



**Facultad  
de Química**



**PEDECIBA  
MEC-UDELAR**



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**

**Desarrollo de inhibidores de sistemas proteína-ligando.**

**Estudio del caso de metiltransferasas.**

**Qca. Natalia Mariel Díaz Carpintieri**

**Tesis de Doctorado**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Doctor**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de  
la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Mayo del 2025



**Facultad  
de Química**



**PEDECIBA  
MEC-UDELAR**



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**

**Desarrollo de inhibidores de sistemas proteína-ligando.**

**Estudio del caso de metiltransferasas.**

**Qca. Natalia Mariel Díaz Carpintieri**

**Tesis de Doctorado**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Doctor**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de  
la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Mayo del 2025



# **Desarrollo de inhibidores de sistemas proteína-ligando.**

## **Estudio del caso de metiltransferasas.**

Tribunal:

Dra. Mariana Pazos

Dra. Virginia López

Dra. Valeria Schapiro

Dr. Gonzalo Hernández, Director

Dr. Danilo Davyt, Director



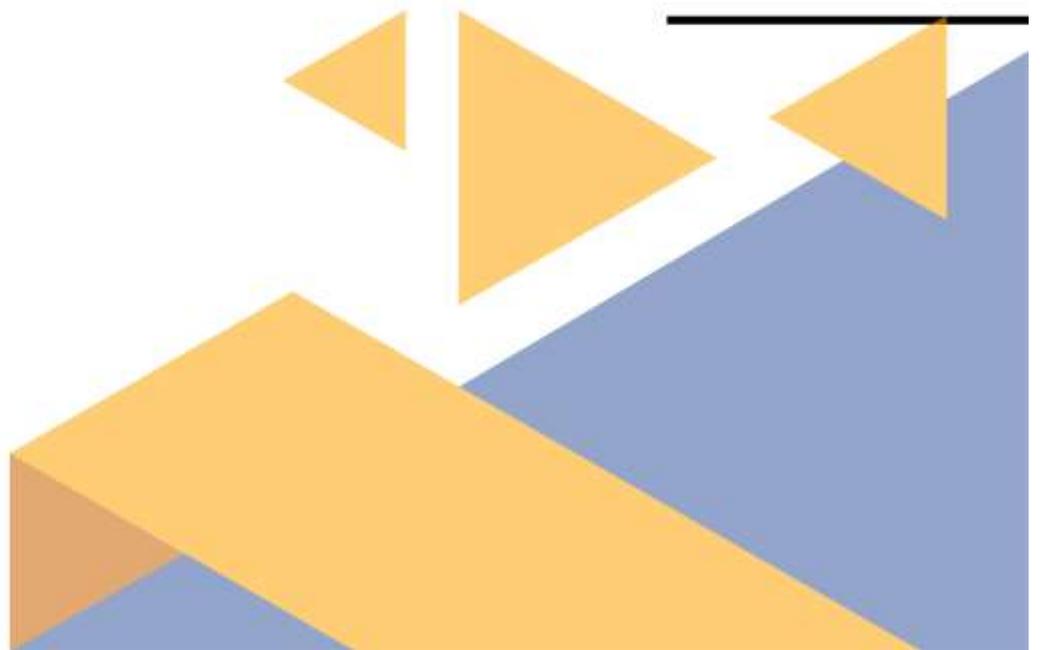
**“The major value in life is not what you get. The major value in life is what you become”**

**Jim Rohn**





# Agradecimientos



Culminado con este proyecto de posgrado, lo que me llena de orgullo y entusiasmo, quiero agradecer a las personas que fui conociendo en este camino y que de una forma u otra aportaron su granito de arena para que esto fuera posible.

### **Donde todo comenzó: El laboratorio de Química Farmacéutica**

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, Danilo y Gonzalo, por su empeño y dedicación en mi formación. Especialmente a Danilo por permitirme formar parte del laboratorio de QFarm, animándome y alentándome a continuar con esta formación. A ambos les agradezco por acompañarme en este camino de aprendizaje continuo entre risas y bromas, estrés y frustración, en persona o por zoom. Gracias por elegirme su estudiante de posgrado.

- **Agradecer también a todo el grupo humano que me acompañó durante todos estos años:**

Quiero agradecer a Gloria por estar siempre al pendiente de la parte administrativa, de los congresos, y de los eventos importantes. Por siempre tener toda la información que necesitábamos y por el don de conseguir las mejores ofertas en hoteles cuando íbamos de congreso, pero especialmente agradecer por toda la ayuda brindada en la última etapa de la escritura. Siguiendo con Laurita, gracias por aportar algo de orden y rezongos al laboratorio, por arreglar una que otra columna que se me rompió, y en especial gracias por alegrarnos las tardes con tus cantos. También quiero agradecer a Graciela, por los chistes rebuscados y enseñanzas. Por último, quiero agradecer a Eduardo por todas sus enseñanzas y los momentos compartidos.

Siguiendo con Ceci, gracias por defenderme cuando me molestaban (malos compañeros de laboratorio), por hacerme reír con tus ocurrencias e historias. También a Guille, gracias por ayudarme con cada cosa que te pedí, desde cómo hacer una reacción hasta arreglar cosas que se rompían o estaba por romperse. Es increíble la cantidad de cosas sin sentido que decís por minuto, pero también es increíble todo lo que aprendí de eléctrica, herramientas y de equipos contigo.

- **Siguiendo a las personas con las que compartí todos los días mano a mano quería agradecer a mis compañeros de laboratorio:**

Empezando con Lau, gracias por las salidas, charlas y viajes. Por bancarme la cabeza cuando nada salía y tratar de ayudarme siempre. Franco, gracias por pasarme tus conocimientos computacionales y hacer más amena la jornada con tus ocurrencias. También agradecer a Martín por ser el compañero que se queda en la tarde/noche y hacerme compañía con JC y los señores de la radio. A Cami y a Magda por hacer los MS a los compuestos, regalarme plantitas y enseñarme como cuidarlas. Además de estar siempre dispuestas a ayudarme con lo que necesitara. Siguiendo con Vane, gracias por tu energía, las sesiones de Reiki y las meriendas compartidas en el lab. También agradecer al Chelo por ayudarme con las reacciones, en especial las hidrogenaciones, por tus gritos característicos y por tus canciones de comerciales. Por último, quiero agradecer a la nueva generación en el lab: a Lu por sus ocurrencias y sus enigmas químicos; a Juli por la buena onda con la que venís siempre; a Agustín por hacer la jornada más divertida con tus preguntas y tu música.

- **Por último y no menos importante, quería agradecer a las personas que ya no están en el laboratorio: Alexia, Flor, Cathe, Vero, Vale.**

Especialmente quiero agradecer a Vero, por ayudarme en mis primeros meses en Qfarm, enseñándome donde estaba todo y como era el funcionamiento en el laboratorio. Me enseñaste poner en práctica todas las habilidades que se ven en la carrera y bajar a tierra pila de conceptos. También quiero agradecer a Vale por todo lo que compartimos en los primeros años del posgrado. Las clases eternas de enzimología compartidas con “yo”, el millón y medio de series que me recomendaste, el poder hablar de la farándula y de las cosas que iban pasando.

#### **A los compañeros de otros laboratorios:**

Quiero agradecer a los compañeros del laboratorio de Química Orgánica, por estar siempre a disposición de los préstamos de reactivos y a compartir su experiencia.

A Horacio, gracias por enseñarme a usar el RMN en ciencias, me ayudó a ver que realmente era un tema que me gustaba al punto de querer incluirlo en la tesis. También agradecerte por la cantidad de tubos que me hiciste a lo largo de los años y la paciencia que me tuviste cuando me olvidaba de llenar algún campo importante o simplemente viajaba en el tiempo y ponía una fecha que no era.

**Agradecida con las colaboraciones que establecimos a lo largo de los años que hicieron esto posible:**

A la Dra. Susana Castro y al Dr. Juan Marizcurrena, gracias por comenzar con las primeras aproximaciones en la producción de la enzima y ayudarnos a marcar las pautas de los pasos a seguir en este tema.

Al Dr. Juan Pablo Tosar y al Dr. Mauricio Castellano, gracias por sumarse a la idea de este proyecto y ayudarnos con la obtención del sustrato de la enzima. Gracias por permitirme asistir al laboratorio para hacer los ensayos de actividad y por la buena onda cada vez que teníamos que hacer una de las pruebas. En especial quería agradecer a Mauri que dedicó su tiempo para recibirme y enseñarme como trabajar en el laboratorio.

A la Dr. Sonia Rodríguez y al Msc Diego Umpierrez quería agradecerles especialmente por colaborar con nosotros en las instancias finales, cuando estábamos bastantes cortos de tiempo y teníamos que hacer todo a contra reloj. Gracias Diego por enseñarme y recordarme como trabajar con proteínas, gracias a vos pude producir y purificar mi primera proteína recombinante y aprender muchísimo del proceso. En especial te quiero agradecer el tiempo que dedicaste a este trabajo, a deshoras, por celular y haciendo todo lo que estaba al alcance y más.

Por último, quiero agradecer a los grupos de la Dra. Jaqueline Ferreira y la Dra. Germano de Oliveira y del Dr. Etienne Decroly por la buena disposición al realizar los ensayos biológicos de las muestras.

**También agradecer a las personas que me recibieron como pasante en su laboratorio:**

Quería agradecer a los grupos del Dr. Jesús Angulo y la Dra. Tanja Schirmeister que me recibieron en sus laboratorios permitiendo mi capacitación en sus áreas de experticia permitiéndome crecer como persona e investigador.

**A las agencias financiadoras:**

Quiero agradecer a las agencias financiadoras de este proyecto: a la ANII por la financiación de mi beca de maestría y doctorado, así como también la financiación de pasantías en el exterior; a la CAP por la financiación de la beca de finalización de doctorado; y a CSIC por la financiación de pasantías en el exterior. Por último, quisiera agradecer al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y al programa de posgrado de la Facultad de Química, por aceptarme como estudiante y permitirme avanzar en mis estudios.

