potencial de estos compuestos en el tratamiento de enfermedades parasitarias desatendidas, se propuso la ruta sintética mostrada en el **Esquema 3.2**, como método alternativo para la obtención de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos a partir de la azida **58**. Esta propuesta sintética se basó en la amplia variedad estructural de los aldehídos disponibles comercialmente.



34, R = *n*-hexil
35, R = *n*-heptil
57, R = *n*-octil

Figura 3.2. Estructura química de derivados 2-2-alquilaminoetil bisfosfónicos.

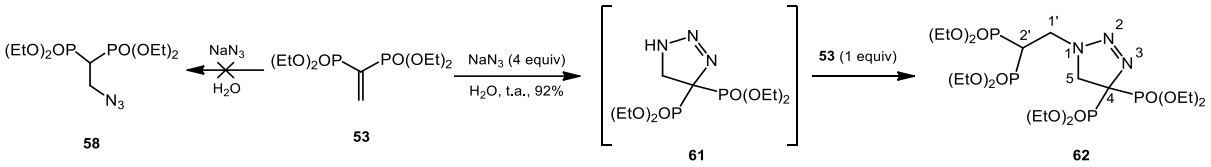


Esquema 3.2. Ruta sintética alternativa para la obtención de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos.

3.2.- REACCIÓN DE AZIDA DE SODIO CON VINILIDEN-BISFOSFONATO DE TETRAETILO

Anteriormente, se encontraba descripto que cuando se hacía reaccionar vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) con azida de sodio, usando agua como solvente, el compuesto **53** se comportaba como aceptor de Michael, para dar el producto de adición conjugada **58**.[114,117] Sin embargo, no había disponible ningún dato espectroscópico que apoyara la estructura de este compuesto.

Contrariamente a lo que estaba informado, cuando se hizo reaccionar el aceptor de tipo Michael **53** con un exceso de azida de sodio no se obtuvo el producto de adición conjugada **58**, sino el compuesto **62** (**Esquema 3.3**).[118] En este sentido, se había descripto que la azida de sodio podía sufrir reacciones de cicloadición 1,3-dipolares con compuestos carbonílicos α,ß-insaturados.[119] Por tanto, se propuso que el compuesto **62** resultaba de la cicloadición 1,3-dipolar de la azida al doble enlace **53**, seguida de la adición conjugada del triazol intermediario **61** al aceptor de Michael **53**.[118]

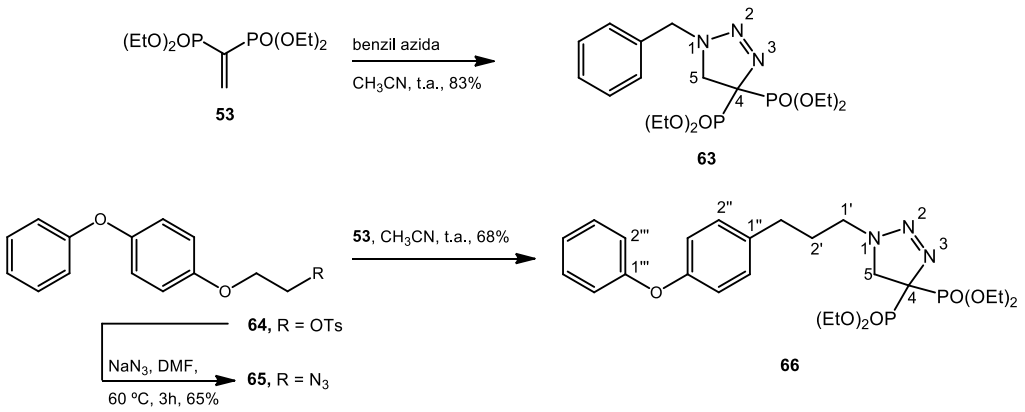


Esquema 3.3. Reacción de azida de sodio con vinilidenbisfosfonato de tetraetilo.

En efecto, el compuesto **62** se caracterizó completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. Posteriormente, la reacción entre vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) y azida de sodio se llevó a cabo en diferentes solventes, como metanol, acetonitrilo y metanol-agua (1:1), obteniéndose exclusivamente en todos los casos, el compuesto **62** con excelentes rendimientos.[118]

Las cicloadiciones 1,3 dipolares involucran 4 electrones π del dipolo y 2 electrones π del alqueno. Si proceden a través de un mecanismo concertado son térmicamente permitidas, con la descripción [$_{\pi}4_s$ + $_{\pi}2_s$] de acuerdo a las reglas de Woodward-Hoffman.[120] El estado de transición de estas reacciones está controlado por los orbitales moleculares frontera (OMF) de los sustratos. Dependiendo de la diferencia de energía entre los OMF del dipolo y el dipolarófilo, el orbital molecular ocupado de mayor energía del dipolo ($HOMO_{dipolo}$) puede interactuar con el orbital molecular desocupado de menor energía del alqueno o dipolarófilo ($LUMO_{alqueno}$), o el $LUMO_{dipolo}$ con el $HOMO_{alqueno}$.[121,122] En la reacción de azida de sodio con vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**), la funcionalidad *gem*-bisfosfonato disminuiría la energía del $LUMO_{alqueno}$.[122] Por tanto, se podría asumir una interacción $HOMO_{azida}$–$LUMO_{alqueno}$.

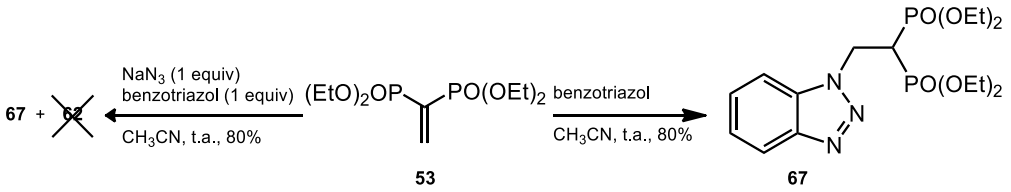
Dados los resultados obtenidos, se consideró que el tratamiento del compuesto **53** con alquilazidas llevaría a 4,5-dihidro-1*H*-1,2,3-triazoles relativamente complejos conteniendo la unidad *gem*-bisfosfonato. En efecto, la reacción entre el alqueno **53** y benzil azida, en acetonitrilo a temperatura ambiente, dio lugar al cicloaducto **63** con 83% de rendimiento.[118] De manera similar, una azida más compleja como **65**, preparada a partir del tosilato previamente descripto **64**,[123] dio lugar al 1,2,3-triazol **66** con 68% de rendimiento.[118] Para ambos compuestos se observaron las señales diagnóstico características en los espectros de RMN de ^{1}H y de ^{13}C (**Esquema 3.4.**). Por ejemplo, en el espectro de RMN de ^{13}C de 1-bencil-4,5-dihidro-1*H*-1,2,3-triazol-4,4-bisfosfonato de tetraetilo (**63**) se observó un triplete centrado a 84,3 ppm, con una constante de acoplamiento de 151,2 Hz ($^{1}J_{C\text{-}P}$) correspondiente a la señal asignada a la posición C-4. Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{1}H los protones asignados como H-5 se observaban como un triplete centrado a 3,64 ppm, con una constante de acoplamiento de 26,7 Hz ($^{3}J_{H\text{-}P}$). En ambas reacciones se obtuvo un sólo regioisómero.[118] En base a la teoría de orbitales frontera, se puede suponer una regioquímica dipolo-HO-controlada.[122]



Esquema 3.4. Cicloadiciones 1,3-dipolares entre vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) y azidas.

Para explicar la formación del triazol **62** a partir del cicloaducto hipotético **61**, se estudió la nucleofilidad de benzotriazol, que contiene la unidad 4,5-dihidro-1*H*-1,2,3-triazol. La reacción del compuesto **53** con benzotriazol condujo al aducto de Michael **67** con 80% de rendimiento (**Esquema 3.5**). Por tanto, se postuló que la formación del triazol **62** resultaba luego de una reacción de cicloadición

1,3-dipolar, que ocurría primero, para dar el cicloaducto **61** el cual, una vez producido, reaccionaba inmediatamente con otra molécula del aceptor de Michael **53** para dar el compuesto **62**. Los estudios de reactividad competitiva sobre el compuesto **53** reforzaron esta hipótesis. Cuando se trató vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) con una solución con azida de sodio (1 equivalente) y benzotriazol (1 equivalente), sólo se formó el aducto de Michael **67**, mientras que el compuesto **62** no fue detectado (**Esquema 3.5)**.[118]



Esquema 3.5. Competencia entre adición de Michael versus cicloadición 1,3-dipolar.

En resumen, se encontró que las azidas reaccionan en estos sistemas como compuestos dipolares, en vez de como nucléofilos. Además, se verificó que las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, que involucran al vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) proceden con alta regioselectividad.[118] Dado que hay muy pocos ejemplos de reacciones de cicloadición donde el compuesto **53** actúe como dienófilo o dipolarófilo, se propuso estudiar la reactividad del doble enlace **53** como dipolarófilo en algunas reacciones de cicloadición 1,3-dipolar.

3.3.- VINILIDEN-BISFOSFONATO DE TETRAETILO COMO DIPOLARÓFILO

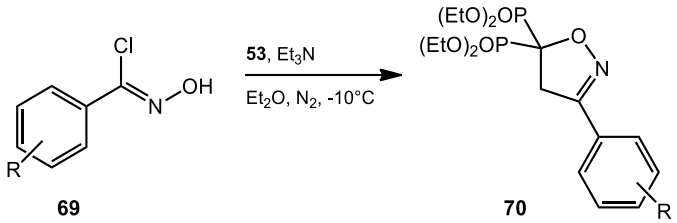
3.3.1.- REACCIÓN CON ÓXIDOS DE NITRILO

Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar constituyen uno de los métodos más utilizados para la síntesis de heterociclos de cinco miembros. En particular, los óxidos de nitrilo **68** son intermediarios importantes en la síntesis de 4,5-dihidro-isoxazoles y otros heterociclos con enlaces nitrógeno-oxígeno (**Figura 3.3**).[124,125] Se planteó que la adición 1,3-dipolar de óxidos de nitrilo con vinilidenbisfosfonato (**53**) daría lugar a 4,5-dihidro-isoxazoles conteniendo la

funcionalidad *gem*-bisfosfonato. En efecto, se había descripto la síntesis de isoxazolinas **70** a partir del alqueno **53** (**Esquema 3.6**). En este caso, se utilizaron cloruros hidroxámicos **69** como fuente de óxidos de nitrilo.[126]

68

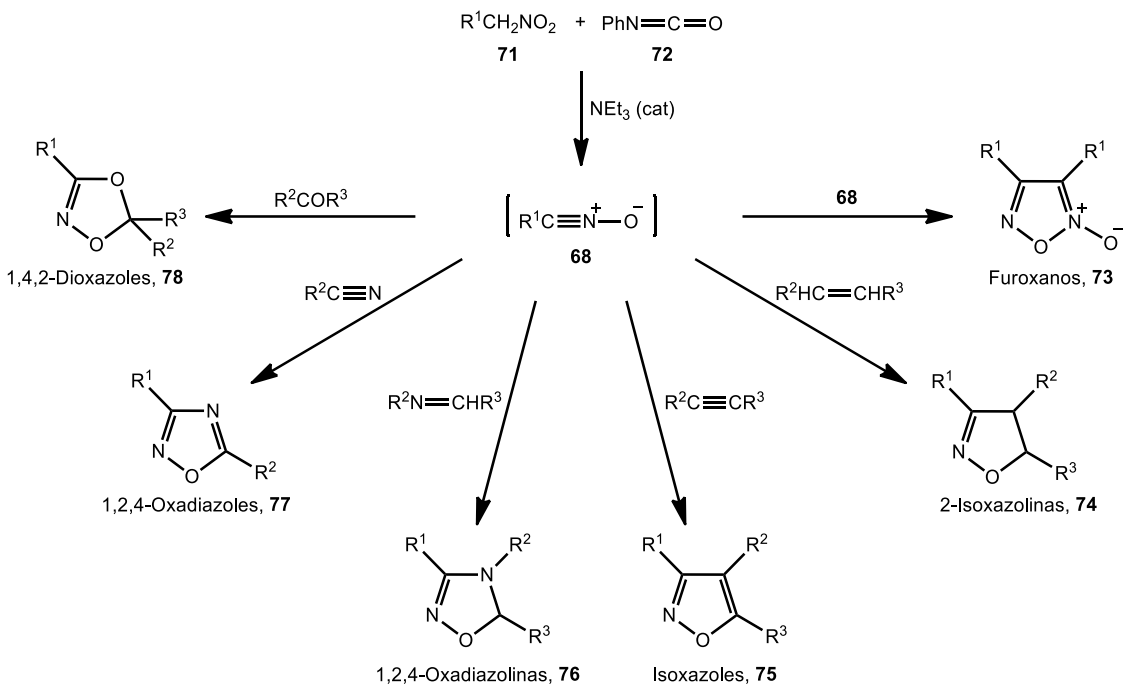
Figura 3.3. Estructura general de óxidos de nitrilo.



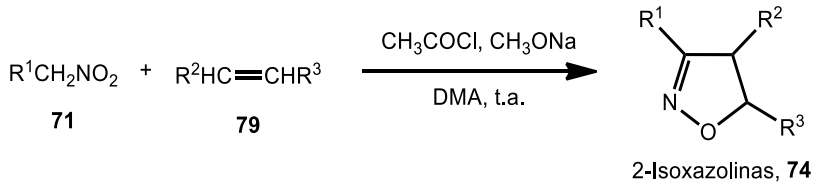
(66 - 93% Rendimiento)

Esquema 3.6. Síntesis de isoxazolinas a partir de cloruros hidroxámicos.

La deshidrohalogenación de cloruros hidroxámicos **69** es un procedimiento típico para la obtención de óxidos de nitrilo **68**.[127] Sin embargo, la principal desventaja de este método radica en la preparación de los compuestos **69**, lo cual requiere la generación de cloro gaseoso y el uso de altas concentraciones de ácido clorhídrico.[128] Otros métodos de obtención de óxidos de nitrilo se basan en la deshidratación de nitrocompuestos primarios **71**.[127] En efecto, desde que Mukaiyama y Hoshino informaron el uso de fenilisocianato **72**, en presencia de cantidades catalíticas de trietilamina, para la deshidratación de nitrocompuestos primarios,[129] éstos se convirtieron en precursores importantes en la síntesis de heterociclos (**Esquema 3.7**).[130] A este respecto, también fue descripto el uso de agentes acilantes, en combinación con bases, como método para la preparación *in situ* de óxidos de nitrilo (**Esquema 3.8**).[124] Sin embargo, la desventaja de éste y otros métodos de obtención de óxidos de nitrilo por deshidratación de nitrocompuestos primarios, radica en la obtención de una cantidad considerable de productos colaterales. Además, la conversión del nitrocompuesto **71** no es completa, lo que dificulta aún más la purificación del cicloaducto **74**.[127,129]

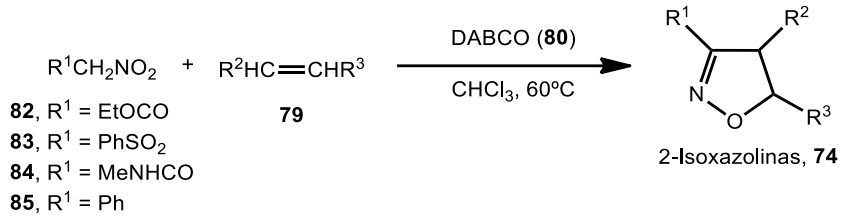


Esquema 3.7. Óxidos de nitrilo como intermediarios en la síntesis de heterociclos.[124]

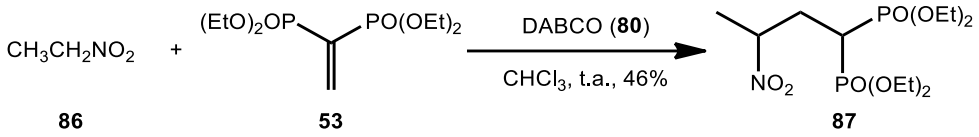


Esquema 3.8. Preparación *in situ* de óxidos de nitrilo.[124]

Recientemente, se había evaluado la capacidad de diaminas terciarias, tales como 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano (DABCO, **80**) y *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamina (TMEDA, **81**), de promover la deshidratación de nitrocompuestos en presencia de dipolarófilos.[131] En efecto, se comprobó que el uso de DABCO (**80**) permitía la obtención de isoxazolinas **74** directamente a partir de nitrocompuestos activados (**82**-**84**) y fenilnitrometano (**85**), sin necesidad de utilizar ningún agente acilante (**Esquema 3.9**).[130,131] Sin embargo, cuando se hizo reaccionar nitroetano (**86**) con DABCO (**80**) en presencia de viniliden-bisfosfonato de tetraetilo (**53**) no se obtuvo el producto de cicloadición 1,3-dipolar **74**, sino el producto de adición conjugada **87** (**Esquema 3.10**).[118]

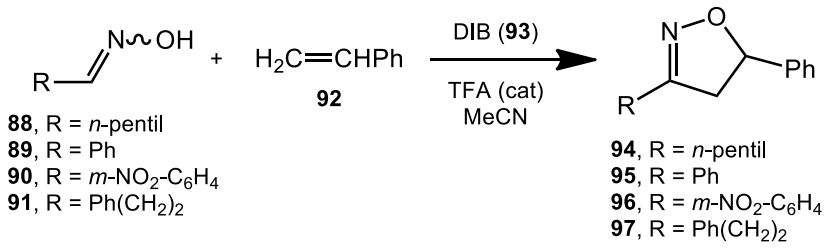


Esquema 3.9. Uso de diaminas terciarias para la deshidratación de nitrocompuestos primarios.[130]



Esquema 3.10. Adición conjugada de nitrocompuestos a vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**).[118]

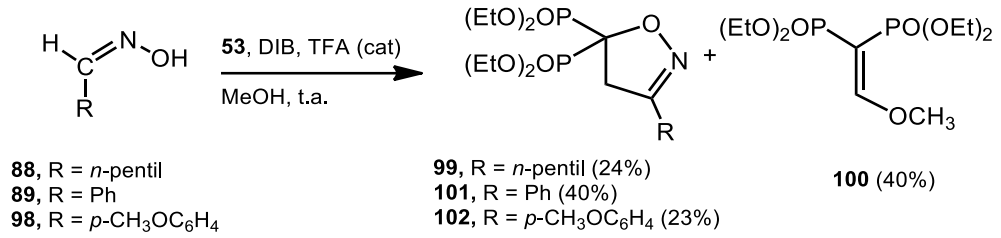
En búsqueda de un método que permitiera realizar la amidación oxidativa de fenoles en tándem con una cicloadición 1,3-dipolar, Mendelsohn y colaboradores habían encontrado que las aldoximas **88**-**91** podían ser oxidadas *in situ* a óxidos de nitrilo, utilizando diacetoxi-iodo benceno (DIB, **93**) en metanol conteniendo cantidades catalíticas de ácido trifluoro-acético (TFA) (**Esquema 3.11**).[132] Por lo tanto, se propuso llevar a cabo las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar que involucraran al vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**), utilizando aldoximas como fuente de óxidos de nitrilo.



Esquema 3.11. Oxidación *in situ* de aldoximas a óxidos de nitrilo.[132]

3.3.1.1.- Síntesis y caracterización de 4,5-dihidroisoxazoles

En primer lugar se sintetizaron las aldoximas **88** (R = *n*-C_5H_{11}), **89** (R = Ph) y **98** (R = *p*-OMe-C_6H_4) siguiendo procedimientos descriptos en la literatura.[133] Cuando se adicionó gota a gota una solución metanólica de la oxima **88** a una solución de DIB (**93**) y alqueno **53** en metanol conteniendo cantidades catalíticas de TFA, se obtuvo el cicloaducto **99** con un rendimiento bajo, pero reproducible, de 24%. Notablemente, además del cicloaducto **99**, se obtuvo el compuesto **100** con 40% de rendimiento. Es probable que este compuesto provenga de la adición conjugada de metanol, seguida por oxidación.



Esquema 3.12. Síntesis de 4,5-dihidro-isoxazoles derivados de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**).

Para la obtención de las isoxazolinas **101** y **102**, se adicionó gota a gota una solución metanólica del alqueno **53** a una solución de la oxima correspondiente y DIB, en metanol conteniendo cantidades catalíticas de TFA. Los compuestos **101** y **102** fueron obtenidos con rendimientos de 40 y 23%, respectivamente.

En todas las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar de óxidos de nitrilo a vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) sólo se obtuvo un regioisómero. Al igual que para la cicloadición de azidas al compuesto **53**, el curso estereoquímico de la reacción puede ser explicado por una regioquímica dipolo-HO-controlada.

Todos los 4,5-dihidro-isoxazoles obtenidos fueron caracterizados completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. A modo de ejemplo, en el espectro de RMN de ^{1}H de (3-pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (**99**) los protones correspondientes al H-4 se observaban como un triplete centrado a 3,56 ppm, con una constante de acoplamiento de 23,7 Hz ($^3J_{H\text{-}P}$). Los protones asignados como H-1' de la cadena lateral se observaban como un triplete centrado

a 2,36 ppm, con una constante de acoplamiento de 7,6 Hz ($^3J_{H-H}$). Por otra parte, se observaban las señales correspondientes al grupo etilo unido al átomo de oxígeno de la funcionalidad bisfosfonato; un multiplete centrado a 4,26 ppm y un triplete ($^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz) centrado a 1,35 ppm (**Figura 3.4**).

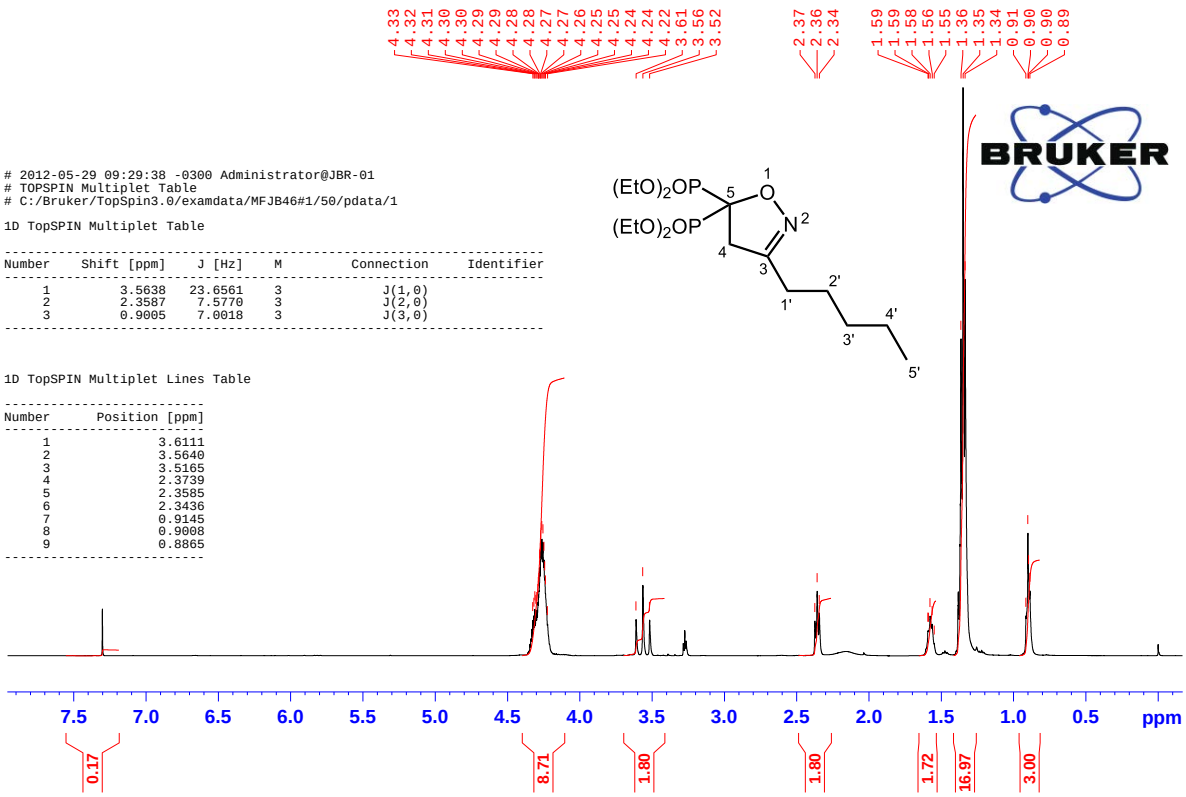


Figura 3.4. Espectro de RMN de ^{1}H de (3-pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (**99**).

En el espectro de RMN de ^{13}C la señal asignada a C-5 se observaba como un triplete centrado a 81,7 ppm, con una constante de acoplamiento de 157,8 Hz ($^1J_{C-P}$), indicando que un átomo de carbono está unido a dos átomos de fósforo y a un átomo de oxígeno. Por otra parte, la señal asignada a C-4 se observaba como un triplete centrado 44,4 ppm, con una constante de acoplamiento de 2,1 Hz ($^2J_{C-P}$), mientras que la señal asignada a C-3 aparecía como un triplete centrado a 158,4 ppm, con una constante de acoplamiento de 4,2 Hz ($^3J_{C-P}$) (**Figura 3.5**).

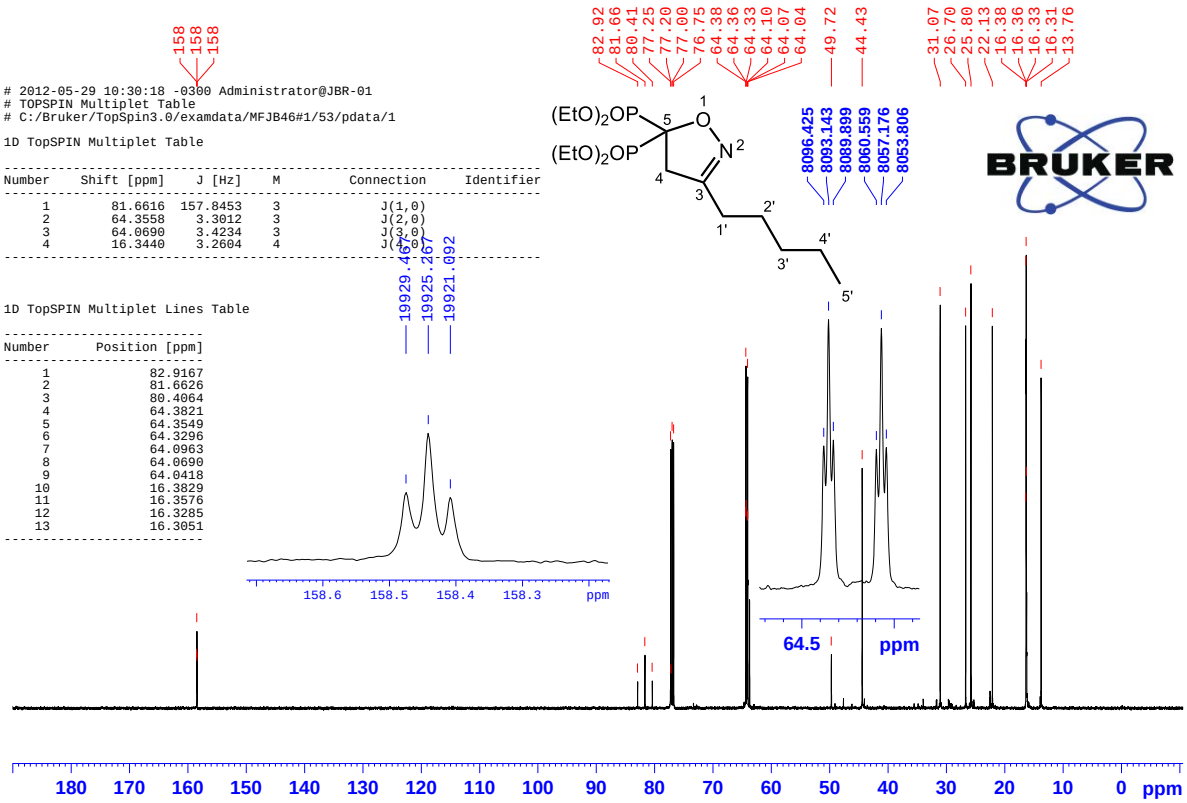


Figura 3.5. Espectro de RMN de ^{13}C de (3-pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (**99**).

En el espectro de RMN de ^{31}P de 3-pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (**99**) sólo se observó un singulete a 14,94 ppm, ya que los dos átomos de fósforo presentes en la estructura son equivalentes (**Figura 3.6**).

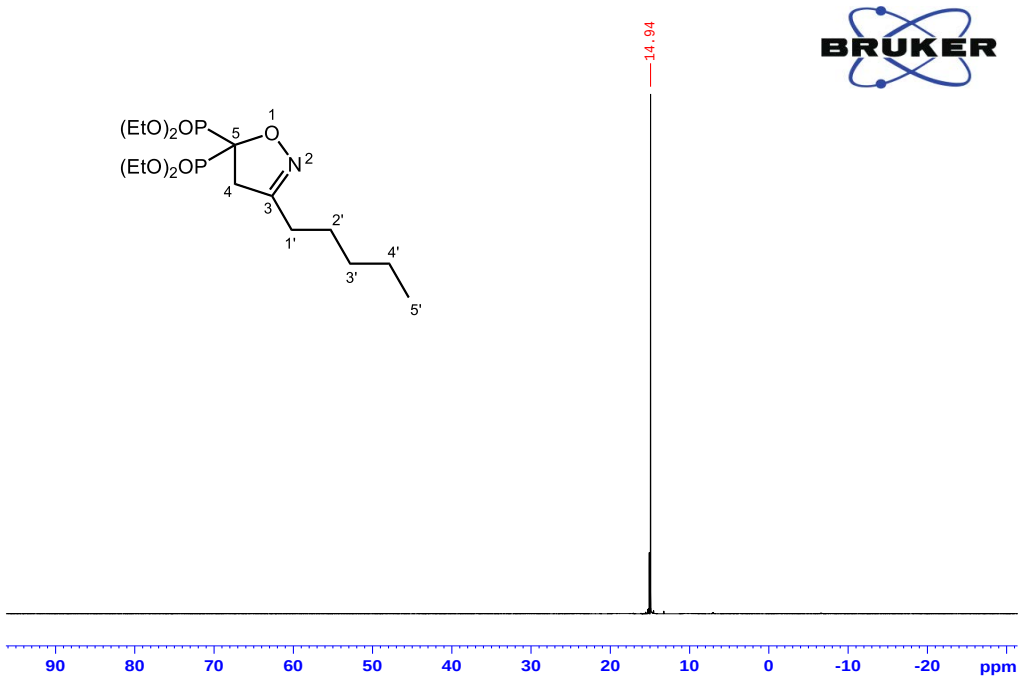
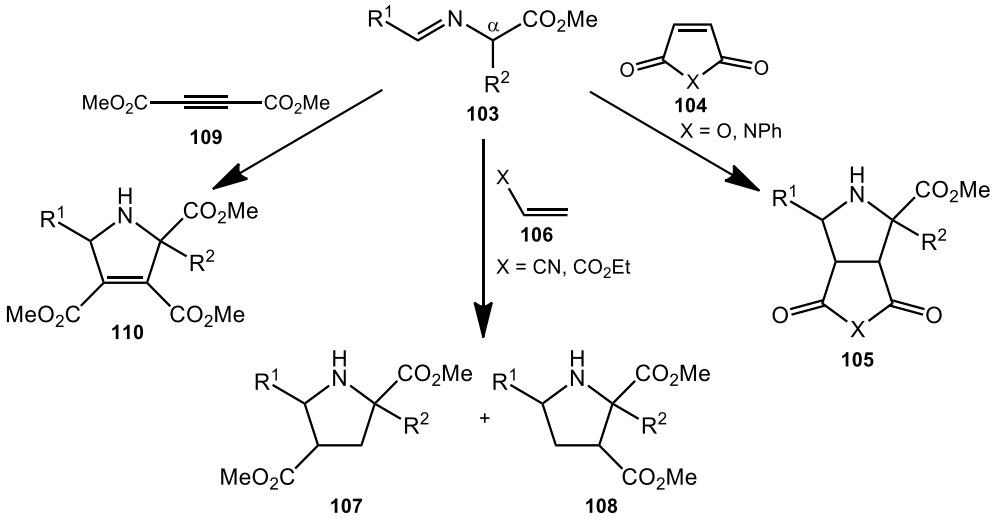


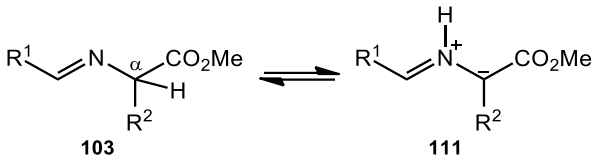
Figura 3.6. Espectro de RMN de ^{31}P de (3-pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (**99**).

3.3.2.- REACCIÓN CON ILUROS DE AZOMETINO

Grigg y Kemp habían encontrado que las iminas derivadas de α-amino ácidos **103** reaccionaban con alquenos deficientes en electrones para dar pirrolidinas polisustituídas (**Esquema 3.13**).[134] Se planteó entonces que las iminas de fórmula **103** reaccionaban con los alquenos de fórmulas **104**, **106** y **109** a través de cicloadiciones 1,3-dipolares, por la formación *in situ* de iluros de azometino **111**. En efecto, al calentar las iminas en una mezcla $CD_3OD/CDCl_3$ (1:1) y seguir la reacción por ^{1}H-RMN, se pudo evidenciar el intercambio de deuterio entre el carbono alfa al carboxilato (C-α) y el átomo de nitrógeno (**Esquema 3.14**).[134]

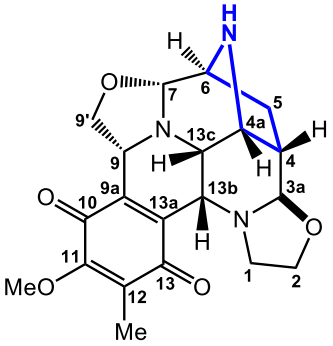


Esquema 3.13. Síntesis de pirrolidinas a partir de iminas derivadas de α-amino ácidos.



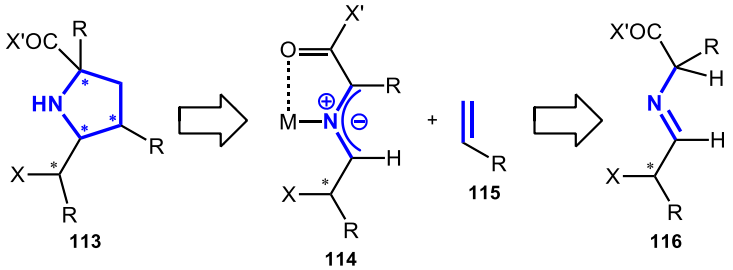
Esquema 3.14. Equilibrio de la imina con su dipolo.

Posteriormente, la secuencia descripta por Grigg se convirtió en una metodología ampliamente utilizada para la síntesis de pirrolidinas con diversos patrones de sustitución.[135] Por ejemplo, Garner y Kaniskan plantearon la obtención del anillo D (pirrolidina) del alcaloide bioactivo bioxalomicina β1 (**112**) a través de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar estereoselectiva (**Esquema 3.15**). El mayor reto era acceder al cicloaducto **113** con las funciones amino dispuestas en *anti*, así como se encuentran los grupos amino de las posiciones C13c y C4a en el producto natural (**Figura 3.7**).[136]



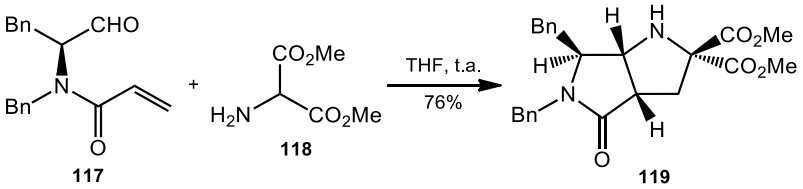
112

Figura 3.7. Estructura de Bioxalomicina β1.

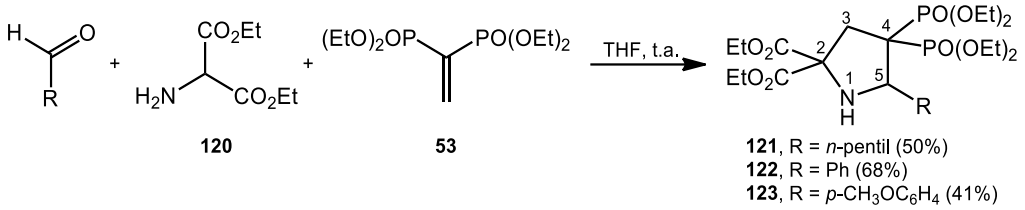


Esquema 3.15. Propuesta de síntesis de pirrolidinas *via* iluros de azometino.[136]

En este contexto, Garner y Kaniskan desarrollaron un método que les permitió obtener la pirrolidina **119**, con la disposición *anti* requerida de los grupos amino, directamente a partir de 2-amino-malonato de dimetilo (**118**) y la amida **117** (**Esquema 3.16**).[136] Esta metodología demostró ser útil para la obtención *one pot* de pirrolidinas altamente funcionalizadas.[135] Por lo tanto, se propuso sintetizar pirrolidinas, conteniendo la funcionalidad *gem*-bisfosfonato, utilizando la metodología descripta por Garner y Kaniskan (**Esquema 3.17**).



Esquema 3.16. Síntesis de pirrolidinas a partir de 2-amino-malonato de dimetilo.[136]



Esquema 3.17. Síntesis *one pot* tricomponente de pirrolidinas.

Las pirrolidinas **121**-**123** fueron obtenidas a partir de los aldehídos correspondientes, 2-amino-malonato de dietilo (**120**) y vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**), con rendimientos de 50%, 68% y 41% respectivamente. El 2-amino-malonato de dietilo (**120**) se preparó siguiendo procedimientos descriptos en la literatura.[137,138] En todos los casos sólo se obtuvo el cicloaducto con regioquímica dipolo-HO-controlada.[122]

Las pirrolidinas obtenidas fueron caracterizadas completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. Por ejemplo, en el espectro de RMN de ^{1}H de (±)-4,4-bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (**122**) la señal correspondiente al protón H-5 se observaba como un doble doblete centrado a 4,99 ppm, con una constante de acoplamiento de 30,0 Hz ($^3J_{H-P}$) y otra de 13,1 Hz ($^3J_{H-P}$), debido a que se acoplaba con dos átomos de fósforo diferentes. Además, como la posición C-5 es un centro asimétrico, los protones asignados como H-3 son diasterotópicos, por lo que aparecían a distintos δ. Uno de los protones de la posición C-3 (H-3$_a$) se observaba como un doble doblete centrado a 3,23 ppm, con constantes de acoplamiento de 19,3 Hz ($^3J_{H-P}$) y 15,2 Hz ($^1J_{H-H}$), mientras que el protón asignado como H-3$_b$ se observaba como un doble doble doblete centrado a 3,32 ppm, con constantes de acoplamiento de 22,1 Hz ($^3J_{H-P}$), 15,0 Hz ($^1J_{H-H}$) y 10,4 Hz ($^3J_{H-P}$), respectivamente (**Figura 3.8**).

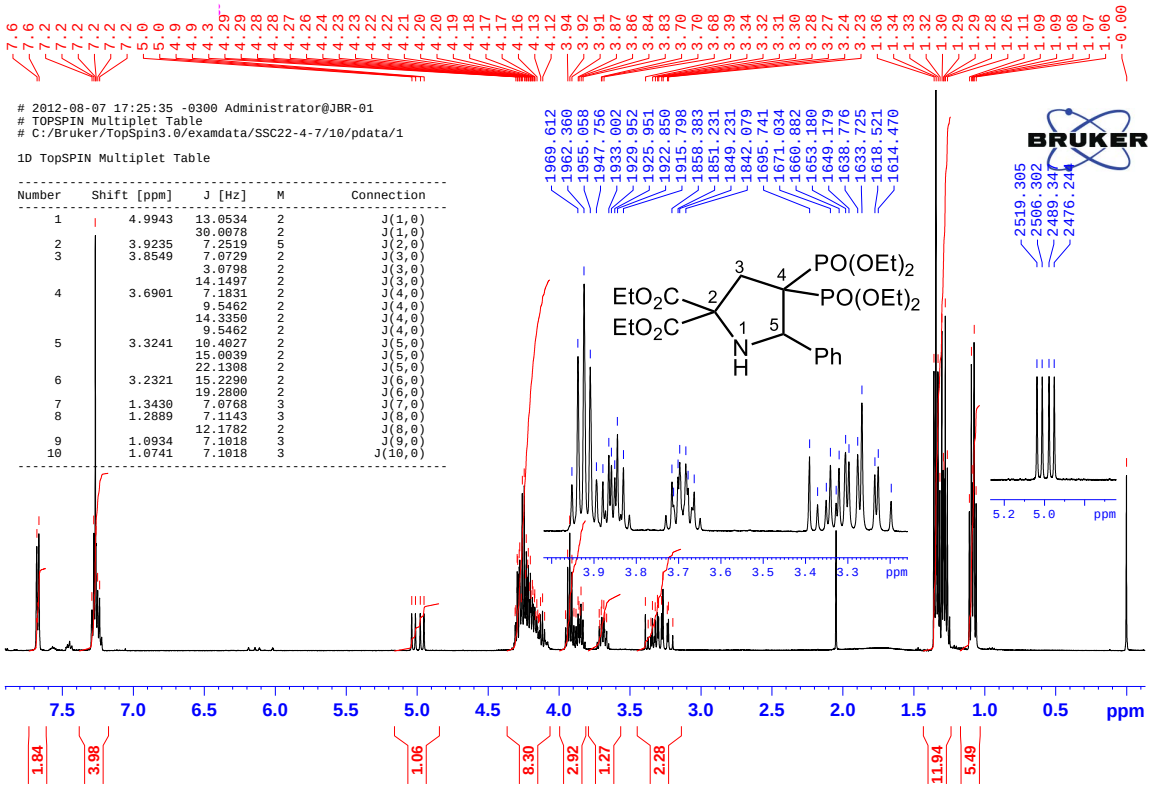


Figura 3.8. Espectro de RMN de ^{1}H de (±)-4,4-bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (**122**).