**Al tribunal evaluador de esta tesis:**

Gracias a la Dra. Mariana Pasos, la Dra. Virginia López y la Dra. Valeria Shapiro por aceptar ser el tribunal evaluador de mi trabajo de posgrado.

**Por último, agradecer a las personas de mi vida, que sin entender nada de lo que les hablo me escuchan y apoyan en las decisiones que tomo:**

A mi familia, pilar fundamental en mi vida que siempre me apoyó en seguir estudiando y básicamente en todo lo que se me ocurre. A Nico, por apoyarme, acompañarme y escucharme no solo en lo relacionado a la montaña rusa de emociones que vino con hacer y terminar esta tesis, sino que en todo aspecto de mi vida. Por último, quiero agradecer a mis amigas, esa familia que uno elige: Maga, Cyn, Fio, Majo, Jime, Marce, Romi y Mano. La vida no sería la misma sin ustedes, sin su apoyo, nuestras charlas, consejos, risas, chismes y problemas.

# **Desarrollo de inhibidores de sistemas proteína-ligando.**

## **Estudio del caso de metiltransferasas.**

Natalia Mariel Díaz Carpintieri, Dr.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de  
la República

2025

DIRECTORES: Dr. Gonzalo Hernández, Dr. Danilo Davyt.

**(Facultad de Química, Universidad de la República)**

El virus del dengue es el causante de la enfermedad del dengue que afecta a millones de personas a nivel mundial. Este virus, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, codifica la proteína no estructural de la subunidad NS5 con actividad metiltransferasa (NS5-Mtasa). Ésta realiza dos metilaciones consecutivas en la caperuza del extremo 5' del ARN mensajero (ARN-cap5'), utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como co-factor.

La presente tesis doctoral se centró en el desarrollo de inhibidores de la NS5-Mtasa del virus del Dengue serotipo 2 (NS5-Mtasa-Den2) a partir de la propuesta, desarrollo y optimización de un diseño racional de compuestos.

Para lograr este objetivo seleccionamos 4 herramientas para el diseño racional de inhibidores: la síntesis orgánica de los compuestos a evaluar; el estudio de interacción proteína-ligando mediante resonancia magnética nuclear (RMN); los ensayos biológicos para medir la actividad antiviral de los compuestos; y los

modelos computacionales para evaluar los resultados obtenidos en las técnicas anteriores y poder predecir nuevos posibles inhibidores.

Se desarrollaron y optimizaron las herramientas computacionales, los experimentos de RMN para el estudio de interacción proteína-ligando, así como las primeras aproximaciones en la producción de la NS5-Mtasa-Den2 a partir de la colaboración con grupos de mayor experticia en el área.

Con respecto a la síntesis orgánica se llevó a cabo la búsqueda y optimización de una ruta sintética adecuada, logrando la síntesis total de 20 compuestos finales que se dividieron en tres series: A, B y C. Adicionalmente los compuestos fueron evaluados frente a la NS5-Mtasa-Den2 en un ensayo de unión a filtros (radioactive filter-binding assay (FBA), en inglés) y en cultivos celulares infectadas con el virus del dengue serotipo 2.

# **Development of protein-ligand system inhibitors.**

## **A case study of methyltransferases.**

Natalia Mariel Díaz Carpintieri, Dr.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química Universidad de la  
República

2025

DIRECTORES: Dr. Gonzalo Hernández, Dr. Danilo Davyt.

**(Faculty of Chemistry, University of the Republic)**

The dengue virus is the responsible agent of dengue disease, which affects millions of people worldwide. This virus, belonging to the Flaviviridae family, encodes the non-structural protein of the NS5 subunit with methyltransferase activity (NS5-Mtase). This enzyme performs two consecutive methylations on the cap structure of the 5' end of the messenger RNA (5'-cap RNA), using S-adenosylmethionine (SAM) as a co-factor.

This doctoral thesis focused on the development of inhibitors for the NS5-Mtase of the Dengue virus serotype 2 (NS5-Mtase-Den2) through the proposal, development, and optimization of a rational compound design.

To achieve this objective, we selected four tools for the rational design of inhibitors: the organic synthesis of the compounds to be evaluated; the study of protein-ligand interactions using nuclear magnetic resonance (NMR); biological

assays to measure the antiviral activity of the compounds; and computational models to analyze the results obtained from the previous techniques and predict new potential inhibitors.

Computational tools, NMR experiments for the study of protein-ligand interactions, as well as initial approaches to produce NS5-Mtase-Den2 were developed and optimized in collaboration with groups with greater experience in the field.

Regarding organic synthesis, a suitable synthetic route was optimized, leading to the total synthesis of 20 final compounds, which were divided into three series: A, B, and C. Additionally, the compounds were evaluated against NS5-Mtase-Den2 using a radioactive filter-binding assay (FBA) and against cell infected with the Dengue virus serotype 2.

# Índice

<b>Antecedentes.....</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>xx</b>
<b>Capítulo 1: Introducción y objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo 2: Estudio del sitio de unión del SAM a la NS5-Mtasa-Den2.</b>	
<b>Propuesta de los análogos sintéticos.....</b>	<b>35</b>
Antecedentes.....	36
2.1. Estudio del sitio de unión.....	39
2.1.1. Confirmación de que la NS5-Mtasa-DEN2 pertenece a las metiltransferasas de clase I.....	39
2.1.2. Estudio del bolsillo de unión al SAM.....	44
2.2. Inhibidores reportados para flavivirus.....	49
2.3. Propuesta de los análogos a SAM y SFG.....	51
<b>Capítulo 3: Primera aproximación de a los compuestos de interés:</b>	
<b>Síntesis de la serie A.....</b>	<b>55</b>
Antecedentes.....	55
3.1. Ruta sintética 1: Primeras aproximaciones de síntesis.....	59
3.2. Ruta sintética 2: Nueva estrategia sintética.....	67
3.3. Ruta sintética 3: Formación de la amida.....	84
<b>Capítulo 3: Parte experimental.....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 4: Síntesis de los compuestos de la Serie B.....</b>	<b>135</b>
Antecedentes.....	136
4.1. Síntesis de los compuestos de la serie B.....	137
4.2. Asignación de los espectros de RMN realizados. Caracterización de los compuestos sintetizados.....	144
<b>Capítulo 4: Parte experimental.....</b>	<b>157</b>

<b>Capítulo 5: Síntesis de los compuestos de la Serie C.....</b>	<b>209</b>
Antecedente.....	210
5.1. Optimización de la ruta sintética para la obtención de la serie C.....	213
5.1.1. Estrategias sintéticas para la obtención de derivados del triazol.....	213
5.1.2. Estrategias sintéticas para el acople del heterociclo triazol al compuesto 3.....	216
5.2. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie C.....	226
<b>Capítulo 5: Parte experimental.....</b>	<b>231</b>
<b>Capítulo 6: Estudios computacionales de los compuestos de interés frente a NS5-Mtasa-Den2.....</b>	<b>281</b>
Antecedentes.....	282
6.1. Primeras aproximaciones al modelo de docking.....	284
6.1.1. Elección del programa.....	284
6.1.2. Optimización del modelo de docking.....	286
6.1.3. Validación del método de docking MOE-GOLD.....	295
6.2. Estudio del poder predictivo.....	299
6.2.1. Estudio del poder predictivo del modelo: docking.....	299
6.2.2. Estudio del poder predictivo del modelo: Dinámica molecular.....	305
6.2.3. Estudio del poder predictivo del modelo: MM/PBSA.....	315
6.3. Aplicación del modelo de docking a los compuestos de interés....	323
<b>Capítulo 6: Parte Experimental.....</b>	<b>327</b>
<b>Capítulo 7: Producción y evaluación de la enzima NS5-Mtasa-Den2.....</b>	<b>331</b>
Antecedentes.....	332
7.1. Evaluación de las metiltransferasas de origen comercial.....	337
7.2. Producción de NS5-Mtasa-Den2.....	343
7.3. Ensayo de actividad: Consideraciones iniciales.....	347
7.4. Producción del sustrato de la enzima: análogo al ARNm vira....	351

7.5. Evaluación de la actividad metiltransferasa de NS5-Mtasa-Den2 utilizando el kit comercial seleccionado.....	354
7.5.1. Optimización del kit de actividad.....	361
7.5.2. Re-evaluación de la actividad metiltransferasa de NS5- Mtasa-Den2 utilizando el kit comercial optimizado.....	364
7.5.3. Nueva producción y evaluación de la NS5-Mtasa-Den2..	368
7.6. Optimización de la producción de NS5-Mtasa-Den2 y su evaluación biológica.....	371
7.6.1. Primera optimización en la producción de NS5-Mtasa-Den2 .....	371
7.6.2. Segunda optimización en la producción de NS5-Mtasa- Den2.....	375
7.6.3. Tercer intento de producción de NS5-Mtasa-Den2.....	377
7.6.4. Cuarto intento de producción de NS5-Mtasa-Den2.....	378
<b>Capítulo 7: Parte experimental.....</b>	<b>383</b>
<b>Capítulo 8: Estudio de la interacción proteína-ligando por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....</b>	<b>389</b>
Antecedentes.....	390
8.1. Puesta a punto de experimento de STD-RMN.....	398
8.1.1. Optimización del experimento de STD-RMN.....	398
8.1.2. Mapa de epítomos de unión de ligando.....	410
8.2. Estudio por competencia en STD-RMN.....	414
8.3. Uso del experimento STD-RMN para los análogos propuestos.....	421
<b>Capítulo 8: Parte experimental.....</b>	<b>423</b>
<b>Capítulo 9: Evaluación biológica de los compuestos sintetizados análogos al SAM y el SFG.....</b>	<b>429</b>
9.1. Evaluación biológica: ensayo in-vitro frente a la NS5-Mtasa- Den2.....	430
9.2. Evaluación biológica: ensayo in-vitro frente a células infectadas con el virus del dengue, serotipo 2.....	437

9.2.1. Determinación de la citotoxicidad celular, determinación del CC50.....	437
9.2.2. Evaluación de la actividad antiviral en Den2.....	438
9.2.3. Resultados obtenidos.....	440
<b>Capítulo 9: Parte experimental.....</b>	<b>443</b>
<b>Capítulo 10: Conclusiones y Perspectivas.....</b>	<b>447</b>

## Lista de abreviaturas

1,2-DCE: 1,2-dicloroetano

<sup>13</sup>C-RMN: espectro de carbono por RMN

<sup>19</sup>F-RMN: espectro de fluor por RMN

<sup>1</sup>H-RMN: espectro de protón por RMN

AcOEt: acetato de etilo

AcOH: ácido acético

ARN: ácido ribonucleico

atm: atmósfera

ATP: adenosín trifosfato

BnN<sub>3</sub>: azida de bencilo

Boc: tert-butoxicarbonilo

Boc<sub>2</sub>O: di-tert-butildicarbonato

CC50: concentración citotóxica media máxima

CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado

CDI: 1,1'-carbonildiimidazol

CE50: concentración efectiva media máxima

Cuant: Cuantitativo

D<sub>2</sub>O: agua deuterada

DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida

DCM: diclorometano

Den2: virus del dengue, serotipo 2.

DIAD: diisopropílico del ácido azodicarboxílico

DIBAL-H: hidruro de diisobutilaluminio

DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina

DMAP: dimetilaminopiridina

DMF: dimetilformamida

DMP: peryodinano de Dess-Martin

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-d6: dimetilsulfóxido deuterado

DTT: ditiotreitól

eq: equivalente

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GMP: ácido guanílico

GTP: guanosina trifosfato

HBTU: hexafluorofosfato de benzotriazol tetrametiluronio

HMBC-RMN: espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples por RMN.

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento

HRMS: espectrometría de masas de alta resolución

HSQC-RMN: espectro de coherencia cuántica simple Heteronuclear por RMN

IBX: ácido 2-yodoxibenzoico

J: Constante de acoplamiento

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : tartrato mixto de potasio y sodio

MeCN: acetonitrilo

MeOD: metanol deuterado

MeOH: metanol

MOE: Molecular Operating Environment

NOE: Efecto Overhauser nuclear

NOE-RMN: espectro unidimensional de efecto Overhauser nuclear

NOESY: espectro bidimensional de efecto Overhauser nuclear

pdb: Protein data bank

PPh<sub>3</sub>: trifenilfosfina

ppm: parte por millón

ppm: partes por millón

Rend: Rendimiento

Rf: factor de retención

rf: radiofrecuencias

RMN: resonancia magnética nuclear

SAH: S-adenosilhomocysteína

SAM: S-adenosilmetionina

SFG: Sinefungin

Tamb: Temperatura ambiente

TBS: tert-butildimetilsililo

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

TLC: Cromatografía en capa fina

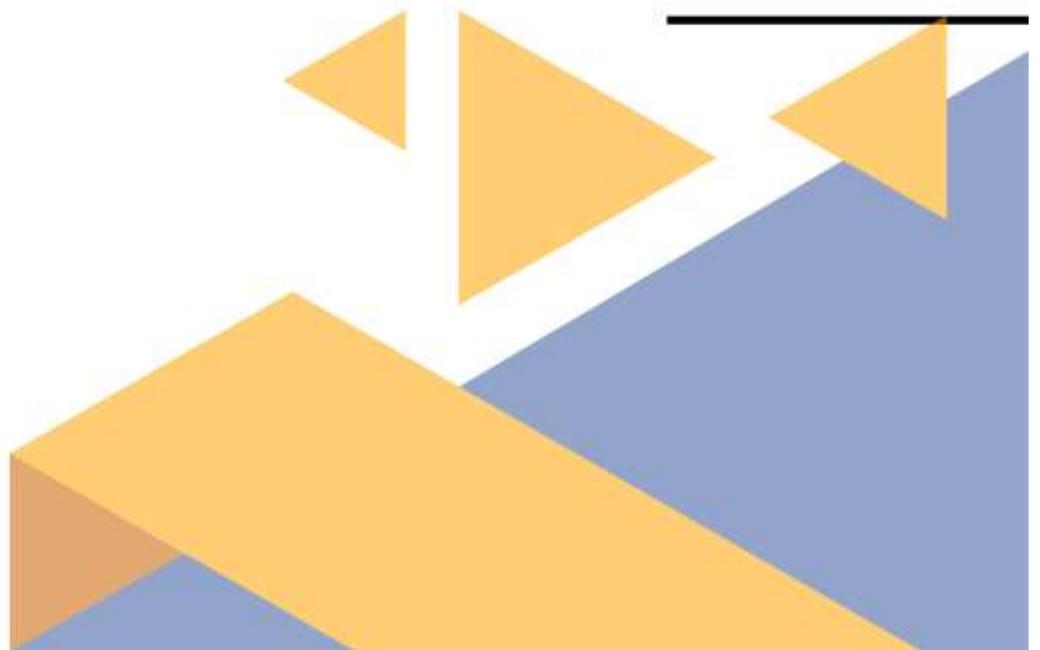
TMS: tetrametilsilano

UV: Ultravioleta



## **Capítulo 1:**

# **Introducción y Objetivos**



La enfermedad del dengue, que afecta a millones de personas en el mundo anualmente, se presenta generalmente de manera asintomática o con síntomas leves. Dentro de estos, encontramos síntomas como: fiebre, dolor intenso de cabeza, dolor muscular y dolor en las articulaciones. En casos de gravedad, en general en un estadio más avanzado de la enfermedad, se pueden desarrollar dificultades respiratorias y daño grave en órganos, por lo cual, esta enfermedad puede resultar mortal. La enfermedad del dengue es transmitida por mosquitos hembra del género *Aedes aegypti* infectados, por lo que suele presentarse en zonas tropicales y subtropicales.<sup>1</sup>

El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades reportó en su página web los casos de dengue en el mundo por cada 100.000 habitantes desde marzo del 2024 a febrero del 2025, (Figura 1.1). En la figura se puede apreciar que América Latina se encuentra dentro de las áreas más afectadas. Así mismo, realizaron una actualización de los casos reportados en los primeros meses del presente año (de enero a febrero del año 2025), donde se notificaron hasta ese momento 640.349 casos de dengue y un total de 159 muertes relacionadas. Se detectó de esta forma la circulación del dengue en África, América, Asia sudoriental y la región del Pacífico occidental. (Figura 1.2).<sup>2</sup>

---

1 Khan, M. B.; Yang, Z.-S.; Lin, C.-Y.; Hsu, M.-C.; Urbina, A. N.; Assavalapsakul, W.; Wang, W.-H.; Chen, Y.-H.; Wang, S.-F. *J. Infect. Public Health* **2023**, *16* (10), 1625–1642.

2 Centro Europeo para la prevención y el control de enfermedades. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/twelve-month-dengue-virus-disease-case-notification-rate-100-000-population-march?etrans=es>. (Visitado marzo 02, 2025)

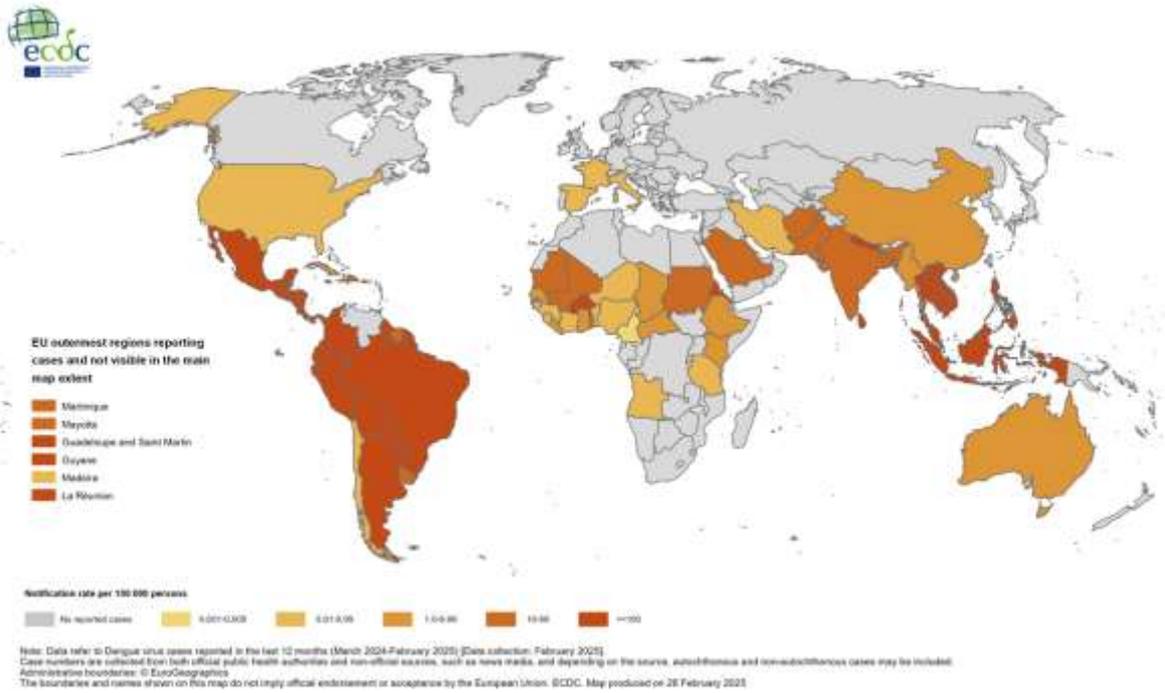


Figura 1.1: Casos de la enfermedad del dengue reportados en el mundo por cada 100.000 habitantes desde marzo del 2024 a febrero del 2025 según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades.