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaba un triplete centrado a 51,7 ppm, con una constante de acoplamiento de 136,4 Hz ($^{1}J_{C\text{-}P}$), correspondiente a la posición C-4, lo cual es típico para este arreglo de una unión *gem*-bisfosfónica. Además, la señal asignada a C-5 se observaba como un doblete centrado a 66,3 ppm, con una constante de acoplamiento de 4,3 Hz ($^{2}J_{C\text{-}P}$), mientras que la señal asignada a C-3 se observaba como un triplete centrado a 38,3 ppm, con una constante de acoplamiento de 3,8 Hz ($^{2}J_{C\text{-}P}$). Por otra parte, la señal correspondiente a C-2 aparecía como un doble doblete centrado a 71,0 ppm, con constantes de acoplamiento de 6,9 Hz y 1,9 Hz, debido a que se acopla a dos átomos de fósforo con constantes de acoplamiento diferentes (**Figura 3.9**).

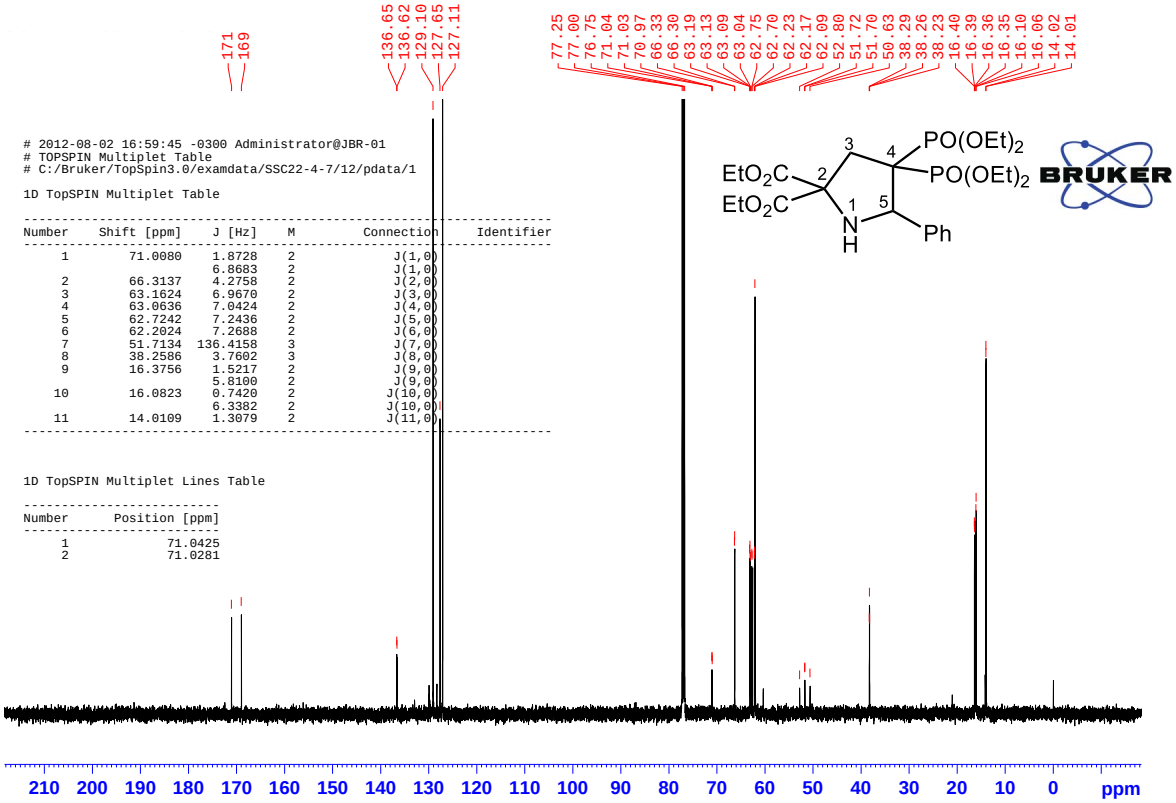


Figura 3.9. Espectro de RMN de ^{13}C de (±)-4,4-bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (**122**).

Finalmente, en el espectro de RMN de ^{31}P de (±)-4,4-bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (**122**) se observaban dos dobletes, uno centrado a 22,76 ppm y otro centrado a 23,68 ppm, ambos con constantes de acoplamiento de 13,6 Hz ($^{2}J_{P\text{-}P}$). Esto se debe a que los dos átomos de fósforo no son química ni magnéticamente equivalentes, por lo que se acoplan entre ellos (**Figura 3.10**).

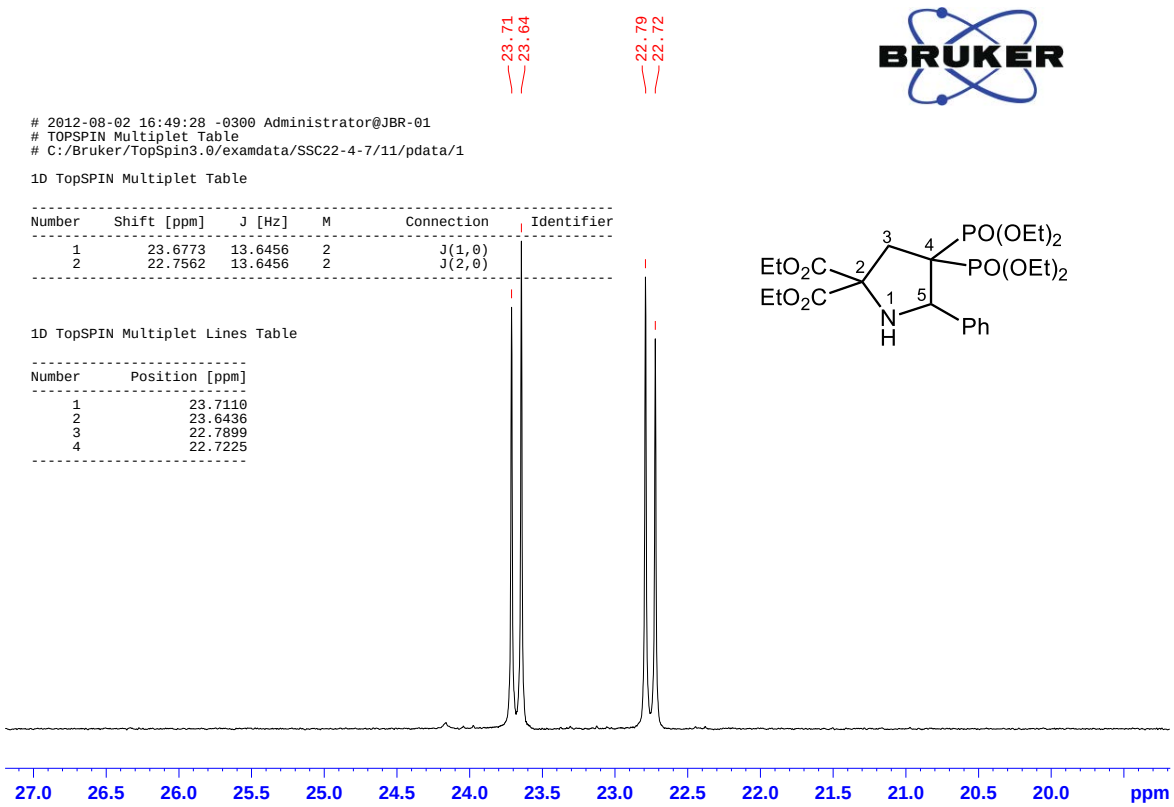


Figura 3.10. Espectro de RMN de ^{31}P de (±)-4,4-bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (**122**).

En resumen, la capacidad de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) de comportarse como dipolarófilo en reacciones de cicloadición 1,3-dipolar nos permitió obtener diferentes anillos polifuncionalizados conteniendo la unidad *gem*-bisfosfonato. Además, en todos los casos los 4,5-dihidro-isoxazoles **99**, **101** y **102** y las pirrolidinas **121**-**123** fueron obtenidos con alta regioselectividad.

Capítulo 4:

2-Alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos

4.1.- ANTECEDENTES

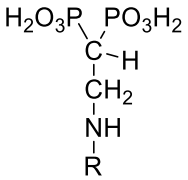
Como se discutió anteriormente, la enfermedad de Chagas constituye un grave problema de salud pública en América Latina.[52,53] Además, ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades parasitarias más desatendidas del mundo.[53,68] La quimioterapia actual para el mal de Chagas se basa en drogas no específicas descubiertas empíricamente, tales como nifurtimox (**21**) y benznidazol (**22**).[74] Estas drogas poseen ciertas desventajas como sensibilidad selectiva sobre diferentes cadenas de *T. cruzi*, efectos secundarios graves y la necesidad de tratamientos prologados. Sin embargo, la mayor limitación de nifurtimox y benznidazol es que no son efectivas en la fase crónica de la enfermedad.[69,74] Por lo tanto, el desarrollo de nuevas drogas más eficientes e inocuas para el tratamiento del mal de Chagas es un tópico de enorme interés.

Urbina y colaboradores habían encontrado que los acidocalcisomas de *T. cruzi* contienen cantidades significativas de pirofosfato inorgánico. En efecto, PPi resultó ser más abundante que ATP en las formas replicativas de *T. cruzi*.[55] Por tanto, era probable que PPi ejerciera un rol fundamental en el metabolismo del parásito. Posteriormente, se identificaron enzimas que utilizaban PPi en lugar de ATP en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos patógenos.[55,61] Se postuló que estas enzimas podían servir como blancos moleculares para el diseño de nuevos agentes antiparasitarios.

Por otro lado, se evaluó el efecto de algunos bisfosfonatos nitrogenados en la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*. Los bisfosfonatos de fórmula general **2** son análogos estructurales de pirofosfato, en los que un grupo metileno reemplaza el átomo de oxígeno puente entre los dos átomos de fósforo. Teniendo en cuenta que numerosos bisfosfonatos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento prolongado de trastornos óseos, podría esperarse una baja toxicidad para las drogas que contengan esta funcionalidad.[52,86,87] A este respecto, se encontró que pamidronato (**7**), alendronato (**8**) y risedronato (**12**) inhibían la proliferación de amastigotes *in vitro* (IC_{50} = 65 μM, 65 μM y 300 μM, respectivamente) sin toxicidad para las células huésped. Adicionalmente, pamidronato mostró ser efectivo *in vivo*, ya que redujo la parasitemia en ratones con infección aguda por *T. cruzi*.[55]

Posteriormente, se encontró que los bisfosfonatos nitrogenados inhiben la resorción ósea inhibiendo la actividad enzimática de FPPS humana.[37,50,63] La inhibición de *h*FPPS produce un déficit en la prenilación de proteínas que conlleva a la apoptosis de osteoclastos.[35] De manera similar, la prenilación de proteínas ocurre en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos patógenos.[64] Finalmente, la expresión de un gen de *T. cruzi* que codificaba una enzima FPPS funcional, permitió comprobar que los bisfosfonatos nitrogenados inhiben la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* inhibiendo la actividad de *Tc*FPPS.[65] FPPS cataliza dos reacciones de condensación 1'-4 consecutivas entre un sustrato alílico (DMAPP o GPP) y un sustrato homoalílico (IPP) para dar FPP.[12] Esta enzima pertenece a la familia de proteínas prenil transferasas que han sido caracterizadas como enzimas homodiméricas que requieren iones metálicos divalentes, como Mg^{2+} o Mn^{2+}, para su actividad.[39]

Además, los bisfosfonatos lineales se han convertido en prometedores agentes anti *T. cruzi*.[39] En particular, los derivados 2-alquilaminoetil bisfosfónicos resultaron potentes inhibidores de la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*, y de la actividad enzimática de *Tc*FPPS. Por ejemplo, el compuesto **34** exhibió un ED_{50} de 0,84 μM contra *T. cruzi* (amastigotes) y un IC_{50} de 0,49 μM hacia *Tc*FPPS, mientras que el compuesto **35** presentó un IC_{50} de 0,058 μM contra la enzima blanco (**Figura 4.1**).[87] Estos 2-alquilaminoetil bisfosfonatos habían sido diseñados originalmente para mantener la capacidad de coordinación con Mg^{2+} de manera tridentada, como se creía que ocurría con los 1-hidroxi y 1-amino-bisfosfonatos.[52,86]



32, R = *n*-propil
33, R = *n*-pentil
34, R = *n*-hexil
35, R = *n*-heptil

Figura 4.1. Estructura química de derivados 2-alquilaminoetil bisfosfónicos.

Inicialmente, se creía que la actividad de los derivados 2-alquilaminoetil, 1-hidroxi y 1-amino bisfosfónicos se debía a la capacidad de coordinar iones Mg^{2+} de manera tridentada en el sitio activo de la enzima.[52,86] Sin embargo, luego de obtener las estructuras cristalinas de *Tc*FPPS en complejos con 2-alquilaminoetil bisfosfonatos, se observó que el átomo de nitrógeno en C-2 no forma parte de la esfera de coordinación de los iones Mg^{2+}.[12,39] La estructura de coordinación tridentada está circunscripta a los grupos hidroxilo unidos a los átomos de fósforo, tanto para 2-alquilaminoetil- como para 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos.[67,89]

Las estructuras cristalinas de *Tc*FPPS con los bisfosfonatos **32**-**35** contienen además tres cationes Mg^{2+} e IPP, o un ión SO_4^{-2} en el caso del compuesto **35** (R = *n*-heptilo).[12] Estos complejos se encuentran empacados de manera más compacta que la enzima sin ligandos, de manera similar a lo observado anteriormente para los complejos de *Tc*FPPS con alendronato (**8**), risedronato (**12**), zoledronato (**13**) y minodronato (**14**).[66,67]

Los estudios cristalográficos indican que los compuestos **32**-**35** se unen al sitio alílico de la enzima a través de un complejo que involucra a tres núcleos de Mg^{2+}, de manera similar a lo observado para los sustratos biológicos.[139-141] Los tres átomos de Mg^{2+} están coordinados octaédricamente por la proteína, los grupos fosfato de la funcionalidad bisfosfonato y oxígenos de moléculas de agua (**Figura 4.2**). Por otra parte, IPP se une a la enzima interactuando directamente con los residuos Arg^{51}, Arg^{108} y Arg^{360}.[12]

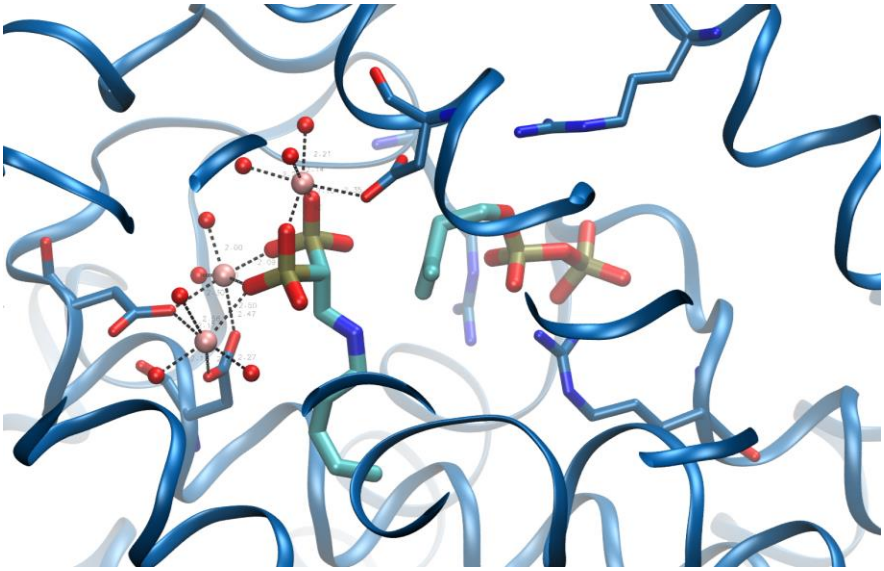


Figura 4.2. Estructura del complejo *Tc*FPPS·**33**·IPP (PDB ID: 4DWB).[12]

La superposición estructural de los complejos de *Tc*FPPS con 2-alquilaminoetil bisfosfonatos (**32**-**35**) señala que los grupos fosfato de la funcionalidad bisfosfonato interactúan con los mismos residuos de la proteína, localizados en la parte superior del sitio activo. Sin embargo, hacia el interior de la proteína hay algunas diferencias significativas. Por ejemplo, en los complejos de *Tc*FPPS con **34** (R = *n*-hexilo) y **35** (R = *n*-heptilo), los residuos Tyr^{94} y Gln^{167} adoptan una conformación diferente para acomodar a los bisfosfonatos con cadenas laterales más largas **(Figura 4.3)**. En el complejo de *Tc*FPPS con el bisfosfonato **35** el extremo del inhibidor unido al monómero A de la enzima se encuentra a 3,15 Å del residuo Ile^{129} del monómero B.[12]

Anteriormente, se había propuesto que los residuos His^{93} y Tyr^{94} formaban el "piso" del sitio alílico, determinando la longitud máxima de los sustratos alílicos y de los inhibidores que podían unirse a la enzima.[142] En efecto, los estudios con FPPS aviar habían revelado que cuando Phe^{112} y Phe^{113} (equivalentes a His^{93} y Tyr^{94} de *Tc*FPPS) eran reemplazados por Ala y Ser, respectivamente, la enzima mutada producía GGPP, de 20 átomos de carbono.[48] Además, se encontró que en algunas especies la enzima GGPPS contiene aminoácidos más pequeños, como serina o treonina, en la posición equivalente a Tyr^{94} de *Tc*FPPS, indicando que Tyr^{94} podría tener un papel determinante en la longitud final del producto.[143] Estas observaciones señalaban que los residuos His^{93} y Tyr^{94} del monómero A y el residuo Ile^{129} del monómero B podrían determinar la longitud máxima permitida de la cadena alquílica del inhibidor **(Figura 4.3)**.[12]

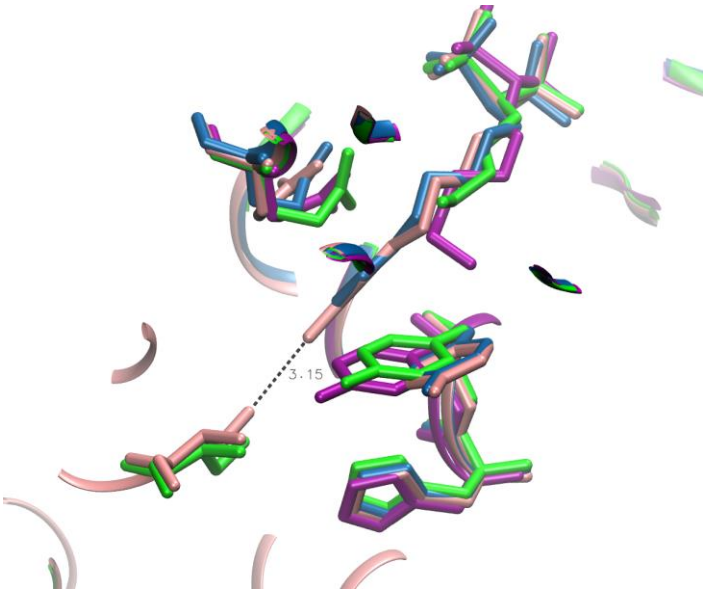


Figura 4.3. Superposición de los complejos de *Tc*FPPS con **33** (R = *n*-propil, verde, PDB ID: 4DXJ), **34** (R = *n*-pentil, violeta, PDB ID: 4DWB), **35** (R = *n*-hexil, azul, PDB ID: 4E1E) y **36** (R = *n*-heptil, rosa, PDB ID: 4DWG).[12]

Adicionalmente, se estudió la interacción de *Tc*FPPS con 2-alquilaminoetil bisfosfonatos por calorimetría de titulación isotérmica. Se determinó que los compuestos **32**-**35** se unen a la enzima blanco con una entalpía desfavorable. La entropía favorable que domina la energía libre resulta de un delicado balance entre dos efectos opuestos: la pérdida desfavorable de entropía conformacional, debido al "congelamiento" de las rotaciones alrededor de los enlaces simples del inhibidor y de las cadenas laterales de los residuos del sitio activo, y el aumento favorable de entropía asociado con la inmersión de las cadenas alquílicas hidrofóbicas. Con el compuesto **32** de cadena más corta (R = *n*-propil) el balance produce la unión más fuerte de la serie (IC_{50} = 0,038 μM). El aumento en la longitud de la cadena alquílica a *n*-pentil o *n*-hexil reduce la afinidad en más de un orden de magnitud (IC_{50} = 1,84 μM y 0,49 μM, respectivamente). Esta tendencia se revierte cuando R = *n*-heptil (IC_{50} = 0,058 μM). Según estas observaciones, si se siguiera aumentando la longitud de la cadena alquílica podrían obtenerse compuestos con afinidades mayores. Sin embargo, la estructura del complejo de *Tc*FPPS con el inhibidor **35** muestra que si la longitud de la cadena alquílica es mayor a siete átomos de carbono, se producirían choques con los residuos His^{93}, Tyr^{94} del monómero A, y con el residuo Ile^{129} del monómero B (**Figura 4.3**).[12]

Posteriormente, se comparó la estructura del complejo de *Tc*FPPS con **35** (R = *n*-heptil), con la estructura del complejo de FPPS aviar con GPP (**Figura 4.4**). Se observó que el nitrógeno N-1 del compuesto **35** ocupa la misma posición en el sitio de unión que el carbono C-1 de la cadena alílica de GPP, y que el resto de las cadenas se alinean hasta la posición C-6 del compuesto **35,** que se solapa con el carbono C-7 de GPP. El carbono C-7 de GPP es un carbono terciario con dos grupos metilo, mientras que el carbono equivalente del compuesto **35** (C-6) tiene sólo un grupo metilo. El metilo terminal del inhibidor **35** ocupa una posición intermedia entre los dos grupos metilo de GPP, lo que hace que esta porción del compuesto **35** sea menos complementaria al sitio de unión. Por lo tanto, es probable que la adición de un grupo metilo en la posición C-6 del bisfosfonato **35** resulte en un mejor inhibidor. De manera análoga, la adición de un metilo en la posición C-2 aumentaría la afinidad del compuesto **35** (**Figura 4.4**).[12]

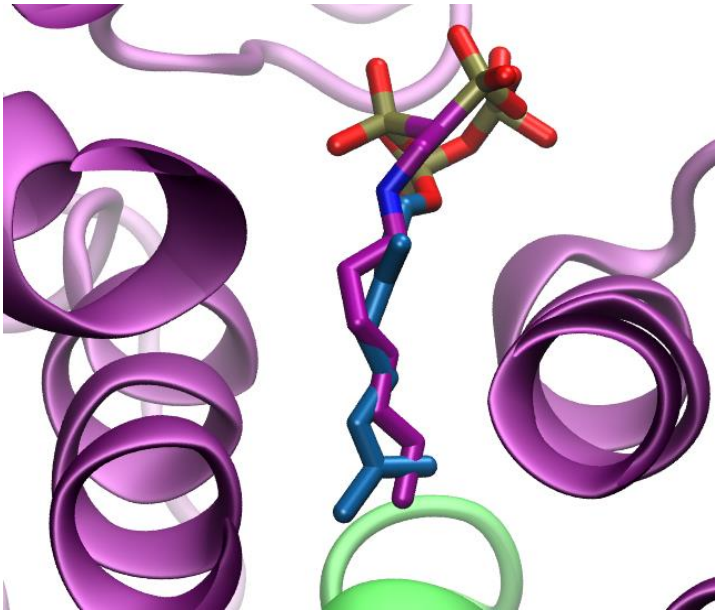


Figura 4.4. Superposición estructural del complejo *Tc*FPPS·ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1,1-bisfosfónico (PDB ID: 4DWG)[12] con el complejo *Gg*FPPS·GPP (PDB ID: 1UBW).[48] La enzima *Gg*FPPS no se muestra en la figura, sólo su ligando GPP (azul).

Además, se observó que la conformación del inhibidor **35** es compatible con los dos dobles enlaces de GPP, sugiriendo que la introducción de dobles enlaces en las posiciones C-1 y C-5 de la cadena alquílica del compuesto **35** fijaría la

conformación del inhibidor en la conformación que adopta en el sitio de unión.[12] Esta modificación reduciría la pérdida de entropía conformacional sin afectar la entalpía de unión. El compuesto resultante sería un excelente análogo del GPP unido a la enzima, sin embargo, contendría una funcionalidad enamina demasiado inestable. Por lo tanto, se propuso que el compuesto **124**, con dobles enlaces en las posiciones C-2 y C-5, sería un potencial líder para la síntesis de nuevos bisfosfonatos inhibidores de *Tc*FPPS (**Figura 4.5**)[12].

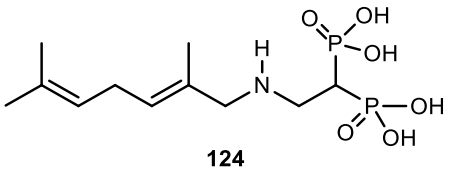
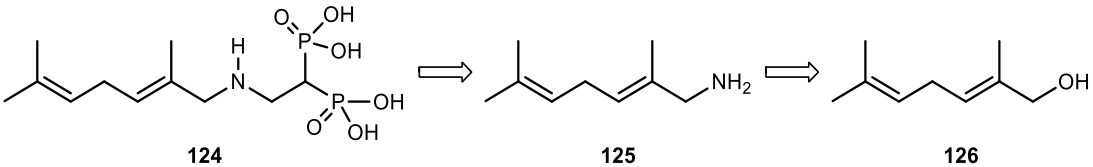


Figura 4.5. Bisfosfonato seleccionado como molécula blanco.

4.2.- APROXIMACIÓN SINTÉTICA

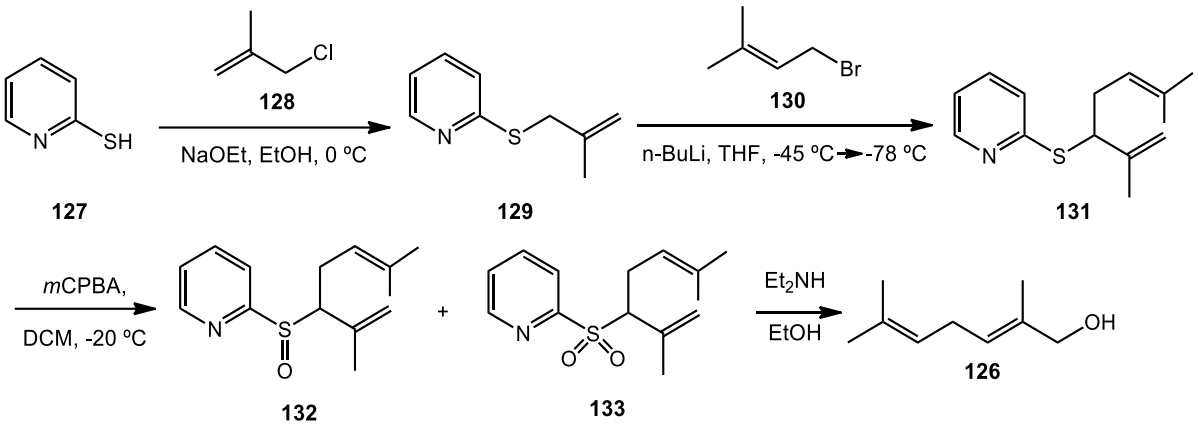
En primer lugar, se planteó la obtención del bisfosfonato **124** a partir de la amina alílica **125,** siguiendo procedimientos similares a los utilizados anteriormente para la síntesis de 2-alquilaminoetil bisfosfonatos lineales (**32**-**35**). Además, se propuso que la amina **125** podía ser preparada *via* el alcohol alílico **126,** cuya síntesis había sido descripta previamente (**Esquema 4.1**).[144]



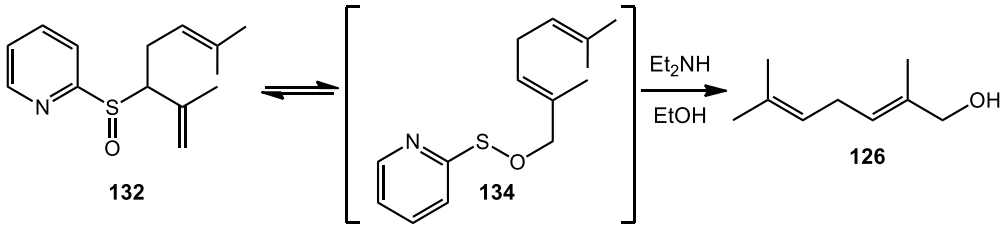
Esquema 4.1. Propuesta de síntesis de bisfosfonato **124**.

La síntesis del alcohol **126,** el cual puede ser considerado como un intermediario clave para la preparación del compuesto **124**, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descripto por Mori y Ueda ligeramente modificado.[144] De esta manera, por reacción entre 2-mercaptopiridina (**127**) y cloruro de metalilo (**128**) en presencia de etóxido de sodio se obtuvo **129**, el cual por tratamiento con bromuro de isopentenilo (**130**) y *n*-butil litio dio lugar a **131**. Este compuesto, por

tratamiento con ácido *m*-cloroperoxibenzoico seguido de digestión con dietilamina en metanol condujo al alcohol alílico **126** (**Esquema 4.2**). La obtención del alcohol **126** se basa en la conversión del sulfóxido **132** al intermediario sulfenato **134**, a través de un reordenamiento sigmatrópico (**Esquema 4.3**).[145] Dado que sólo el sulfóxido conduce a la obtención del producto **126** es necesario minimizar la sobreoxidación del tioéter **131** a la sulfona **133**.

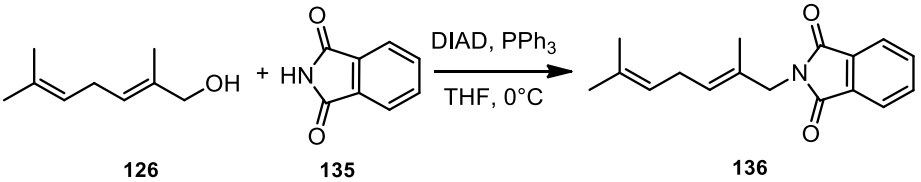


Esquema 4.2. Síntesis de (*E*)-2,6-dimetil-hepta-2,5-dien-1-ol.[144]



Esquema 4.3. Reordenamiento sulfóxido-sulfenato.[145]

Una vez obtenido el alcohol **126**, se introdujo la función nitrogenada a través de una reacción de Mitsunobu.[146] Estas condiciones permitieron la obtención directa de la ftalimida *N*-sustituída **136** con 54% de rendimiento (**Esquema 4.4**).



Esquema 4.4. Síntesis de (*E*)-2-(2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)isoindolina-1,3-diona (**136**).

La ftalimida *N*-sustituída **136** se caracterizó completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. En el espectro de RMN de ^{1}H se observaban claramente las señales correspondientes a los protones vinílicos H-3 y H-5. La señal correspondiente a H-3 aparecía como un triple quintuplete (*J* = 7,0; 1,4 Hz**)** centrado a 5,05 ppm, mientras que la señal correspondiente a H-5 aparecía como un triple cuarteto (*J* = 7,2; 1,3 Hz) centrado a 5,36 ppm. Por otra parte, la señal correspondiente a los protones H-4 se observaba como un triplete ($^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,3 Hz) centrado a 2,70 ppm, mientras que la señal correspondiente a los protones asignados como H-1 aparecía como un singulete a 4,20 ppm (**Figura 4.5**).

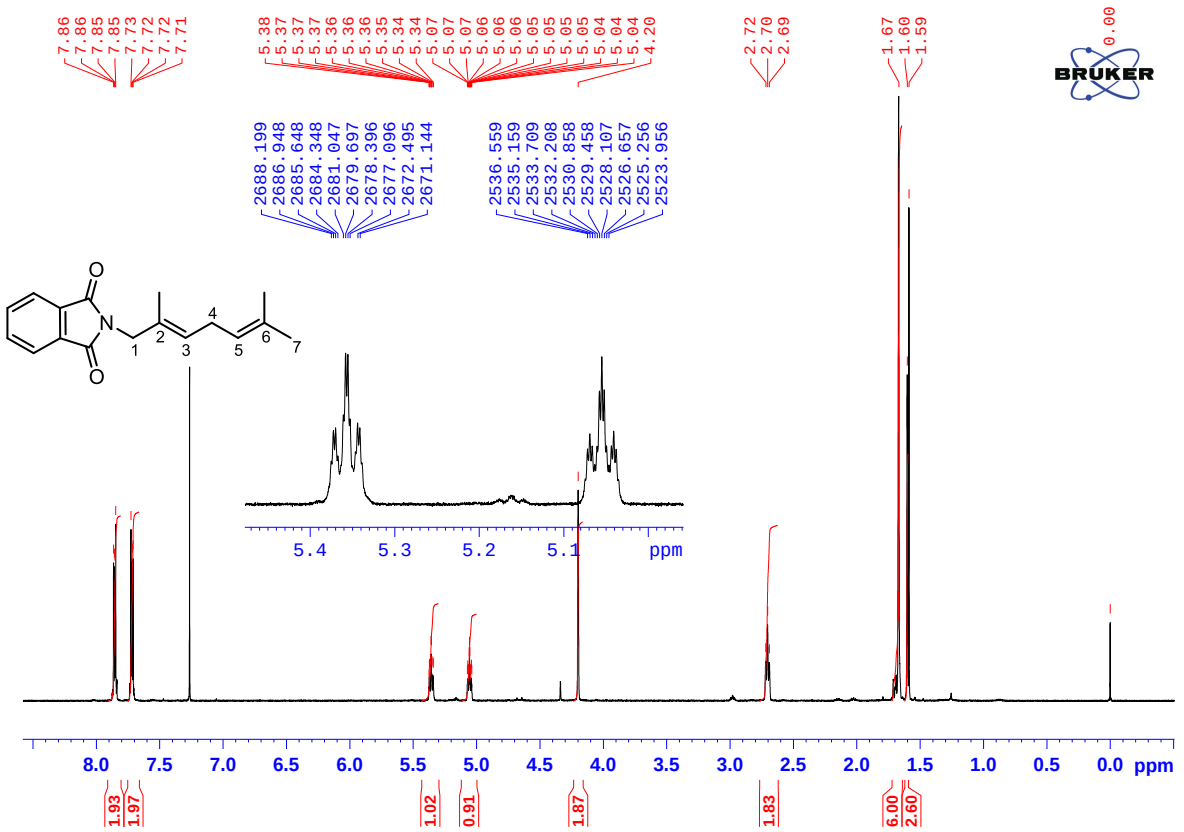


Figura 4.5. Espectro de RMN de ^{1}H de (*E*)-2-(2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)isoindolina-1,3-diona (**136**).

En el espectro de RMN de ^{13}C de la ftalimida **136** las señales correspondientes a los carbonos C-3 y C-5 aparecían a 122,3 y 126,6 ppm, respectivamente. Por otra parte, las señales asignadas a los carbonos cuaternarios de la cadena lateral C-2 y C-6 se observaban a 132,1 y 132,0 ppm,

respectivamente. Además, la señal asignada a C-1 aparecía a 45,0 ppm, mientras que la señal correspondiente a C-4 aparecía a 26,9 ppm (**Figura 4.6**).

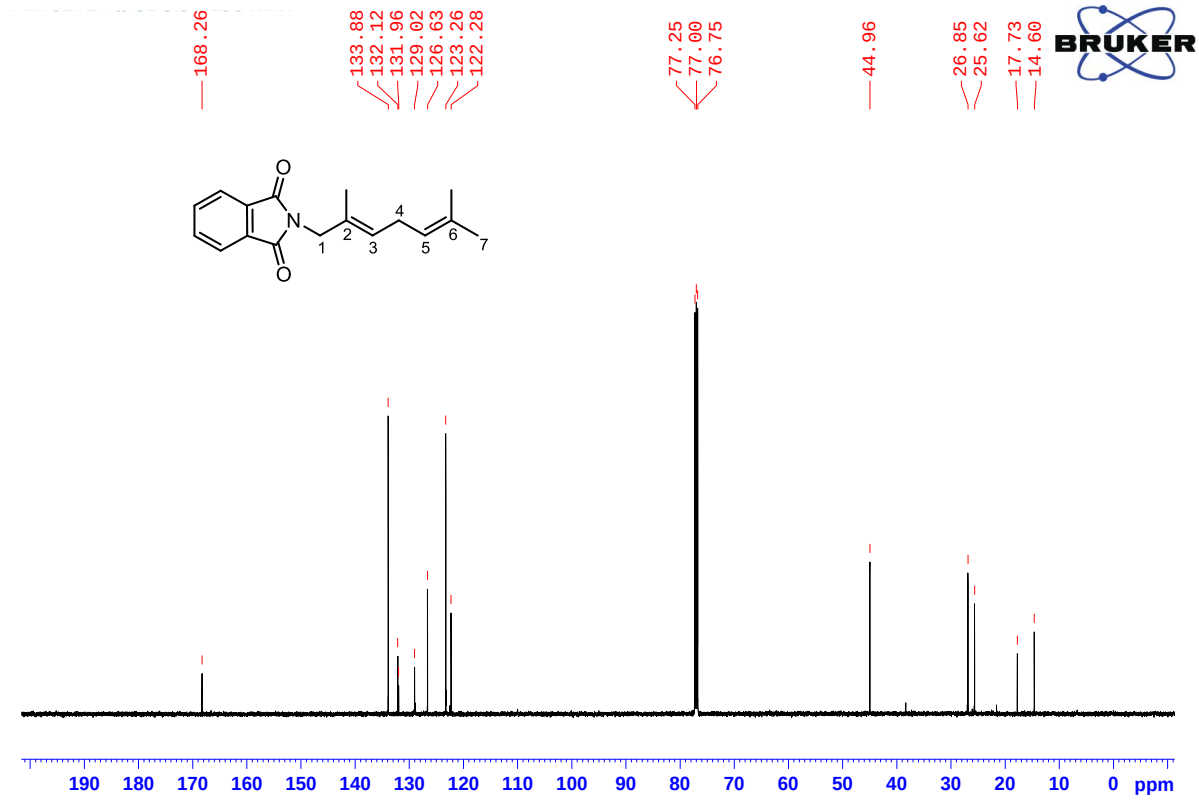
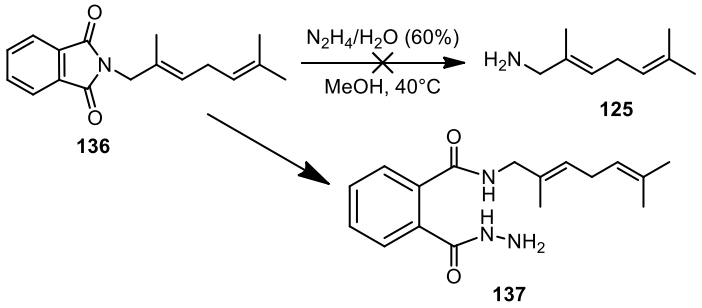


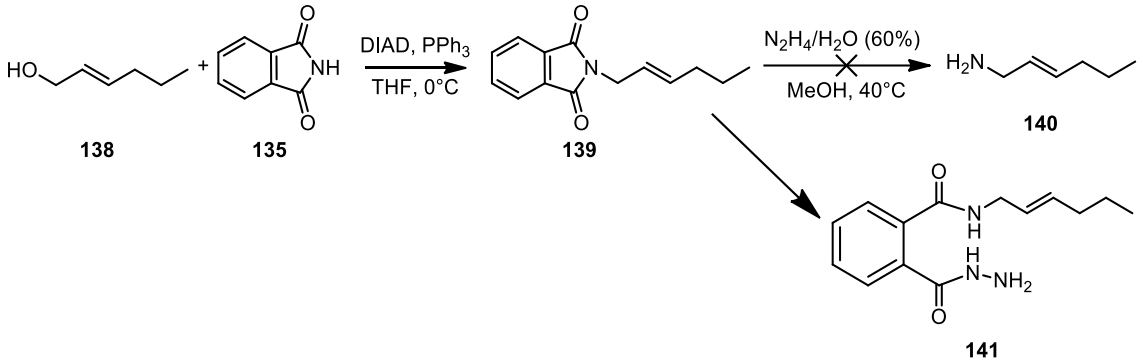
Figura 4.6. Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-2-(2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)isoindolina-1,3-diona (**136**).