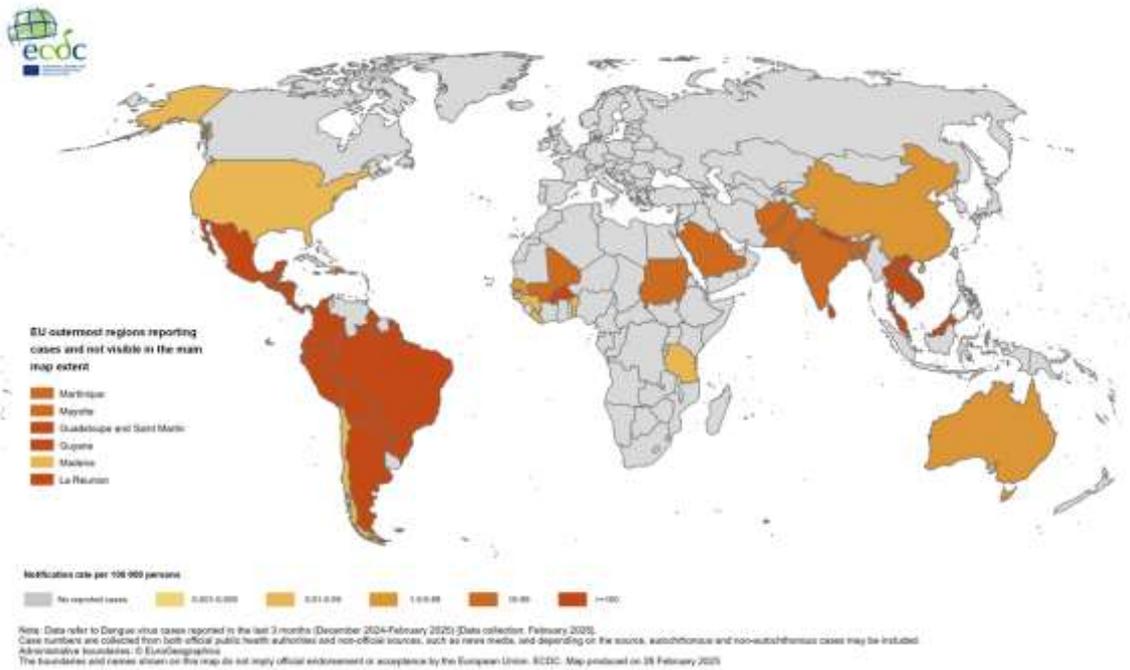


Figura 1.2: Casos reportados en el mundo por cada 100.000 habitantes desde diciembre 2024 a febrero del 2025 según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades.

Por otra parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el 7 de febrero del año 2025 emitió un documento denominado: “Alerta Epidemiológica. Riesgo de brotes de dengue por aumento de circulación de DENV-3 en la Región de las Américas”. En el mismo detallaron los casos reportados de dengue en el año 2024 y 2025 en la región. En la Figura 1.3 se aprecia el aumento significativo de los casos de dengue entre los años 2021 a 2024, presentando en el año 2024 el mayor registro de casos de la enfermedad del dengue en comparación a los últimos 45 años. Si bien se observa una tendencia al aumento de los casos a lo largo de los años, el remarcado aumento en los últimos 15 años puede deberse a la propagación del mosquito que transmite la enfermedad, así como también a un aumento de la temperatura debido al cambio climático.<sup>3</sup>

**Figure 1.** Total number of reported dengue cases and number of countries and territories, 1980 – 2025 (up to EW 4) in the Americas Region.

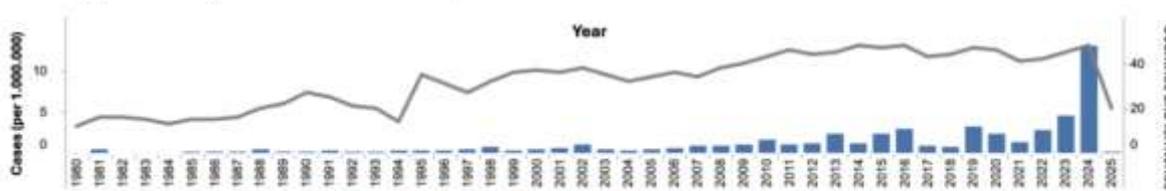


Figura 1.3: Casos reportados para la enfermedad del dengue en América a lo largo de los años reportado por la organización Panamericana de la Salud (OPS) el 7 de febrero en el documento: “Alerta Epidemiológica. Riesgo de brotes de dengue por aumento de circulación de DENV-3 en la Región de las Américas”.

Con respecto a nuestro país, en el año 2016 se detectó el primer caso autóctono de dengue en Uruguay, con un total de 19 notificaciones de casos autóctonos y 42 notificaciones de casos importados en ese año.<sup>4,5</sup>

3 Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica. Riesgo de brotes de dengue por aumento de circulación de DENV-3 en la Región de las Américas. <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-risk-dengue-outbreaks-due-increased-circulation-denv-3-americas> (Visitado marzo 04, 2025)

4 Fundación io. <https://fundacionio.com/casos-de-dengue-en-uruguay-departamento-de-salto-epicentro-del-brote/#:~:text=San%20Jos%C3%A9%20Febrero-,2016.,casos%20aut%C3%B3ctonos%20y%2042%20importados> (Visitado marzo 03, 2025)

5 Ministerio de Salud Pública. <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/ministerio-salud-publica-detecto-primer-caso-autoctono-dengue-uruguay>. (Visitado marzo 03, 2025)

El virus del dengue es el causante de esta enfermedad y presenta cuatro serotipos (Den1, Den2, Den3 y Den4). En la actualidad no existe un tratamiento específico para la enfermedad que provoca este virus, por lo cual la estrategia frente a estos casos se centra en tratar los síntomas con el fin de aliviar el dolor y malestar. Existe una vacuna contra el virus del dengue desarrollada por el laboratorio japonés Takeda (TAK-003),<sup>6</sup> aprobada en Indonesia en agosto de 2022, protege contra los cuatro serotipos del virus. A partir de setiembre del año 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS),<sup>7</sup> recomienda su uso en áreas con altos índices de la enfermedad y su transmisión. Países como Argentina y Brasil ya comenzaron sus respectivos esquemas de vacunación con la TAK-003. Sin embargo, la medida de prevención por excelencia promovida por las distintas localidades afectadas es el evitar la picadura y reproducción de estos mosquitos.

El virus del dengue al igual que otros virus perjudiciales para la salud humana como lo son el virus del Zika, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Estos virus envueltos poseen toda su información genética dentro de una única hebra de ARN de polaridad positiva. Este ARN codifica 5 proteínas estructurales y 7 proteínas no-estructurales. Dentro de estas proteínas no estructurales se encuentra la proteína de la subunidad NS5, que presenta 2 dominios, uno con actividad polimerasa en el C terminal (NS5-Pol) y el otro con actividad metiltransferasa en el N terminal (NS5-Mtasa).

Se ha reportado que las NS5-Mtasa se encuentran altamente conservadas dentro del género *flavivirus*.<sup>8</sup> Estas, realizan 2 metilaciones consecutivas en la caperuza del extremo 5' del ARN mensajero co-trascriptionalmente en las posiciones N7 de la guanosina y en la 2'O de la primera base de adenosina. Para realizar estas metilaciones la enzima utiliza como co-factor al S-adenosilmetionina (SAM), formando como subproducto de la reacción el S-

---

6 Petri, E.; Biswal, S.; Lloyd, E.; Tricou, V.; Folschweiller, N. *Vaccine* **2024**, *42* (26), 126309.

7 Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. (Visitado marzo 04, 2025)

8 Dong, H.; Zhang, B.; Shi, P.-Y. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (1), 1–10.

homocisteinadenosina (SAH) a partir de la pérdida del grupo metilo por parte del SAM (Figura 1.4). Kroschewski et al.,<sup>9</sup> reportaron que estas metilaciones se llevarían a cabo por una misma metiltransferasa donde ocurriría primero la metilación en la posición N7 y luego en la posición 2'O, donde la metilación en N7 se presentaría fundamental para la replicación viral (Figura 1.5).

Se ha reportado el compuesto conocido como sinefungin (SFG) como inhibidor de este tipo de metiltransferasas que presentan SAM como co-factor. Si bien la eficacia del SFG como inhibidor es variable frente a distintas metiltransferasas, se ha reportado que el SFG no atraviesa la membrana plasmática,<sup>10</sup> lo que podría explicar su falta de actividad en modelos celulares (Figura 1.4).

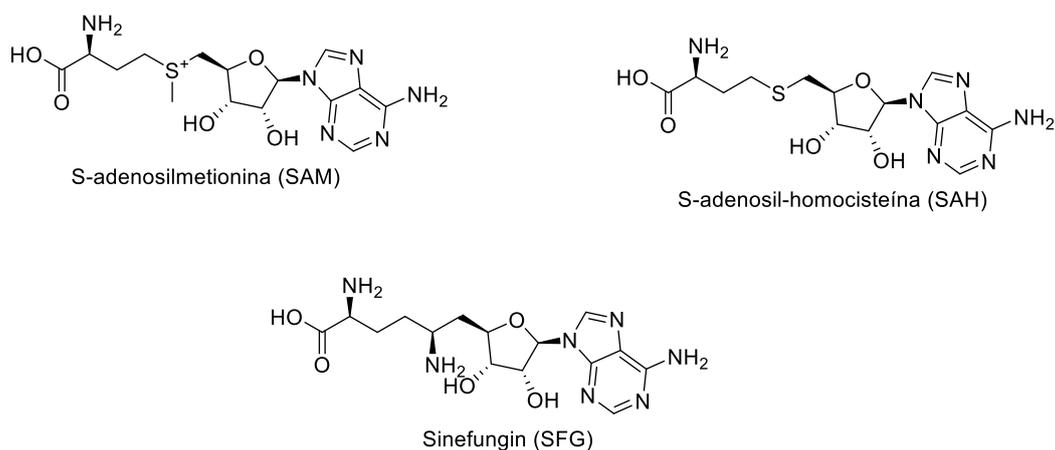


Figura 1.4: Se muestran las estructuras del SAM, SAH y SFG.

9 Kroschewski, H.; Lim, S. P.; Butcher, R. E.; Yap, T. L.; Lescar, J.; Wright, P. J.; Vasudevan, S. G.; Davidson, A. D. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (28), 19410–19421.

10 Bobiļeva, O.; Bobrovs, R.; Kaņepe, I.; Patetko, L.; Kalniņš, G.; Šišovs, M.; Bula, A. L.; Gřīnberga, S.; Borodušķis, M.; Ramata-Stunda, A.; Rostoks, N.; Jirgensons, A.; Tārs, K.; Jaudzems, K. *ACS Med. Chem. Lett.* 2021, *12* (7), 1102–1107.

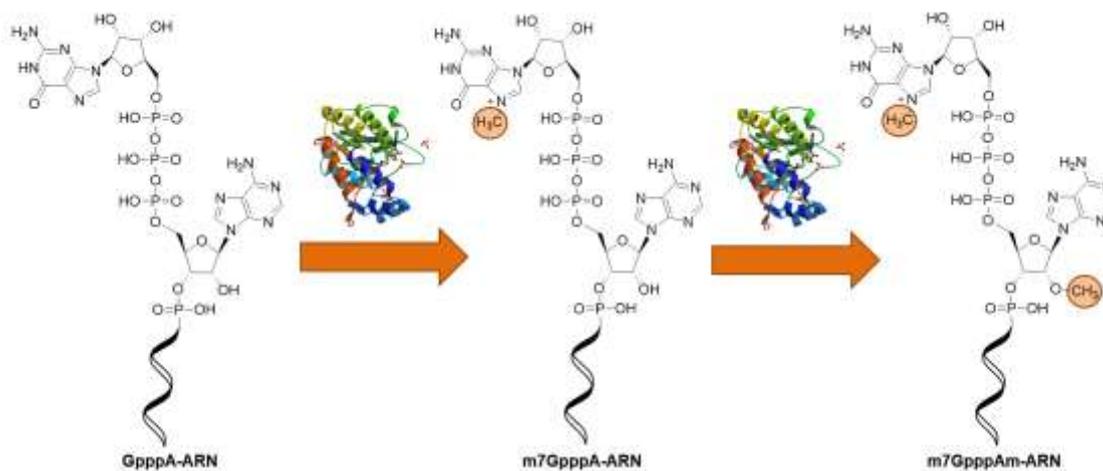
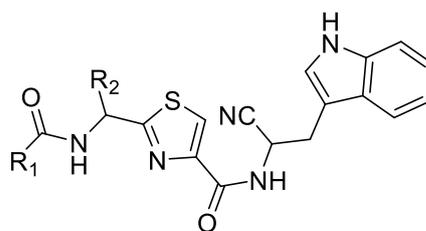


Figura 1.5: Metilaciones realizadas por la enzima NS5-MTasa-Den2 sobre la caperuza del ARN mensajero en la posición 7 de la Guanosina y la posición 2'O de la primera base de la adenosina.

En el año 2015 a partir de una colaboración, entre nuestro grupo y el Dr. Alex Taranto de la Universidad Federal de Minas Gerais ubicada en Brasil, se llevaron a cabo estudios computacionales de screening virtual inverso (SVI) sobre compuestos derivados de la Bacilamida C (alcaloide tiazólico aislado de la bacteria *Bacillus Endophyticus*), propuestos a partir de la tesis de maestría de la Dra. Verónica Martínez.<sup>11</sup> Como resultado del SVI se obtuvo que la metiltransferasa del virus del dengue del serotipo 2 (NS5-Mtasa-Den2) se presentaba como un posible blanco enzimático. Se sintetizaron los 3 compuestos seleccionados (figura 1.6) como posibles inhibidores por el programa de SVI y se evaluaron estos en un ensayo celular frente al virus del dengue, llevado a cabo por el grupo de la Dra. Jaqueline M. S. Ferreira, Universidad Federal de São João Del-Rei, Brasil. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de estos 3 compuestos presentó actividad. A partir de estos resultados y de la evidente necesidad a nivel regional y global de la búsqueda de antivirales contra el virus del dengue (en base a los datos discutidos anteriormente), se decidió conservar como blanco enzimático a la NS5-Mtasa-Den2 y desarrollar inhibidores a partir de un diseño racional.

11 Martínez, V.; Davyt, D. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24* (24), 1572–1575.



- 1) R1: Ph y R2: CH<sub>2</sub>-Ph
- 2) R1: CH<sub>3</sub> y R2: CH<sub>2</sub>-Ph
- 3) R1: Ph y R2: CH<sub>3</sub>

Figura 1.6: Estructura de los 3 compuestos derivados de la bacilamida C

El diseño racional de compuestos para su uso terapéutico ha tomado más relevancia en los últimos años. Esta estrategia necesita un enfoque multidisciplinario al momento de contemplar los compuestos candidatos, así como a la macromolécula objetivo. Anteriormente, se optaba únicamente por el screening masivo de compuestos frente a la macromolécula objetivo, una vez obtenido un compuesto que presentara la actividad buscada se recurría a realizar cambios estructurales sobre dicho compuesto con el fin de lograr modificaciones en la actividad presentada con anterioridad. De esta forma se obtenía un panorama de las modificaciones que aumentaban o disminuían la actividad deseada pero no se obtenían datos de como actuaba dicho compuesto frente al blanco de interés. Este enfoque conllevaba un tiempo apreciable y gran costo asociado. Por lo cual, con el creciente aumento de técnicas que permiten el estudio de las interacciones proteína-ligando como por ejemplo RMN, Rayos X, entre otros, así como modelos computacionales que permiten establecer una relación entre la estructura y la actividad, se recurrió a la utilización de estas herramientas en la propuesta y optimización de los compuestos líderes siguiendo un acercamiento racional y direccionado a la síntesis de un compuesto con la actividad deseada frente al blanco de interés.<sup>12-14</sup>

Es así, que al momento de proponer la estrategia a seguir seleccionamos 4 herramientas para el diseño racional de inhibidores de la NS5-Mtasa-Den2.

- 
- 12 Mavromoustakos, T.; Durdagi, S.; Koukoulitsa, C.; Simcic, M.; G. Papadopoulos, M.; Hodoscek, M.; Golic Grdadolnik, S. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (17), 2517–2530.
  - 13 Mandal, S.; Moudgil, M.; Mandal, S. K. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *625* (1–3), 90–100.
  - 14 *Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications*; Parrill, A. L., Reddy, M. R., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1999; Vol. 719.

Estas fueron: la síntesis orgánica de los compuestos a evaluar; el estudio de interacción proteína-ligando mediante resonancia magnética nuclear (RMN); los ensayos biológicos para medir la actividad antiviral de los compuestos; y los modelos computacionales para evaluar los resultados obtenidos en las técnicas anteriores y poder predecir nuevos posibles inhibidores. Es así, como estas herramientas se retroalimentan entre sí, formando un ciclo en el cual se optimizan propiedades y compuestos con el fin de alcanzar una estructura líder, (Figura 1.7).

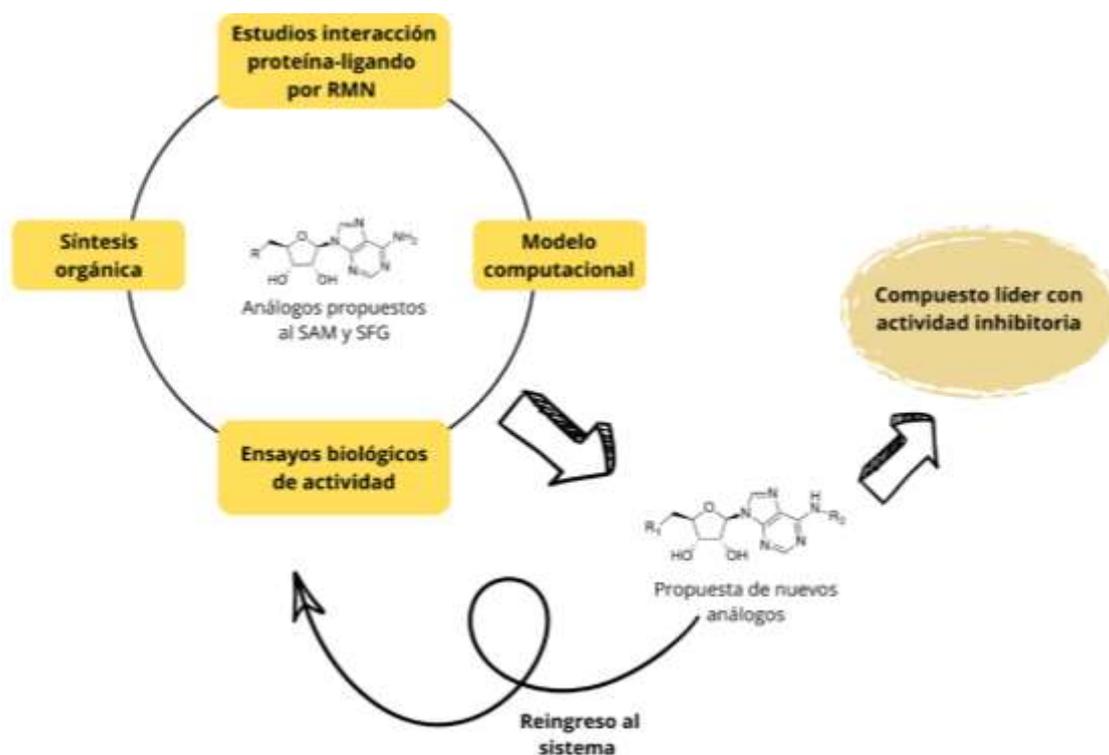


Figura 1.7: Representación del diseño racional diseñado. Los análogos al SAM y SFG son sometidos a las cuatro herramientas seleccionadas, las cuales se retroalimentan entre sí para realizar la propuesta de nuevos análogos. Estas nuevas estructuras reingresan al sistema de forma iterativa hasta obtener un compuesto líder con la actividad inhibitoria deseada.

La tesis se estructura en diez capítulos donde se desarrolla el diseño racional propuesto. Comenzamos con el estudio de la NS5-Mtasa-Den2 para el diseño y síntesis de análogos al SAM y el SFG para luego continuar con la síntesis orgánica de los compuestos propuestos. La optimización y puesta a punto de las rutas sintéticas seleccionadas se desarrollarán a lo largo de tres capítulos para la síntesis de los compuestos de las series A, B y C.