Una vez disponible el compuesto **136**, se procedió a preparar la amina alílica **125**. Sin embargo, el tratamiento con solución acuosa de hidracina (60%) a 40°C no permitió la desprotección completa de la ftalimida **136**, dando lugar al producto de hidrólisis parcial **137** (**Esquema 4.5**).



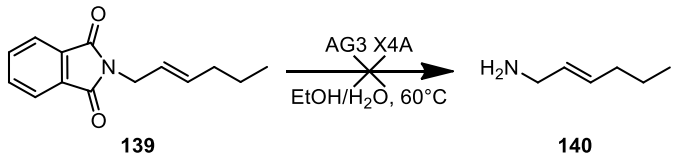
Esquema 4.5. Hidrólisis parcial de ftalimida *N*-sustituída **136**.

Teniendo en cuenta que la reacción de hidrólisis de la ftalimida no era una reacción trivial, se preparó un análogo simple de una ftalimida alílica como **139**, la cual se obtuvo por tratamiento del alcohol alílico **138** con ftalimida bajo las mismas condiciones de Mitsunobu.[146] De manera similar a lo obtenido para la ftalimida **136**, el tratamiento de *N*-hexenil ftalimida **139** con solución acuosa de hidracina (60%) a 40°C también resultó en el producto de hidrólisis parcial **141** (**Esquema 4.6**).



Esquema 4.6. Hidrólisis parcial de *N*-hexenil ftalimida **139.**

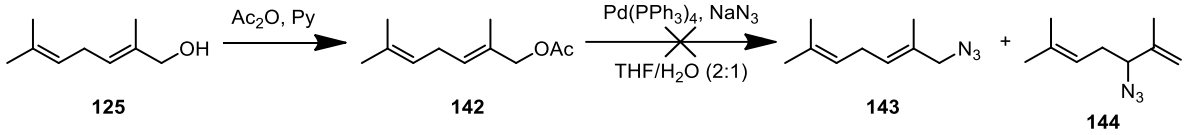
Anteriormente, se había descripto el uso de resinas de intercambio aniónico débil para la hidrólisis de ftalimidas conteniendo un grupo hidroxilo en la cadena lateral del átomo de nitrógeno.[147] Considerando a *N*-hexenil ftalimida **139** como modelo simplificado de la ftalimida **136**, se procedió a estudiar la desprotección de la misma utilizando la resina de intercambio aniónico AG3 X4A. Sin embargo, el uso de esta resina no permitió acceder a la amina **140** (**Esquema 4.7**).



Esquema 4.7. Uso de resina de intercambio aniónico para la desprotección de **140.**

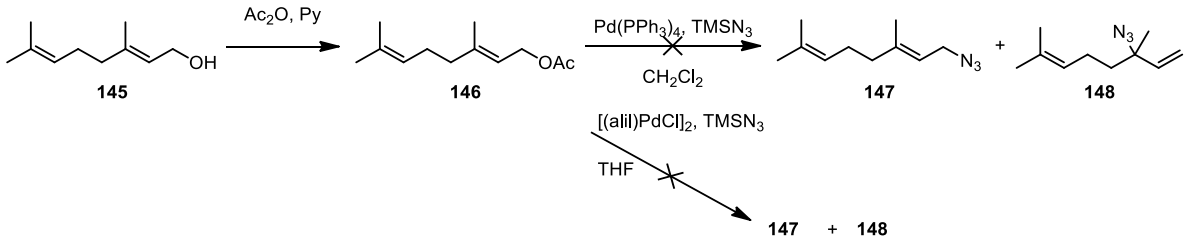
Posteriormente, se propuso obtener la amina alílica **125** a partir de la azida **143**. La azidación catalizada por paladio (0) de acetatos y fosfatos alílicos había sido descripta previamente por Murahashi y colaboradores.[148] Sin embargo, cuando

se trató el acetato **142** con azida de sodio en presencia de cantidades catalíticas de tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0), no se verificó ninguna reacción (**Esquema 4.8**).



Esquema 4.8. Azidación catalizada por paladio (0) del acetato alílico **142.**

Adicionalmente, se propuso estudiar la azidación catalizada por paladio de acetato de geranilo (**146**). Para ello se utilizaron algunas condiciones descriptas para la reacción de alilación de Tsuji-Trost.[149] Esta reacción involucra la formación de un complejo η^3 π-alil sobre el cual se adiciona de manera estereoselectiva un nucleófilo (**Figura 4.7**).[150] La alilación asimétrica informada por Tsuji y Trost es uno de los métodos más utilizados para la formación de enlaces C–C y C–heteroátomo.[151] Sin embargo, bajo ninguna de las condiciones evaluadas se observó el consumo del acetato **146** (**Esquema 4.9**).



Esquema 4.9. Azidación catalizada por paladio (0) de acetato de geranilo**.**

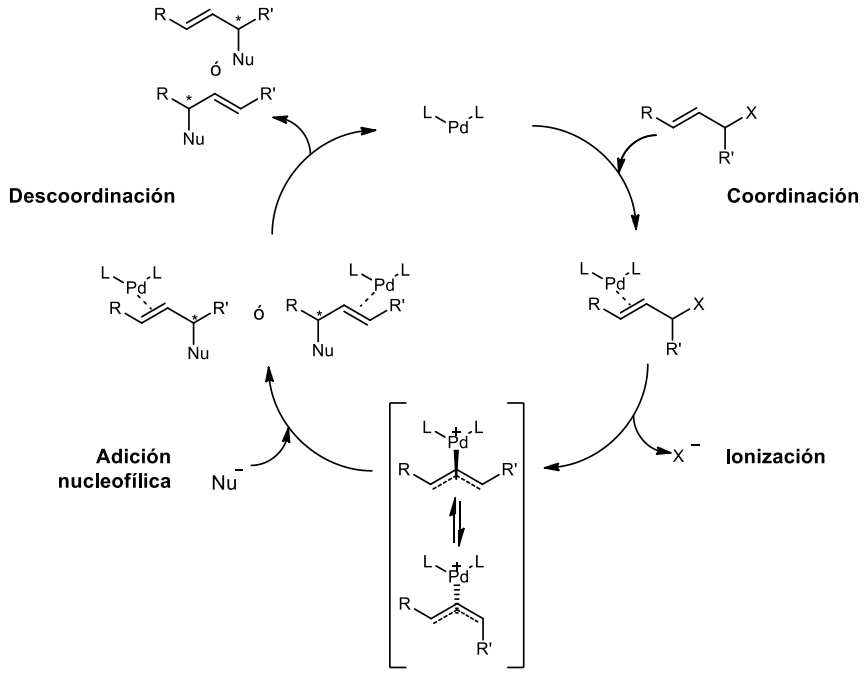
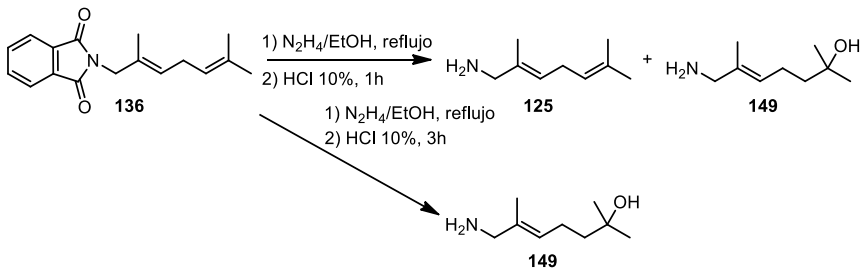


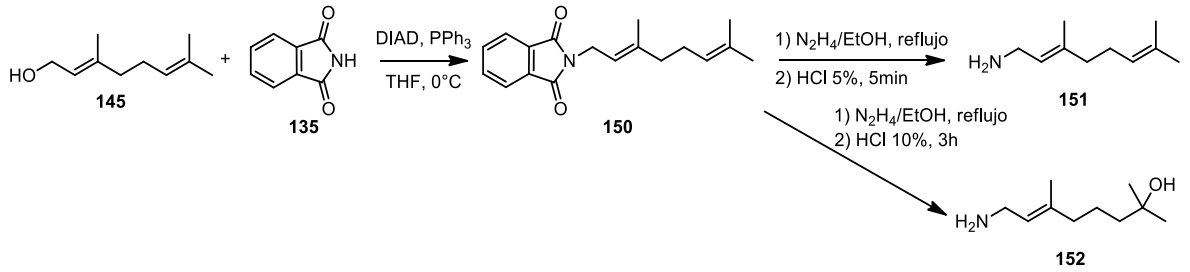
Figura 4.7. Alquilación alílica asimétrica (AAA) catalizada por paladio (0).[150]

Frente a estos resultados, se retomó la síntesis de aminas alílicas a través de ftalimidas *N*-sustituídas como intermediarios para la obtención de estos compuestos. En este sentido, se estudió la desprotección de la ftalimida **136** empleando monohidrato de hidracina a 78 °C.[146] Sin embargo, en lugar de la amina alílica **125** se obtuvo mayoritariamente el compuesto **149**. Se propuso que este compuesto provenía de la hidratación del doble enlace terminal, dado que la finalización de la reacción implica tratamiento con ácido clorhídrico diluido. En efecto, se constató que al aumentar la concentración del ácido y el tiempo de digestión, se obtenía exclusivamente el alcohol **149** (**Esquema 4.10**). El alcohol **149** se caracterizó completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución.



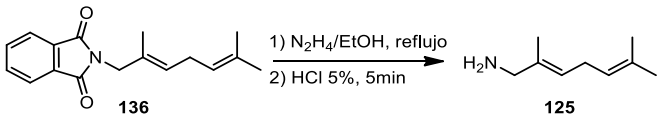
Esquema 4.10. Desprotección de ftalimida *N*-sustituída **136.**

Adicionalmente, se evaluó la desprotección con hidracina de *N*-geranil ftalimida **150**, preparada a partir de geraniol (**145**). Disminuyendo la concentración de ácido clorhídrico a 5% y el tiempo de digestión a 10 min, se pudo obtener la geranilamina **151** de manera satisfactoria. De manera similar a lo observado anteriormente para la ftalimida **136**, se constató que al aumentar la concentración de ácido o el tiempo de digestión, se obtenía mayoritariamente el alcohol **152**, producto de la hidratación por ataque del ácido clorhídrico al doble enlace terminal (**Esquema 4.11**).



Esquema 4.11. Desprotección de *N*-geranil ftalimida**.**

Posteriormente, el tratamiento de la ftalimida *N*-sustituída **136** con monohidrato de hidracina a 78 °C dio lugar a la amina alílica **125** con 84% de rendimiento (**Esquema 4.12**). La amina **125** fue caracterizada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear.



Esquema 4.12. Desprotección de ftalimida *N*-sustituída **136.**

En el espectro de RMN de ^{1}H de la amina **125** las señales correspondientes a los protones vinílicos H-3 y H-5 se observaban como un triple quintuplete (J = 7,1; 1,2 Hz) centrado a 5,11 ppm y un triple triplete (J = 7,1; 1,0 Hz) centrado a 5,26 ppm, respectivamente. Además, la señal correspondiente a los protones asignados como H-1 aparecía como un singulete a 3,17 ppm, mientras que la señal correspondiente a los protones H-4 se observaba como un triplete ($^3J_{H\text{-}H}$ = 7,1 Hz) centrado a 2,72 ppm (**Figura 4.8**).

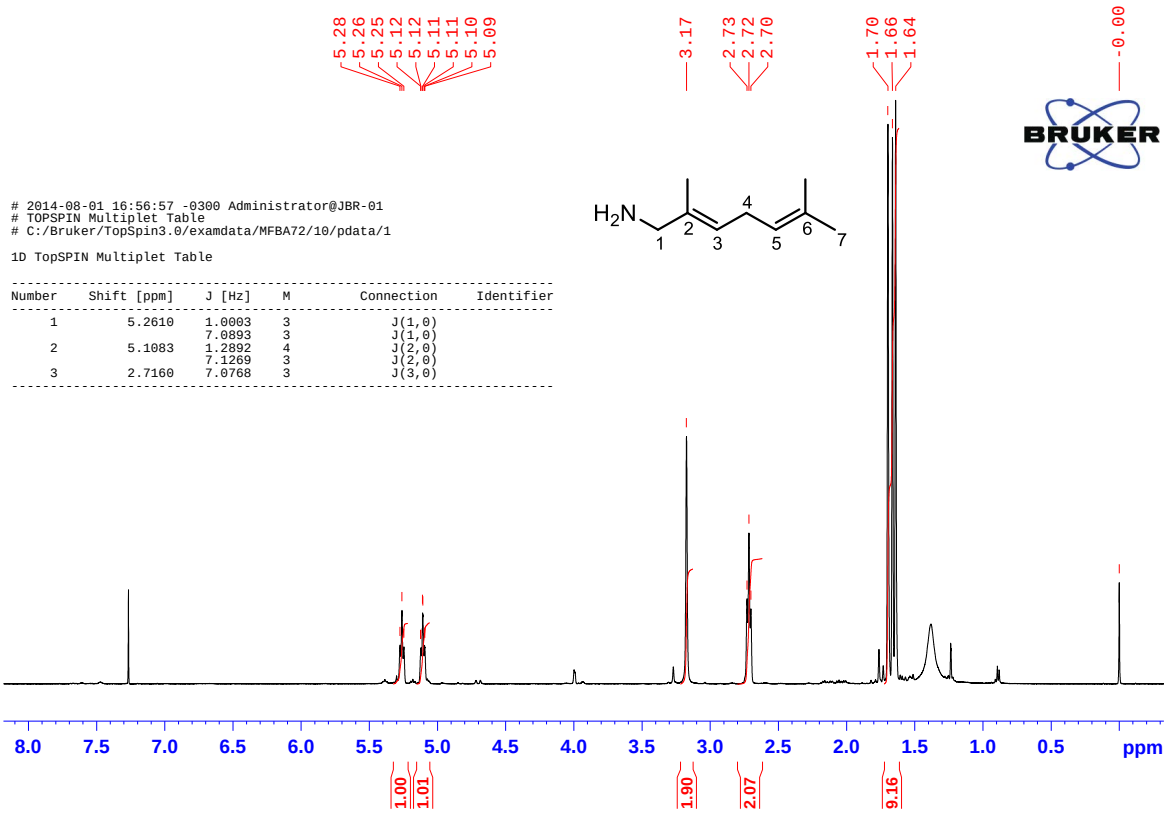


Figura 4.8. Espectro de RMN de ^{1}H de (*E*)-2,6-dimetil-hepta-2,5-dien-1-il amina (**125**).

En el espectro de RMN de ^{13}C de la amina **125** las señales correspondientes a los carbonos C-3 y C-5 aparecían a 122,6 y 122,9 ppm, respectivamente. Por otra parte, las señales asignadas a los carbonos C-2 y C-6 se observaban a 136,3 y 131,7 ppm, respectivamente. Además, la señal asignada a C-1 aparecía a 49,9 ppm, mientras que la señal correspondiente a C-4 aparecía a 26,8 ppm (**Figura 4.9**).

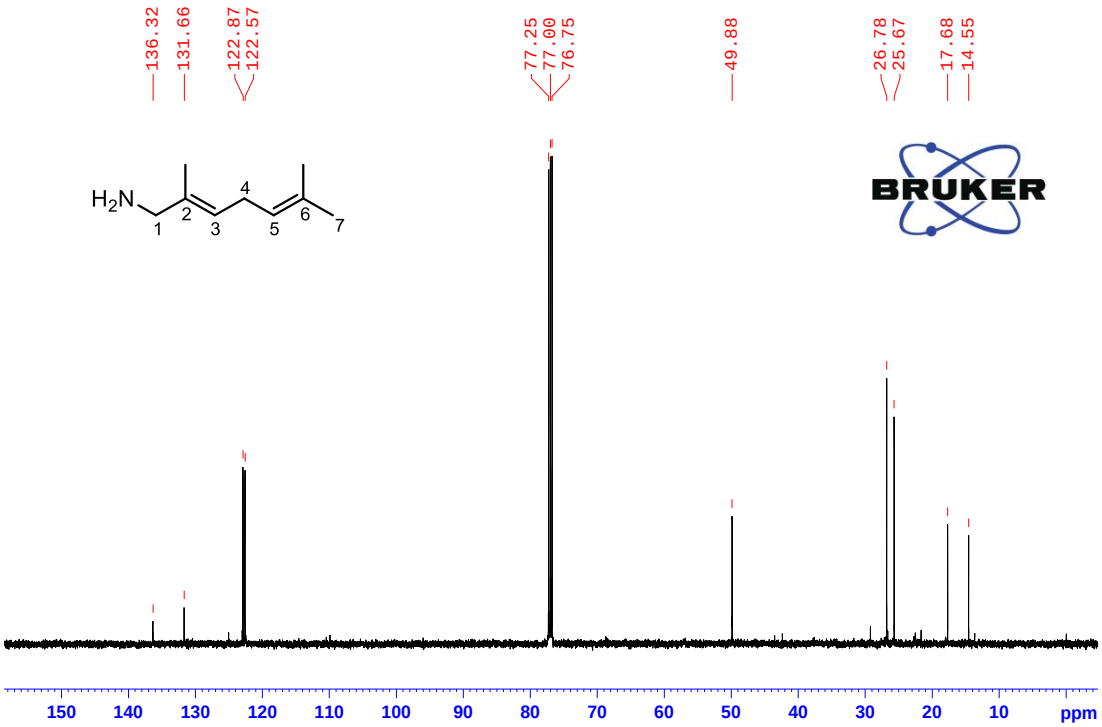
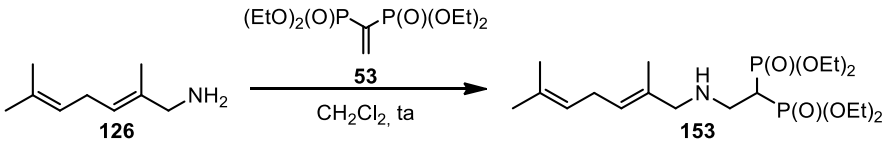


Figura 4.9. Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-2,6-dimetil-hepta-2,5-dien-1-il amina (**125**).

Posteriormente, la adición conjugada de la amina **125** al aceptor de Michael **53** permitió acceder al bisfosfonato de tetraetilo **153** de manera cuantitativa (**Esquema 4.13**). Cabe destacar que este compuesto no se purificó por columna cromatográfica ya que, como se había verificado para 2-alquilaminoetil bisfosfonatos de tetraetilo sintetizados previamente en el laboratorio, puede sufrir una reacción de retro-Michael promovida por la sílica. Anteriormente, los precursores inmediatos de los ácidos bisfosfónicos habían sido hidrolizados sin purificación previa para obtener los ácidos bisfosfónicos libres **32**-**35**, que fueron purificados por recristalización.[87]



Esquema 4.13. Síntesis de 1-[(*E*)-2-((2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**153**).

El bisfosfonato de tetraetilo **153**, precursor inmediato de la molécula blanco **124**, fue caracterizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear. En el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **153** se observaban claramente las señales correspondientes a los protones vinílicos H-6 y H-8. La señal correspondiente a H-6 aparecía como un triple triplete (*J* = 7,1; 1,3 Hz**)** centrado a 5,09 ppm, mientras que la señal correspondiente a H-8 aparecía como un triplete ($^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,2 Hz) centrado a 5,29 ppm. Además, las señales correspondientes a los protones asignados como H-1 y H-2 se observaban como un triple triplete (*J* = 23,7; 5,9 Hz**)** centrado a 2,64 ppm y un triple doblete (*J* = 16,8; 5,9 Hz**)** centrado a 3,08 ppm, respectivamente, lo cual es característico para derivados 2-alquilaminoetil y 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos (**Figura 4.10**).

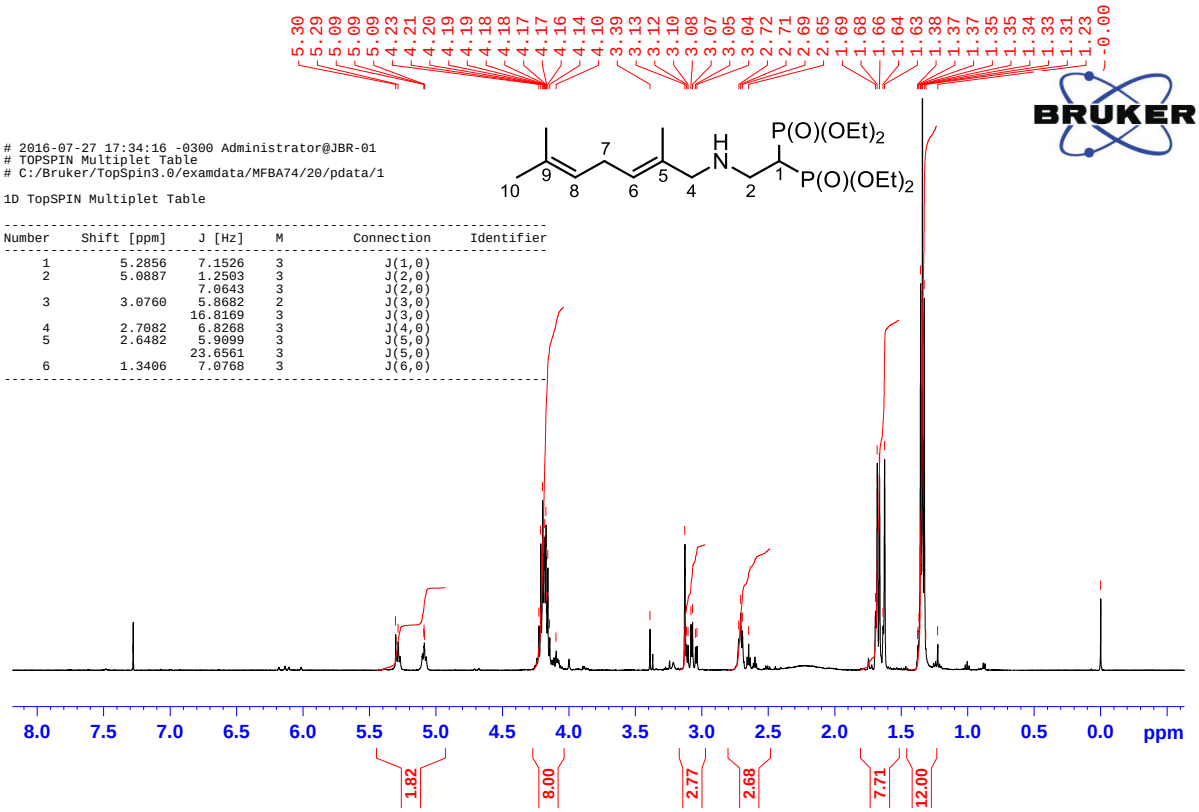


Figura 4.10. Espectro de RMN de ^{1}H de 1-[(*E*)-2-((2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**153**).

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **153** la señal correspondiente a C-1 se observaba como un triplete centrado a 37,6 ppm, con una constante de aoplamiento de 132,4 Hz ($^{1}J_{C\text{-}P}$), lo cual es típico para este arreglo de una unión

gem-bisfosfónica. Además, la señal correspondiente al carbono asignado como C-2 aparecía como un triplete centrado a 44,8 ppm con una constante de acoplamiento de 4,3 Hz ($^{2}J_{C\text{-}P}$) (**Figura 4.11**).

Por otra parte, las señales correspondientes a C-6 y C-8 se observaban a 122,8 y 125,1 ppm respectivamente, mientras que los carbonos cuaternarios asignados como C-5 y C-9 se observaban a 132,8 y 131,5 ppm, respectivamente (**Figura 4.11**).

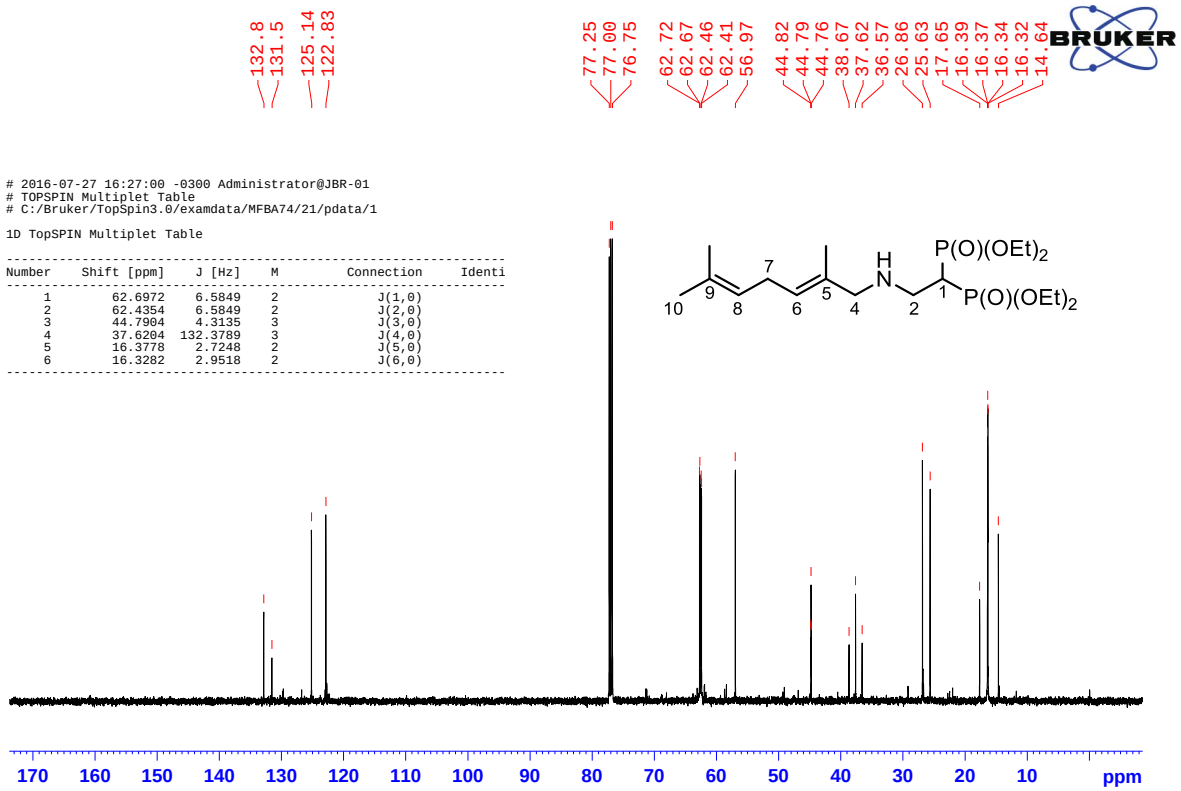


Figura 4.11. Espectro de RMN de ^{13}C de 1-[(*E*)-2-((2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**153**).

Por último, en el espectro de RMN de ^{31}P del compuesto **153** sólo se observó un singulete a 22,82 ppm, ya que los dos átomos de fósforo presentes en la estructura son equivalentes (**Figura 4.12**).

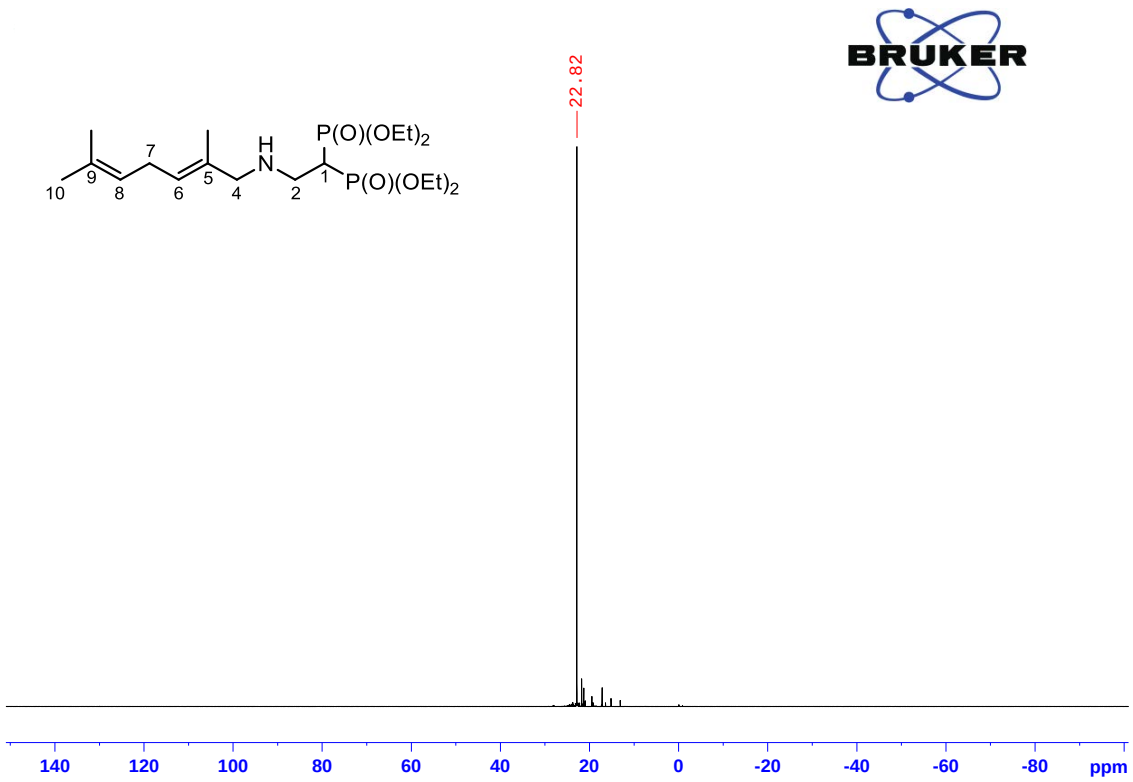
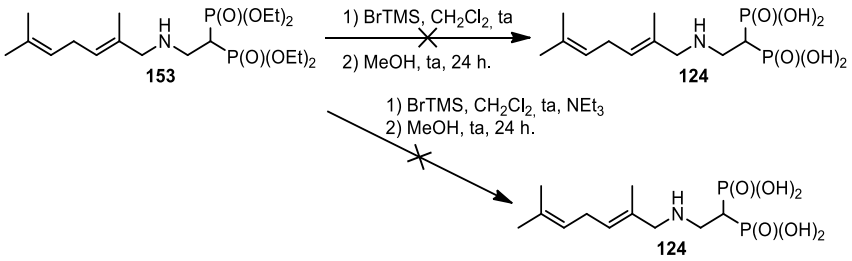


Figura 4.12. Espectro de RMN de ^{31}P de 1-[(*E*)-2-((2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**153**).

Una vez disponible el compuesto **153**, se procedió a preparar el ácido bisfosfónico **124**. Cabe destacar que los tetra alquil ésteres de ácidos bisfosfónicos no se convierten en ácidos libres en el plasma humano, por tanto no pueden funcionar como prodrogas y deben ser hidrolizados para poder ejercer su actividad biológica.[152] En efecto, todos los ácidos 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfónicos preparados previamente en el laboratorio habían sido obtenidos por hidrólisis con ácido clorhídrico de los bisfosfonatos de tetraetilo correspondientes.[87] Sin embargo, el tratamiento con ácido clorhídrico resultaba incompatible con la presencia de dobles enlaces en el compuesto **153**.

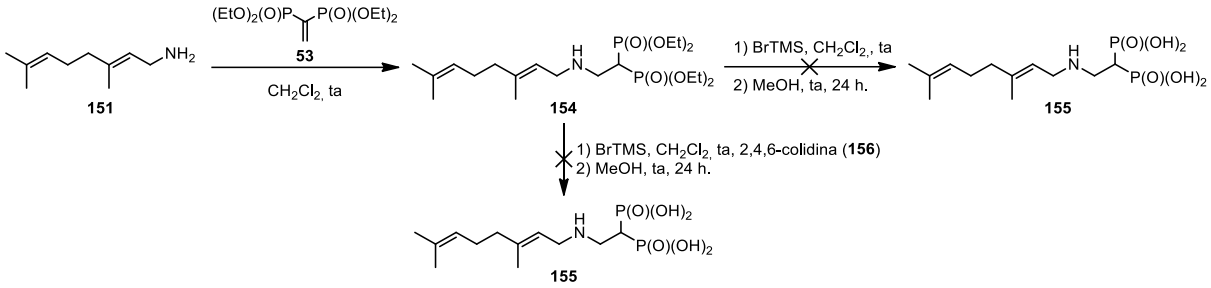
Otro de los métodos descriptos para la obtención de ácidos *gem*-bisfosfónicos consistía en la hidrólisis mediada por iodo o bromotrimetilsilano de los bisfosfonatos de tetraetilo correspondientes.[153-156] Por lo tanto, se procedió a evaluar el uso de bromotrimetilsilano para la hidrólisis del bisfosfonato **153**. Sin embargo, el tratamiento con bromotrimetilsilano seguido por digestión con metanol no permitió la desprotección de los grupos etilo de manera satisfactoria. En efecto, se constató por RMN que la hidrólisis del éster de tetraetilo **153** no fue

completa y que además parte del doble enlace terminal se hidrató. Para neutralizar el medio ácido que pudiera estar provocando la hidratación del doble enlace terminal, se llevó a cabo la hidrólisis adicionando trietilamina. En este caso, se observó por ^{1}H-RMN la aparición de un doble doblete (J = 33,9; 30,4 Hz) centrado a 5,97 ppm. Además, se verificó la desaparición del triple triplete centrado a 2,64 ppm y del triple doblete centrado a 3,08 ppm característicos del aducto de Michael **153**. Estos resultados indicaban la ruptura del enlace N–C-2, lo cual permite postular que tuvo lugar una reacción de retro-Michael (**Esquema 4.14**).



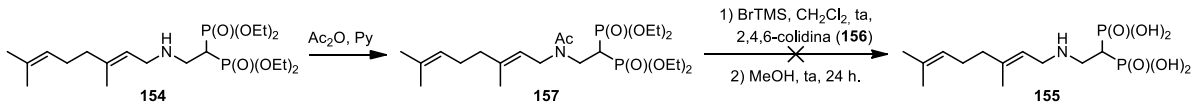
Esquema 4.14. Hidrólisis de bisfosfonato de tetraetilo **153**.

Dado que las condiciones descriptas para la hidrólisis mediada por bromotrimetilsilano de tetra alquil ésteres de ácidos bisfosfónicos no habían funcionado para la hidrólisis del compuesto **153,** se sintetizó el éster de tetraetilo **154** a partir de geranilamina (**151**) para evaluar diferentes condiciones de hidrólisis. En primer lugar, el tratamiento de **154** con bromotrimetilsilano, seguido por digestión con metanol, no produjo la hidrólisis completa del compuesto. Además, como se había verificado anteriormente para el compuesto **153**, parte del doble enlace terminal se hidrató. Posteriormente, se procedió a realizar la hidrólisis de **154** con bromotrimetilsilano y colidina (**156**), de acuerdo al método descripto por Wiemer y colaboradores para la desprotección de isoprenil bisfosfonatos.[157] Sin embargo, de manera similar a lo observado para la hidrólisis del compuesto **153,** se verificó por ^{1}H-RMN la aparición de un doble doblete (J = 33,9; 30,4 Hz) centrado a 5,97 ppm, y la desaparición de las señales características del aducto de Michael. Estos resultados permiten sugerir que tuvo lugar una reacción de retro-Michael, de manera similar a lo observado para el compuesto **153** (**Esquema 4.15**).



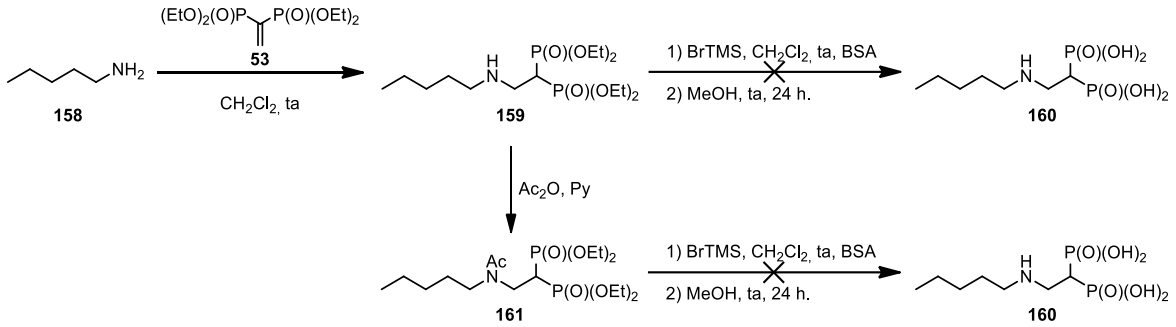
Esquema 4.15. Hidrólisis de bisfosfonato de tetraetilo **154**.

Adicionalmente, se evaluó la hidrólisis del éster de tetraetilo acetilado **157** con bromotrimetilsilano y colidina (**156**). Sin embargo, se observó nuevamente por ^{1}H-RMN la aparición de un doble doblete (*J* = 33,9; 30,4 Hz) centrado a 5,97 ppm, consistente con la presencia de una unidad eteniliden *gem*-bisfosfónica, tipo **53**. Además, la desaparición del triple triplete y del triple doblete característicos de 2-alquil-aminoetil bisfosfonatos, permitía suponer que tuvo lugar una reacción de retro-Michael (**Esquema 4.16**).



Esquema 4.16. Hidrólisis de éster de tetraetilo acetilado **157**.

Posteriormente, se sintetizó el éster de tetraetilo **159** a partir de pentilamina, como un análogo simple de los compuestos **153** y **154**. Se procedió a evaluar la hidrólisis del compuesto **159** con bromotrimetilsilano en presencia de *N,O*-Bis(trimetilsilil) acetamida (BSA). La *N,O*-Bis(trimetilsilil) acetamida (BSA) es un agente sililante ampliamente utilizado, ya que permite la sililación de compuestos orgánicos en condiciones neutras y minimiza la obtención de productos secundarios.[158] Sin embargo, los datos espectroscópicos sugerían que también había tenido lugar una reacción de retro-Michael. De manera similar, cuando se hizo reaccionar el compuesto acetilado **161** con bromotrimetilsilano y BSA se observó nuevamente por ^{1}H-RMN la aparición del doble doblete (*J* = 33,9; 30,4 Hz) centrado a 5,97 ppm y la desaparición del triple triplete y del triple doblete asignados a los protones H-1 y H-2, respectivamente, lo cual sugiere que podría haber ocurrido una reacción de retro-Michael (**Esquema 4.17**).



Esquema 4.17. Hidrólisis de compuestos **159** y **161**.

Los resultados obtenidos permiten postular que los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos tales como **153**, **154** y **159** no se pueden hidrolizar utilizando agentes sililantes. En este caso, es probable que el átomo de nitrógeno pueda coordinarse al átomo de silicio, que actúa como centro ácido de Lewis, promoviendo una reacción de retro-Michael. La protección del nitrógeno de la cadena lateral con un grupo acetilo no permite superar este inconveniente, ya que el átomo de oxígeno del grupo acetilo también podría coordinarse al silicio para dar lugar a la reacción de retro-Michael.

Resulta evidente que la hidrólisis de los ésteres de grupos fosfonato de derivados del tipo **153**, **154** y otros relacionados estructuralmente no es un proceso directo. En este sentido, debe desarrollarse una nueva química dada la gran potencialidad de estos compuestos.

Como los derivados azufrados eran también compuestos muy relevantes desde el punto de vista farmacológico, se decidió sintetizar los análogos azufrados de los compuestos **124** y **155**. Dicha síntesis se discute en detalle en el capítulo 5.

Capítulo 5:

2-Alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos

5.1.-ANTECEDENTES

En la actualidad, se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Toxoplasma gondii*.[76,79] Si bien en la mayoría de los casos la infección es asintomática, en individuos inmunosuprimidos puede tener consecuencias graves.[76] Como se discutió anteriormente, la quimioterapia actual para la toxoplasmosis exhibe numerosas limitaciones, como por ejemplo efectos secundarios significativos, costos elevados y baja biodisponibilidad en el sistema nervioso central.[102,159] Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes anti *T. gondii*, basada en el conocimiento actual de la biología del parásito, es un tópico de enorme interés.