Posteriormente se presentará el capítulo donde se desarrollará el modelo computacional, para continuar con el capítulo de la producción de la NS5-Mtasa-Den2 como una proteína recombinante y su evaluación. En el siguiente capítulo se tratará la puesta a punto de los estudios de la interacción proteína-ligando mediante RMN, para llegar al penúltimo capítulo donde se abordarán los ensayos biológicos empleados. Para finalizar, el capítulo número diez corresponde a las conclusiones y perspectivas a futuro del trabajo realizado.

## **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo de tesis es el desarrollo y optimización del diseño racional de inhibidores de la NS5-Mtasa-Den2, con el fin de obtener una estructura líder con actividad antiviral.

## **Objetivos específicos**

Para cumplir este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Propuesta racional de análogos al SAM y SFG.
- Propuesta, desarrollo y optimización de las rutas sintéticas para la obtención de dichos análogos.
- Obtención de la NS5-Mtasa-Den2 de interés o un modelo análogo con otra metiltransferasa para realizar los estudios pertinentes.
- Elección de técnica/s para el estudio de las interacciones proteína-ligando por RMN, así como su optimización y puesta a punto.
- Estudio de la interacción proteína-ligando de los compuestos análogos de SAM y SFG.
- Desarrollo de un modelo computacional para el estudio de los análogos, así como para poder predecir posibles inhibidores NS5-Mtasa-Den2.
- Búsqueda de un ensayo de actividad biológica para la evaluación de los compuestos análogos a SAM y SFG frente al blanco de interés: NS5-Mtasa-Den2.

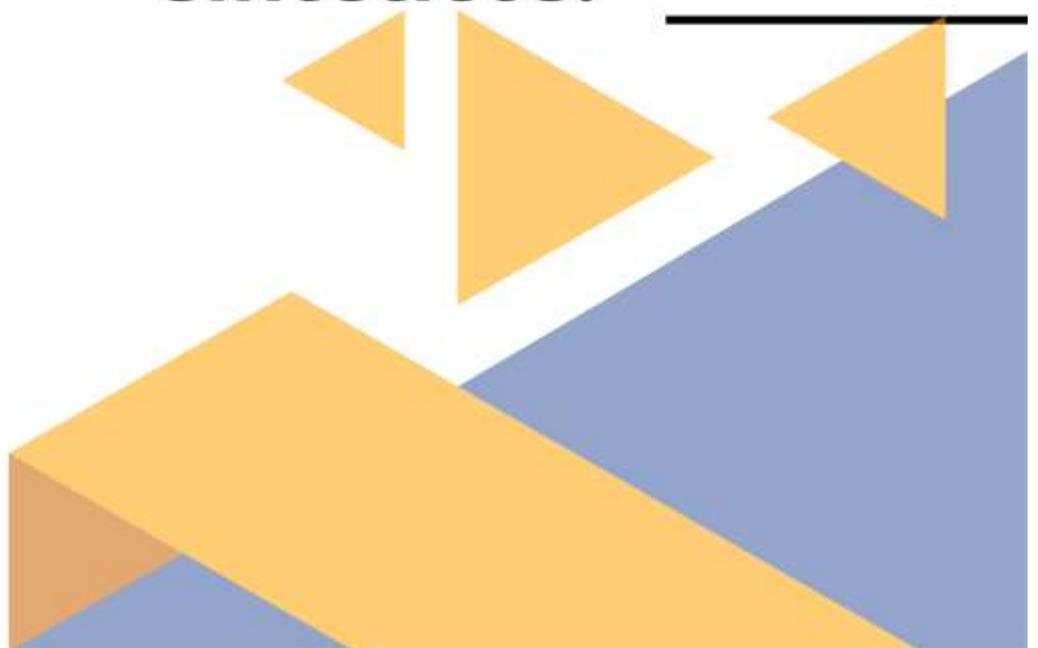




## **Capítulo 2:**

**Estudio del sitio de unión del  
SAM a la NS5-Mtasa-Den2.**

**Propuesta de los análogos  
sintéticos.**



### Antecedentes:

Las enzimas metiltransferasas de clase I utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como co-factor, el cual actúa como donador de grupo metilo. El SAM es sintetizado en el citosol celular por la metionina adenosiltransferasa (también conocida como S-adenosilmetionina sintetasa) a partir de ATP y L-metionina.<sup>1</sup> Si bien la función metabólica principal del SAM es la de donador de metilo (entre el 85 y 90% de las moléculas de SAM formadas se utilizan con este fin), el SAM también está involucrado en otras vías metabólicas. Un ejemplo es la vía de transulfuración para la síntesis de cisteína a partir de S-adenosilhomocisteína (SAH). El SAH se obtiene como subproducto en las reacciones de metilación cuando el SAM pierde su grupo metilo soportado en el átomo de azufre cargado positivamente (Figura 2.1).<sup>2-4</sup> Se ha demostrado que cuando existe una acumulación de SAH este actúa como un inhibidor competitivo en metiltransferasas.<sup>5</sup>

El compuesto conocido como sinefungin (SFG) fue aislado por primera vez de una cepa bacteriana de *streptomyces griseolus* como un potencial antifúngico.<sup>6,7</sup> Posteriormente, se reportó su actividad antitumoral,<sup>8</sup> antiviral,<sup>9</sup> y antiparasitaria.<sup>10</sup>

---

1 Cantoni. G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74 (11), 2942-2943.

2 Roje, S. *Phytochemistry* **2006**, 67 (15), 1686–1698.

3 Shelly C. Lu. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, 32, 391-395.

4 Ouyang, Y.; Wu, Q.; Li, J.; Sun, S.; Sun, S. *Cell Prolif.* **2020**, 53 (11), e12891.

5 Wolfe, M. S.; Borchardt, R. T. *J. Med. Chem.* **1991**, 34 (5), 1521–1530.

6 Hamil R.L.; Hoehn M.M. *J. Antibiot.* **1973**, 26, 463-465.

7 Gordee, R. S.; Butler, T. F. *J. Antibiot.* **1973**, 26, 466-470.

8 Zingg, J. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24 (16), 3267–3275.

9 Pugh, G.; Borchardt, R. T. *Biochemist.* **1982**, 21, 1535-1541.

10 Dube, D. K.; Mpimbaza, G.; Allison, A. C.; Lederer, E.; Rovis, L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1983**, 32 (1), 31–33.

El SFG es capaz de inhibir enzimas metiltransferasas de clase I a través de un mecanismo por competencia por el sitio de unión al co-factor.<sup>11–13</sup> La analogía estructural entre el SAM y el SFG explicaría dicho mecanismo de inhibición (Figura 2.1).

El SFG presenta una potencia inhibitoria muy variable frente a distintas metiltransferasas. Por ejemplo, el SFG presenta IC<sub>50</sub> de 1.63 μM frente a la proteína arginina N-metiltransferasa (PRMT1),<sup>14</sup> e IC<sub>50</sub> de 14 μM frente a la metiltransferasa del Virus del Nilo Occidental (Mtasa-WNV);<sup>15</sup> mientras que, frente a la histona lisina metiltransferasa eucromática 1 (EHMT1) el SFG presenta IC<sub>50</sub> de 513 μM.<sup>16</sup>

Se han realizado ensayos *in vivo* en células con el SFG y este no presentó actividad.<sup>17</sup> Según los estudios de permeabilidad realizados por Jaudzems K. et al.<sup>18</sup> el SFG no atravesaría la membrana plasmática imposibilitando su ingreso a la célula.

- 
- 11 Schluckebier, G.; Zhong, P.; Stewart, K. D.; Kavanaugh, T. J.; Abad-Zapatero, C. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289* (2), 277–291.
  - 12 Schluckebier, G.; Kozak, M.; Bleimling, N.; Weinhold, E.; Saenger, W. *J. Mol. Biol.* **1997**, *265*, 56–67
  - 13 Álvarez-Mínguez, A.; Del Río, N.; Belén-Blázquez, A.; Casanova, E.; Orduña, J.-M.; Camarero, P.; Hurtado-Marcos, C.; Del Águila, C.; Pérez-Pérez, M.; Martín-Acebes, M. A.; Agudo, R. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2024**, *7*, 100282.
  - 14 Cheng, D.; Yadav, N.; King, R. W.; Swanson, M. S.; Weinstein, E. J.; Bedford, M. T. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (23), 23892–23899.
  - 15 Chen, H.; Zhou, B.; Brecher, M.; Banavali, N.; Jones, S. A.; Li, Z.; Zhang, J.; Nag, D.; Kramer, L. D.; Ghosh, A. K.; Li, H. *PLoS ONE* **2013**, *8* (10), e76900.
  - 16 Devkota, K.; Lohse, B.; Liu, Q.; Wang, M.-W.; Stærk, D.; Berthelsen, J.; Clausen, R. P. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (4), 293–297.
  - 17 Tao, Z.; Cao, R.; Yan, Y.; Huang, G.; Lv, K.; Li, W.; Geng, Y.; Zhao, L.; Wang, A.; He, Q.; Yang, J.; Fan, S.; Huang, M.; Guo, H.; Zhong, W.; Liu, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 994–1004.
  - 18 Bobiļeva, O.; Bobrovs, R.; Kaņepe, I.; Patetko, L.; Kalniņš, G.; Šišovs, M.; Bula, A. L.; Grīnberga, S.; Boroduškis, M.; Ramata-Stunda, A.; Rostoks, N.; Jirgensons, A.; Tārs, K.; Jaudzems, K. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (7), 1102–1107.