Los isoprenoides son metabolitos esenciales en todos los organismos debido a su participación en una variedad de procesos biológicos. A pesar de su diversidad estructural y funcional, todos los isoprenoides provienen de los mismos precursores: pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). En *T. cruzi*, IPP es sintetizado únicamente *via* el camino de mevalonato, en el cual la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa es la enzima reguladora clave (**Figura 1.5**). Por otra parte, en parásitos Apicomplexa como *T. gondii*, IPP y DMAPP son sintetizados a través del camino de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP) (**Figura 5.1**).[40,102]

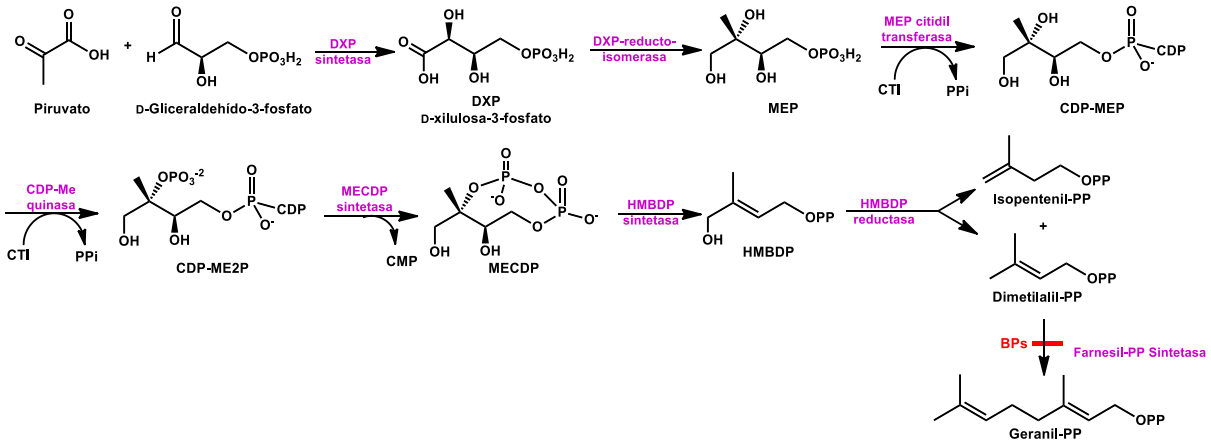
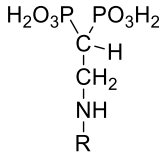


Figura 5.1. Biosíntesis de isoprenoides en parásitos Apicomplexa.[40]

Para sintetizar isoprenoides de mayor longitud, *T. gondii* posee una enzima bifuncional (*Tg*FPPS) capaz de catalizar tanto la formación de FPP como de GGPP.[103] Además de su producción de isoprenoides, los parásitos del género *Toxoplasma* pueden tomar FPP y/o GGPP del huésped, en el cual son sintetizados a través del camino de mevalonato.[159] Varias enzimas del camino biosintético de isoprenoides han sido identificadas como blancos moleculares relevantes para el tratamiento de enfermedades parasitarias.[102,160] En particular, los derivados 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfónicos (**32**-**35**) resultaron potentes inhibidores de la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*. Estos bisfosfonatos ejercen su acción antiparasitaria inhibiendo la actividad enzimática de *Tc*FPPS. Por ejemplo, el compuesto **34** inhibe la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* con un ED_{50} de 0,84 μM y un IC_{50} de 0,49 μM hacia *Tc*FPPS, mientras que el compuesto **35** presentó un IC_{50} de 0,058 μM contra la enzima blanco (**Figura 5.2**).[87]



34, R = *n*-hexil
35, R = *n*-heptil

Figura 5.2. Estructura química de derivados 2-alquilaminoetil bisfosfónicos.

Por otra parte, los derivados 1-hidroxi-, 1-alquil- y 1-amino-1,1-bisfosfónicos resultaron sumamente útiles para establecer correlaciones de estructura química-actividad biológica. Por ejemplo, el 1-hidroxi-1,1-bisfosfonato **29** (R = OH, n = 5) resultó ser un potente inhibidor contra amastigotes de *T. cruzi* (ED_{50} = 18 μM) mientras que el compuesto **162** (R = OH, n = 9) es efectivo contra taquizoítos de *T. gondii* (ED_{50} = 0,28 μM).[52,85,161] Además, algunos 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos inhibieron la proliferación de taquizoítos de *T. gondii*, y la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo, el compuesto **163** exhibió un ED_{50} de 6,23 μM contra taquizoítos de *T. gondii* y un IC_{50} de 0,093 μM hacia *Tg*FPPS (**Figura 5.3**).[88]

29, R = OH, n = 5
162, R = OH, n = 9
164, R = F, n = 7
165, R = F, n = 8

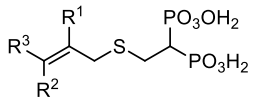
163, X = NH, R = *n*-dodecil
166, X = S, R = *n*-nonil
167, X = S, R = *n*-decil
168, X = S(O), R = *n*-heptil

Figura 5.3. Estudios de relación estructura química-actividad biológica.

Contrariamente a lo esperado, los derivados α-fluoro-1,1-bisfosfónicos están completamente desprovistos de actividad contra amastigotes de *T. cruzi* y *Tc*FPPS, independientemente de la longitud de la cadena. Sin embargo, estos compuestos resultaron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. En efecto, los bisfosfonatos **164** y **165** exhiben valores de IC_{50} de 0,035 μM y 0,060 μM respectivamente, hacia la enzima blanco. La alta selectividad de estos compuestos hacia *Tg*FPPS frente a *Tc*FPPS se puede justificar por el hecho de que las secuencias de estas enzimas tienen menos de 50% de similitud (**Figura 5.3**).[113]

Los derivados 2-alquilmercaptoetil bisfosfónicos también surgieron como potenciales agentes antiparasitarios. En efecto, los compuestos **166** y **167** resultaron potentes inhibidores de la proliferación de taquizoítos de *T. gondii* con valores de EC_{50} de 1,2 μM y 1,8 μM, respectivamente. Esta acción antiparasitaria está asociada a una potente inhibición de la actividad enzimática de *Tg*FPPS, con valores de IC_{50} de 0,025 μM y 0,021 μM, respectivamente. Adicionalmente, el bisfofonato **168**, conteniendo una funcionalidad sulfóxido en C-3, demostró ser un potente inhibidor de la actividad enzimática de *Tg*FPPS, con un IC_{50} de 0,009 μM (**Figura 5.3**).[114]

Dado el potencial de los derivados 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos como agentes antiparasitarios, y en base a los estudios estructurales y termodinámicos de la interacción de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos con *Tc*FPPS, se postularon las estructuras **169**-**171** como blancos moleculares para su síntesis y evaluación biológica (**Figura 5.4**).

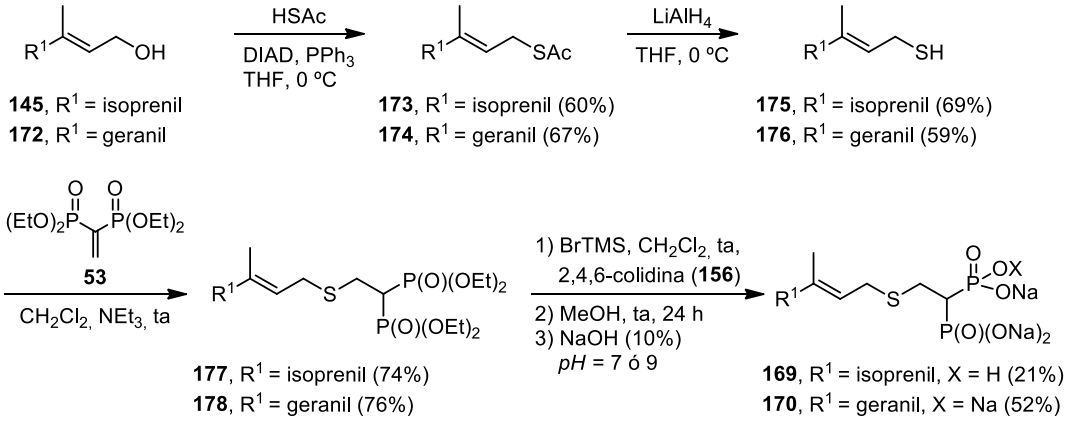


169, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = isoprenil
170, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = geranil
171, R^1 = Me, R^2 = H, R^3 = metilalil

Figura 5.4. Estructura de compuestos seleccionados como blancos moleculares.

5.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Los compuestos **169** y **170** fueron preparados siguiendo la estrategia sintética mostrada en el **Esquema 5.1**. En primer lugar, se obtuvieron los tioacetatos **173** y **174**, a partir de geraniol (**145**) y farnesol (**172**), ambos disponibles comercialmente. La reacción de geraniol (**145**) y farnesol (**172**) con ácido tioacético bajo condiciones de Mitsunobu permitió obtener los tioacetatos **173** y **174** con 60 y 67% de rendimiento, respectivamente.



Esquema 5.1. Síntesis de derivados 2-alquilmercaptoetil bisfosfónicos.

Posteriormente, se llevó a cabo la reducción de los tioacetatos **173** y **174** por tratamiento con hidruro de aluminio y litio. Estas condiciones permitieron obtener los tioles **175** y **176** con 69 y 59% de rendimiento, respectivamente. La adición conjugada de los tioles **175** y **176** al aceptor de Michael **53** dio lugar a los bisfosfonatos de tetraetilo **177** y **178** con rendimientos de 74 y 76%, respectivamente (**Esquema 5.1**). Ambos bisfosfonatos fueron caracterizados completamente por espectrometría de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. A modo de ejemplo, en el espectro de

RMN de ^{1}H del compuesto **177** las señales correspondientes a los protones asignados como H-1 y H-2 se observaban como un triple triplete (J = 23,8; 6,1 Hz) centrado a 2,63 ppm y un triple doblete (J = 16,3; 6,4 Hz) centrado a 3,04 ppm, respectivamente. Estas señales son características de derivados 2-alquilaminoetil y 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos (**Figura 5.5**).

Por otra parte, las señales correspondientes a los protones vinílicos H-5 y H-9 se observaban como un triplete ($^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,7 Hz) centrado a 5,28 ppm y un multiplete centrado a 5,10 ppm, respectivamente. Además, la señal correspondiente a los protones asignados como H-4 aparecía como un doblete ($^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8,4 Hz) centrado a 3,24 ppm (**Figura 5.5**).

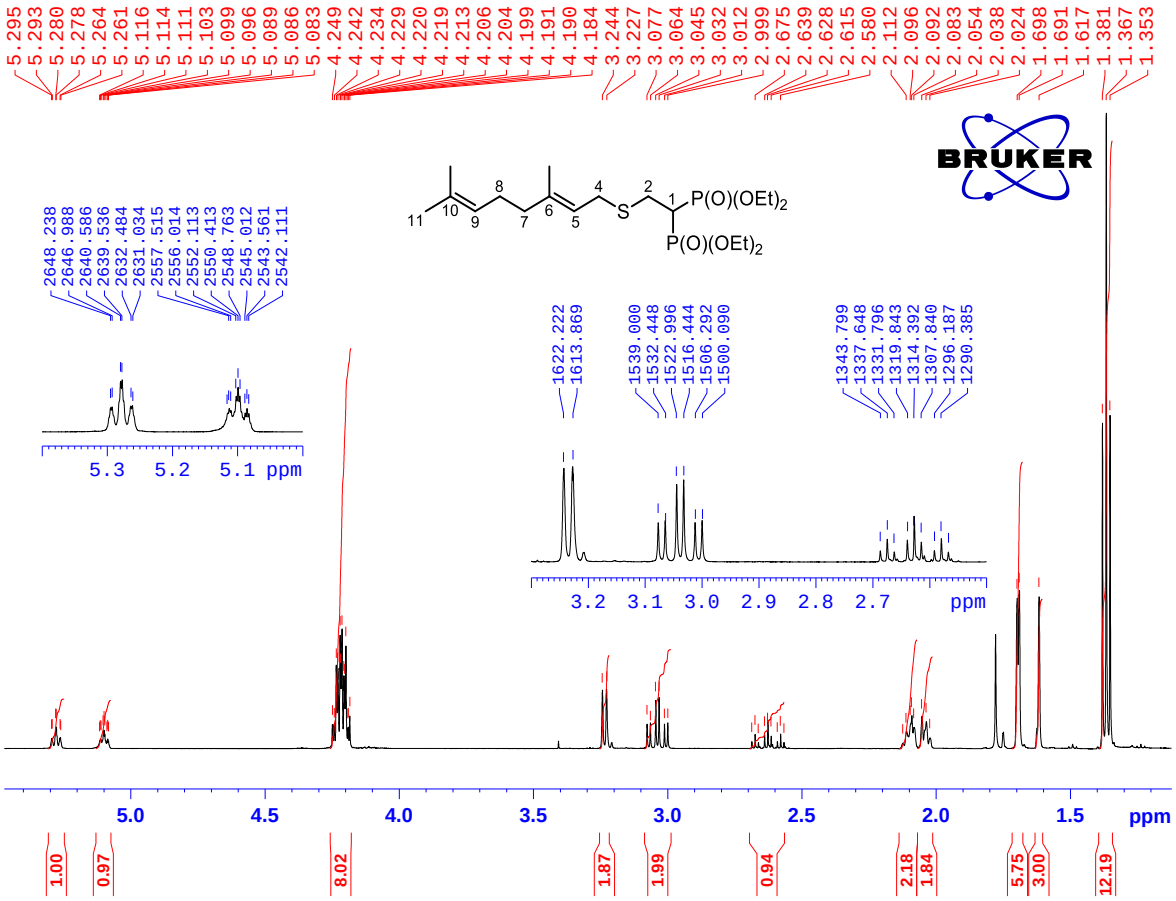


Figura 5.5. Espectro de RMN de ^{1}H de 1-[(*E*)-2-((3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1- bisfosfonato de tetraetilo (**177**).

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **177** la señal correspondiente a C-1 se observaba como un triplete centrado a 38,9 ppm, con una constante de acoplamiento de 131,6 Hz ($^{1}J_{C\text{-}P}$), lo cual es típico para este arreglo de una unión

gem-bisfosfónica. Además, la señal correspondiente al carbono asignado como C-2 aparecía como un triplete ($^{2}J_{C\text{-}P}$ = 5,0 Hz) centrado a 27,3 ppm (**Figura 5.6**).

Por otra parte, las señales correspondientes a C-5 y C-9 se observaban a 119,9 y 123,9 ppm, respectivamente, mientras que los carbonos cuaternarios asignados como C-6 y C-10 se observaban a 139,4 y 131,7 ppm, respectivamente (**Figura 5.6**).

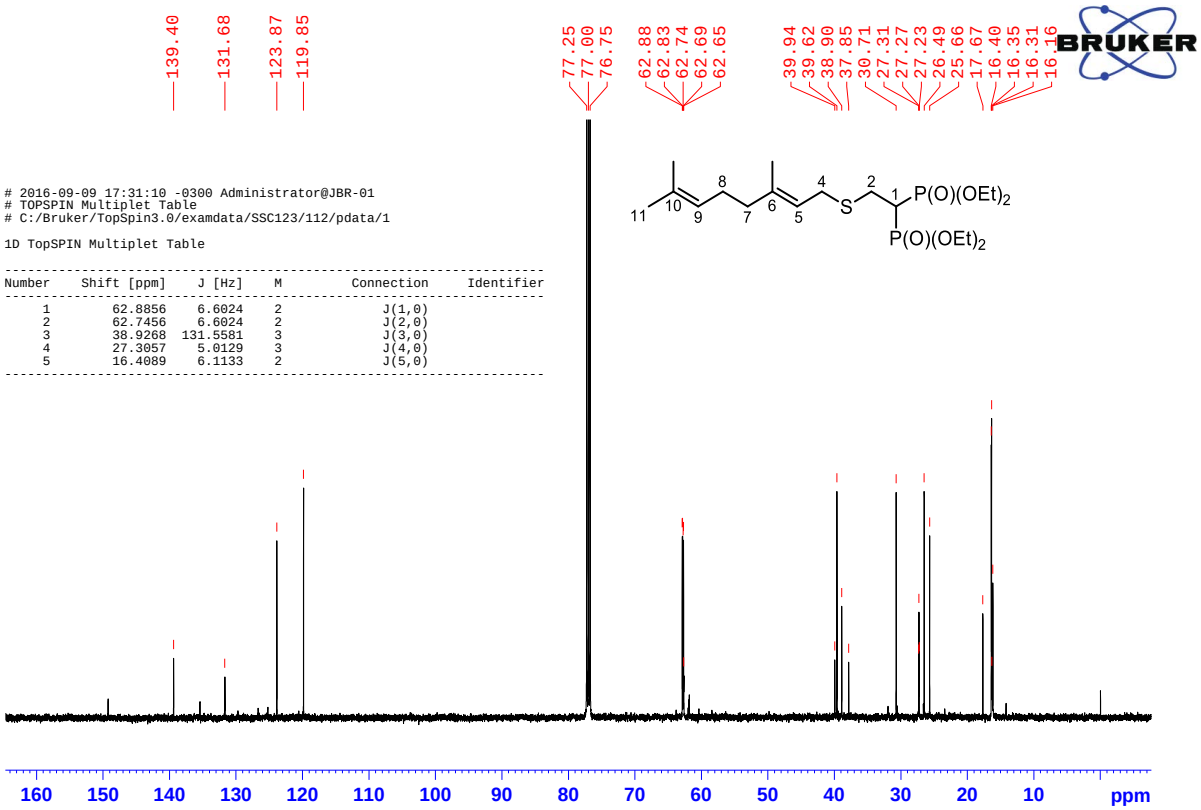


Figura 5.6. Espectro de RMN de ^{13}C de 1-[(*E*)-2-((3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1- bisfosfonato de tetraetilo (**177**).

Por último, en el espectro de RMN de ^{31}P del compuesto **177** sólo se observaba un singulete a 21,72 ppm, ya que los dos átomos de fósforo presentes en la estructura son equivalentes (**Figura 5.7**).

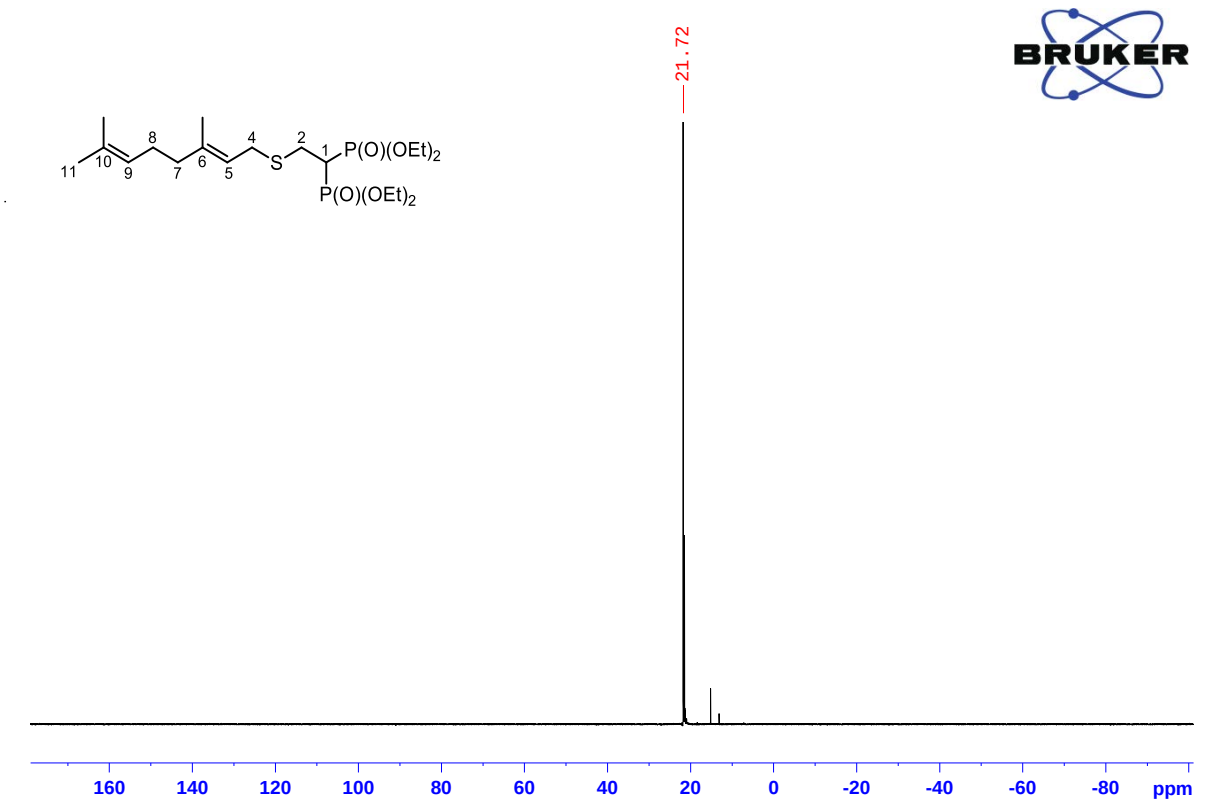


Figura 5.7. Espectro de RMN de ^{31}P de 1-[(*E*)-2-((3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1- bisfosfonato de tetraetilo (**177**).

Una vez obtenidos los bisfosfonatos de tetraetilo **177** y **178**, se procedió a preparar los ácidos bisfosfónicos correspondientes. Los bisfosfonatos **177** y **178** fueron sometidos a las condiciones descriptas anteriormente para la hidrólisis de bisfosfonatos de tetraetilo conteniendo cadenas isoprenoides en la posición C-1. El tratamiento de los bisfosfonatos **177** y **178** con bromotrimetilsilano en presencia de colidina (**156**), seguido de digestión con metanol, permitió la desprotección satisfactoria de los grupos etilo. El derivado **169** se obtuvo en forma de su sal trisódica con 21% de rendimiento, mientras que el compuesto **170** se obtuvo en forma de su sal tetrasódica con 52% de rendimiento. Ambos compuestos fueron caracterizados completamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa de alta resolución. La pureza de estos compuestos se determinó por análisis elemental.

A modo de ejemplo, en el espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **169** la señal correspondiente a los protones asignados como H-2 aparecía como un doble doble doblete (*J* = 15,1; 14,0; 7,3 Hz) centrado a 2,93 ppm, debido a que los protones H-2 se acoplan con el protón H-1 y con los dos átomos de fosforo con

diferentes constantes de acoplamiento. Además, la señal correspondiente al protón H-1 aparecía desplazada a campos altos (1,94-2,08 ppm), superponiéndose con las señales correspondientes a los protones H-7 y H-8 (**Figura 5.8**).

Por otra parte, las señales correspondientes a los protones vinílicos H-5 y H-9 se observaban como un triplete ($^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz) centrado a 5,30 ppm y un triplete ($^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz) centrado a 5,11 ppm, respectivamente, mientras que la señal correspondiente a los protones H-4 aparecía como un doblete ($^3J_{H-H}$ = 7,7 Hz) centrado a 3,20 ppm (**Figura 5.8**).

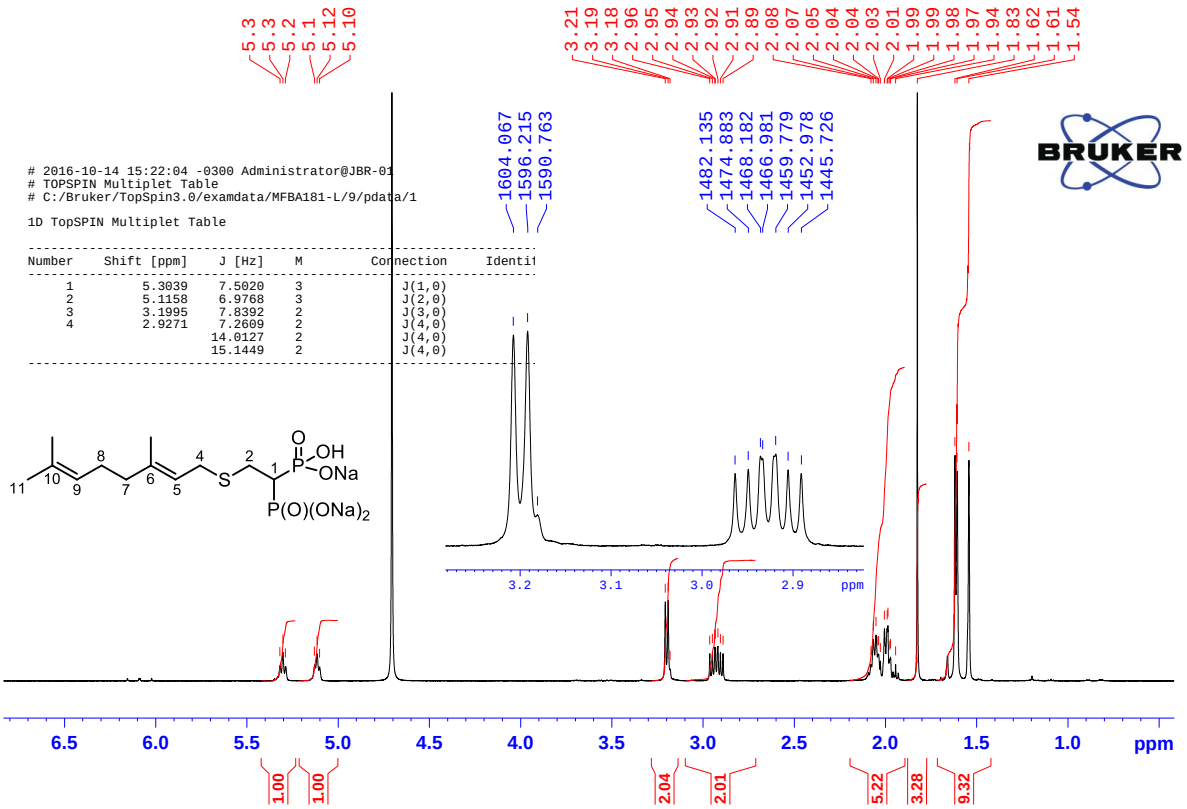


Figura 5.8. Espectro de RMN de ^{1}H de la sal trisódica de ácido 1-[(*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfónico (**169**).

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **169**, la señal correspondiente a C-1 se observaba como un triplete ($^1J_{P-C}$ = 109,3 Hz) centrado a 40,1 ppm, lo cual es característico para este tipo de unión *gem*-bisfosfónica. Además, la señal correspondiente a C-2 aparecía como un triplete ($^2J_{P-C}$ = 3,7 Hz) centrado a 28,7 ppm, mientras que las señales correspondientes a los carbonos C-5 y C-9 se observaban a 119,8 y 124,2 ppm, respectivamente (**Figura 5.9**).

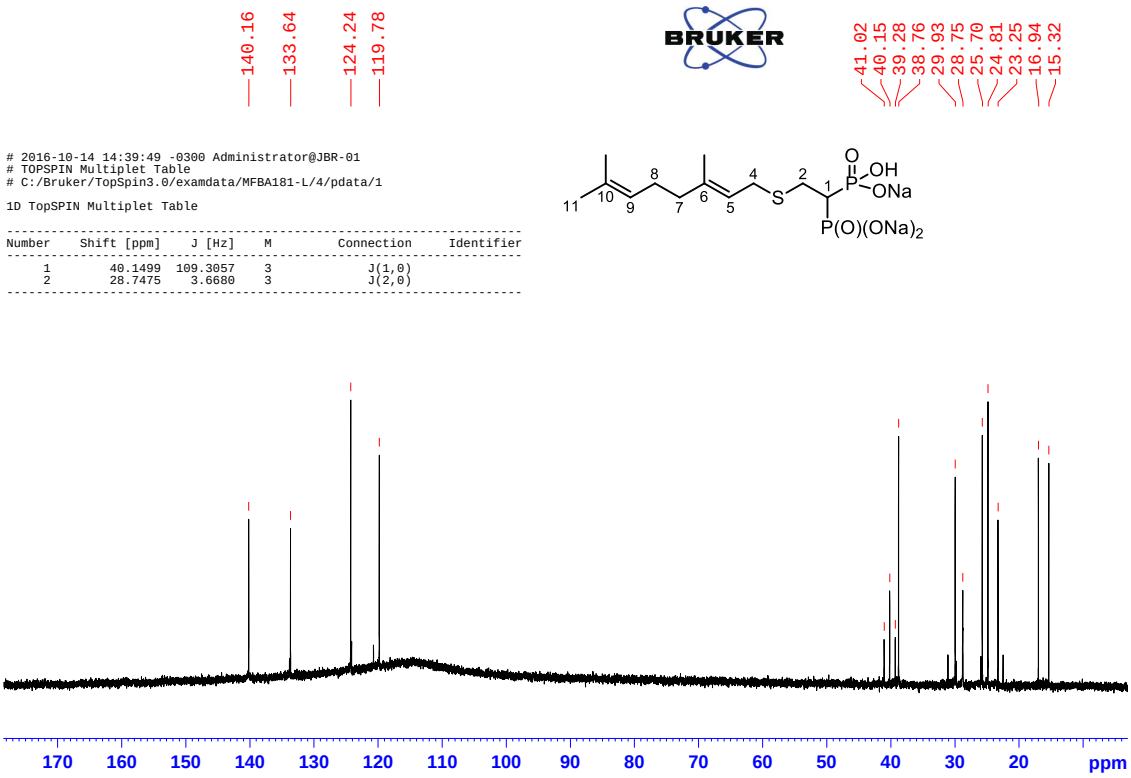


Figura 5.9. Espectro de RMN de ^{13}C de la sal trisódica de ácido 1-[(*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfónico (**169**).

Cabe destacar que la asignación de las señales de los espectros de ^{1}H y ^{13}C se realizó utilizando técnicas bidimensionales tales como experimentos de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C (HSQC y HMBC) y homonuclear (COSY-45). A modo de ejemplo, en el espectro de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C HSQC del compuesto **169** se observaba que el triplete ($^{1}J_{P\text{-}C}$ = 109,3 Hz) centrado a 40,1 ppm en el espectro de ^{13}C-RMN correlaciona con el multiplete entre 1,94 y 2,08 ppm en el espectro de ^{1}H-RMN, indicando que la señal correspondiente a H-1 aparecía superpuesta con las señales correspondientes a los protones H-7 y H-8 (**Figura 5.10**).

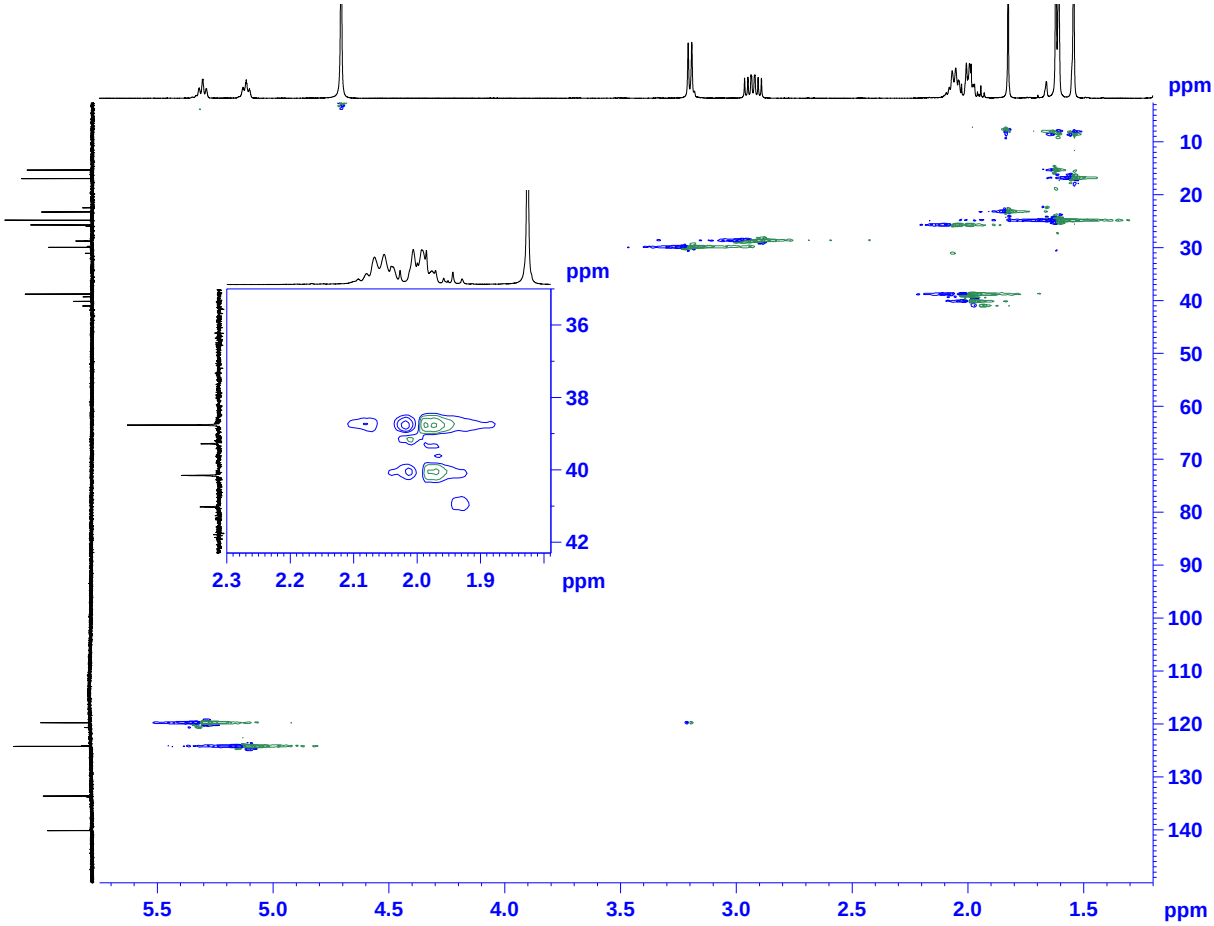


Figura 5.10. Espectro de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C HSQC del compuesto **169**.

Adicionalmente, en el espectro de correlación homonuclear ^{1}H-^{1}H COSY-45 se observaba que el doble doble doblete (J = 15,1; 14,0; 7,3 Hz) centrado a 2,93 ppm, correspondiente al protón H-2, correlaciona con el multiplete entre 1,94 y 2,08 ppm, indicando que la señal correspondiente al protón H-1 se desplazaba a campos altos, superponiéndose con las señales correspondientes a los protones H-7 y H-8. Por otra parte, se observaba que el triplete ($^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,5 Hz) centrado a 5,30 ppm correspondiente al protón vinílico H-5 correlacionaba con el doblete centrado a 3,20 ppm correspondiente a H-4, con el singulete en 1,62 ppm correspondiente al grupo metilo en C-6, y con el multiplete entre 1,94 y 2,08 ppm, mientras que la señal correspondiente al protón vinílico H-9 (5,11 ppm, t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,0 Hz) correlacionaba con el singulete en 1,61 ppm correspondiente al grupo metilo en C-10, y con el multiplete entre 1,94 y 2,08 ppm. Estas correlaciones

corroboraban que el multiplete entre 1,94 y 2,08 ppm correspondía a los protones asignados como H-1, H-7 y H-8 (**Figura 5.11**).

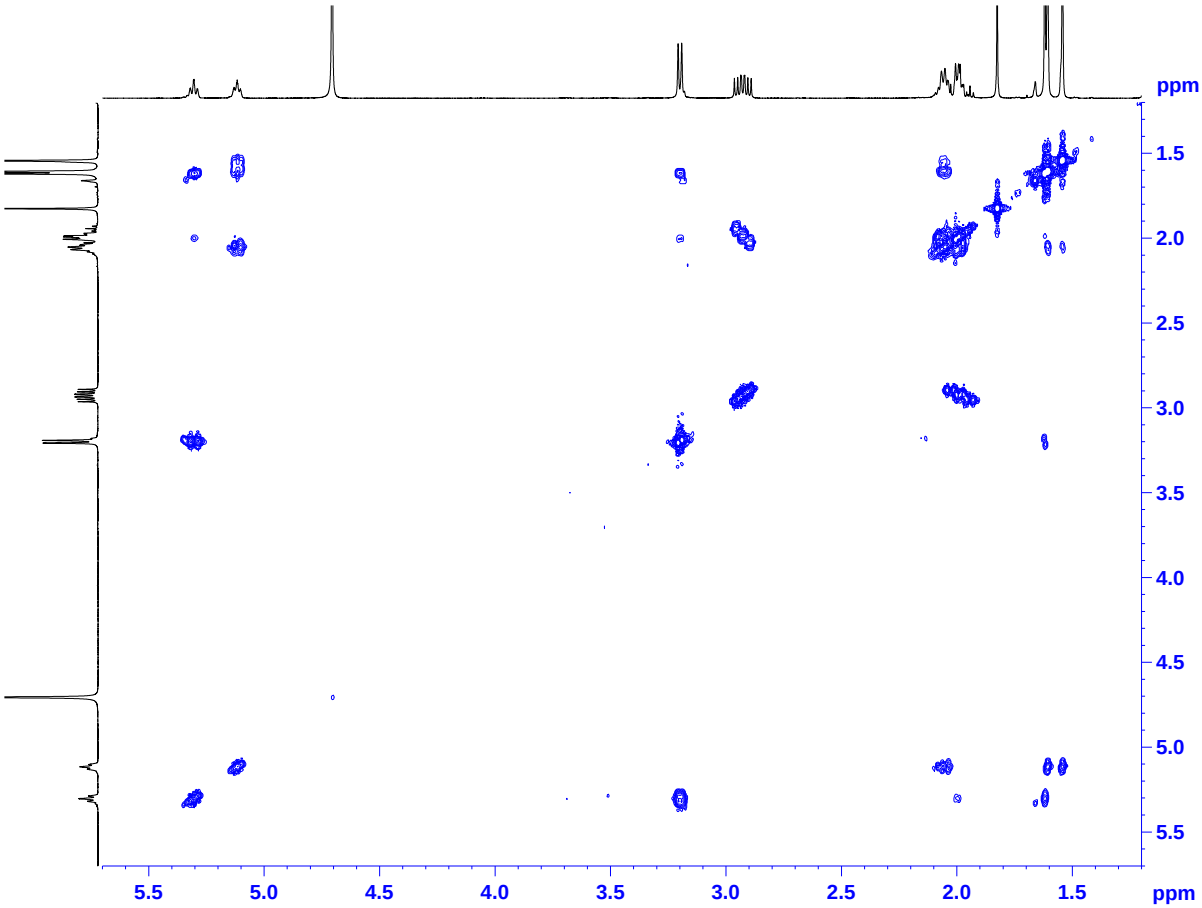


Figura 5.11. Espectro de correlación homonuclear ^{1}H-^{1}H COSY-45 del compuesto **169**.

Finalmente, el espectro de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C HMBC permitió asignar las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-10 y C-6, y a los grupos metilo en C-6 y C-10. Por ejemplo, se observaba que la señal a 140,2 ppm en el espectro de ^{13}C-RMN correlacionaba con el doblete ($^{3}J_{H-H}$ = 7,7 Hz) centrado a 3,20 ppm en el espectro de ^{1}H-RMN, por lo que correspondía al carbono C-6. Por otra parte, la señal a 133,6 ppm en el espectro de ^{13}C-RMN correlacionaba con dos singuletes en el espectro de ^{1}H-RMN correspondientes a dos grupos metilo, por lo que corresponde al carbono cuaternario C-10 (**Figura 5.12**).

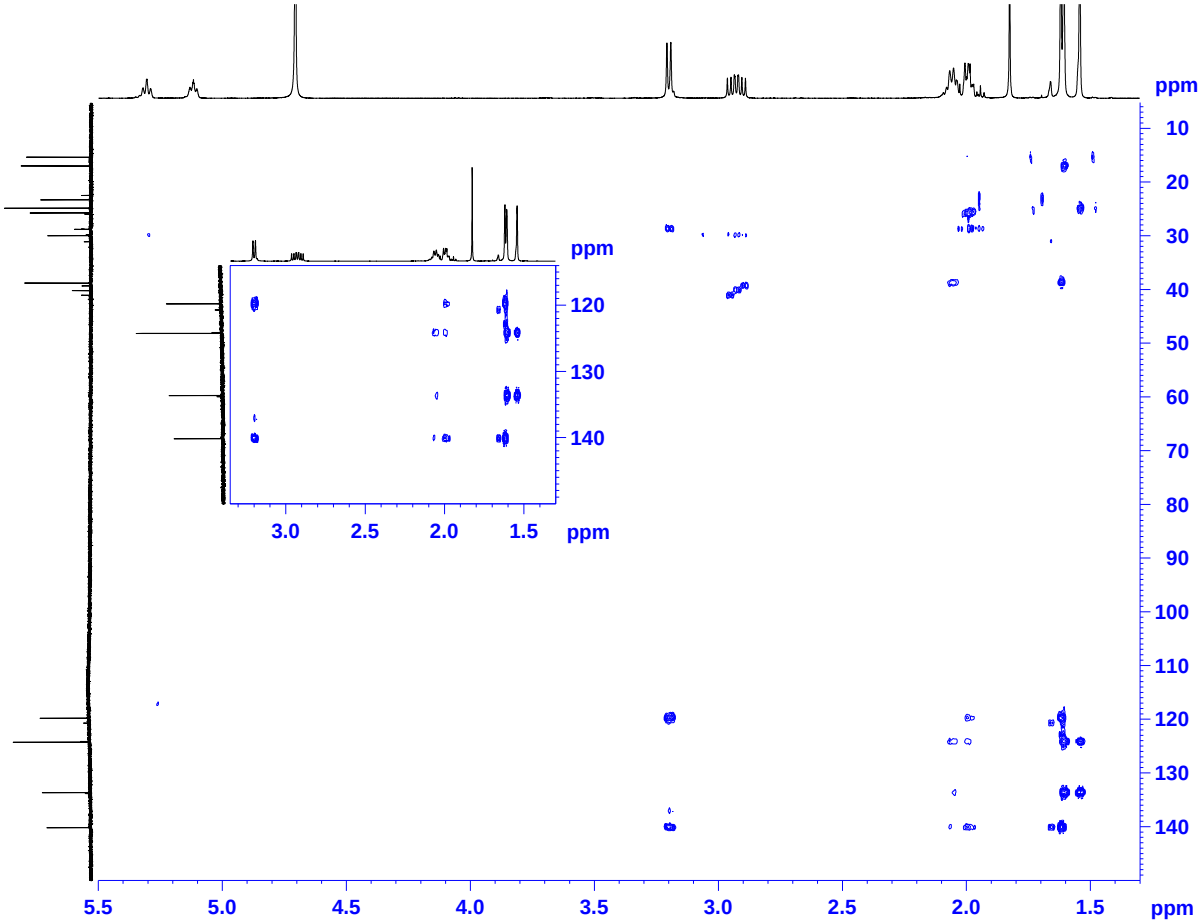


Figura 5.12. Espectro de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C HMBC del compuesto **169**.