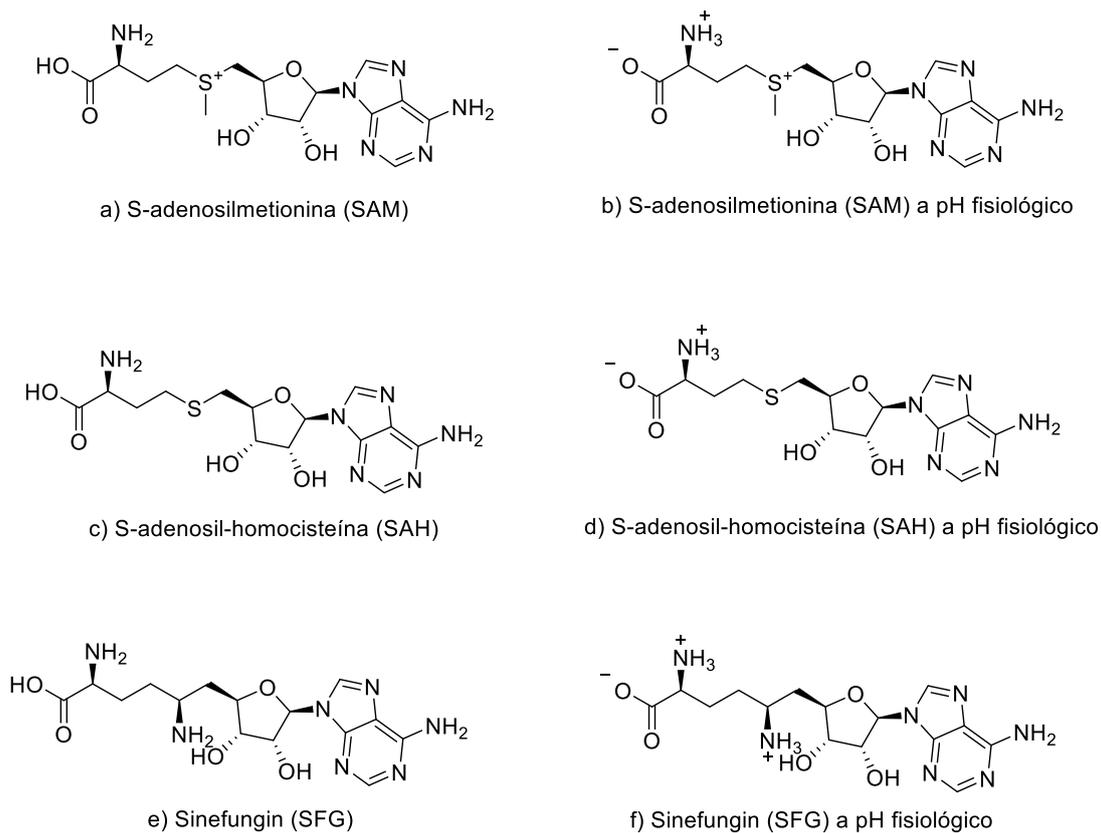


Figura 2.1: Estructuras de: a) S-adenosilmetionina (SAM), b) SAM a pH fisiológico c) S-adenosilhomocisteína (SAH), d) SAH a pH fisiológico e) Sinefungin (SFG), f) SFG a pH fisiológico.

## **2.1. Estudio del sitio de unión:**

### **2.1.1. Confirmación de que la NS5-Mtasa-DEN2 pertenece a las metiltransferasas de clase I:**

Las enzimas metiltransferasas que utilizan SAM como co-factor para realizar la metilación del sustrato se clasifican en cinco categorías (I-V). Dentro de estas categorías, la clase I es la más amplia y engloba a aquellas metiltransferasas que presentan un plegamiento de Rossmann. El pliegue de Rossmann es una estructura supersecundaria formado por una serie de segmentos alternados de cadena beta ( $\beta$ ) y hélice alfa ( $\alpha$ ), donde las cadenas  $\beta$  están unidas por enlaces de hidrógeno formando una hoja  $\beta$ . El pliegue de Rossmann posibilita la unión de la enzima a cofactores de nucleósido.<sup>19,20</sup>

La primera estructura de una metiltransferasa dependiente de SAM elucidada fue la ADN-metiltransferasa C5-citosina M.HhaI (M.HhaI-ADN-Mtasa). A lo largo de los años se fueron reportando una mayor variedad de otras metiltransferasas dependientes de SAM. A pesar de metilar sustratos diferentes todas compartían la misma estructura básica, donde además de presentar un pliegue de Rossmann se determinaron otras dos características fundamentales:<sup>21</sup>

- 1)** La primera cadena  $\beta$  correspondiente al pliegue de Rossmann termina en un motivo G-G-G (o al menos G-G) el cual es el sitio de unión de nucleótidos. Además, este se dobla bruscamente por debajo del SAM para iniciar la primera hélice  $\alpha$ .
- 2)** Un residuo ácido al final de  $\beta$ 2 se encuentra altamente conservado. Este, forma enlaces de hidrógeno con ambos hidroxilos de la ribosa del SAM.

---

19 Rossmann, I. G.; Argos, P. *J. Mol. Biol.* **1977**, 109, 99-129.

20 Chouhan, B. P. S.; Maimaiti, S.; Gade, M.; Laurino, P. *Biochemistry* **2019**, 58 (3), 166–170.

21 Schubert, H. L.; Blumenthal, R. M.; Cheng, X. *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28 (6), 329–335.

Si bien las metiltransferasas de los flavivirus se clasifican como metiltransferasas de clase I debido a su estructura y función, no existe un estudio exhaustivo para la enzima NS5-Mtasa-Den2 que establezca esta clasificación. Se presentó relevante para la propuesta racional de análogos el estudio de esta enzima para un mejor entendimiento de la misma. Debido a esto, en este capítulo abordaremos el estudio estructural inicial de la NS5-Mtasa-Den2 comenzando con la corroboración de que esta metiltransferasa de interés se clasificaría como de clase I.

Decidimos comenzar por comparar la estructura de la M.HhaI-ADN-Mtasa, definida como de clase I, con la enzima NS5-Mtasa-Den2 con el fin de realizar un estudio más completo del sitio de unión al SAM. Seleccionamos las estructuras cristalinas reportadas en el protein Data Bank (pdb)(*wwPDB consortium. Nucleic Acids Res.*, 2019, 47, D1, D520-D528.), para NS5-Mtasa-Den2 co-cristalizada con SAH (pdb:1L9K) y M.HhaI-ADN-Mtasa co-cristalizada con SAM (pdb:6MHT).

Se comenzó con la inspección visual de ambas estructuras con el fin de localizar la hoja  $\beta$  de siete cadenas rodeada por hélices  $\alpha$ . Para una mejor visualización se realizó el diagrama de la topología a partir de las estructuras del pdb en PUBsum.<sup>22</sup> (Figura 2.2)

---

<sup>22</sup> Laskowski, R. A.; Hutchinson, E. G.; Michie, A. D.; Wallace, A. C.; Jones, M. L.; Thornton, J. M. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22 (12), 488–490.

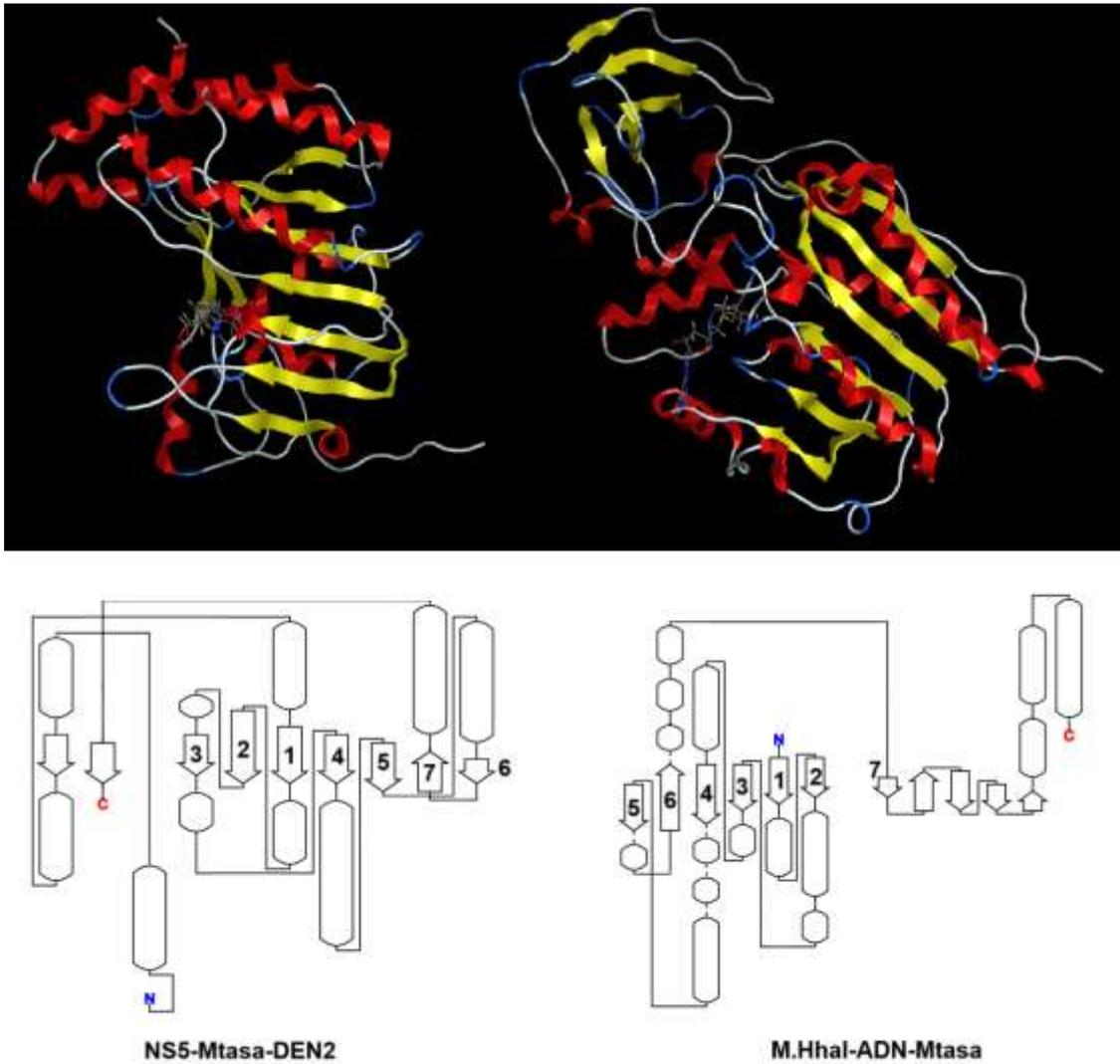


Figura 2.2- Estructura cristalina de NS5-Mtasa-Den2 (arriba a la izquierda), de M.Hhal-ADN-Mtasa (arriba a la derecha). Diagrama de topología de NS5-Mtasa-Den2 (abajo a la izquierda), de M.Hhal-ADN-Mtasa (abajo a la derecha).