Adicionalmente en el espectro de RMN de ^{31}P sólo se observaba un singulete a 15,85 ppm, ya que los dos átomos de fósforo presentes en la estructura eran equivalentes (**Figura 5.13**).

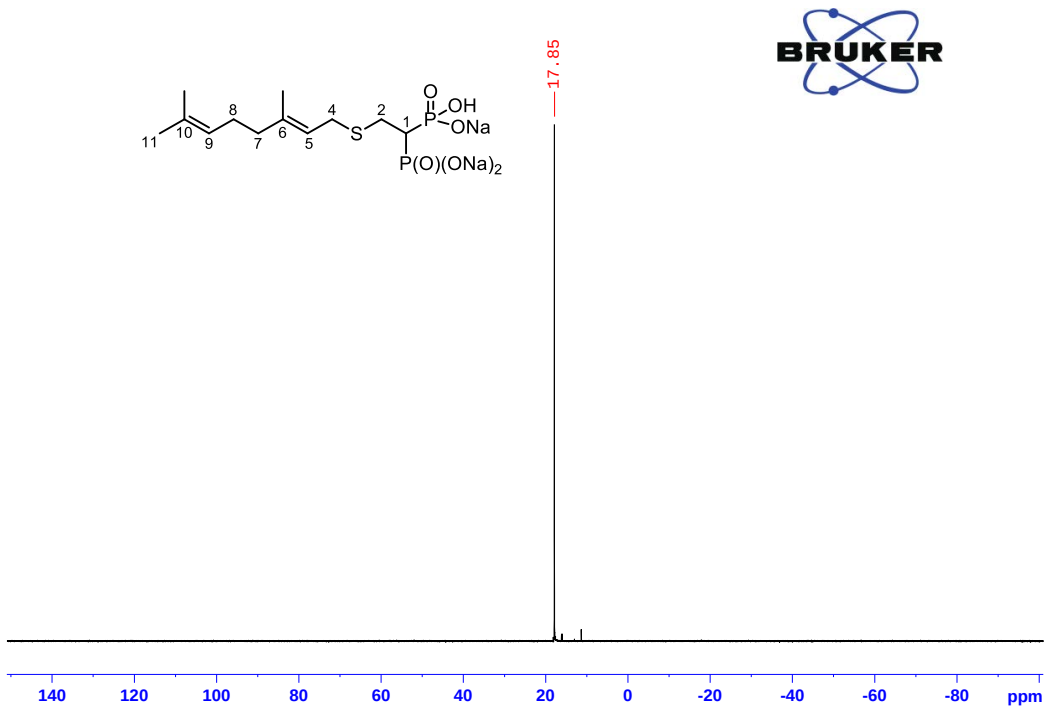
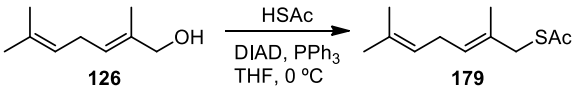


Figura 5.13. Espectro de RMN de ^{31}P de la sal trisódica de ácido 1-[(*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfónico (**169**).

Por otra parte, el tioacetato **179** se obtuvo a partir del alcohol **126**, el cual fue preparado siguiendo el procedimiento descripto por Mori y Ueda (ligeramente modificado) ilustrado en el **Esquema 4.2**. La reacción del alcohol **126** con ácido tioacético bajo condiciones de Mitsunobu condujo al tioacetato **179** con 69% de rendimiento (**Esquema 5.2**). El compuesto **179** fue caracterizado por espectrometría de resonancia magnética nuclear.



Esquema 5.2. Síntesis de (*E*)-S-(2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il) etanotioato (**179**).

En el espectro de RMN de ^{1}H del tioacetato **179** se observaban claramente las señales correspondientes a los protones vinílicos H-3 y H-5. Por ejemplo, la señal correspondiente al protón asignado como H-3 se observaba como un triple quinteto (*J* = 7,1; 1,4 Hz) centrado a 5,07 ppm, mientras que la señal correspondiente al protón H-5 aparecía como un triple cuarteto (*J* = 7,3; 1,2 Hz) centrado a 5,38 ppm (**Figura 5.14**).

Por otra parte, la señal correspondiente a los protones H-1 se observaba como un cuarteto ($^4J_{H-H}$ = 0,9 Hz) centrado a 3,55 ppm, mientras que la señal correspondiente a los protones H-4 aparecía como un triplete ($^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz) centrado a 2,68 ppm. Además, la señal característica del grupo protector acetilo aparecía como un singulete a 2,33 ppm (**Figura 5.14**).

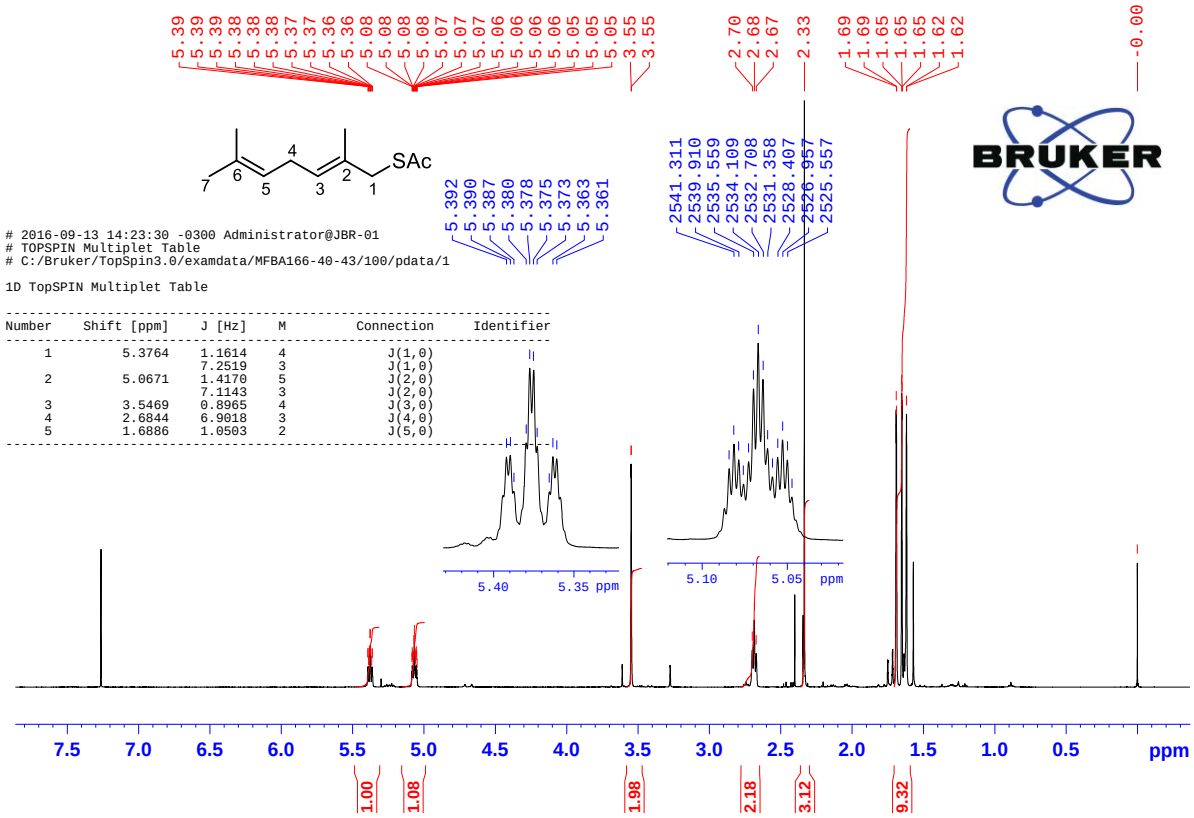


Figura 5.14. Espectro de RMN de ^{1}H de *S*-((*E*)-2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il) etanotioato (**179**).

En el espectro de RMN de ^{13}C las señales correspondientes a los carbonos C-3 y C-5 se observaban a 122,2 y 127,9 ppm, respectivamente, mientras que las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-2 y C-6 se observaban a 130,0 y 132,1 ppm, respectivamente (**Figura 5.15**).

Por otra parte, la señal correspondiente a C-1 se observaba a 38,2 ppm, mientras que la señal correspondiente a C-4 aparecía a 27,2 ppm. Además, la señal correspondiente al carbono carbonílico del grupo acetilo se observaba a 195,1 ppm (**Figura 5.15**).

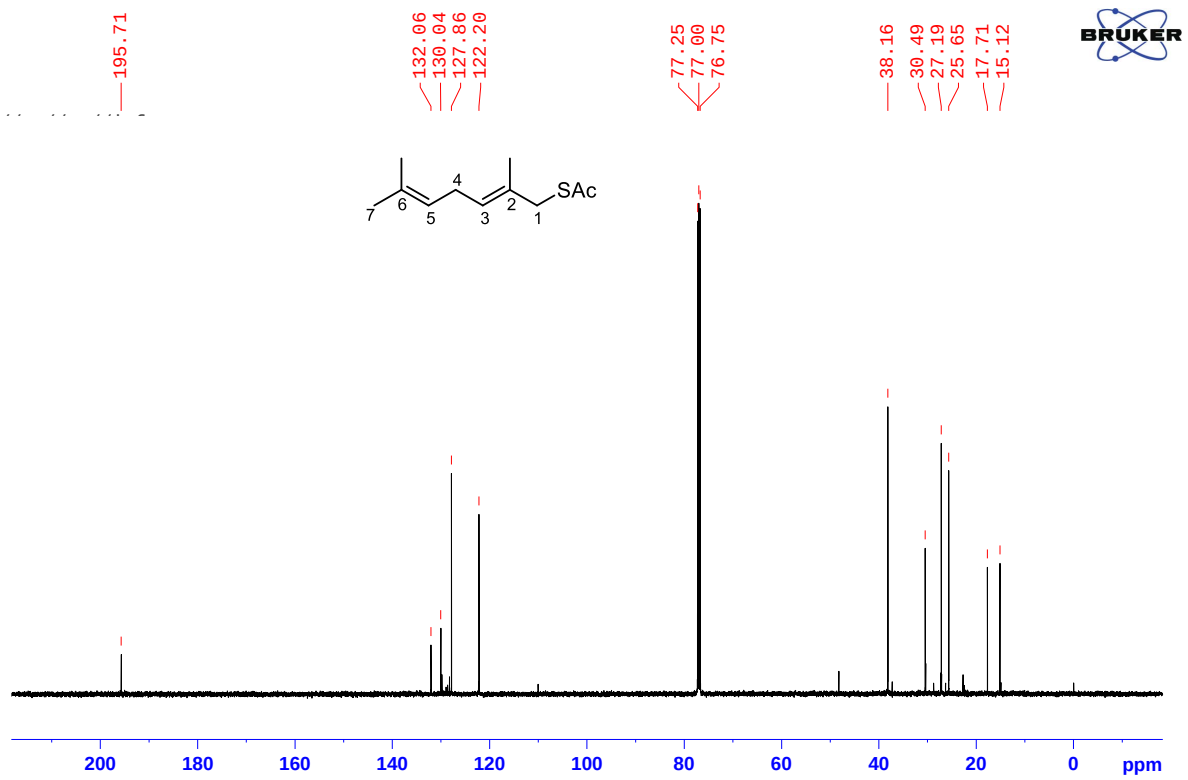
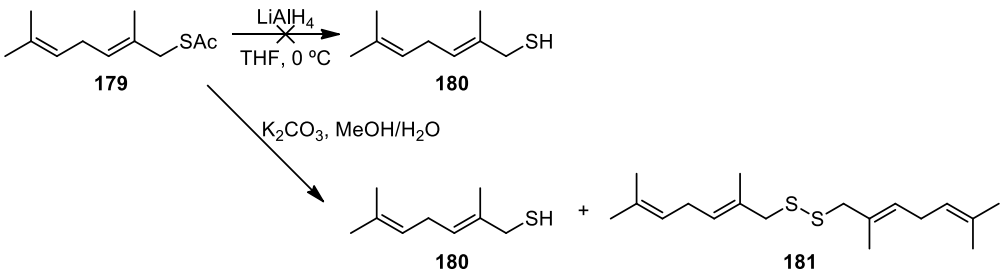


Figura 5.15. Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*S*-(2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il) etanotioato (**179**).

Una vez disponible el tioacetato **179** se procedió a preparar el tiol **180**. Sin embargo, a diferencia de lo observado previamente para los compuestos **173** y **174**, el tratamiento del tioacetato **179** con hidruro de aluminio y litio no dio lugar al tiol correspondiente. Por tanto, se consideró obtener el compuesto **180** por hidrólisis del tioacetato **179** con carbonato de potasio en metanol. A pesar de haber llevado a cabo la reacción bajo atmosfera inerte, se obtuvo una mezcla de tiol **180** y disulfuro **181** en proporción 8:1 de acuerdo al análisis del espectro de ^{1}H-RMN de la mezcla **180**-**181** (**Esquema 5.3**).



Esquema 5.3. Síntesis de (*E*)-2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-tiol (**180**).

En el espectro de RMN de ^{1}H del crudo de reacción la señal correspondiente a los protones H-1 del tiol **180** se observaba como un doblete ($^{3}J_{H-H}$ = 7,8 Hz) centrado a 3,12 ppm, mientras que la señal correspondiente a los protones H-1 del compuesto **181** aparecía como un singulete a 3,24 ppm (**Figura 5.16**). Esta mezcla no se pudo separar por columna cromatográfica debido a que el tiol **180** y el disulfuro **181** tienen polaridades muy similares. Por lo tanto, dado que los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos obtenidos previamente en el laboratorio habían sido purificados por columna cromatográfica sin que tuviera lugar una reacción de retro-Michael, se consideró hacer reaccionar directamente la mezcla de tiol **180** y disulfuro **181** (8:1) con el aceptor de Michael **53** para obtener el compuesto **182** (**Esquema 5.4**). Además, dado que el bisfosfonato **182** es mucho más polar que el disulfuro **181**, era de esperar que la separación de ambos compuestos mediante una columna de sílica-gel fuese sencilla.

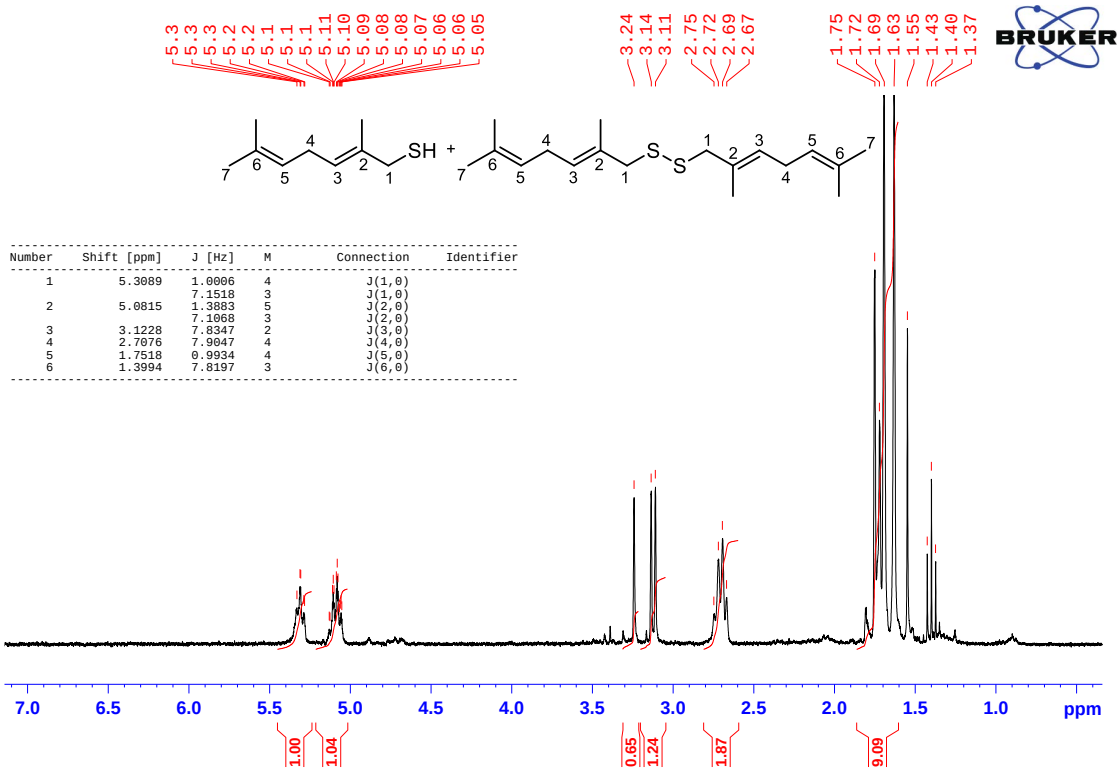
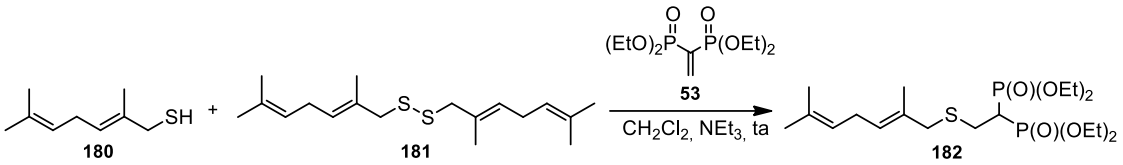


Figura 5.16. Espectro de RMN de ^{1}H de la mezcla de los compuestos **180** y **181** en relación 8:1.



Esquema 5.4. Síntesis de 1-[(*E*)-2-((2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**182**).

Posteriormente, la reacción de la mezcla tiol **180**-disulfuro **182** (8:1) con vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) dio lugar al bisfosfonato **182**. En efecto, luego de la purificación correspondiente para separar el bisfosfonato **182** del disulfuro **181** se observaban las señales características de derivados 2-alquilaminoetil y 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos en el espectro de RMN de ^{1}H. Por ejemplo, la señal correspondiente al protón H-1 se observaba como un triple triplete (*J* = 23,8; 6,2 Hz) centrado a 2,61 ppm, mientras que la señal correspondiente a los protones H-2 se observaba como un triple doblete (*J* = 16,2; 6,2 Hz) centrado a 2,94 ppm (**Figura 5.17**).

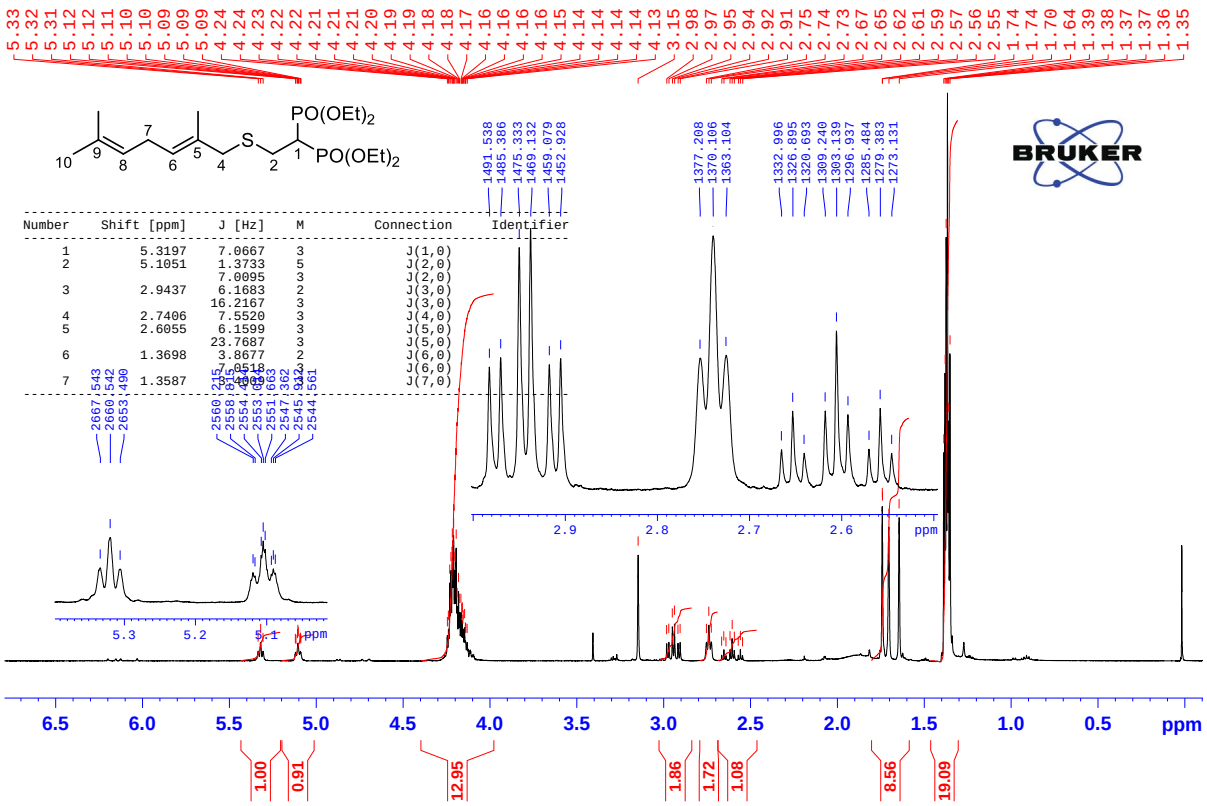


Figura 5.17. Espectro de RMN de ^{1}H de bisfosfonato **182**.

Adicionalmente, en el espectro de RMN de ^{13}C la señal correspondiente a C-1 se observaba como un triplete (J = 131,7 Hz) centrado a 38,7 ppm, lo cual es característico de una unión tipo *gem*-bisfosfónica (**Figura 5.18**).

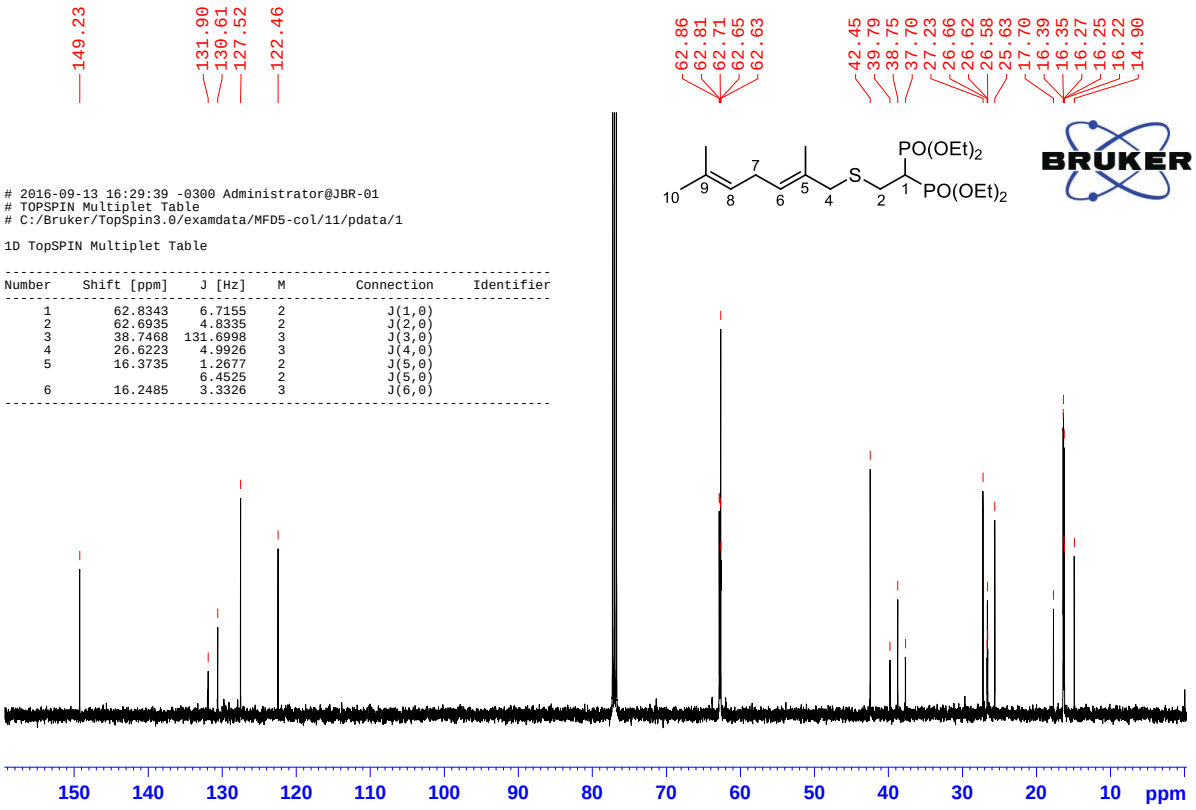


Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C de bisfosfonato **182**.

En el espectro de RMN de ^{31}P se observaba la señal correspondiente a los dos átomos de fósforo del bisfofonato **182** como un singulete a 21,77 ppm. Sin embargo, también se observaba la señal correspondiente a los átomos de fósforo del aceptor de Michael **53** como un singulete a 13,07 ppm (**Figura 5.19**). Por lo tanto, se propuso separar el tetraetil éster **182** de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**), mediante una columna de sílica-gel. Esta separación cromatográfica sería más complicada que la anterior ya que ambos compuestos tienen polaridades similares.

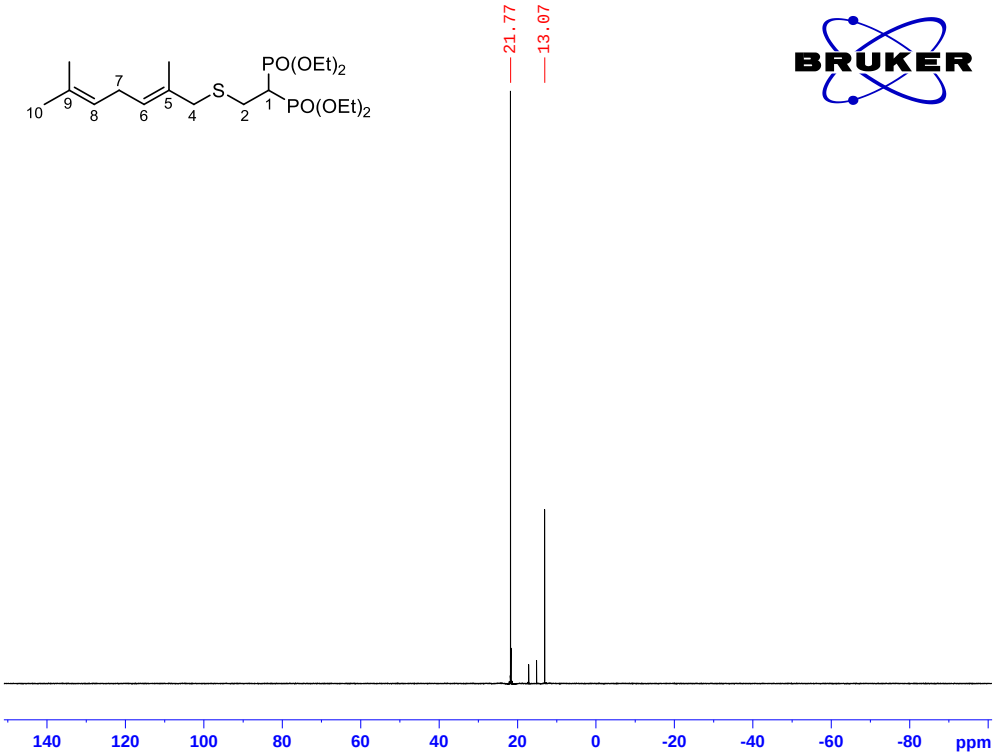


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^{31}P de bisfosfonato **182**.

Luego de llevar a cabo una segunda purificación por columna cromatográfica se verificó la aparición de varias señales alrededor de 21,4 ppm en el espectro de RMN de ^{31}P, lo cual indicaba la formación de compuestos de fósforo similares al bisfosfonato **182**. Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{1}H se observó la aparición de una nueva señal en la región vinílica del espectro, y la distorsión del triple doblete centrado a 2,94 ppm correspondiente a los protones H-2 del aducto de Michael **182**. Por lo tanto, es probable que el arreglo de dobles enlaces presente en el bisfosfonato **182** sea inestable, pudiendo sufrir algún tipo de reordenamiento en medio ácido, como la sílica-gel.

5.3.-EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Contrariamente a lo esperado, los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos **169** y **170** estuvieron completamente desprovistos de actividad contra amastigotes de *T. cruzi* y taquizoítos de *T. gondii*. Sin embargo, el compuesto **169** exhibió una actividad modesta contra la enzima *Tg*FPPS (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Evaluación biológica de 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos contra *Tc*FPPS, *Tg*FPPS, amastigotes de *T.cruzi* y taquizoítos de *T. gondii*.

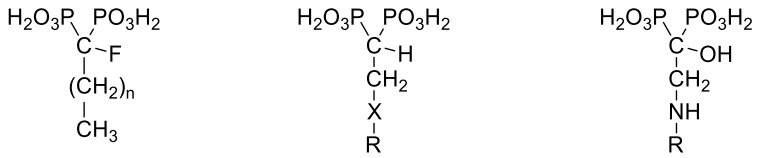
Compuesto	***Tc*FPPS** **IC_{50} (μM)**	**amastigotes de** *T.cruzi* **ED_{50} (μM)**	***Tg*FPPS** **IC_{50} (μM)**	**taquizoítos de** *T. gondii* **ED_{50} (μM)**
169	NT	>10,0	0,313 ± 0,027	>10,0
170	NT	>10,0	NT	>10,0
Benznidazol		1,80 ± 0,39		

La falta de actividad biológica de los compuestos **169** y **170** contra *T. gondii* fue inesperada ya que los derivados 2-alquilmercaptoetil bisfosfónicos obtenidos anteriormente en el laboratorio habían sido potentes inhibidores de la proliferación de taquizoítos de *T. gondii*. Por ejemplo, los compuestos **166** (R = *n*-nonil) y **167** (R = *n*-decil) exhibieron valores de ED_{50} de 1,2 μM y 1,8 μM, respectivamente.[114] Además, esta actividad celular estaba asociada a una potente inhibición de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Evidentemente, la introducción de dobles enlaces y ramificaciones en la cadena alquílica de 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos no aumenta la afinidad de los derivados hacia la enzima blanco, sino que por el contrario disminuye significativamente la afinidad hacia *Tg*FPPS. En efecto, el compuesto **183** exhibe un IC_{50} de 0,024 μM hacia *Tg*FPPS,[114] mientras que el compuesto **169**, con dos dobles enlaces en las posiciones C-5 y C-9 y dos grupos metilo en C-6 y en C-10 exhibe una actividad mínima hacia *Tg*FPPS (**Figura 5.20**, **Tabla 5.1**).

Figura 5.20. Estructura de los compuestos **183** y **169**.

Por otra parte, la falta de actividad del compuesto **170** hacia *Tg*FPPS también resultaba interesante ya que los derivados 2-alquilaminoetil-, α-fluoro- y 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos de cadena larga obtenidos anteriormente habían resultado potentes inhibidores de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo, los compuestos **163**, **165** y **167** exhibían valores de IC_{50} hacia la enzima

blanco de 0,093 μM, 0,060 μM y 0,021 μM, respectivamente. Además, el 1-hidroxi-2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonato **51** obtenido en este trabajo de tesis también había demostrado ser un potente inhibidor de la enzima *Tg*FPPS con un IC_{50} de 0,039 μM (**Figura 5.21**). La selectividad de estos inhibidores por *Tg*FPPS frente a *Tc*FPPS se puede racionalizar por el hecho de que las secuencias de estas enzimas difieren un 50%. Además, dado que *Tg*FPPS es una enzima bifuncional, que cataliza tanto la formación de FPP (15 átomos de C) como de GGPP (20 átomos de C),[103,104] es razonable asumir que la actividad de esta enzima pueda ser inhibida por compuestos con cadenas carbonadas largas, estructuralmente similares a GGPP. Sin embargo, a pesar de la similitud estructural con GGPP, el compuesto **170** estuvo completamente desprovisto de actividad contra *Tg*FPPS y taquizoítos de *T. gondii*.



165, n = 8 **163**, X = NH, R = *n*-dodecil **167**, X = S, R = *n*-decil **51**, R = *n*-octil

Figura 5.21. Estructura de bisfosfonatos activos contra *Tg*FPPS.

En resumen, los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos **169** y **170** fueron obtenidos siguiendo el método descripto por Wiemer y colaboradores para la hidrólisis de isoprenil bisfosfonatos.[157] Si bien estos compuestos son similares estructuralmente con los sustratos de la enzima blanco, estuvieron completamente desprovistos de actividad hacia *Tg*FPPS y taquizoítos de *T. gondii*.

Conclusiones

En este trabajo de tesis se obtuvieron los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos **48**-**52** que fueron evaluados contra *T. cruzi* y *T. gondii*, agentes causales de la enfermedad de Chagas y la toxoplasmosis, respectivamente. Contrariamente a lo esperado, ninguno de estos compuestos resultó ser efectivo contra amastigotes de *T. cruzi* ni contra la enzima blanco *Tc*FPPS. Evidentemente, la introducción de un grupo hidroxilo adicional en la posición C-1 de los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos (**32**-**35**), para obtener los derivados 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfónicos (**48**-**52**), disminuye significativamente la actividad contra *T. cruzi*. Sin embargo, algunos de estos compuestos resultaron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo, los bisfosfonatos **49** (R = *n*-hexil) y **51** (R = *n*-octil) inhiben la actividad enzimática de *Tg*FPPS, exhibiendo valores de IC_{50} de 0,051 μM y 0,039 μM, respectivamente. Esta actividad enzimática estaba asociada a una eficiente actividad celular, con valores de ED_{50} de 4,7 μM y 2,0 μM, respectivamente. La alta selectividad de los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos hacia *Tg*FPPS frente a *Tc*FPPS puede deberse a que las secuencias de estas enzimas tienen menos de 50% de similitud.

Por otra parte, se estudió el comportamiento de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) como dipolarófilo en algunas reacciones de cicloadición 1,3-dipolar. En primer lugar, se analizó la reacción del alqueno **53** con óxidos de nitrilo, los cuales fueron obtenidos *in situ* a partir de aldoximas por oxidación con diacetoxi-iodo benceno (DIB). Además, se estudió la reactividad de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) en la reacción de ciclización de Grigg, la cual involucra la formación *in situ* de un iluro de azometino a partir de una imina derivada de un α-aminoácido. En ambos casos, el uso de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) como dipolarófilo permitió la obtención directa de heterociclos altamente funcionalizados conteniendo la funcionalidad *gem*-bisfosfonato, con alta regioselectividad.

Posteriormente, se estudió la síntesis del 2-alquilamino-1,1-bisfosfonato **124**, a partir del alcohol alílico **126**. La estrategia sintética desarrollada permitió acceder al compuesto **153**, precursor inmediato del bisfosfonato **124**. Sin embargo, el método descripto para la hidrólisis de isoprenil bisfosfonatos no permitió la obtención del bisfosfonato **124**, ya que, de acuerdo al espectro de ^{1}H-RMN, tuvo lugar una reacción de retro-Michael. Estos resultados ponen en

evidencia la necesidad desarrollar una nueva química que permita la desprotección de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos con dobles enlaces en la cadena lateral.

Finalmente, dado el potencial de los derivados 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos como agentes antiparasitarios, y en base a los estudios estructurales y termodinámicos de la interacción de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos con *Tc*FPPS, se postularon las estructuras **169**-**171** como blancos moleculares para su síntesis y evaluación biológica. Los derivados **169** y **170** fueron obtenidos a partir de los tetraetil bisfosfonatos correspondientes, de acuerdo al método descripto por Wiemer y colaboradores. Sin embargo, si bien el tetraetil bisfosfonato **182** pudo ser obtenido *via* el alcohol **126**, la purificación por columna cromatográfica produjo un reordenamiento de los dobles enlaces de la cadena lateral.

La evaluación biológica de los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos **169** y **170** dio lugar a resultados muy interesantes. Contrariamente a lo esperado, los compuestos **169** y **170** estuvieron completamente desprovistos de actividad contra amastigotes de *T. cruzi* y taquizoítos de *T. gondii*. Sin embargo, el compuesto **169** exhibió una actividad marginal contra la enzima *Tg*FPPS. Evidentemente, la introducción de dobles enlaces y ramificaciones en la cadena alquílica de 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos no aumenta la afinidad de los derivados hacia la enzima blanco, sino que por el contrario disminuye significativamente la afinidad hacia *Tg*FPPS.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis ponen de manifiesto la importancia de los estudios de relación estructura química-actividad biológica en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Dado que la funcionalidad *gem*-bisfosfonato le confiere a los bisfosfonatos de uso clínico la capacidad de acumularse selectivamente en el sitio de acción, con efectos secundarios mínimos, la búsqueda de nuevas drogas basadas en bisfosfonatos que puedan ser utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la toxoplasmosis continúa siendo un tópico de enorme interés. Por lo tanto, los esfuerzos posteriores están dirigidos a la optimización de las estructuras de 2-alquilaminoetil y 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos, para la obtención de compuestos con potente actividad anti *T.cruzi* y anti *T. gondii.*

Parte experimental

GENERALIDADES

En todos los casos las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente flameado y bajo atmósfera estática de nitrógeno o argón.

Los solventes utilizados fueron de calidad "para análisis" o superior. Tetrahidrofurano: se destiló previamente sobre sodio-benzofenona; cloruro de metileno y acetonitrilo se calentaron a reflujo en presencia de pentóxido de fósforo, se destilaron y se guardaron sobre tamices moleculares de 4 Å; metanol y etanol se secaron según el método descripto en la literatura *via* el alcóxido de magnesio correspondiente. El ácido bencensulfónico se secó al vacío a 40 °C sobre pentóxido de fósforo.

Cromatografía en capa delgada: se utilizaron cromatofolios de sílica gel F_{254} y de fase reversa (RP-18, F_{254}) de 0,20 mm de espesor sobre soporte de aluminio (Merck). Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso. Se utilizó la técnica ascendente para el desarrollo de las mismas. El revelado se realizó por: (a) exposición a luz ultravioleta (λ = 254 nm); (b) inmersión en solución 0,04 M de $Mo_7O_{24}(NH_4)_6$, 3 Mm de $Ce(SO_4)_2$ en H_2SO_4-H_2O (9:1) y posterior calentamiento; (c) inmersión en solución 0,1% m/v de ninhidrina en etanol y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna: se realizó con sílica gel 60 de malla 230-400 (Merck) y fase reversa (octadecyl-funcionalized silica gel, Aldrich). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Puntos de fusión: se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Resonancia magnética nuclear: los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos con espectrómetros Bruker AC-200 (operando a 200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), Fourier 300 (operando a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) y AM 500 (operando a 500,13 MHz para ^1H, 125,76 MHz para ^{13}C y 202,45 MHz para ^{31}P) a 303 K. Se utilizaron los siguientes solventes deuterados según se indica en cada caso: $CDCl_3$, CD_3OD, DMSO-d_6, D_2O. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal del tetrametilsilano (TMS). Se utilizó H_3PO_4 (85%) como referencia externa para los espectros de ^{31}P. Las

constantes de acoplamiento se expresan en Hz. Las señales se describen como s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuarteto), q (quintuplete), sext (sextuplete), dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete), dt (doble triplete), td (triple doblete), tt (triple triplete), t dist (triplete distorsionado), sa (singulete ancho) y m (multiplete).

En algunos casos, la asignación de las señales correspondientes a los espectros de resonancia magnética de ^{1}H o ^{13}C se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales, tales como experimentos de correlación heteronuclear ^{1}H-^{13}C (HSQC y HMBC) y/o homonuclear (COSY-45).

Espectrometría de masa: los espectros de masa de alta resolución fueron obtenidos usando un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II, el cual es un híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo con capacidad EM/EM, Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR), CONICET, FCEyN.

Análisis elemental: los microanálisis fueron realizados por UMYMFOR (CONICET, FCEyN).

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos biológicos se realizaron en el laboratorio del Dr. Roberto Docampo, en la University of Georgia, Athens, E.E.U.U. bajo su supervisión.

Determinación de la inhibición de la actividad enzimática hacia *Tc*FPPS

Una solución del compuesto a evaluar en 100 µL de buffer, conteniendo 10 mM de Hepes (p*H* = 7,4), 5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de ditiotreitol, 4,5 µM de [4-^{14}C]IPP (10 µC$_i$/µmol) y 55 µM de DMAPP, fue precalentada a 37 ºC. El ensayo se inició con el agregado de la proteína recombinante (10-20 ng). Se incubó a 37 ºC por un período de 30 minutos. Se cortó la reacción por el agregado de 10 µL de HCl 6,0 *N*. Se alcalinizó con NaOH 6,0 M (15 µL), diluyó con agua y extrajo con hexano (1,0 mL). La fase orgánica se lavó con agua (1,0 mL) y se trasvasó posteriormente a un vial de centello. Se agregó solución de centelleo (4,0 mL) y se realizó la medición correspondiente.

Se define una unidad de actividad enzimática como la actividad requerida

para incorporar 1 nmol de [4-^{14}C]IPP en [14-^{14}C]FPP en un minuto. Para determinar los valores de IC_{50} se realizaron medidas a 4 ó 5 concentraciones diferentes. Estas concentraciones dependían de cada compuesto en particular.

Evaluación biológica contra amastigotes de *T. cruzi*

Se sembraron células Vero (3,4 x 10^4 células/pocillo) expuestas a radiación γ (2000 Rads) en placas de 96 pocillos en medio RPMI (100 µL), el cual contenía 10% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas toda la noche a 35 ºC y 7% de CO_2.

Luego de la incubación, las células fueron expuestas a una suspensión de 3,6 x 10^5 tripomastigotes/pocillo (cadena CL sobreexpresando una proteína fluorescente tdTomate) durante 5 horas, a 35 ºC y 7% de CO_2. El cultivo se lavó con D'Hanks para eliminar cualquier parásito extracelular y los compuestos a ser evaluados se adicionaron en diluciones seriales en medio RPMI. Cada concentración se evaluó por cuadruplicado.

Cada placa contenía también controles con células huésped sin parásitos (como blanco), controles con dos diluciones de drogas representativas sin parásitos (para ensayos de citotoxicidad) y controles con parásitos sin droga (como control positivo). Por cada placa, se usó benznidazol como control positivo en concentraciones de 3,5 y 1,5 µM. Luego de la adición de los compuestos, se incubaron las placas durante 3 días a 35 ºC y 7% de CO_2. Las placas fueron evaluadas para fluorescencia (Ex = 544 Em = 612). Los valores de ED_{50} fueron determinados por análisis de regresión no lineal.

Determinación de la inhibición de la actividad enzimática hacia *Tg***FPPS**

Se siguió el mismo procedimiento descripto para el caso de *Tc*FPPS, excepto que el buffer contenía 1 mM de $MgCl_2$.

Evaluación biológica contra taquizoítos de *T. gondii*

Los experimentos sobre taquizoítos de *T. gondii* se llevaron a cabo usando

tachizoítos expresando una proteína fluorescente. Los parásitos eran conservados en células hTerT cultivadas en medio DMEM-HG, complementado con suero fetal bovino (1%), glutamina (2mM) y piruvato (1mM), a 37 ºC en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

Para evaluar la actividad de los compuestos se cultivaron células hTerT en placas de 96 pocillos y se adicionaron diluciones seriales de los compuestos en el mismo medio (DMEM-HG). Los taquizoítos recién aislados fueron filtrados a través de un filtro de 3 µm antes de inocular los cultivos (10^4 taquizoítos/pocillo). Las placas fueron incubadas a 37 ºC y se fue observando la fluorescencia día tras día.

Para calcular los valores de ED_{50} se graficó el porcentaje de inhibición del crecimiento en función de la concentración de la droga, ajustando los valores a la siguiente ecuación:

$$I = \frac{I_{máx}\, C}{(EC_{50} + C)}$$

donde I es el porcentaje de inhibición, $I_{máx}$ = 100% de inhibición, C es la concentración del inhibidor y EC_{50} es la concentración requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50%.

MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los cálculos computacionales se realizaron en colaboración con el Dr. Carlos A. Stortz, del Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA.

Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Gaussian09, el funcional B3LYP y el set de bases 6-311+G(d,p). Los cálculos se llevaron a cabo con optimización completa de la geometría usando condiciones estándar de terminación, e incluyendo en todos los casos el efecto del solvente (agua) a través del modelo del continuo polarizable (PCM), como se encuentra implementado en el Gaussian09. Se introdujeron varias geometrías para encontrar los confórmeros más importantes; el átomo de Mg siempre aparecía coordinado a dos átomos de O, y usualmente el enlace hidrógeno dirigía los procesos de minimización de energía.

2-ALQUILAMINOETIL-1-HIDROXI-1,1-BISFOSFONATOS

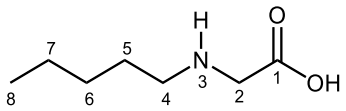
Síntesis de ácidos 2-(*n*-alquilamino)acéticos

Procedimiento general

A una solución enfriada a 0 ºC de la *n*-alquilamina correspondiente (10 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se agregó gota a gota bromoacetato de bencilo (2,29 g; 10 mmol). Luego, se agregó trietilamina (2,7 mL; 19,4 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente toda la noche. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel) eluyendo con una mezcla de hexano-EtOAc (19:1) para obtener los ésteres bencílicos (**38**-**42**) como aceites incoloros, con rendimientos entre 29 y 84%.

Luego, una solución del éster bencílico correspondiente (8,0 mmol) en acetato de etilo (50 mL) en presencia de paladio sobre carbono (50 mg) se trató con hidrógeno a 3 atm en un aparato Parr. Se agitó la mezcla de reacción durante 6 horas y se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado. Se evaporó el solvente para obtener los aminoácidos libres **43**-**47** que fueron usados en el siguiente paso sin purificación previa.

Ácido 2-(*n*-pentilamino)acético (43)



43

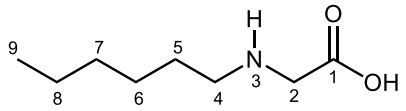
Rendimiento: 46%, sólido blanco, pf 185-190 ºC (desc.).

^{1}H RMN (500,13 MHz, CD_3OD) δ 0,94 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 3H, H-8), 1,37 (m, 4H, H-6 y H-7), 1,68 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-5), 2,97 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 2H, H-4), 3,47 (s, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CD_3OD) δ 14,1 (C-8), 23,2 (C-7), 26,9 (C-6), 29,7 (C-5), 48,7 (C-4), 50,6 (C-2), 170,9 (C-1).

EMAR (ESI) calculado para $C_7H_{16}O_2NNa$ $[M + Na]^+$ 168,1000; encontrado 168, 1010.

Ácido 2-(*n*-hexilamino)acético (44)



44

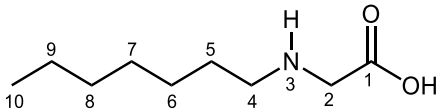
Rendimiento: 91%, sólido blanco, pf 196-199 ºC (desc.).

^{1}H RMN (500,13 MHz, CD_3OD) δ 0,92 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 3H, H-9), 1,35 (m, 4H, H-7 y H-8), 1,39 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, 2H, H-6), 1,67 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,6 Hz, 2H, H-5), 2,97 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-4), 3,46 (s, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CD_3OD) δ 14,3 (C-9), 23,5 (C-8), 27,2 (C-6), 27,3 (C-7), 32,4 (C-5), 48,7 (C-4), 50,6 (C-2), 170,9 (C-1).

EMAR (ESI) calculado para $C_8H_{18}O_2N$ $[M + H]^+$ 160,1338; encontrado 160,1343.

Ácido 2-(*n*-heptilamino)acético (45)



45

Rendimiento: 67%, sólido blanco, pf 187-191 ºC.

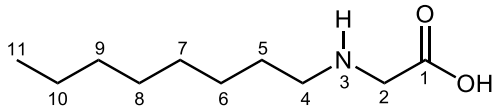
^{1}H RMN (500,13 MHz, CD_3OD) δ 0,91 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 3H, H-10), 1,32 (m, 4H, H-8 y H-9), 1,37 (m, 4H, H-6 y H-7), 1,67 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-5), 2,97 (m, 2H, H-4), 3,46 (s, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CD_3OD) δ 13,6 (C-10), 22,2 (C-9), 28,5 (C-6), 28,7 (C-7), 29,4 (C-8), 31,3 (C-5), 47,4 (C-4), 49,2 (C-2), 169,5 (C-1).

EMAR (ESI) calculado para $C_9H_{20}O_2N$ $[M + H]^+$ 174,1494; encontrado 174,1510.

Anal. Calculado para ($C_9H_{19}O_2N$): C 62,39; H 11,05; N 8,08. Encontrado C 62,05; H 10,62; N 7,74.

Ácido 2-(*n*-octilamino)acético (46)



46

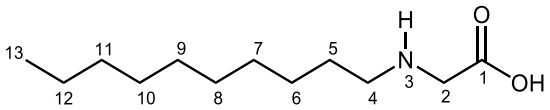
Rendimiento: 96%, sólido blanco, pf 188-193 ºC.

^{1}H RMN (500,13 MHz, CD_3OD) δ 0,90 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 3H, H-11), 1,33 (m; 10H; H-6, H-7, H-8, H-9 y H-10), 1,68 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-5), 2,97 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-4), 3,46 (s, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CD_3OD) δ 14,4 (C-11), 23,7 (C-10), 27,2 (C-6), 27,6 (C-8), 30,17 (C-7), 30,19 (C-9), 32,9 (C-5), 48,7 (C-4), 50,6 (C-2), 170,9 (C-1).

EMAR (ESI) calculado para $C_{10}H_{22}O_2N$ $[M + H]^+$ 188,1651; encontrado 188,1669.

Ácido 2-(*n*-decilamino)acético (47)



47

Rendimiento: 98%, sólido blanco, pf 184-187 ºC.

^{1}H RMN (500,13 MHz, CD_3OD) δ 0,89 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 3H, H-13), 1,24 (m; 14H; H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11 y H-12), 1,67 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-5), 2,97 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 8,9 Hz, 2H, H-4), 3,46 (s, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CD_3OD) δ 14,4 (C-13), 23,7 (C-12), 27,2 (C-6), 27,6 (C-7), 30,2 (C-8), 30,4 (C-9), 30,5 (C-10), 30,6 (C-11), 33,0 (C-5), 48,7 (C-4), 50,6 (C-2), 170,9 (C-1).

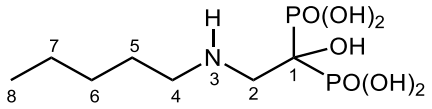
EMAR (ESI) calculado para $C_{10}H_{22}O_2N$ $[M + H]^+$ 188,1651; encontrado 188,1669.

Síntesis de ácidos 1-[(*n*-alquilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos

Procedimiento general

A un balón seco de tres bocas provisto de un refrigerante, a través del cual se hizo circular agua a 0 ºC, se adicionó un ácido 2-(*n*-alquilamino)-acético correspondiente (2,9 mmol), ácido fosforoso (273 mg; 2,9 mmol) y ácido bencénsulfónico anhidro (1,0 g; 6,3 mmol) bajo atmósfera de argón. Se calentó la mezcla a 65 ºC y se agregó PCl_3 (500 µL; 5,8 mmol) gota a gota con agitación vigorosa. Se dejó reaccionar a 65 ºC durante 16 horas, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó agua fría (60 mL) y se llevó a reflujo (100 ºC) por 5 horas. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se agregó acetona (60 mL). La mezcla resultante se enfrió a 0 ºC por 24 horas. El producto se filtró y se recristalizó de una mezcla de agua-etanol.

Ácido 1-[(*n*-pentilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (48)



48

Rendimiento: 31%, sólido blanco, pf 186-190 ºC.

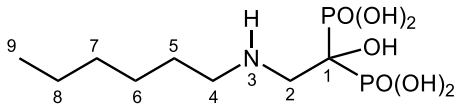
^{1}H RMN (500,13 MHz, D_2O) δ 0,79 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 3H, H-8), 1,26 (m, 4H, H-6 y H-7), 1,62 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, 2H, H-5), 3,02 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-4), 3,40 (t, $^3J_{H-P}$ = 11,7 Hz, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, D_2O) δ 13,0 (C-8), 21,4 (C-7), 25,0 (C-6), 27,7 (C-5), 48,2 (C-4), 49,9 (C-2), 70,3 (t, $^1J_{C-P}$ = 137,5 Hz, C-1).

^{31}P RMN (202,46 MHz, D_2O) δ 14,82.

EMAR (ESI) calculado para $C_7H_{19}O_7NP_2Na$ $[M + Na]^+$ 314,0534; encontrado 314,0527.

Ácido 1-[(*n*-hexilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (49)



49

Rendimiento: 38%, sólido blanco, pf 189-190 ºC (desc.).

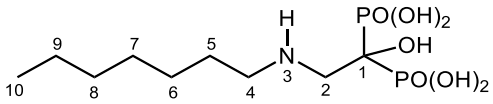
^{1}H RMN (500,13 MHz, D_2O) δ 0,77 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 3H, H-9), 1,25 (m, 4H, H-7 y H-8), 1,29 (q, $^3J_{H-H}$ = 6,6 Hz, 2H, H-6), 1,61 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-5), 3,02 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 2H, H-4), 3,39 (t, $^3J_{H-P}$ = 11,7 Hz, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, D_2O) δ 13,2 (C-9), 21,6 (C-8), 25,2 (C-6), 25,3 (C-7), 30,4 (C-5), 48,2 (C-4), 50,0 (C-2), 70,4 (t, $^1J_{C-P}$ = 138,4 Hz, C-1).

^{31}P RMN (202,46 MHz, D_2O) δ 14,69.

EMAR (ESI) calculado para $C_8H_{21}O_7NP_2Na$ $[M + Na]^+$ 328,0691; encontrado 328,0684.

Ácido 1-[(*n*-heptilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (50)



50

Rendimiento: 10%, sólido blanco, pf 155-159 ºC.

^{1}H RMN (500,13 MHz, D_2O) δ 0,90 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 3H, H-10), 1,18 (m, 6H, H-7, H-8 y H-9), 1,24 (m, 2H, H-6), 1,60 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, 2H, H-5), 3,01 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,6 Hz, 2H, H-4), 3,39 (t, $^3J_{H-P}$ = 11,7 Hz, 2H, H-2).

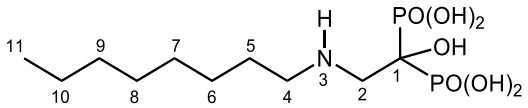
^{13}C RMN (125,77 MHz, D_2O) δ 13,3 (C-10), 21,8 (C-9), 25,3 (C-6), 25,5 (C-7), 27,8 (C-8), 30,7 (C-5), 48,3 (C-4), 49,9 (C-2), 70,3 (t, $^1J_{C-P}$ = 137,7 Hz, C-1).

^{31}P RMN (202,46 MHz, D_2O) δ 15,31.

EMAR (ESI) calculado para $C_9H_{24}O_7NP_2$ $[M + H]^+$ 320,1030; encontrado 320,1037.

Anal. Calculado para ($C_9H_{23}O_2NP_2 \cdot 1{,}50H_2O$): C 31,22; H 7,57; N 4,05. Encontrado C 31,53; H 7,75; N 4,36.

Ácido 1-[(*n*-octilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (51)



51

Rendimiento: 43%, sólido blanco, pf 188-190 ºC.

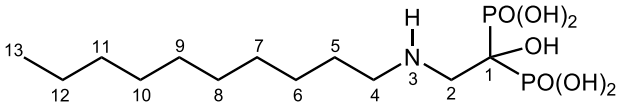
^{1}H RMN (500,13 MHz, D_2O) δ 0,85 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 3H, H-11), 1,25 (m; 10H; H-6, H-7, H-8, H-9 y H-10), 1,54 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 2H, H-5), 2,90 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 2H, H-4), 3,22 (t, $^3J_{H-P}$ = 10,7 Hz, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, D_2O) δ 13,9 (C-11), 22,1 (C-10), 25,6 (C-6), 25,9 (C-8), 28,46 (C-7), 28,48 (C-9), 31,1 (C-5), 47,4 (C-4), 49,8 (C-2), 69,4 (t, $^1J_{C-P}$ = 132,3 Hz, C-1).

^{31}P RMN (202,46 MHz, D_2O) δ 14,85.

EMAR (ESI) calculado para $C_{10}H_{25}O_7NP_2Na$ $[M + Na]^+$ 356,1004; encontrado 356,0994.

Ácido 1-[(*n*-decilamino)etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico (52)



52

Rendimiento: 71%, sólido blanco, pf 188-190 ºC.

^{1}H RMN (500,13 MHz, DMSO-d_6) δ 0,84 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,7 Hz, 3H, H-13), 1,25 (m, 14H, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11 y H-12), 1,54 (m, 2H, H-5), 2,90 (t dist, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 2H, H-4), 3,22 (t, $^3J_{H-P}$ = 11,1 Hz, 2H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, DMSO-d_6) δ 13,9 (C-13), 22,1 (C-12), 25,6 (C-6), 25,9 (C-7), 28,5 (C-8), 28,7 (C-9), 28,8 (C-10), 28,9 (C-11), 31,3 (C-5), 47,3 (C-4), 50,0 (C-2), 69,2 (t, $^1J_{C-P}$ = 130,0 Hz, C-1).

^{31}P RMN (202,46 MHz, DMSO-d_6) δ 15,19.

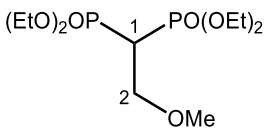
EMAR (ESI) calculado para $C_{12}H_{30}O_7NP_2$ $[M + H]^+$ 362,1498; encontrado 362,1493.

CICLOADICIONES 1,3-DIPOLARES

Síntesis de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (53)

Intermediario 2-metoxietilidenebisfosfonato de tetraetilo

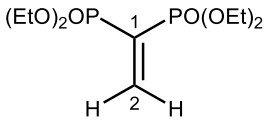
Una mezcla de paraformaldehído (3,05 g; 0,1 mol) y Et_2NH (2,08 mL; 1,47 g; 20,1 mmol) en MeOH (50 mL) se calentó a reflujo durante 2 horas hasta completa disolución. Luego, se agregó metilenbisfosfonato de tetraetilo (5,0 mL; 5,815 g; 20,2 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 horas. Se siguió la reacción por 1H-RMN hasta la desaparición de la señal característica del sustrato, un triplete ($^2J_{P\text{-}H}$ = 21,0 Hz) centrado a 2,45 ppm. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se evaporó el solvente. Luego, se agregó MeOH (50 mL) y se evaporó el solvente nuevamente. El residuo se disolvió dos veces en tolueno (25 mL) y se evaporó el solvente, para eliminar el MeOH remanente. Se obtuvo el intermediario 2-metoxietilidenebisfosfonato de tetraetilo correspondiente.



^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1,34 (t, *J* = 7,1 Hz, 12 H, CH_2CH_3), 2,69 (tt, *J* = 23,9; 5,4 Hz, 12 H, H-1), 3,37 (s, 3H, OCH_3), 3,89 (dt, *J* = 16,1; 5,5 Hz, 2H, H-2), 4,18 (m, 8H, CH_2CH_3).

Compuesto 53

Se agregó tolueno anhidro (50 mL) al intermediario anterior, y se acopló una trampa Dean-Stark al balón de reacción. Se calentó a reflujo durante 48 horas. Se concentró la mezcla y se particionó entre CH_2Cl_2 (70 mL) y H_2O (70 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50mL), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, EtOAc-MeOH, 99:1) para obtener **53** puro.



53

Rendimiento: 5,785 g (96%), aceite incoloro.

^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1,36 (t, *J* = 7,1 Hz, 12 H, CH_2CH_3), 4,16 (m, 8H, CH_2CH_3), 7,01 (dd, *J* = 37,8; 33,8 Hz, 2 H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,2 (t, *J* = 3,2 Hz, CH_2CH_3), 62,6 (t, *J* = 2,8 Hz, CH_2CH_3), 132,0 (t, *J* = 167,0 Hz, C-1), 149,2 (C-2).

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 13,07.

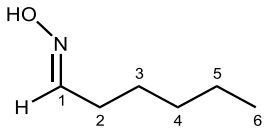
Los datos de RMN fueron similares a los descriptos previamente.[162]

Síntesis de oximas

Procedimiento general

Se agregó una solución de clorhidrato de hidroxilamina (4,3362 g; 62,0 mmol) en agua (10 mL) a una solución del aldehído correspondiente (50,0 mmol) en agua (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se agregó gota a gota una solución de carbonato de sodio (3,1746 g; 30,0 mmol) en agua (10 mL). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se extrajo con éter (3 x 35 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada acuosa de cloruro de sodio (2 x 35 mL) y se secaron ($MgSO_4$). Se evaporó el solvente para obtener las oximas **88**, **89** y **98** que fueron usadas en el siguiente paso sin purificación previa.

Hexanaldoxima (88)

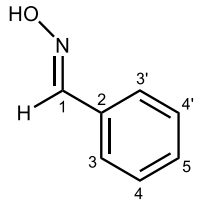


88

Se agregó una solución de clorhidrato de hidroxilamina (4,3362 g; 62,0 mmol) en agua (10 mL) a una solución de hexanal (5,00 g; 50,0 mmol) en agua (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó gota a gota una solución de carbonato de sodio (3,1746 g; 30,0 mmol) en agua (10 mL). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se extrajo con éter (3 x 35 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada acuosa de cloruro de sodio (2 x 35 mL) y se secaron ($MgSO_4$). Se evaporó el solvente para obtener la oxima **88** pura.

Rendimiento: 5,286 g (92%), aceite incoloro, R_f = 0,70 (Hex-AcOEt, 1:1).
^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 0,89 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 1H, H-6), 0,90 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 2H, H-6), 1,33 (m, 4H, -CH_2-), 1,50 (m, 2H, -CH_2-), 2,20 (dt, J = 7,5; 6,2 Hz, 0,5H, H-2), 2,38 (dt, J = 7,6; 5,5 Hz, 1,5H, H-2), 6,73 (t, J = 5,5 Hz; 0,75H, H-1), 7,42 (t, J = 5,5 Hz, 0,25H, H-1)
^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 13,9 (C-6), 22,3 (C-5), 24,9 (C-3), 25,7 (C-2), 26,1 (C-2), 31,2 (C-4), 31,5 (C-4), 152,2 (C-1), 152,9 (C-1).

Benzaldoxima (89)



89

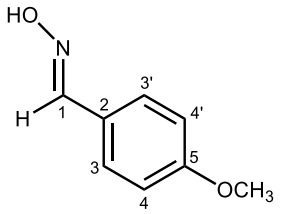
Se agregó una solución de clorhidrato de hidroxilamina (818 mg, 12 mmol) en agua (10 mL) a una solución de benzaldehído (1,00 g; 9,4 mmol) en agua (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó gota a gota una solución de carbonato de sodio (599 mg; 5,7 mmol) en agua (10 mL). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se extrajo con éter (3 x 35 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada acuosa de cloruro de sodio (2 x 35 mL) y se secaron ($MgSO_4$). Se evaporó el solvente para obtener la oxima **89** pura.

Rendimiento: 948 mg (83%), R_f = 0,70 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 7,38 (m, 3H, H-4, H-4' y H-5), 7,58 (m, 2H, H-2 y H-2'), 8,17 (s, 1H, H-1).

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 127,0 (C-3), 128,8 (C-4), 130,0 (C-5), 131,9 (C-2), 150,3 (C-1).

Anisaldoxima (98)



98

Se agregó una solución de clorhidrato de hidroxilamina (766 mg, 11 mmol) en agua (10 mL) a una solución de benzaldehído (1,00 g; 7,3 mmol) en agua (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó gota a gota una solución de carbonato de sodio (467 mg; 4,4 mmol) en agua (10 mL). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se extrajo con éter (3 x 35 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada acuosa de cloruro de sodio (2 x 35 mL) y se secaron ($MgSO_4$). Se evaporó el solvente para obtener la oxima **98** pura.

Rendimiento: 441 mg (40%), R_f = 0,65 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 3,84 (s, 3H, OCH_3), 6,91 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,8 Hz, 2H, H-4 y H-4'), 7,62 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,7 Hz, 2H, H-3 y H-3'), 8,12 (s, 1H, H-1).

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 55,3 (OCH_3), 114,2 (C-4), 124,5 (C-2), 128,5 (C-3), 149,9 (C-1), 161,0 (C-5).

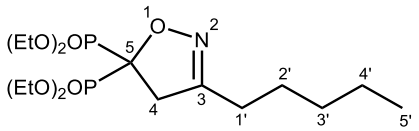
Síntesis de 4,5-dihidroisoxazoles

Procedimiento general

(3-Pentil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (99)

Se agregó gota a gota una solución de hexanaldoxima (92 mg; 0,80 mmol) en MeOH (2 mL) a una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**52**; 200 mg; 0,67 mmol), diacetoxi-iodo benceno (DIB; 259 mg; 0,80 mmol) y TFA (15 µL; 0,20 mmol) en MeOH (2 mL), bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente por 1 hora. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, CH_2Cl_2-MeOH, 49: 1) para obtener los compuestos **99** y **100** puros.

Compuesto 99



99

Rendimiento: 67 mg (24%), aceite incoloro, R_f = 0,38 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

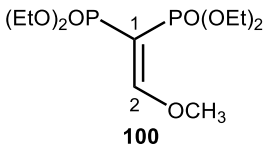
^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 0,90 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 3H, H-5'), 1,35 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 12H; OCH_2CH_3), 1,37 (m, 4H, H-3' y H-4'), 1,58 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, 2H, H-2'), 2,36 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,6 Hz, 2H, H-1'), 3,56 (t, $^3J_{P-H}$ = 23,7 Hz, 2H, H-4), 4,26 (m, 8H, OCH_2CH_3).

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 13,8 (C-5'), 16,3 (c, $^3J_{C-P}$ = 3,3 Hz, OCH_2CH_3), 22,1 (C-4'), 25,8 (C-2'), 26,7 (C-3'), 31,1 (C-1'), 44,4 (t, $^2J_{C-P}$ = 2,1 Hz, C-4), 64,1 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,4 Hz, OCH_2CH_3), 64,4 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,3 Hz, OCH_2CH_3), 81,7 (t, $^1J_{C-P}$ = 157,8 Hz, C-5), 158,4 (t, $^3J_{C-P}$ = 4,2 Hz, C-3).

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 14,94.

EMAR (ESI) calculado para $C_{16}H_{34}O_7NP_2$ $[M + H]^+$ 414,1811; encontrado 414,1794.

Compuesto 100



100

Rendimiento: 89 mg (40%), aceite incoloro, R_f = 0,32 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

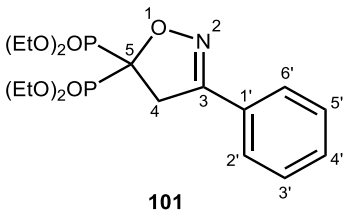
^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1,33 (m, 12H, OCH_2CH_3), 4,01 (s, 3H, OCH_3), 4,11 (m, 8H, OCH_2CH_3), 7,62 (dd, *J* = 33,8; 13,1 Hz, 1 H, H-2).

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,1 (t, $^3J_{C-P}$ = 5,9 Hz, OCH_2CH_3), 62,0 (d, $^2J_{C-P}$ = 5,0 Hz, OCH_2CH_3), 62,1 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,4 Hz, OCH_2CH_3), 63,3 (OCH_3), 93,7 (dd, *J* = 180,7; 173,6 Hz, C-1), 174,2 (dd, *J* = 16,1; 4,4 Hz, C-2).

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 12,29 (d, $^2J_{P-P}$ = 31,7 Hz), 17,95 (d, $^2J_{P-P}$ = 30,2 Hz).

EMAR (ESI) calculado para $C_{11}H_{25}O_7P_2$ $[M + H]^+$ 331,1076; encontrado 331,1082.

(3-Fenil-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil)-bisfosfonato de tetraetilo (101)



101

Se agregó gota a gota una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 200 mg; 0,67 mmol) en MeOH (1 mL) a una solución de benzaldoxima (97 mg; 0,80 mmol), DIB (259 mg; 0,80 mmol) y TFA (15 µL; 0,20 mmol) en MeOH (2 mL), bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente por 1 hora. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, CH_2Cl_2-MeOH, 98: 2) para obtener el compuesto **101** puro.

Rendimiento: 112 mg (40%), aceite amarillento, R_f = 0,52 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,34 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 6H, OCH_2CH_3), 1,35 (t,

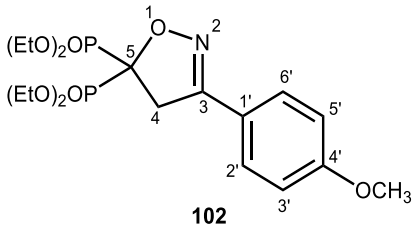
$^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 6H, OCH_2CH_3), 3,99 (t, $^3J_{P-H}$ = 23,4 Hz, 2H, H-4), 4,31 (m, 8H, OCH_2CH_3), 7,43 (m, 3H, H_{arom}), 7,67 (dd, *J* = 8,0; 1,5 Hz, 2H, H-2' y H-6').

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,3 (c, $^3J_{C-P}$ = 3,2 Hz, OCH_2CH_3), 42,3 (t, $^2J_{C-P}$ = 2,1 Hz, C-4), 64,1 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,4 Hz, OCH_2CH_3), 64,4 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,3 Hz, OCH_2CH_3), 83,1 (t, $^1J_{C-P}$ = 157,1 Hz, C-5), 126,9 (C-2'), 127,9 (C-1'), 128,7 (C-3'), 130,6 (C-4'), 156,0 (t, $^3J_{C-P}$ = 4,3 Hz, C-3).

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 14,51.

EMAR (ESI) calculado para $C_{17}H_{27}O_7NP_2Na$ $[M + Na]^+$ 442,1161; encontrado 442,1153.

[3-(4-Metoxifenil)-4,5-dihidroisoxazol-5,5-diil]-bisfosfonato de tetraetilo (102)



102

Se siguió el mismo procedimiento utilizado para la preparación del compuesto **101**. Se agregó gota a gota una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 200 mg; 0,67 mmol) en MeOH (1 mL) a una solución de anisaldoxima (121 mg; 0,80 mmol), DIB (259 mg; 0,80 mmol) y TFA (15 µL; 0,20 mmol) en MeOH (2 mL), bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente por 1 hora. Finalizada la reacción el producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, CH_2Cl_2-MeOH, 49:1) para obtener el compuesto **102** puro.

Rendimiento: 70 mg (23%), aceite amarillento, R_f = 0,45 (CH_2Cl_2-MeOH, 9:1).

^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,33 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 6H, OCH_2CH_3), 1,35 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 6H, OCH_2CH_3), 3,85 (s, 3H, OCH_3), 3,97 (t, $^3J_{P-H}$ = 23,4 Hz, 2H, H-4), 4,31 (m, 8H, OCH_2CH_3), 6,93 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,7 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 7,61 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,6 Hz, 2H, H-2' y H-6').

^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,4 (c, $^3J_{C-P}$ = 3,0 Hz, OCH_2CH_3), 42,6 (t, $^2J_{C-P}$ = 2,2 Hz, C-4), 55,3 (OCH_3), 64,2 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,4 Hz, OCH_2CH_3), 64,5 (t,

$^{2}J_{C\text{-}P}$ = 3,3 Hz, OCH_2CH_3), 82,9 (t, $^{1}J_{C\text{-}P}$ = 157,1 Hz, C-5), 114,2 (C-3'), 120,4 (C-1'), 128,6 (C-2'), 155,6 (t, $^{3}J_{C\text{-}P}$ = 4,3 Hz, C-3), 161,5 (C-4').

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 14,67.

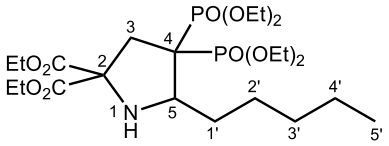
EMAR (ESI) calculado para $C_{18}H_{30}O_8NP_2$ $[M + H]^+$ 450,1448; encontrado 450,1457.

SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS

Procedimiento general

Una solución del aldehído correspondiente (0,80 mmol) y 2-amino-malonato de dietilo (**120**; 44 mg; 0,25 mmol) en THF anhidro (4 mL) se trató con una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 44 mg; 0,25 mmol) en THF (1 mL) bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y se siguió el consumo del alqueno **53** por CCD. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt), para obtener cada uno de los compuestos esperados, **121**, **122** y **123,** puros.

(±)-4,4-Bis(dietoxifosforil)-5-pentil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (121)



121

Una solución de hexanal (80 mg; 0,80 mmol) y 2-amino-malonato de dietilo (**120**; 44 mg; 0,25 mmol) en THF anhidro (4 mL) se trató con una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 44 mg; 0,25 mmol) en THF (1 mL) de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt), para obtener el compuesto **121** puro.

Rendimiento: 72 mg (50%), aceite incoloro.

^{1}H RMN (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 0,89 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,0 Hz, 3H, H-5'), 1,27 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,1 Hz, 6H, $C(O)OCH_2CH_3$), 1,33 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,1 Hz, 3H, $POCH_2CH_3$), 1,34 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7,1 Hz, 9H, $POCH_2CH_3$), 1,36-1,51 (m, 3H, H-3'$_a$ y H-4'), 1,61-1,75 (m, 4H,

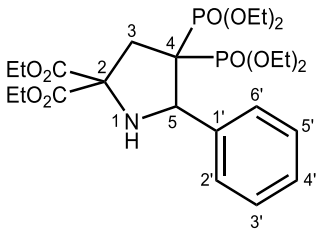
H-1'$_a$, H-2' y H-3'$_b$), 2,13 (m, 1H, H-1'$_b$), 2,98 (ddd, *J* = 20,9; 15,1; 9,1 Hz, 1H, H-3$_a$), 3,25 (dt, *J* = 20,5; 15,2 Hz; 1H, H-3$_b$), 3,48 (ddt, *J* = 22,9; 10,4; 2,2 Hz, 1H, H-5), 4,19 (m, 7,2 Hz, 4H, C(O)OC*H*$_2$CH$_3$), 4,20-4,43 (m, 8H, POC*H*$_2$CH$_3$).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CDCl$_3$) δ 13,96 (C(O)OCH$_2$*C*H$_3$), 13,97 (C(O)OCH$_2$*C*H$_3$), 14,1 (C-5'), 16,34 (d, $^3J_{C-P}$ = 4,6 Hz, POCH$_2$*C*H$_3$), 16,37 (d, $^3J_{C-P}$ = 4,5 Hz, POCH$_2$*C*H$_3$), 16,44 (d, $^3J_{C-P}$ = 4,5 Hz, POCH$_2$*C*H$_3$), 22,5 (C-4'), 28,4 (C-2'), 31,1 (d, $^2J_{C-P}$ = 3,2 Hz, C-1'), 31,7 (C-4'), 38,7 (dd, *J* = 4,2; 2,4 Hz, C-3), 50,9 (t, $^1J_{C-P}$ = 134,5 Hz, C-4), 62,0 (O*C*H$_2$CH$_3$), 62,1 (O*C*H$_2$CH$_3$), 62,4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,4 Hz, O*C*H$_2$CH$_3$), 62,6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,1 Hz, O*C*H$_2$CH$_3$), 63,1 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,1 Hz, O*C*H$_2$CH$_3$), 63,4 (d, $^2J_{C-P}$ = 5,9 Hz, O*C*H$_2$CH$_3$), 65,5 (d, $^2J_{C-P}$ = 2,7 Hz, C-5), 72,4 (dd, *J* = 7,2; 2,0 Hz, C-2), 169,2 (*C*O), 170,6 (*C*O).

^{31}P RMN (202,46 MHz, CDCl$_3$) δ 24,17 (d, $^2J_{P-P}$ = 16,8 Hz), 24,29 (d, $^2J_{P-P}$ = 16,8 Hz).

EMAR (ESI) calculado para $C_{23}H_{46}O_{10}NP_2$ $[M + H]^+$ 558,2597; encontrado 558,2602.

(±)-4,4-Bis(dietoxifosforil)-5-fenil-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (122)



122

Una solución de benzaldehído (310 mg; 3,0 mmol) y 2-amino-malonato de dietilo (**120**; 117 mg; 0,67 mmol) en THF anhidro (4 mL) se trató con una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 200 mg; 0,67 mmol) en THF (1 mL) de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt), para obtener el compuesto **122** puro.

Rendimiento: 257 mg (68%), aceite incoloro.

^{1}H RMN (500,13 MHz, CDCl$_3$) δ 1,07 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 3H, C(O)OCH$_2$C*H*$_3$), 1,09 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 3H, C(O)OCH$_2$C*H*$_3$), 1,29 (dt, *J* = 12,2; 7,1 Hz, 6H, POCH$_2$C*H*$_3$), 1,34 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 6H, POCH$_2$C*H*$_3$), 3,23 (dd, *J* = 19,3; 15,2 Hz, 1H, H-3$_a$), 3,32 (ddd,

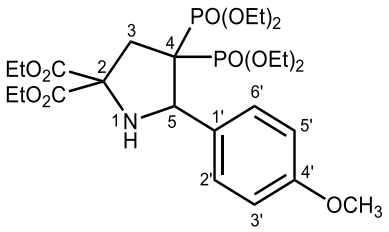
J = 22,1; 15,0; 10,4 Hz, 1H, H-3b), 3,69 (ddt, *J* = 14,3; 9,6; 7,2 Hz, 1H, C(O)OC*H*2aCH3), 3,85 (ddd, *J* = 14,3; 9,6; 7,2 Hz, 1H, C(O)OC*H*2bCH3), 3,92 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 2H, C(O)OC*H*2CH3), 4,10-4,31 (m, 8H, POC*H*2CH3), 4,99 (dd, *J* = 30,0; 13,1 Hz, 1H, H-5), 7,27 (m, 3H, Harom), 7,67 (m, 2H, Harom).

^{13}C RMN (125,77 MHz, CDCl3) δ 14,01 (C(O)OCH2*C*H3), 14,02 (C(O)OCH2*C*H3), 16,1 (dd, *J* = 6,3; 0,8 Hz, POCH2*C*H3), 16,4 (dd, *J* = 5,8; 1,5 Hz, POCH2*C*H3), 38,3 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,8 Hz, C-3), 51,7 (t, $^1J_{C-P}$ = 136,4 Hz, C-4), 62,1 (O*C*H2CH3), 62,2 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,3 Hz, O*C*H2CH3), 62,7 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,2 Hz, O*C*H2CH3), 63,1 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,0 Hz, O*C*H2CH3), 63,2 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,0 Hz, O*C*H2CH3), 66,3 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,3 Hz, C-5), 71,0 (dd, *J* = 6,9; 1,9 Hz, C-2), 127,1 (C-2'), 127,7 (C-4'), 129,1 (C-3'), 136,6 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,7 Hz, C-1'), 169,0 (*C*O), 171,0 (*C*O).

^{31}P RMN (202,46 MHz, CDCl3) δ 22,76 (d, $^2J_{P-P}$ = 13,6 Hz), 23,68 (d, $^2J_{P-P}$ = 13,6 Hz).

EMAR (ESI) calculado para $C_{24}H_{40}O_{10}NP_2$ $[M + H]^+$ 564,2122; encontrado 564,2133.

(±)-4,4-Bis(dietoxifosforil)-5-(4-metoxifenil)-pirrolidina-2,2-dicarboxilato de dietilo (123)



123

Una solución de anisaldehído (224 mg; 1,6 mmol) y 2-amino-malonato de dietilo (**120**; 58 mg; 0,25 mmol) en THF anhidro (4 mL) se trató con una solución de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**; 100 mg; 0,33 mmol) en THF (1 mL) de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt), para obtener el compuesto **123** puro.

Rendimiento: 81 mg (41%), aceite incoloro.

^{1}H RMN (500,13 MHz, CDCl3) δ 1,10 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 3H, C(O)OCH2C*H*3), 1,14 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 3H, C(O)OCH2C*H*3), 1,29 (dt, *J* = 10,9; 7,1 Hz, 6H, POCH2C*H*3), 1,34

(dt, J = 7,1; 1,0 Hz, 6H, $POCH_2CH_3$), 3,21 (dd, J = 19,3; 15,2 Hz, 1H, H-3_a), 3,31 (ddd, J = 22,0; 15,0; 10,2 Hz, 1H, H-3_b), 3,72 (ddt, J = 14,1; 9,6; 7,2 Hz, 1H, $C(O)OCH_{2a}CH_3$), 3,79 (s, 3H, $COCH_3$), 3,85 (ddt, J = 14,2; 10,2; 7,1 Hz, 1H, $C(O)OCH_{2b}CH_3$), 3,94 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 1H, $C(O)OCH_{2c}CH_3$), 3,96 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 1H, $C(O)OCH_{2d}CH_3$), 4,11-4,31 (m, 8H, $POCH_2CH_3$), 4,95 (dd, J = 30,0; 13,0 Hz, 1H, H-5), 6,82 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,9 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 7,59 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,7 Hz, 2H, H-2' y H-6').

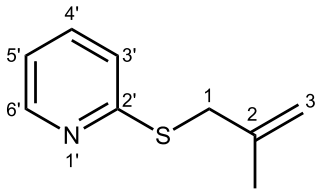
^{13}C RMN (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,02 ($C(O)OCH_2CH_3$), 14,03 ($C(O)OCH_2CH_3$), 16,2 (d, $^3J_{P-C}$ = 6,2 Hz, $POCH_2CH_3$), 16,4 (d, $^3J_{P-C}$ = 5,2 Hz, $POCH_2CH_3$), 38,2 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,8 Hz, C-3), 51,6 (dd, J = 137,8; 134,9 Hz, C-4), 55,2 (OCH_3), 62,07 (OCH_2CH_3), 62,08 (OCH_2CH_3), 62,3 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,3 Hz, OCH_2CH_3), 62,6 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,3 Hz, OCH_2CH_3), 63,06 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,0 Hz, OCH_2CH_3), 63,09 (d, $^2J_{C-P}$ = 7,0 Hz, OCH_2CH_3), 65,9 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,3 Hz, C-5), 71,0 (dd, J = 6,8; 1,9 Hz, C-2), 112,5 (C-3'), 128,8 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,9 Hz, C-1'), 130,3 (C-2'), 159,2 (C-4'), 169,0 (CO), 171,1 (CO).

^{31}P RMN (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 22,85 (d, $^2J_{P-P}$ = 13,7 Hz), 23,84 (d, $^2J_{P-P}$ = 13,7 Hz).

EMAR (ESI) calculado para $C_{25}H_{41}O_{11}NP_2Na$ $[M + Na]^+$ 616,2053; encontrado 616,2066.

2-ALQUILAMINOETIL-1,1-BISFOSFONATOS

2-((2-Metilalil)tio)piridina (129)



129

A una solución de etóxido de sodio, preparada con sodio (620 mg; 27,0 mmol) y etanol anhidro (20 mL), se agregó 2-mercaptopiridina (**127**; 3,00 g; 27,0 mmol) a 0 ºC. Se agitó durante 15 minutos. Luego, se agregó cloruro de metalilo (**128**; 3,06 mL; 2,81 g; 31,0 mmol) y se dejó reaccionar a 0 ºC por 3 horas.

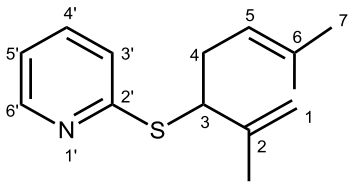
Se evaporó el solvente y se particionó el residuo entre agua (50 mL) y éter etílico (50 mL). La fase orgánica se lavó con solución acuosa de hidróxido de sodio al 5% (2 x 30 mL) y agua (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente para obtener el compuesto **129** puro.

Rendimiento: 3,743 g (84%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,85 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 3,86 (s, 2H, H-1), 4,86 (t, *J* = 1,4 Hz, 1H, H-3$_a$), 5,02 (c, *J* = 0,9 Hz, 1H, H-3$_b$), 6,97 (ddd, *J* = 7,3; 4,9; 1,0 Hz, 1H, H-5'), 7,18 (dt, *J* = 8,1; 0,9 Hz, 1H, H-3'), 7,47 (ddd, *J* = 7,9; 7,5; 1,8 Hz, 1H, H-4'), 8,42 (ddd, 4,9; 1,7; 0,9 Hz, 1H, H-6').

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 21,5 (C*H*$_3$ en C-2), 37,1 (C-3), 113,7 (C-1), 119,5 (C-5'), 122,3 (C-3'), 135.9 (C-4'), 141,3 (C-2), 149,4 (C-6'), 159,0 (C-2').

2-((2,6-Dimetillhepta-1,5-dien-3-il)tio)piridina (131)



131

Se agregó gota a gota una solución 1,1 M de *n*-butil litio en hexano (22 mL) a una solución de **129** (3,74 g; 22,7 mmol) en THF anhidro (50 mL) a −50 ºC. La mezcla de reacción se tornó rojo intenso y se enfrió a −78 ºC. Luego, se agregó gota a gota una solución de bromuro de isopentenilo (**130**; 2,8 mL; 3,61 g; 24,2 mmol) en THF anhidro (10 mL). El color rojo se desvaneció y se dejó reaccionar a −78 ºC durante 1 hora. Luego, se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se cortó la reacción agregando una solución saturada de cloruro de amonio (50 mL). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con éter etílico (2 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano−AcOEt, 49:1) para obtener el compuesto **131** puro.

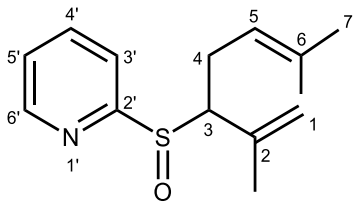
Rendimiento: 2,384 g (45%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 1,68 (s, 3H, H-7), 1,82 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 2,43 (m, 1H, H-4$_a$), 2,56 (m, 1H, H-4$_b$), 4,40 (dd, *J* = 8,6; 6,6 Hz, 1H, H-3), 4,85 (sa, 1H, H-1$_a$), 4,98 (sa, 1H, H-1$_b$), 5,15 (tt, *J* = 7,0; 1,2 Hz, 1H, H-5), 6,92 (ddt, *J* = 7,3; 5,1; 1,0 Hz, 1H, H-5'), 7,17 (ddd, *J* = 8,0; 1,9; 1,0 Hz, 1H, H-3'), 7,46 (m, 1H, H-4'), 8,42 (ddd, *J* = 4,0; 1,8; 0,9 Hz, 1H, H-6').
^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 18,0 (*C*H$_3$ en C-6), 19,5 (*C*H$_3$ en C-2), 25,8 (C-7), 32,1 (C-4), 51,2 (C-3), 113,3 (C-1), 119,6 (C-5'), 121,2 (C-3'), 123,2 (C-5), 133,5 (C-6), 135,9 (C-4'), 144,2 (C-2), 149,4 (C-6'), 159,1 (C-2').
EMAR (ESI) calculado para $C_{14}H_{20}NS$ $[M+H]^+$ 234,1316; encontrado 234,1319.

2-((2,6-Dimetilhepta-1,5-dien-3-il)sulfinil)piridina (132) y 2-((2,6-Dimetilhepta-1,5-dien-3-il)sulfonil)piridina (133)

Se agregó gota a gota una solución de ácido *m*-cloroperoxibenzoico (77% pureza; 5,61 g; 26,6 mmol) en cloruro de metileno (100 mL) a una solución de **131** (5,91 g; 25,3 mmol) en cloruro de metileno (100 mL) a –25 ºC bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar a –25 ºC durante 1 hora. Luego, se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se cortó la reacción agregando una solución saturada de carbonato de sodio (75 mL). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (2 x 75 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 19:1) para obtener los compuestos **132** y **133** puros.

Compuesto 132 (dos diasteroisómeros)

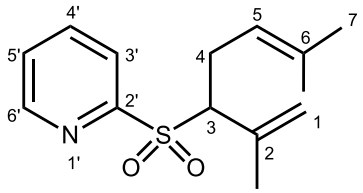


132

Rendimiento: 5,68 g (91%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,42 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 1,55 (s, 3H, C*H*$_3$* en C-6), 1,50 (s, 3H, H-7), 1,70 (s, 3H, H-7*), 1,73 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 1,88 (s, 3H, C*H*$_3$* en C-2), 2,25 (m, 1H, H-4$_a$), 2,60 (m, 1H, H-4$_a$*), 2,47 (m, 1H, H-4$_b$), 2,85 (m, 1H, H-4$_b$*), 3,46 (dd, *J* = 8,2; 7,9 Hz, 1H, H-3), 3,57 (dd, *J* = 10,3; 4,9 Hz, 1H, H-3*), 4,48 (sa, 1H, H-1$_a$), 4,77 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H, H-1$_a$*), 4.83 (tq, *J* = 7,0, 1,4 Hz, 1H, H-5), 5,03 (sa, 1H, H-1$_b$), 5,13 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H, H-1$_b$*), 5,19 (m, 1H, H-3*), 7,31 (m, 1H, protón aromático), 7,88-7,97 (m, 2H, protón aromático), 8,60-8,64 (m, 1H, protón aromático)

Compuesto 133



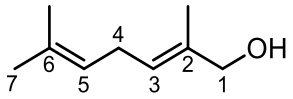
133

Rendimiento: 403 mg (6%), sólido amarillento.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,57 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 1,67 (s, 3H, H-7), 1,82 (sa, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 2,48 (m, 1H, H-4$_a$), 2,72 (m, 1H, H-4$_b$), 4,21 (dd, *J* = 11,2; 4,2 Hz, 1H, H-3), 4,84 (sa, 1H, H-1$_a$), 4,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-5), 5,02 (sa, 1H, H-1$_b$), 7,51 (ddd, *J* = 7,7; 4,7; 1,1 Hz, 1H, H-5'), 7,91 (dt, *J* = 7,7; 1,7 Hz, 1H, H-4'), 8,02 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H-3'), 8,74 (ddd, *J* = 4,6; 1,6; 0,8 Hz, 1H, H-6')

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 17,9 (*C*H$_3$ en C-6), 20,2 (*C*H$_3$ en C-2), 24,6 (C-7), 25,7 (C-4), 67,7 (C-3), 118,4 (C-1), 120,8 (C-5'), 123,4 (C-3'), 127,1 (C-5), 135,1 (C-6), 136,4 (C-2), 137,7 (C-4'), 150,1 (C-6'), 156,6 (C-2').

(*E*)-2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-ol (126)



126

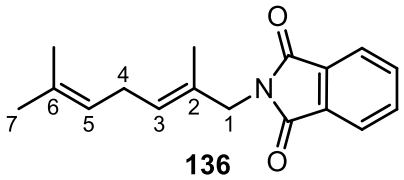
Se trató una solución de **132** (5,65 g; 22,7 mmol) en metanol (100 mL) con dietilamina (100 mL). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 horas. Luego, se evaporó el solvente y se particionó el residuo entre éter etílico (100 mL) y agua (100 mL). La fase acuosa se extrajo con éter etílico (2 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con ácido clorhídrico al 5% (2 x 30 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 30 mL) y solución saturada de cloruro de sodio (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 19:1) para obtener el alcohol **126** puro.

Rendimiento: 1,973 g (62%), aceite incoloro, R_f = 0,51 (hexano–AcOEt, 1:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 (s, 3H, H-7), 1,70 (s, 6H, CH_3 en C-2, CH_3 en C-6), 2,73 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 2H, H-4), 4,00 (s, 2H, H-1), 5,11 (tq, J = 7,0; 1,3 Hz, 1H, H-3), 5,39 (tc, J = 7,3; 1,3 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 13,6 (CH_3 at C-2), 17,7 (CH_3 at C-6), 25,7 (C-7), 26,7 (C-4), 69,0 (C-1), 122,4 (C-3), 125,1 (C-5), 132,0 (C-6), 134,5 (C-2).

(*E*)-2-(2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-il)isoindolina-1,3-diona (136)



136

Se agregó gota a gota una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD; 0,70 mL; 703 mg; 3,5 mmol) en THF anhidro (5 mL) a una mezcla de alcohol **126** (406 mg; 2,9 mmol), trifenil fosfina (911 mg; 3,5 mmol) y ftalimida (511 mg; 3,5 mmol) en THF anhidro (10 mL) a 0 ºC. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 horas. Luego, se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 19:1), para obtener el compuesto **136** puro.

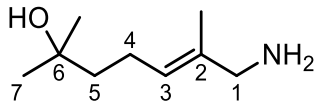
Rendimiento: 453 mg (58%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,60 (s, 3H, H-7), 1,67 (s, 6H, C*H*$_3$ en C-2, C*H*$_3$ en C-6), 2,70 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 2H, H-4), 4,20 (s, 2H, H-1), 5,05 (tq, *J* = 7,0; 1,4 Hz, 1H, H-3), 5,36 (tc, *J* = 7,2; 1,3 Hz, 1H, H-5), 7,72 (dd, *J* = 3,0; 5,5 Hz, 2H, H-3'), 7,86 (dd, *J* = 3,1; 5,4 Hz, 2H, H-2').

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,6 (*C*H$_3$ en C-2), 17,7 (*C*H$_3$ en C-6), 25,6 (C-7), 26,9 (C-4), 45,0 (C-1), 122,3 (C-3), 123,3 (C-2'), 126,6 (C-5), 129,0 (C-1'), 132,0 (C-6), 132,1 (C-2), 133,9 (C-3'), 168,3 (*C*O).

EMAR (ESI) calculado para $C_{17}H_{19}O_2NNa$ $[M+Na]^+$ 292,1313; encontrado 292,1315.

(*E*)-7-Amino-2,6-dimetilhept-5-en-2-ol (149)



149

Una solución de la ftalimida **136** (600 mg; 2,2 mmol) en etanol (10 mL) se trató con solución acuosa de hidracina al 65% (109 µL; 71 mg; 2,2 mmol). La mezcla de reacción se llevó a reflujo por 3 horas. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró. Se evaporó el solvente y se trató el residuo con ácido clorhídrico al 10% (10 mL) durante 3 horas. Se filtró la suspensión y se ajustó el p*H* del filtrado a 11 por adición de hidróxido de sodio 1,0 M. Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente para obtener el compuesto **149** puro.

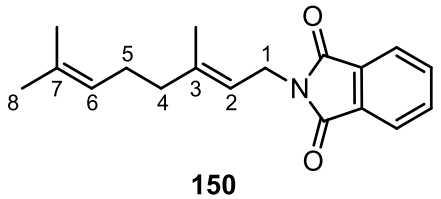
Rendimiento: 180 mg (52%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,24 (s, 6H, H-7, C*H*$_3$ en C-6), 1,36 (sa, 2H, N*H*$_2$), 1,55 (m, 2H, H-5), 1,66 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 2,11 (m, 2H, H-4), 3,17 (s, 2H, H-1), 5,30 (tc, *J* = 7,1; 1,2 Hz, 1H, H-3).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,5 (*C*H$_3$ en C-2), 22,7 (C-4), 29,2 (C-7, *C*H$_3$ en C-6), 43,5 (C-5), 49,9 (C-1), 70,8 (C-6), 123,7 (C-3), 136,6 (C-2).

EMAR (ESI) calculado para $C_9H_{19}ONNa$ $[M+Na]^+$ 180,1364; encontrado 180,1353.

(*E*)-2-(3,7-Dimetilocta-2,6-dien-1-il)isoindolina-1,3-diona (150)

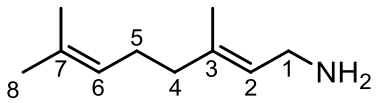


150

Se agregó gota a gota una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD; 1,34 mL; 1,38 g; 6,5 mmol) en THF anhidro (5 mL) a una mezcla de geraniol (**145**; 1,00 g; 6,5 mmol), trifenil fosfina (1,70 g; 6,5 mmol) y ftalimida (953 mg; 6,5 mmol) en THF anhidro (10 mL) a 0 ºC, de acuerdo al procedimiento descripto para la obtención del compuesto **136**. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 19:1) para obtener el compuesto **149** puro.

Rendimiento: 1,47 g (80%), aceite incoloro, R_f 0,52 (hexano–AcOEt, 4:1)
^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 1,56 (s, 3H, H-8), 1,63 (s, 3H, CH_3 en C-7), 1,82 (s, 3H, CH_3 en C-3), 2,00 (m, 2H, H-5), 2,08 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 2H, H-4), 4,27 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 2H, H-1), 5,05 (m, 1H, H-6), 5,27 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, 1H, H-2), 7,70 (m, 2H, H-3'), 7,85 (m, 2H, H-2').

(*E*)-3,7-Dimetilocta-2,6-dien-1-amina (151)



151

Se trató una solución del compuesto **150** (900 mg; 3,2 mmol) en etanol (13 mL) con solución acuosa de hidracina al 65% (152 µL; 101 mg; 3,2 mmol). Se llevó la mezcla de reacción a reflujo por 3 horas, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se evaporó el solvente. Se trató el residuo con solución acuosa de ácido clorhídrico al 5% (10 mL) durante 5 minutos y se filtró. Se ajustó el p*H* de la solución a 11 por adición de hidróxido de

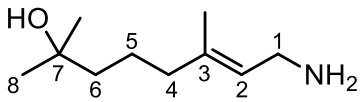
sodio 1,0 M. Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente para obtener la amina **151** pura.

Rendimiento: 422 mg (86%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,60 (s, 3H, H-8), 1,63 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-7), 1,69 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-3), 2,00 (m, 2H, H-5), 2,08 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, H-4), 3,27 (d, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 2H, H-1), 5,10 (tq, *J* = 6,7; 1,3 Hz, 1H, H-6), 5,26 (tq, *J* = 6,9; 1,2 Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,1 (*C*H$_3$ en C-3), 17,7 (*C*H$_3$ en C-7), 25,7 (C-8), 26,5 (C-5), 39,5 (C-4), 39,6 (C-1), 124,1 (C-2), 125,9 (C-6), 131,5 (C-7), 136,3 (C-3).

(*E*)-8-amino-2,6-dimetiloct-6-en-2-ol (152)



152

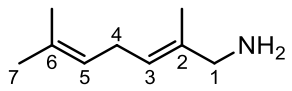
Una solución de la ftalimida **150** (1,47 g; 5,2 mmol) en etanol (10 mL) se trató con solución acuosa de hidracina al 65% (247 µL; 255 mg; 5,2 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 3 horas y se trató de acuerdo al procedimiento descripto para la obtención del compuesto **149**. Se evaporó el solvente para obtener el compuesto **152** puro.

Rendimiento: 680 mg (78%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,23 (s, 6H, H-8, C*H*$_3$ en C-7), 1,46 (sa, 2H, N*H*$_2$), 1,44–1,52 (m, 4H, H-4, H-5), 1,64 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-3), 2,01 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 2H, H-6), 3,30 (d, $^3J_{H-H}$ = 6,5 Hz, 2H, H-1), 5,28 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,0 (*C*H$_3$ en C-3), 22,5 (C-5), 29,3 (C-8, *C*H$_3$ en C-7), 39,6 (C-4), 39,9 (C-6), 43,5 (C-1), 70,9 (C-7), 126,0 (C-2), 136,3 (C-3).

(*E*)-2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-amina (125)



125

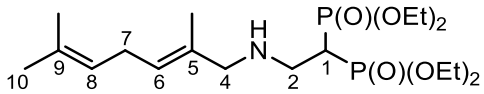
Se trató una solución del compuesto **136** (400 mg; 1,5 mmol) en etanol (10 mL) con solución acuosa de hidracina al 65% (71 µL; 73 mg; 1,5 mmol) de acuerdo al procedimiento descripto para la obtención de la amina **151**. Se evaporó el solvente para obtener la amina **125** pura.

Rendimiento 175,4 mg (84%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 (s, 3H, C-7), 1,66 (C*H*$_3$ en C-2), 1,70 (C*H*$_3$ en C-6), 2,72 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 2H, H-4), 3,17 (s, 2H, H-1), 5,11 (tc, *J* = 7,1; 1,2 Hz, 1H, H-3), 5,26 (tt, *J* = 7,1; 1,0 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,6 (*C*H$_3$ en C-2), 17,7 (*C*H$_3$ en C-6), 25,7 (C-7), 26,8 (C-4), 49,9 (C-1), 122,6 (C-3), 122,9 (C-5), 131,7 (C-6), 136,3 (C-2).

1-[(*E*)-2-((2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (153)



153

Se trató una solución de **52** (328 mg; 1,1 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) con trietilamina (133 mg; 185 mL; 1,3 mmol) y el compuesto **125** (152 mg; 1,1 mmol) bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 horas. Se evaporó el solvente para obtener el compuesto **153** puro.

Rendimiento 483,2 mg (100%), aceite incoloro.

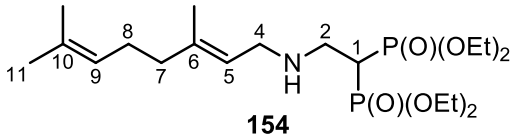
^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,34 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 12H, CH$_2$C*H*$_3$), 1,63 (s, 3H, H-10), 1,66 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-5), 1,68 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-9), 2,64 (tt, *J* = 23,7; 5,9 Hz,

1H, H-1), 2,71 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 2H, H-7), 3,08 (td, *J* = 16,8; 5,9 Hz, 2H, H-2), 3,12 (s, 2H, H-4), 4,18 (m, 8H, C*H*$_2$CH$_3$), 5,09 (tt, *J* = 7,1; 1,3 Hz, 1H, H-6), 5,29 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 1H, H-8).

^{13}C NMR (125,77 MHz, CDCl$_3$) δ 14,6 (*C*H$_3$ en C-5), 16,3 (d, $^3J_{C-P}$ = 3,0 Hz, CH$_2$*C*H$_3$), 16,4 (d, $^3J_{C-P}$ = 2,7 Hz, CH$_2$*C'*H$_3$), 18,7 (*C*H$_3$ en C-9), 24,7 (C-10), 26,9 (C-7), 37,6 (t, $^1J_{C-P}$ = 132,4 Hz, C-1), 44,8 (t, $^2J_{C-P}$ = 4,3 Hz, C-2), 57,0 (C-4), 62,4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,6 Hz, *C*H$_2$CH$_3$), 62,7 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,6 Hz, *C'*H$_2$CH$_3$), 122,8 (C-6), 125,1 (C-8), 131,5 (C-9), 132,8 (C-5).

^{31}P NMR (202,46 MHz, CDCl$_3$) δ 22,82 ppm.

1-[(*E*)-2-((3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)amino)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (154)



154

Se trató una solución de **52** (400 mg; 1,33 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) con la amina **151** (204 mg; 1,33 mmol) bajo atmósfera de argón, de acuerdo al procedimiento descripto para la síntesis del compuesto **153**. Se evaporó el solvente para obtener el compuesto **154** puro.

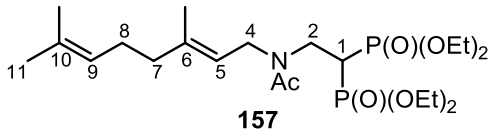
Rendimiento 611 mg (100%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, CDCl$_3$) δ 1,34 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 12H, CH$_2$C*H*$_3$), 1,63 (s, 3H, H-11), 1,66 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-10), 1,68 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 2,71 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,8 Hz, 4H, H-7, H-8), 2,65 (tt, *J* = 23,7; 5,9 Hz, 1H, H-1), 3,08 (td, *J* = 16,8; 5,9 Hz, 2H, H-2), 3,13 (sa, 2H, H-4), 5,09 (tt, *J* = 7,1; 1,3 Hz, 1H, H-9), 5,29 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, CDCl$_3$) δ 14,6 (*C*H$_3$ en C-6), 16,3 (d, $^3J_{C-P}$ = 3,0 Hz, CH$_2$*C*H$_3$), 16,4 (d, $^3J_{C-P}$ = 2,7 Hz, CH$_2$*C'*H$_3$), 17,7 (*C*H$_3$ en C-10), 25,6 (C-11), 26,9 (C-8), 37,6 (t, $^1J_{C-P}$ = 132,4 Hz, C-1), 44,8 (t, $^2J_{C-P}$ = 4,3 Hz, C-2), 57,0 (C-4), 62,4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,8 Hz, *C*H$_2$CH$_3$), 62,7 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, *C'*H$_2$CH$_3$), 122,8 (C-5), 125,1 (C-9), 131,5 (C-10), 132,8 (C-6).

^{31}P NMR (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 22,82 ppm.

1-[((*E*)-3,7-Dimetilocta-2,6-diene-1-acetamido)etil] 1,1- bisfosfonato de tetraetilo (157)



157

Una solución del compuesto **154** (227 mg; 0,5 mmol) en piridina anhidra (3,0 mL) se trató con anhídrido acético (3,0 mL) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, CH_2Cl_2-metanol, 19:1) para obtener el compuesto **157** puro.

Rendimiento 312 mg (63%), aceite incoloro.

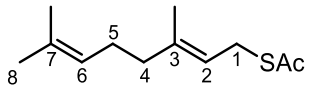
^{1}H NMR (500.13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,34 (t, $^{3}J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 6H, CH_2CH_3), 1,35 (t, $^{3}J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 6H, CH_2CH_3'), 1,61 (s, 3H, H-11), 1,68 (s, 3H, CH_3 en C-10), 1,69 (s, 3H, CH_3 en C-6), 2,00–2,11 (m, 4H, H-7, H-8), 2,07 (s, 3H, C(O)CH_3), 3,38 (tt, *J* = 22,7; 5,5 Hz, 1H, H-1), 3,71 (ddd, *J* = 14,7; 11,1; 7,4 Hz, 2H, H-2), 4,04 (d, $^{3}J_{H-H}$ = 6,4 Hz, 2H, H-4), 4,18 (m, 8H, CH_2CH_3), 5,07 (m, 2H, H-5, H-9).

^{13}C NMR (125.77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,3 (CH_3 en C-6), 16,34 (d, $^{3}J_{C-P}$ = 6,7 Hz, CH_2CH_3), 16,4 (d, $^{3}J_{C-P}$ = 6,6 Hz, CH_2CH_3'), 17,7 (CH_3 en C-10), 21,9 (C(O)CH_3), 25,7 (C-11), 26,3 (C-8), 34,4 (t, $^{1}J_{C-P}$ = 129,9 Hz, C-1), 39,5 (C-7), 44,4 (t, $^{2}J_{C-P}$ = 3,5 Hz, C-2), 48,8 (C-4), 62,4 (d, $^{2}J_{C-P}$ = 6,8 Hz, CH_2CH_3), 62,7 (d, $^{2}J_{C-P}$ = 6,8 Hz, CH_2CH_3'), 119,7 (C-5), 123,6 (C-9), 131,9 (C-10), 139,4 (C-6), 171,2 (C(O)CH_3).

^{31}P NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$) δ 21,49 ppm.

2-ALQUILMERCAPTOETIL-1,1-BISFOSFONATOS

S-((*E*)-(3,7-Dimetilocta-2,6-dien-1-il) etanotioato (173)

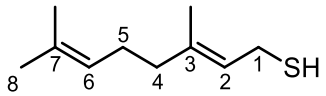


173

Se agregó gota a gota una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD; 1,91 mL; 1,97 g; 9,72 mmol) en THF anhidro (20 mL) a una mezcla de geraniol (**145**; 1,00 g; 6,48 mmol), trifenilfosfina (2,55 g; 9,72 mmol) y ácido tioacético (0,55 mL; 592 mg; 7,78 mmol) en THF anhidro (20 mL) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Luego, se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 9:1), para obtener el compuesto **173** puro.

Rendimiento 828 mg (60%), aceite incoloro, R_f = 0,54 (hexano–AcOEt, 19:1).
^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,59 (s, 3H, H-8), 1,68 (s, 6H, C*H*$_3$ en C-3, C*H*$_3$ en C-7), 2,00 (m, 2H, H-4), 2,06 (m, 2H, H-5), 2,32 (s, 3H, SC(O)C*H*$_3$), 3,54 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-1), 5,06 (tq, *J* = 6,8; 1,4 Hz, 1H, H-6), 5,21 (tq, *J* = 7,9; 1,3 Hz, 1H, H-2).
^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,2 (*C*H$_3$ en C-3), 17,7 (*C*H$_3$ en C-7), 25,6 (C-1), 26,4 (C-8), 27,3 (C-5), 30,4 (SC(O)*C*H$_3$), 39,5 (C-4), 118,4 (C-2), 123,8 (C-6), 131,7 (C-7), 140,1 (C-3), 196,1 (S*C*(O)CH$_3$).
EMAR (ESI) calculado para $C_{12}H_{20}OS$ $[M+Na]^+$ 235,1133; encontrado 235,1138.

(*E*)-3,7-Dimetilocta-2,6-dien-1-tiol (175)



175

Una solución del tioacetato **173** (901 mg; 4,24 mmol) en THF anhidro (25 mL) se trató con hidruro de aluminio y litio (322 mg; 8,49 mmol) agregándolo

en pequeñas porciones a 0 ºC. Se dejó reaccionar a 0 ºC durante 4 horas. Se cortó la reacción con acetato de etilo (2 mL). Luego, se particionó con cloruro de metileno (50 mL) y solución saturada de tartrato de potasio (50 mL). La fase orgánica se lavó con agua, se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano) para obtener el compuesto **175** puro.

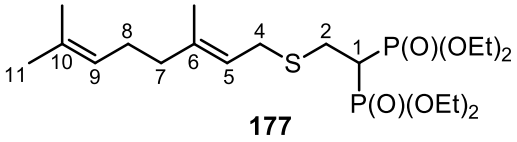
Rendimiento 495 mg (69%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,40 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 1H, S*H*), 1,60 (s, 3H, H-8), 1,66 (d, $^4J_{H-H}$ = 1,2 Hz, C*H*$_3$ en C-7), 1,68 (d, $^4J_{H-H}$ = 1,2 Hz, C*H*$_3$ en C-3), 2,00 (m, 2H, H-4), 2,07 (m, 2H, H-5), 3,16 (ddd, *J* = 7,6; 7,3; 0,4 Hz, 2H, H-1), 5,08 (tq, *J* = 6,9; 1,4 Hz, 1H, H-6), 5,34 (tsext, *J* = 7,8; 1,3 Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 15,8 (*C*H$_3$ en C-3), 17,7 (*C*H$_3$ en C-7), 22,1 (C-1), 25,7 (C-8), 26,4 (C-5), 39,4 (C-4), 123,3 (C-2), 123,6 (C-6), 131,7 (C-7), 137,5 (C-3).

EMAR (ESI) calculado para $C_{10}H_{19}S$ $[M+H]^+$ 171,1207; encontrado 171,1194.

1-[(*E*)-2-((3,7-Dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (177)



177

Una solución del compuesto **53** (1,00 g; 3,34 mmol) en cloruro de metileno anhidro (15 mL) se trató con trietilamina (337 mg; 465 µL; 3,34 mmol) y el tiol **175** (568 mg; 3,34 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt) para obtener el compuesto **177** puro.

Rendimiento 1,163 g (74%), aceite incoloro, R_f = 0,48 (AcOEt–MeOH, 9:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,36 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 12H, CH_2CH_3), 1,61 (s, 3H, H-11), 1,69 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-10), 1,70 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 2,04 (m, 2H, H-7), 2,10 (m, 2H, H-8), 2,63 (tt, *J* = 23,8; 6,1 Hz, 1H, H-1), 3,04 (dt, *J* = 16,2; 6,1 Hz, 2H,

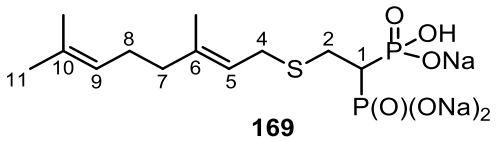
H-2), 3,24 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,4 Hz, 2H, H-4), 5,10 (m, 1H, H-9), 5,28 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,7 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,2 (CH_3 en C-6), 16,4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6,1 Hz, CH_2CH_3), 17,7 (CH_3 en C-10), 25,7 (C-11), 26,5 (C-8), 27,3 (t, $^2J_{C-P}$ = 5,0 Hz, C-2), 30,7 (C-4), 38,9 (t, $^1J_{C-P}$ = 131,6 Hz, C-1), 39,6 (C-7), 119,9 (C-5), 123,9 (C-9), 131,7 (C-10), 139,4 (C-6).

^{31}P NMR (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 21,72 ppm.

EMAR (ESI) calculado para $C_{20}H_{40}O_6SP_2$ $[M+Na]^+$ 493,1919; encontrado 493,1929.

Sal trisódica de ácido 1-[(*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfónico (169)



169

Una solución del aducto de Michael **177** (491 mg; 1,0 mmol) y 2,4,6-colidina (**156**; 1,26 g; 1,30 mL; 10,4 mmol) en cloruro de metileno anhidro (20 mL) se trató con bromotrimetilsilano (1,60 g; 1,38 mL; 10,4 mmol) bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 48 horas. Luego, se adicionó metanol (1 mL) y se evaporó el solvente. El residuo se disolvió en metanol (10 mL) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporó el solvente. Luego, se disolvió el residuo en metanol y se evaporó. Este procedimiento de repitió cuatro veces hasta obtener un sólido. Se disolvió el sólido en agua (10 mL) y se ajustó el *pH* a 7 con solución acuosa de NaOH al 10%. Se agregó acetona (20 mL) y se enfrió a 0 ºC por 24 horas. Se filtró el sólido resultante y se redisolvió en agua. Se lavó con CH_2Cl_2 (5 x 2 mL) y AcOEt (5 x 2 mL). La fase acuosa se liofilizó para obtener el compuesto **169** en forma de su sal trisódica.

Rendimiento 91 mg (21%), sólido amorfo.

^{1}H NMR (500,13 MHz, D_2O) δ 1,54 (s, 3H, H-11), 1,61 (s, 3H, CH_3 en C-10), 1,62 (s, 3H, CH_3 en C-6), 1,94–2,08 (m, 5H, H-1, H-7, H-8), 2,93 (ddd, *J* = 15,1; 14,0; 7,3 Hz, 2H, H-2), 3,20 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,7 Hz, 2H, H-4), 5,11 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 1H, H-9),

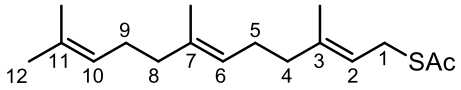
5,30 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, D_2O) δ 15,3 (*C*H_3 en C-6), 16,9 (*C*H_3 en C-10), 24,8 (C-11), 25,7 (C-8), 28,7 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,7 Hz, C-2), 29,9 (C-4), 38,7 (C-7), 40,1 (t, $^1J_{C-P}$ = 109,3 Hz, C-1), 119,8 (C-5), 124,2 (C-9), 133,6 (C-10), 140,2 (C-6).

^{31}P NMR (202,46 MHz, D_2O) δ 15,85 ppm.

EMAR (ESI) calculado para $C_{12}H_{22}O_6SP_2Na_3$ $[M+H]^+$ 425,0305; encontrado 425,0298.

S-((2*E*,6*E*)-3,7,11-Trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) etanotioato (174)



174

Se agregó una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD; 1,34 mL; 1,36 g; 6,7 mmol) en THF anhidro (20 mL) a una mezcla de farnesol **172** (1,00 g; 4,5 mmol), trifenilfosfina (1,77 g; 6,7 mmol) y ácido tioaético (0,38 mL; 410 mg; 5,4 mmol) en THF anhidro (20 mL) a 0 ºC, de acuerdo al procedimiento descripto para la preparación de **173**. Se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 9:1), para obtener el compuesto **174** puro.

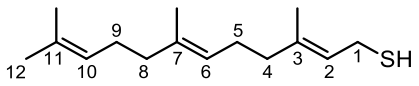
Rendimiento 840 mg (67%), aceite incoloro, R_f = 0,38 (hexano–AcOEt, 4:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,59 (s, 3H, C-12), 1,60 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-7), 1,68 (s, 6H, C*H*$_3$ en C-3, C*H*$_3$ en C-11), 1,95–2,10 (m, 8H, H-4, H-5, H-8, H-9), 2,32 (s, 3H, SC(O)C*H*$_3$), 3,54 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-1), 5,08 (m, 2H, H-6, H-10), 5,21 (tc, *J* = 7,9; 1,1 Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,0 (*C*H_3 en C-3), 16,2 (*C*H_3 en C-7), 17,7 (*C*H_3 en C-11), 25,9 (C-12), 26,3 (C-9), 26,7 (C-5), 27,3 (C-1), 30,4 (SC(O)*C*H_3), 39,5 (C-4), 39,7 (C-8), 118,4 (C-2), 123,7 (C-10), 124,3 (C-6), 131,3 (C-11), 135,3 (C-7), 140,2 (C-3), 196,1 (S*C*(O)CH_3).

EMAR (ESI) calculado para $C_{17}H_{28}OS$ $[M+Na]^+$ 303,1759; encontrado 303,1757.

(2*E*,6*E*)-3,7,11-Trimetildodeca-2,6,10-trien-1-tiol (176)



176

A una solución del tioacetato **174** (840 mg; 3,0 mmol) en THF anhidro (10 mL) se agregaron pequeñas porciones de hidruro de aluminio y litio (170 mg; 4,5 mmol) a 0 ºC, de acuerdo al procedimiento descripto para la obtención del compuesto **175**. La fase orgánica se lavó con agua, se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano) para obtener el compuesto **176** puro.

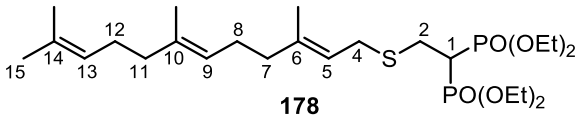
Rendimiento 422 mg (59%), aceite incoloro.

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,42 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 1H, S*H*), 1,62 (s, 6H, C-12, C*H*$_3$ en C-3), 1,68 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-7), 1,71 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-11), 1,99–2,14 (m, 8H, H-4, H-5, H-8, H-9), 3,18 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,2 Hz, 2H, H-1), 5,12 (m, 2H, H-6, H-10), 5,37 (tc, *J* = 7,8; 1,2 Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 15,8 (*C*H$_3$ en C-3), 16,0 (*C*H$_3$ en C-7), 17,7 (*C*H$_3$ en C-11), 22,1 (C-1), 25,7 (C-12), 26,3 (C-9), 26,7 (C-5), 39,4 (C-4), 39,7 (C-8), 123,3 (C-2), 123,7 (C-10), 124,3 (C-6), 131,3 (C-11), 135,3 (C-7), 137,5 (C-3).

EMAR (ESI) calculado para $C_{15}H_{27}S$ $[M+H]^+$ 239,1833; encontrado 239,1820.

1-[(2*E*,6*E*)-2-((3,7,11-Trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (178)



178

Una solución del compuesto **53** (303 mg; 1,0 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) se trató con trietilamina (112 mg; 154 µL; 1,1 mmol) y el tiol **176** (241 mg; 1,0 mmol) de acuerdo al procedimiento descripto para la preparación del compuesto **177**. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna

cromatográfica (sílica gel, AcOEt) para obtener el compuesto **178** puro.

Rendimiento 412 mg (76%), aceite incoloro, R_f = 0,50 (AcOEt–MeOH, 9:1).

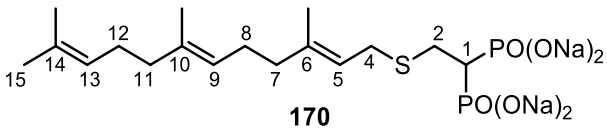
^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,35 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 12H, CH_2CH_3), 1,36 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 12H, $CH_2CH'_3$), 1,60 (s, 6H, C-15, CH_3 en C-6), 1,68 (s, 6H, CH_3 en C-10, CH_3 en C-14), 1,96–2,10 (m, 8H, H-7, H-8, H-11, H-12), 2,61 (tt, *J* = 23,8; 6,1 Hz, 1H, H-1), 3,02 (dt, *J* = 18,2; 6,1 Hz, 2H, H-2), 3,22 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,7 Hz, 2H, H-4), 4,20 (m, 8H, CH_2CH_3), 5,10 (m, 2H, H-9, H-13), 5,26 (tc, *J* = 7,6; 1,0 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 16,2 (CH_3 en C-6), 16,3 (CH_3 en C-10), 16,4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6,1 Hz, CH_2CH_3), 17,7 (CH_3 en C-14), 25,7 (C-15), 27,3 (t, $^2J_{C-P}$ = 5,0 Hz, C-2), 26,5 (C-12), 26,7 (C-8), 30,7 (C-4), 38,9 (t, $^1J_{C-P}$ = 131,6 Hz, C-1), 39,6 (C-7), 39,7 (C-11), 62,7 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,7 Hz, CH_2CH_3), 62,8 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,6 Hz, $C'H_2CH_3$), 119,8 (C-5), 123,8 (C-13), 124,3 (C-9), 131,3 (C-14), 135.,3 (C-10), 139,5 (C-6).

^{31}P NMR (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 21,47 ppm.

EMAR (ESI) calculado para $C_{25}H_{48}O_6SP_2$ $[M+Na]^+$ 561,2545; encontrado 561,2534.

Sal tetrasódica de ácido 1-[(2*E*,6*E*)-2-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)tio)etil]-1,1- bisfosfónico (170)



170

Una solución del aducto de Michael **178** (375 mg; 0,7 mmol) y 2,4,6-colidina (**156**; 843 mg; 920 µL, 7,0 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) se trató con bromotrimetilsilano (1,07 g; 0,9 mL; 7,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 48 horas. Luego, se adicionó metanol (1 mL) y se trató la muestra de acuerdo al procedimiento descripto para la preparación del compuesto **169**. Luego, se disolvió el sólido obtenido en agua (10 mL) y se ajustó el *pH* a 9 con solución acuosa de NaOH al 10%. Se agregó acetona (20 mL) y se enfrió a 0 ºC por 24 horas. Se filtró el sólido resultante y se

redisolvió en agua. Se lavó con CH_2Cl_2 (5 x 2 mL) y AcOEt (5 x 2 mL). La fase acuosa se liofilizó para obtener el compuesto **170** en forma de su sal tetrasódica.

Rendimiento 170 mg (52%) sólido amorfo.

^{1}H NMR (500,13 MHz, D_2O) δ 1,61 (s, 6H, C-15, C*H*$_3$ en C-6), 1,69 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-10) 1,72 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-14), 1,96–2,17 (m, 9H, H-1, H-7, H-8, H-11, H-12), 3,06 (dt, *J* = 14,6; 7,1 Hz, 2H, H-2), 3,31 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-4), 5,14 (m, 2H, H-9, H-13), 5,26 (tc, *J* = 7,8; 1,0 Hz, 1H, H-5).

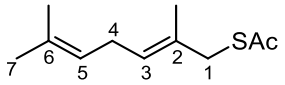
^{13}C NMR (125,77 MHz, D_2O) δ 16,1 (*C*H$_3$ en C-6), 16,3 (*C*H$_3$ en C-10), 17,9 (*C*H$_3$ en C-14), 24,3 (C-15), 25,9 (C-12), 30,2 (t, $^2J_{C-P}$ = 3,7 Hz, C-2), 26,9 (C-12), 27,0 (C-8), 31,4 (C-4), 41,4 (t, $^1J_{C-P}$ = 109,4 Hz, C-1), 40,09 (C-7), 40,11 (C-11), 120,9 (C-5), 125,23 (C-13), 125,22 (C-9), 133,4 (C-14), 136,7 (C-10), 140,6 (C-6).

^{31}P NMR (202,46 MHz, D_2O) δ 18,16 ppm.

EMAR (ESI) calculado para $C_{17}H_{29}O_6SP_2Na_4$ $[M+H]^+$ 515,0751; encontrado 515,0737.

Anal. Calculado para ($C_{17}H_{28}O_6SP_2Na_4 \cdot 2H_2O \cdot NaCl$): C 33,54; H 5,30; Encontrado C 33,54; H 5,46.

S-((*E*)-2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-il) etanotioato (179).



179

Se agregó una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD; 1,02 g; 5,04 mmol) en THF anhidro (10 mL) a una mezcla del alcohol **125** (471 mg; 3,4 mmol), trifenilfosfina (1,32 g; 5,04 mmol) y ácido tioaético (256 mg; 3,4 mmol) en THF anhidro (10 mL) a 0 ºC, de acuerdo al procedimiento descripto para la preparación de **173**. Se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, hexano–AcOEt, 49:1), para obtener el compuesto **179** puro.

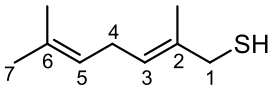
Rendimiento 459 mg (69%) aceite incoloro, R_f = 0,37 (hexano–AcOEt, 19:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,62 (s, 3H, C-7), 1,65 (m, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 1,68 (d, $^4J_{H-H}$ = 1,1 Hz, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 2,33 (s, 3H, SC(O)C*H*$_3$), 2,68 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 2H, H-4), 3,55 (c, $^4J_{H-H}$ = 0,9 Hz, 2H, H-1), 5,08 (tq, *J* = 7,1; 1,2 Hz, 1H, H-3), 5,38

(tc, *J* = 7,3; 1,2 Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 15,2 (C*H*$_3$ en C-2), 17,7 (C*H*$_3$ en C-6), 25,7 (C-7), 27,2 (C-4), 30,5 (SC(O)*C*H$_3$), 38,2 (C-1), 122,2 (C-3), 127,9 (C-5), 130,0 (C-2), 132,1 (C-6), 195,1 (S*C*(O)CH$_3$).

(*E*)-2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-tiol (180)



180

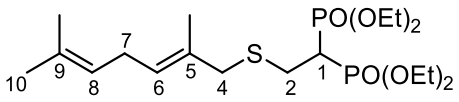
A una solución del tioacetato **179** (353 mg; 1,78 mmol) en 20 mL de una mezcla metanol-agua (5:3) se agregó carbonato de potasio (100 mg; 0,72 mmol). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego, se agregó agua (50 mL) y se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada acuosa de cloruro de sodio (2 x 30 mL), se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel, hexano), para obtener el compuesto **180** y el disulfuro **181**.

Rendimiento 89 mg (32%)[a] aceite incoloro, R_f = 0,57 (hexano–AcOEt, 19:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,40 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, 1H, S*H*), 1,63 (s, 3H, C-7), 1,69 (s, 3H, C*H*$_3$ en C-2), 1,75 (c, $^4J_{H-H}$ = 1,0 Hz, 3H, C*H*$_3$ en C-6), 2,71 (c, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, 2H, H-4), 3,12 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, 2H, H-1), 5,08 (tq, *J* = 7,1; 1,4 Hz, 1H, H-3), 5,31 (tc, *J* = 7,2; 1,0 Hz, 1H, H-5).

[a]Calculado por ^{1}H-RMN.

1-[(*E*)-2,6-Dimetilhepta-2,5-dien-1-il)tio)etil]-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (182).



182

Una solución del compuesto **53** (430 mg; 1,43 mmol) en cloruro de metileno anhidro (15 mL) se trató con trietilamina (147 mg; 205 µL; 1,43 mmol) y la mezcla tiol **180**-disulfuro **182** (8:1) (224 mg; 1,43 mmol de tiol **180**) de acuerdo al procedimiento descripto para la preparación del compuesto **177**. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por columna cromatográfica (sílica gel, AcOEt) para obtener el compuesto **182**.

Rendimiento 268 mg (41%) aceite incoloro, R_f = 0,42 (AcOEt–MeOH, 9:1).

^{1}H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,36 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,0 Hz, 6H, CH_2CH_3), 1,37 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 6H, $CH_2CH'_3$), 1,64 (s, 3H, H-10), 1,70 (s, 3H, CH_3 en C-5), 1,74 (m, 3H, CH_3 en C-9), 2,61 (tt, *J* = 23,8; 6,2 Hz, 1H, H-1), 2,74 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,6 Hz, 2H, H-7), 2,94 (dt, *J* = 16,2; 6,2 Hz, 2H, H-2), 3,15 (s, 2H, H-4), 4,21 (m, 8H, CH_2CH_3), 5,11 (tq, *J* = 7,0; 1,6 Hz, 1H, H-6), 5,31 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 1H, H-8).

^{13}C NMR (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,9 (CH_3 en C-5), 16,2 (t, $^3J_{C-P}$ = 3,3 Hz, CH_2CH_3), 16,4 (dd, *J* = 6,5; 1,3 Hz, $CH_2C'H_3$), 17,7 (CH_3 en C-9), 25,6 (C-10), 26,6 (t, $^2J_{C-P}$ = 5,0 Hz, C-2), 27,2 (C-7), 38,7 (t, $^1J_{C-P}$ = 131,7 Hz, C-1), 42,4 (C-4), 62,7 (d, $^2J_{C-P}$ = 4,8 Hz, CH_2CH_3), 62,8 (d, $^2J_{C-P}$ = 6,7 Hz, $C'H_2CH_3$), 122,2 (C-6), 127,9 (C-8), 130,0 (C-4), 132,1 (C-9).

^{31}P NMR (202,46 MHz, $CDCl_3$) δ 21.77 ppm.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios contra el mal de Chagas y la toxoplasmosis. A este respecto, como se discute en el capítulo 2, se diseñó una serie de 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos como potenciales agentes anti *T. cruzi*.

Los derivados 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfofónicos (**48**-**52**) fueron preparados siguiendo el método descripto por Kieczykowski y colaboradores para la síntesis de 1-hidroxi-bisfosfonatos (ligeramente modificado). A pesar de que los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfofonatos (**32**-**35**) obtenidos anteriormente en el laboratorio son potentísimos inhibidores de la proliferación de amastigotes de *T.cruzi* y de la actividad enzimática de *Tc*FPPS, ninguno de los derivados 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfofónicos (**48**-**52**), con un grupo hidroxilo adicional en la posición C-1, resultó ser efectivo contra amastigotes de *T. cruzi* ni contra la enzima blanco *Tc*FPPS. Esta falta de actividad biológica no podía ser atribuída simplemente a la presencia del grupo hidroxilo en C-1, ya que los bisfosfonatos de uso clínico pamidronato (**7**), alendronato (**8**) y risedronato (**12**) y el 1-hidroxi-bisfosfonato **29** poseen un grupo hidroxilo en la posición C-1 y son activos contra *T. cruzi*.

De acuerdo a los estudios de simulación computacional, los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfofonatos (**32**-**35**) adoptan una conformación restringida, sin tensiones torsionales, que podría ser beneficiosa para el reconocimiento molecular, mientras que los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos (**48**-**52**) presentan una variedad de conformaciones que no conducirían a una interacción favorable con la enzima blanco *Tc*FPPS. Sin embargo, algunos de estos compuestos resultaron potentes inhibidores de la proliferación de taquizoítos de *T. gondii* y de la actividad enzimática de *Tg*FPPS. Por ejemplo el compuesto **51** exhibió un ED_{50} de 2,00 μM contra *T. gondii* (taquizoítos) y un IC_{50} de 0,039 μM hacia *Tg*FPPS. La alta selectividad de los 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos (**48**-**52**) hacia *Tg*FPPS frente a *Tc*FPPS se puede explicar por el hecho que las secuencias de ambas enzimas tienen menos de 50% de similitud.

Adicionalmente, se estudió por ^{1}H-RMN el comportamiento de los protones unidos a heteroátomos de los compuestos **32** y **49**. Se encontró que en ambos casos al adicionar un equivalente de Mg^{2+} la señal correspondiente a los protones del

ácido bisfosfónico se desplazaban a campos altos, mientras que la señal correspondiente al protón unido al nitrógeno no se alteraba. Estos resultados indicaban que tanto para 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfofonatos (**32**-**35**) como para 2-alquilaminoetil-1-hidroxi-1,1-bisfosfofonatos (**48**-**52**) el átomo de nitrógeno en C-3 no está involucrado en la coordinación con Mg^{2+}, corroborando lo obtenido anteriormente en los estudios cristalográficos de los complejos de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfofonatos con *Tc*FPPS.

Por otra parte, dado que se había encontrado que la azida de sodio y alquilazidas reaccionaban con el alqueno **53** como dipolos en vez de como nucleófilos, en el capítulo 3 se estudió la reactividad de vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) como dipolarófilo en algunas reacciones de cicloadición 1,3-dipolares. En primer lugar, se analizó la reacción del alqueno **53** con las aldoximas **88**, **89** y **98** en presencia de diacetoxi-iodo benceno (DIB, **93**) en metanol conteniendo cantidades catalíticas de TFA. Esta metodología permitió la obtención de los 4,5-dihidroisoxazoles **98, 100 y 101** con rendimientos de 24, 40 y 23%, respectivamente. Adicionalmente, se estudió la síntesis *one pot* de pirrolidinas a partir de 2-amino-malonato de dietilo (**120**), vinilidenbisfosfonato de tetraetilo (**53**) y los aldehídos correspondientes. Esta metodología permitió la obtención de las pirrolidinas **121**-**122** con rendimientos entre 41 y 68%. En ambos casos los cicloaductos conteniendo la unidad *gem*-bisfosfonato fueron obtenidos con alta regioselectividad.

Posteriormente, siguiendo con la búsqueda de drogas más eficientes y efectivas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, se propuso que el compuesto **124** con dobles enlaces y grupos metilo estratégicamente ubicados sería un potencial líder para la síntesis de nuevos bisfosfonatos inhibidores de *Tc*FPPS. Esta propuesta, como se detalla en el capítulo 4, se hizo en base a los estudios cristalográficos y calorimétricos de la interacción de los 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfofonatos (**32**-**35**) con *Tc*FPPS.

La estrategia sintética para acceder al compuesto **124** se llevó a cabo *via* el alcohol **126**. Este intermediario clave fue obtenido siguiendo el procedimiento descripto por Mori y Ueda ligeramente modificado. Una vez obtenido el alcohol **126**, se introdujo la función nitrogenada a través de una reacción de Mitsunobu.

Estas condiciones permitieron la obtención de la ftalimida *N*-sustituída **136** con 54% de rendimiento.

Posteriormente, el tratamiento de la ftalimida **136** con monohidrato de hidracina dio lugar a la amina alílica **125** con 84% de rendimiento. Esta reacción no fue trivial ya que, dependiendo de las condiciones del *work up*, podía obtenerse mayoritariamente el alcohol **149** en lugar de la amina **125**. Por otra parte, el bisfosfonato de tetraetilo **153**, precursor inmediato de la molécula blanco, se obtuvo directamente por la adición conjugada de la amina alílica **125** al aceptor de Michael **53**.

Hasta el momento, sólo se encuentran descriptos dos métodos para la hidrólisis de tetraetil bisfosfonatos, a saber, hidrólisis con ácido clorhídrico a reflujo y tratamiento con bromotrimetilsilano seguido de digestión con metanol. Dado que el tratamiento con ácido clorhídrico era incompatible con la presencia de dobles enlaces en la cadena lateral, se evaluó la desprotección del compuesto **153** con bromotrimetilsilano. Sin embargo, de acuerdo al análisis del espectro de ^{1}H-RMN tuvo lugar una reacción de retro-Michael. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de una nueva química para la desprotección de 2-alquilaminoetil-1,1-bisfosfonatos, que sea compatible con la presencia de dobles enlaces en la cadena lateral.

Finalmente, puesto que los derivados 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfónicos también habían resultado interesantes desde el punto de vista farmacológico, en el capítulo 5 se postularon las estructuras **169**-**171** como blancos moleculares para su síntesis y evaluación biológica.

Los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos **169** y **170** fueron obtenidos *via* geraniol y farnesol, ambos disponibles comercialmente, mientras que la estrategia sintética para acceder al compuesto **171** se llevó a cabo *via* el alcohol (*E*)-2,6-dimetilhepta-2,5-dien-1-ol (**126**), el cual había sido obtenido anteriormente de acuerdo al procedimiento descripto por Mori y Ueda ligeramente modificado. En primer lugar, se obtuvieron los tioacetatos **173** y **174** a partir de geraniol y farnesol, mediante una reacción de Mitsunobu. Posteriormente, la reducción de los tioacetatos **173** y **174** con hidruro de aluminio y litio dio lugar a los tioles **175** y **176** con 69 y 59% de rendimiento, respectivamente. Luego, se obtuvieron los tetraetil bisfosfonatos **177** y **178** mediante la adición conjugada de

los tioles **175** y **176** al aceptor de Michael **53**. Finalmente, los tetraetil bisfosfonatos **177** y **178** fueron hidrolizados con bromotrimetilsilano en presencia de colidina, de acuerdo al procedimiento descripto por Wiemer y colaboradores para la hidrólisis de isoprenil bisfosfonatos. Esta metodología permitió la obtención del 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonato **169** en forma de su sal trisódica con 21% de rendimiento, mientras que el bisfosfonato **170** se obtuvo en forma de su sal tetrasódica, con 52% de rendimiento.

Por otra parte, se obtuvo el tioacetato **179** haciendo reaccionar el alcohol **126** con ácido tioacético bajo condiciones de Mitsunobu. Sin embargo, el tratamiento del tioacetato **179** con hidruro de aluminio y litio no permitió obtener el tiol correspondiente. Por lo tanto, se llevó a cabo la hidrólisis del tioacetato **179** con carbonato de potasio en metanol. A pesar de haber llevado a cabo la reacción bajo atmósfera inerte, se obtuvo una mezcla de tiol **180** y disulfuro **181** en proporción 8:1. Esta mezcla se hizo reaccionar directamente con el aceptor de Michael **53** para obtener el tetraetil bisfosfonato **182**. Sin embargo, luego de intentar purificar el compuesto **182** por columna cromatográfica, el análisis de los espectros de RMN de ^{1}H y ^{31}P permitía postular que el doble enlace de la cadena lateral estaba sufriendo algún tipo de reordenamiento promovido por la sílica-gel.

La evaluación biológica de los 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos **169** y **170** dio lugar a resultados muy interesantes. Contrariamente a lo esperado, los compuestos **169** y **170** estuvieron completamente desprovistos de actividad contra amastigotes de *T. cruzi* y taquizoítos de *T. gondii*. Sin embargo, el compuesto **169** exhibió una actividad modesta contra la enzima *Tg*FPPS. Evidentemente, la introducción de dobles enlaces y ramificaciones en la cadena alquílica de 2-alquilmercaptoetil-1,1-bisfosfonatos no aumenta la afinidad de los derivados hacia la enzima blanco, sino que por el contrario disminuye significativamente la afinidad hacia *Tg*FPPS.

Parte del presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- Recher, M.; Barboza, A. P.; Li, Z.-H.; Galizzi, M.; Ferrer-Casal, M.; Szajnman, S. H.; Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Rodriguez, J. B. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Sulfur-Containing 1,1-Bisphosphonic Acids as Antiparasitic Agents. *Eur. J. Med. Chem*. **2013**, *60*, 431-440.
- Ferrer-Casal, M.; Barboza, A.P.; Szajnman, S. H.; Rodriguez, J. B. 1,3-Dipolar cycloadditions on the versatile intermediate tetraethyl vinylidene bisphosphonate. *Synthesis*. **2013**, 45, 2397-2404.
- Ferrer-Casal, M.; Li, C.; Galizzi, M.; Stortz, C. A.; Szajnman, S. H.; Docampo, R.; Moreno S. N. J.; Rodriguez, J. B. New Insights into Molecular Recognition of 1,1-Bisphosphonic Acids by Farnesyl Diphosphate Synthase. *Bioorg. Med. Chem*. **2014**, *22*, 398-405.
- Galaka, T.; Ferrer-Casal, M.; Storey, M.; Li, C.; Chao, M. N.; Szajnman, S. H.; Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Rodriguez, J. B. Antiparasitic Activity of Sulfur- and Fluorine-Containing Bisphosphonates against Trypanosomatids and Apicomplexan Parasites. Molecules, **2017**, *22*, 82.

Referencias

(1) Fleisch, H.; Neuman, W. F. *Am J Physiol* **1961**, *200*, 1296.

(2) Fleisch, H.; Bisaz, S. *Nature*. 1962, 911.

(3) Fleisch, H. *Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient*, Third edit.; The Partenong Publishing Group, 1997.

(4) Fleisch, H.; Bisaz, S. *Am J Physiol* **1962**, *203*, 671.

(5) Fleisch, H.; Russell, R. G. G.; Straumann, F. *Nature* **1966**, *212*, 901.

(6) Schibler, D., Russell, R. G. G., Fleisch, H. *Clin. Sci* **1968**, *35*, 363.

(7) Gabbiani, G. *Canad. J. Physiol. Pharmacol* **1966**, *44*, 203.

(8) Fleisch, H. *Experientia* **1966**, *22*, 367.

(9) Fleisch, H.; Russell, R. G.; Bisaz, S.; Mühlbauer, R. C.; Williams, D. *Eur. J. Clin. Invest.* **1970**, *1*, 12.

(10) Francis, M. D.; Russel, R. G. G.; Fleisch, H. *Science.* **1969**, *165*, 1264.

(11) Russell, R. G. G.; Rogers, M. J. *Bone* **1999**, *25*, 97.

(12) Aripirala, S.; Szajnman, S. H.; Jakoncic, J.; Rodriguez, J. B.; Docampo, R.; Gabelli, S. B.; Amzel, L. M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6445.

(13) Russell, R. G. G.; Mühlbauer, R. C.; Bisaz, S.; Williams, D. A.; Fleisch, H. *Calcif. Tissue Res.* **1970**, *6*, 183.

(14) Ebetino, F. H.; Hogan, A. M. L.; Sun, S.; Tsoumpra, M. K.; Duan, X.; Triffitt, J. T.; Kwaasi, A. A.; Dunford, J. E.; Barnett, B. L.; Oppermann, U.; Lundy, M. W.; Boyde, A.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E.; Russell, R. G. G. *Bone* **2011**, *49*, 20.

(15) van Beek, E.; Hoekstra, M.; van de Ruit, M.; Lowik, C.; Papapoulos, S. *J. bone Miner. Res.* **1994**, *9*, 1875.

(16) Suda, T.; Nakamura, I.; Takahashi, N.; Jimi, E. *J Bone Min. Res* **1997**, *12*, 869.

(17) Azuma, Y.; Sato, H.; Oue, Y.; Okabe, K.; Ohta, T.; Tsuchimoto, M.; Kiyoki, M. *Bone* **1995**, *16*, 235.

(18) Masarachia, P. J.; Weinreb, M.; Balena, R.; Rodan, G. A. *Bone* **1996**, *19*, 281.

(19) Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D. D.; Golub, E.; Rodan, G. A. *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 2095.

(20) Murakami, H.; Takahashi, N.; Sasaki, T.; Udagawa, N.; Tanaka, S.; Nakamura, I.; Zhang, D.; Barbier, A.; Suda, T. *Bone* **1995**, *17*, 137.

(21) Sato, M.; Grasser, W. *J Bone Min. Res* **1990**, *5*, 31.

(22) Schenk, R.; Merz, W. A.; Mühlbauer, R.; Russell, R. G. G.; Fleisch, H. *Calcif. Tissue Res.* **1973**, *11*, 196.

(23) Schmidt, A.; Rutledge, S. J.; Endo, N.; Opas, E. E.; Tanaka, H.; Wesolowski, G.; Leu, C. T.; Huang, Z.; Ramachandaran, C.; Rodan, S. B.; Rodan, G. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 3068.

(24) Murakami, H.; Takahashi, N.; Tanaka, S.; Nakamura, I.; Udagawa, N.; Nakajo, S.; Nakaya, K.; Abe, M.; Yuda, Y.; Konno, F.; Barbier, A.; Suda, T. *Bone* **1997**, *20*, 399.

(25) Hughes, D. E.; Wright, K. R.; Uy, H. L.; Sasaki, A.; Yoneda, T.; Roodman, G. D.; Mundy, G. R.; Boyce, B. F. *J. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 1478.

(26) Rogers, M. J.; Chilton, K. M.; Coxon, F. P.; Lawry, J.; Smith, M. O.; Suri, S.; Russell, R. G. *J. Bone Miner. Res.* **1996**, *11*, 1482.

(27) Shipman, C. M.; Rogers, M. J.; Apperley, J. F.; Russell, R. G.; Croucher, P. I. *Br. J. Haematol.* **1997**, *98*, 665.

(28) Roelofs, A.; Thompson, K.; Gordon, S.; Rogers, M. *Bone* **1999**, *24*, 73S.

(29) Rogers, M. J.; Watts, D. J.; Russell, R. G. G.; Ji, X.; Xiong, X.; Blackburn, G. M.; Bayless, A. V; Ebetino, F. H.; Al, R. E. T. *J Bone Min. Res* **1994**, *9*, 1029.

(30) Rogers, M. J.; Ji, X.; Russell, R. G. G.; Blackburn, G. M.; Williamson, M. P.; Bayless, A. V; Ebetino, F. H.; Watts, D. J. *Biochem J* **1994**, *311*, 303.

(31) Rogers, M. J.; Russell, R. G. G.; Blackburn, G.M.; Williamson, M. P.; Watts, D. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 414.

(32) Rogers, M. J.; Brown, R. J.; Hodkin, V.; Blackburn, G. M.; Russell, R. G. G.; Watts, D. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *869*, 863.

(33) Rogers, M. J.; Xiong, X.; Ji, X.; Monkkonen, J.; Russell, R. G. G.; Williamson, M. P.; Ebetino, F. H.; Watts, D. J. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 625.

(34) Frith, J. C.; Mönkkönen, J.; Blackburn, G. M.; Russell, R. G. G.; Rogers, M. J. *J Bone Min. Res* **1997**, *12*, 1358.

(35) Luckman, S. P.; Hughes, D. E.; Coxon, F. P.; Graham, R.; Russell, G.; Rogers, M. J. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 581.

(36) van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; Löwik, C.; Papapoulos, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 491.

(37) van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; Löwik, C.; Papapoulos, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264*, 108.

(38) Dunford, J. E.; Thompson, K.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Hahn, F. M.; Poulter, C. D.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J. *J. Pharmacol. Exp Ther.* **2001**, *296*, 235.

(39) Rodriguez, J. B.; Falcone, B. N.; Szajnman, S. H. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11*, 307.

(40) Ferrer-Casal, M.; Li, C.; Galizzi, M.; Stortz, C. A.; Szajnman, S. H.; Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Rodriguez, J. B. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22*, 398.

(41) Sun, S.; McKenna, C. E. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1433.

(42) Dunford, J. E.; Kwaasi, A. A.; Rogers, M. J.; Barnett, B. L.; Ebetino, F. H.; Russell, R. G. G.; Oppermann, U.; Kavanagh, K. L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2187.

(43) Rondeau, J. M.; Bitsch, F.; Bourgier, E.; Geiser, M.; Hemmig, R.; Kroemer, M.; Lehmann, S.; Ramage, P.; Rieffel, S.; Strauss, A.; Green, J. R.; Jahnke, W. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 267.

(44) Kavanagh, K. L.; Guo, K.; Dunford, J. E.; Wu, X.; Knapp, S.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J.; Russell, R. G. G.; Oppermann, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 7829.

(45) Poulter, C. D.; Rilling, H. C. *Am. Chem. Soc.* **1978**, *11*, 307.

(46) Cornforth, J. W.; Cornforth, R. H.; Popják, G.; Yengoyan, L. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 3970.

(47) Tarshis, L. C.; Yan, M. J.; Poulter, C. D.; Sacchettini, J. C. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10871.

(48) Tarshis, L. C.; Proteau, P. J.; Kellogg, B. a; Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 15018.

(49) Hosfield, D. J.; Zhang, Y.; Dougan, D. R.; Broun, A.; Tari, L. W.; Swanson, R. V.; Finn, J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8526.

(50) Martin, M. B.; Arnold, W.; Heath, H. T.; Urbina, J. a; Oldfield, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 754.

(51) Ebetino, F. H.; Rozé, C. N.; McKenna, C. E.; Barnett, B. L.; Dunford, J. E.; Russell, R. G. G.; Mieling, G. E.; Rogers, M. J. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 2679.

(52) Szajnman, S. H.; Montalvetti, A.; Wang, Y.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3231.

(53) Urbina, J. A.; Docampo, R. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 495.

(54) Centro de prensa OMS. *Nota Descr. N°340* **2016**, 1.

(55) Urbina, J. A.; Moreno, B.; Vierkotter, S.; Oldfield, E.; Payares, G.; Sanoja, C.; Bailey, B. N.; Yan, W.; Scott, D. A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33609.

(56) Docampo, R.; Scott, D. A.; Vercesi, A. E.; Moreno, S. N. J. *Biochem. J.* **1995**, *310*, 1005.

(57) Vercesi, A. E.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 227.

(58) Vercesi, A. E.; Docampo, R. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 265.

(59) Lu, H. G.; Zhong, L.; Chang, K. P.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9464.

(60) Moreno, S. N. J.; Zhong, L. *Biochem. J.* **1996**, *313*, 655.

(61) Scott, D. A.; De Souza, W.; Benchimol, M.; Zhong, L.; Lu, H. G.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22151.

(62) Martin, M. B.; Grimley, J. S.; Lewis, J. C.; Heath, H. T.; Bailey, B. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Caldera, A.; Lira, R.; Urbina, J. A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Croft, S. L.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 909.

(63) Bergstrom, J. D.; Bostedor, R. G.; Masarachia, P. J.; Reszka, A. A.; Rodan, G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 231.

(64) Eastman, R. T.; White, J.; Hucke, O.; Bauer, K.; Yokoyama, K.; Nallan, L.; Chakrabarti, D.; Verlinde, C. L. M. J.; Gelb, M. H.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13554.

(65) Montalvetti, A.; Bailey, B. N.; Martin, M. B.; Severin, G. W.; Oldfield, E.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33930.

(66) Gabelli, S. B.; McLellan, J. S.; Montalvetti, A.; Oldfield, E.; Docampo, R.; Amzel, L. M. *Proteins* **2006**, *62*, 80.

(67) Huang, C.-H.; Gabelli, S. B.; Oldfield, E.; Amzel, L. M. *Proteins* **2010**, *78*, 888.

(68) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. *Lancet* **2010**, *375*, 1388.

(69) Kirchhoff, L. V. In *Principles and Practice of Clinical Parasitology*; John Wiley & Sons Ltd, 2001; pp 335-353.

(70) Bern, C. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 456.

(71) Develoux, M.; Lescure, F. X.; Le Loup, G.; Pialoux, G. *Rev. Med. Interne*

2009, *30*, 686.

(72) Garzoni, L. R.; Waghabi, M. C.; Baptista, M. M.; De Castro, S. L.; Meirelles, M. D. N. L.; Britto, C. C.; Docampo, R.; Oldfield, E.; Urbina, J. A. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 286.

(73) Pereira, K. S.; Schmidt, F. L.; Guaraldo, A. M.; Franco, R. M.; Dias, V. L.; Passos, L. A. *J Food Prot* **2009**, *72*, 441.

(74) Urbina, J. A. *Acta Trop.* **2010**, *115*, 55.

(75) Pinto Dias, J.; Coura, J. R.; Shikanai Yasuda, M. A. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 123.

(76) Innes, E. A. *Zoonoses Public Health* **2010**, *57*, 1.

(77) Ferguson, D. J. P. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 133.

(78) Kim, K.; Weiss, L. M. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 978.

(79) Ferguson, D. J. P. *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 355.

(80) Schwartzman, J. D. In *Principles and Practice of Clinical Parasitology*; Gillespie, S., Pearson, R. D., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 2001; pp 114-138.

(81) Dubey, J. P. *Int. J. Parasitol.* **2009**, No. 8, 877.

(82) Rodriguez, J. B.; Szajnman, S. H. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 311.

(83) Hill, D.; Dubey, J. P. *Clin. Microbiol. Infect.* **2002**, *8*, 634.

(84) Rivera Fernández, N.; Mondragón Castelán, M.; González Pozos, S.; Ramírez Flores, C. J.; Mondragón González, R.; Gómez de León, C. T.; Castro Elizalde, K. N.; Marrero Ponce, Y.; Arán, V. J.; Martins Alho, M. A.; Mondragón Flores, R. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 2081.

(85) Szajnman, S. H.; Bailey, B. N.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 789.

(86) Szajnman, S. H.; Ravaschino, E. L.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4685.

(87) Szajnman, S. H.; García Liñares, G. E.; Li, Z. H.; Jiang, C.; Galizzi, M.; Bontempi, E. J.; Ferella, M.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16*, 3283.

(88) Rosso, V. S.; Szajnman, S. H.; Malayil, L.; Galizzi, M.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2211.

(89) Cao, R.; Chen, C. K. M.; Guo, R. T.; Wang, A. H. J.; Oldfield, E. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *73*, 431.

(90) Gumienna-Kontecka, E.; Silvagni, R.; Lipinski, R.; Lecouvey, M.; Cesare Marincola, F.; Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Leroux, Y.; Kozlowski, H. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *339*, 111.

(91) Gumienna-kontecka, E.; Jezierska, J.; Lecouvey, M.; Leroux, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 13.

(92) Ebetino, F. H., Francis, M. D., Rogers, M. J., and Russell, R. G. G. *Rev. Contemp. Pharmacother.* **1998**, *9*, 233.

(93) Matczak-Jon, E.; Kurzak, B.; Kamecka, A.; Kafarski, P. *Polyhedron* **2002**, *21*, 321.

(94) van Beek, E.; Löwik, C.; Que, I.; Papapoulos, S. *J. Bone Miner. Res.* **1996**, *11*, 1492.

(95) Marma, M. S.; Xia, Z.; Stewart, C.; Coxon, F.; Dunford, J. E.; Baron, R.; Kashemirov, B. a; Ebetino, F. H.; Triffitt, J. T.; Russell, R. G. G.; McKenna, C. E. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5967.

(96) McKenna, C. E.; Shed, P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4573.

(97) Berkowitz, D. B.; Bose, M. *J. Fluor. Chem.* **2001**, *112*, 13.

(98) Kruijtzer, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969.

(99) Zuliani, V.; Carmi, C.; Rivara, M.; Fantini, M.; Lodola, A.; Vacondio, F.; Bordi, F.; Plazzi, P. V.; Cavazzoni, A.; Galetti, M.; Alfieri, R. R.; Petronini, P. G.; Mor, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3471.

(100) Kieczykowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310.

(101) Mustafa, D. A.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2285.

(102) Rodriguez, J B; Szajnman, S. H. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 311.

(103) Ling, Y.; Li, Z. H.; Miranda, K.; Oldfield, E.; Moreno, S. N. J. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30804.

(104) Li, Z. H.; Cintrón, R.; Koon, N. A.; Moreno, S. N. J. *Biochemistry* **2012**, *51*, 7533.

(105) Demoro, B.; Caruso, F.; Rossi, M.; Benítez, D.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Parajón-Costa, B.; Castiglioni, J.; Galizzi, M.; Docampo, R.; Otero, L.; Gambino, D. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 1252.

(106) Pan, Z.; Chen, J.; Lü, G.; Geng, Y.-Z.; Zhang, H.; Ji, Q. *J. Chem. Phys.*

2012, *136*, 164313.

(107) Swiatla-Wojcik, D. *Chem. Phys.* **2007**, *342*, 260.

(108) Xue, Z.; Li, Q.; Tao, H.; Wang, C. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 11757.

(109) Skarpos, H.; Osipov, S. N.; Vorob'eva, D. V; Odinets, I. L.; Lork, E.; Röschenthaler, G.-V. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2361.

(110) Green, J. R. *Cancer* **2003**, *97* (3 Suppl), 840.

(111) Simoni, D.; Gebbia, N.; Invidiata, F. P.; Eleopra, M.; Marchetti, P.; Rondanin, R.; Baruchello, R.; Provera, S.; Marchioro, C.; Tolomeo, M.; Marinelli, L.; Limongelli, V.; Novellino, E.; Kwaasi, A.; Dunford, J.; Buccheri, S.; Caccamo, N.; Dieli, F. *J Med Chem* **2008**, *51*, 6800.

(112) Szajnman, S. H.; García Liñares, G.; Moro, P.; Rodriguez, J. B. *Eur. J. Org. Chem. Chem.* **2005**, 3687.

(113) Szajnman, S. H.; Rosso, V. S.; Malayil, L.; Smith, A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1424.

(114) Recher, M.; Barboza, A. P.; Li, Z. H.; Galizzi, M.; Ferrer-Casal, M.; Szajnman, S. H.; Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Rodriguez, J. B. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 431.

(115) Sulzer-Mossé, Sarah; Tissot, Matthieu; Alexakis, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3749.

(116) Sulzer-Mossé, S.; Alexakis, A.; Mareda, J.; Bollot, G.; Bernardinelli, G.; Filinchuk, Y. *Chem. A Eur. J.* **2009**, *15*, 3204.

(117) Jiang, Q.; Yang, L.; Hai, L.; Wu, Y. *Lett. Org. Chem.* **2008**, *5*, 229.

(118) Ferrer-Casal, M.; Barboza, A. P.; Szajnman, S. H.; Rodriguez, J. B. *Synth.* **2013**, *45*, 2397.

(119) Chajrasali, R. T.; Junjappa, H. *Synthesis (Stuttg).* **1988**, 453.

(120) Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863.

(121) Fleming, I. *Pericyclic Reactions*; Oxford Science Publications, 1998.

(122) Fleming, I. *Molecular Orbitals & Organic Chemical Reactions*; Sons, J. W. &, Ed.; 2009.

(123) Cinque, G. M.; Szajnman, S. H.; Zhong, L.; Docampo, R.; Schvartzapel, A. J.; Rodriguez, J. B.; Gros, E. G. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1540.

(124) Harada, K.; Kaji, E.; Zen, S. *Chem Pharm Bull.* **1980**, *28*, 3296.

(125) Basel, Y.; Hassner, A. *Synthesis (Stuttg).* **1997**, 309.

(126) Ye, Y.; Xu, G. Y.; Zheng, Y.; Liu, L. Z. *Heteroat. Chem.* **2003**, *14*, 309.

(127) Shimizu, T.; Hayashi, Y.; Teramura, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 2531.

(128) Perold, G. W.; Steyn, A. P.; von Reiche, F. V. K. *J Am Chem Soc* **1957**, *79*, 462.

(129) Mukaiyama, T.; Hoshino, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5339.

(130) Cecchi, L.; De Sarlo, F.; Machetti, F. *European J. Org. Chem.* **2006**, 4852.

(131) Cecchi, L.; De Sarlo, F.; Machetti, F. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7877.

(132) Mendelsohn, B. A.; Lee, S.; Kim, S.; Teyssier, F.; Aulakh, V. S.; Ciufolini, M. A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1539.

(133) Bousquet, E. W. *Org. Synth. Coll. Vol. 2* **1943**, 313.

(134) Grigg, R.; Kemp, J. *J. C. S. Chem. Comm.* **1978**, 109.

(135) Garner, P.; Kaniskan, H. Ü. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10868.

(136) Garner, P.; Kaniskan, H. Ü. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5181.

(137) Zambito, A. J.; Howe, E. E. *Org. Synth. Coll. Vol. 5* **1973**, 373.

(138) Hartung, W. H.; Beaujon, J. H. R.; Cocolas, G. *Org. Synth. Coll. Vol. 5* **1973**, 376.

(139) Laskovics, F. Mark; Krafcik, James M.; Poulterl, C. D. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9458.

(140) Laskovics, F. M.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **1981**, *20*, 1893.

(141) Poulter, C. D.; Craig, J.; Rr, G. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 7227.

(142) Ohnuma, S. I.; Nakazawa, T.; Hemmi, H.; Hallberg, A. M.; Koyama, T.; Ogura, K.; Nishino, T. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10087.

(143) Narita, K.; Ohnuma, S.; Nishino, T. *J Biochem* **1999**, *26*, 566.

(144) Mori, K.; Ueda, H. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2581.

(145) Evans, D. A.; Andrews, G. C. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 147.

(146) Wicek, M.; Kottke, T.; Ligneau, X.; Schunack, W.; Seifert, R.; Stark, H.; Handzlik, J.; Kieć-Kononowicz, K. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19*, 2850.

(147) Kuriyama, N.; Inoue, Y.; Kitagawa, K. *Synthesis (Stuttg).* **1990**, 735.

(148) Murahashi, S.; Taniguchi, Y.; Imada, Y.; Tanigawa, Y. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3292.

(149) Trost, B. M.; Pulley, S. R. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 10143.

(150) Trost, B. M.; Crawley, M. L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921.

(151) Ohshima, T.; Miyamoto, Y.; Ipposhi, J.; Nakahara, Y.; Utsunomiya, M.; Mashima, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14317.

(152) Shevchuk, M. V.; Sotiropoulos, J. M.; Miqueu, K.; Romanenko, V. D.; Kukhar, V. P. *Synlett* **2011**, 1370.

(153) Takeuchi, M.; Sakamoto, S.; Yoshida, M.; Abe, T.; Isomura, Y. *Chem Pharm Bull.* **1993**, *41*, 688.

(154) Mimura, M.; Hayashida, M.; Nomiyama, K.; Ikegami, S.; Iida, Y.; Tamura, M.; Hiyama, Y. . O. *Chem Pharm Bull.* **1993**, *41*, 1971.

(155) Morioka, M.; Kamizono, A.; Takikawa, H.; Mori, A.; Ueno, H.; Kadowaki, S. ichiro; Nakao, Y.; Kato, K.; Umezawa, K. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18*, 1143.

(156) Bulman Page, P. C.; Moore, J. P. G.; Mansfield, I.; McKenzie, M. J.; Bowler, W. B.; Gallagher, J. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1837.

(157) Wiemer, A. J.; Yu, J. S.; Lamb, K. M.; Hohl, R. J.; Wiemer, D. F. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16*, 390.

(158) Capuzzi, M.; Perdicchia, D.; Jørgensen, K. A. *Chem. A Eur. J.* **2008**, *14*, 128.

(159) Szajnman, S. H.; Galaka, T.; Li, Z.-H.; Li, C.; Howell, N. M.; Chao, M. N.; Striepen, B.; Muralidharan, V.; Moreno, S. N. J.; Rodriguez, J. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01590.

(160) García Liñares, G. E.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 335.

(161) Ling, Y.; Sahota, G.; Odeh, S.; Chan, J. M. W.; Araujo, F. G.; Moreno, S. N. J.; Oldfield, E. *J. Med. Chem* **2005**, *48*, 3130.

(162) Degenhardt, C. R.; Burdsall, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3488.