Una vez localizada la hoja  $\beta$ , se numeraron las cadenas  $\beta$  para su identificación. Se comienza a numerar desde el N-terminal desde el 1 al 7 las cadenas  $\beta$  que forman parte de la hoja  $\beta$ . En el caso de la NS5-Mtasa-den2 éstas son:  $\beta$ 1(G<sub>75</sub>-G<sub>81</sub>),  $\beta$ 2(V<sub>97</sub>-T<sub>104</sub>),  $\beta$ 3(L<sub>123</sub>-S<sub>128</sub>),  $\beta$ 4(T<sub>142</sub>-D<sub>146</sub>),  $\beta$ 5(Q<sub>177</sub>-L<sub>183</sub>),  $\beta$ 6(A<sub>204</sub>-R<sub>207</sub>),  $\beta$ 7(M<sub>218</sub>-S<sub>222</sub>).

Posteriormente, se utilizó el programa MOE (Molecular Operating Environment) (2024.0601 Chemical Computing Group ULC, 910-1010 Sherbrooke St. W., Montreal, QC H3A 2R7, 2025.), para el estudio de los puntos **1** y **2** mencionados anteriormente. Se utilizaron las estructuras reportadas en el “pdb” a las cuales

se les eliminaron las moléculas que no correspondían a SAH, SAM o macromoléculas. Se realizó una minimización de energía de ambas estructuras utilizando el campo de fuerza Amber10 con los parámetros preestablecidos en el programa.

Punto 1), se localizó la  $\beta 1$  y se determinaron los residuos G-G-G en ambas estructuras (Figura 2.3). Estas forman parte del loop entre  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ . Este loop se localiza debajo del ligando y justo antes de comenzar la primera hélice  $\alpha$ . Ambas estructuras presentan una secuencia de G-Y-G-G siendo el residuo Y una Arginina (ARG) para la NS5-Mtasa-Den2 y una Leucina (LEU) para la M.Hhal-ADN-Mtasa).

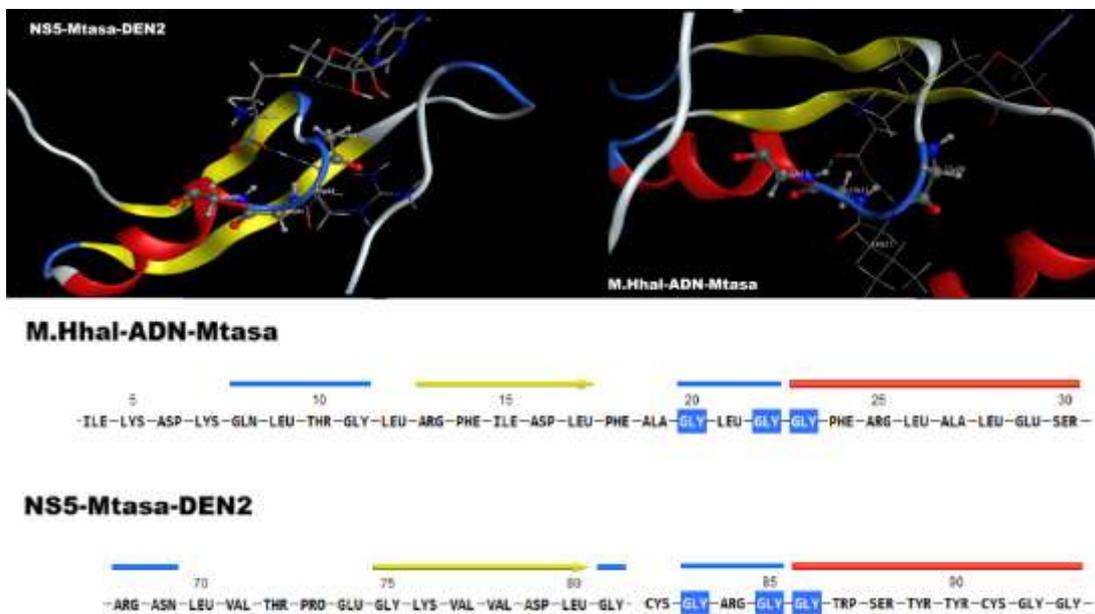


Figura 2.3: Fragmento de la secuencia desde el N-terminal al C-terminal, correspondiente a  $\beta 1$  seleccionando la secuencia de aminoácidos G-G-G.

A continuación, se observan los diagramas de interacción obtenidos para ambos ligandos (SAH en el caso de la NS5-Mtasa-DEN2 y SAM en el caso de la M.Hhal-ADN-Mtasa), donde se observó que ambas estructuras cumplen con el punto 2). El residuo ácido que interacciona con los grupos hidroxilos en ambos casos pertenece al ácido glutámico (Q) siendo Q<sub>40</sub> para M.Hhal-ADN-Mtasa y el Q<sub>111</sub> para NS5-Mtasa-Den2. En el caso de la M.Hhal-ADN-Mtasa el residuo ácido se encuentra al final de  $\beta 2$  y en el caso de la NS5-Mtasa-Den2 en el loop entre  $\beta 2$  y  $\alpha 2$ . (Figura 2.4)

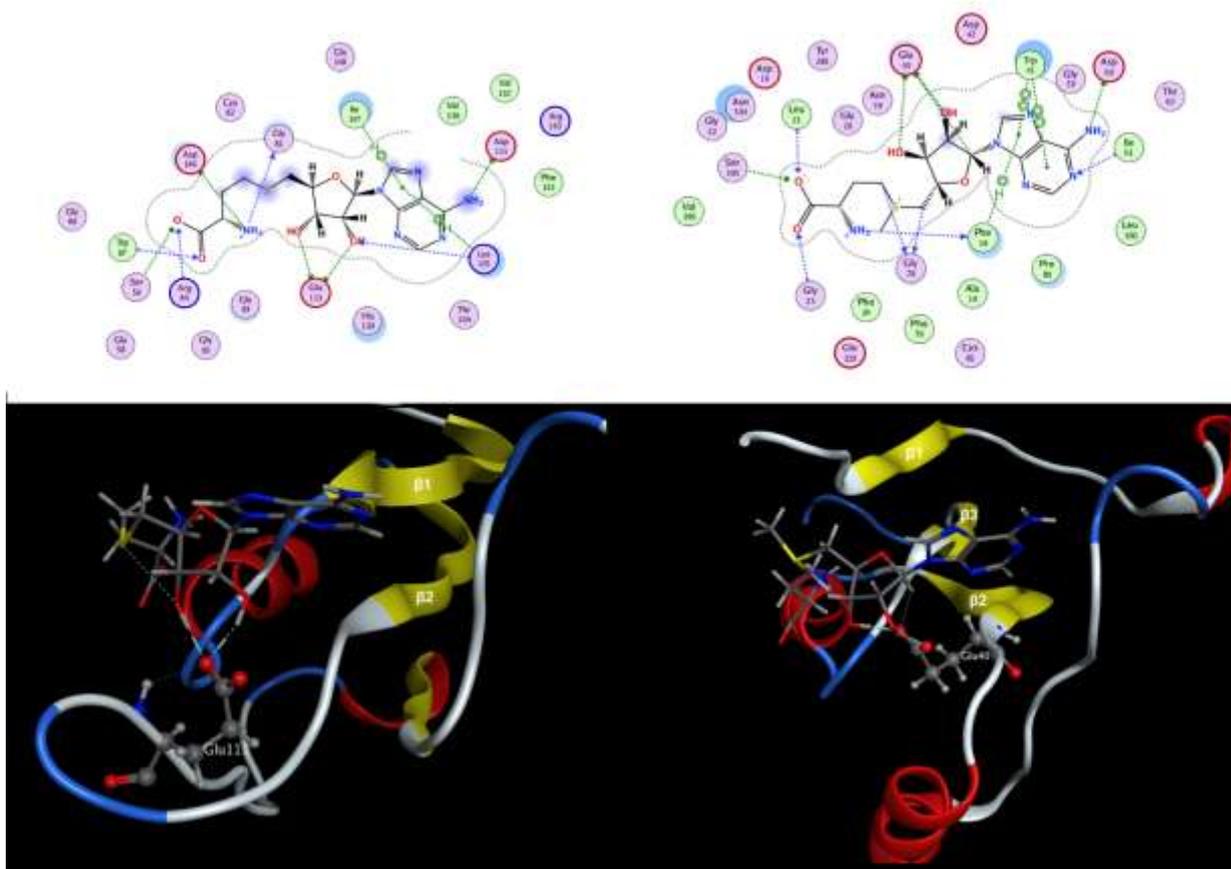


Figura 2.4: Diagrama de las interacciones proteína-ligando para el SAH y NS5-Mtasa-Den2 (arriba a la izquierda) y para el SAM y M.HhaI-ADN-Mtasa (arriba a la derecha). Debajo se muestra el residuo del ácido glutámico correspondiente y su interacción con los hidroxilos de la ribosa.

A partir de lo discutido anteriormente, podemos afirmar que la metiltransferasa NS5-Den2 se clasifica como de clase I.

### 2.1.2. Estudio del bolsillo de unión al SAM:

Las metiltransferasas de los flavivirus se han estudiado ampliamente. Si bien no se ha reportado un mecanismo de acción, se ha determinado que ocurre un mecanismo de reposicionamiento de la caperuza del ARN mensajero (Cap-ARNm).<sup>23</sup> Estas metiltransferasas catalizan dos metilaciones consecutivas en el Cap-ARNm. La primera metilación ocurre en el Nitrógeno 7 de la guanosina, pasando de GpppA-ARN a m7GpppA-ARN y la segunda en el Oxígeno 2' de la primera Adenosina pasando a m7GpppAm-ARN (Figura 2.5). Como estas metiltransferasas solo presentan un sitio de unión al SAM, estas dos metilaciones serían posibles a través de un reposicionamiento del Cap-ARNm.

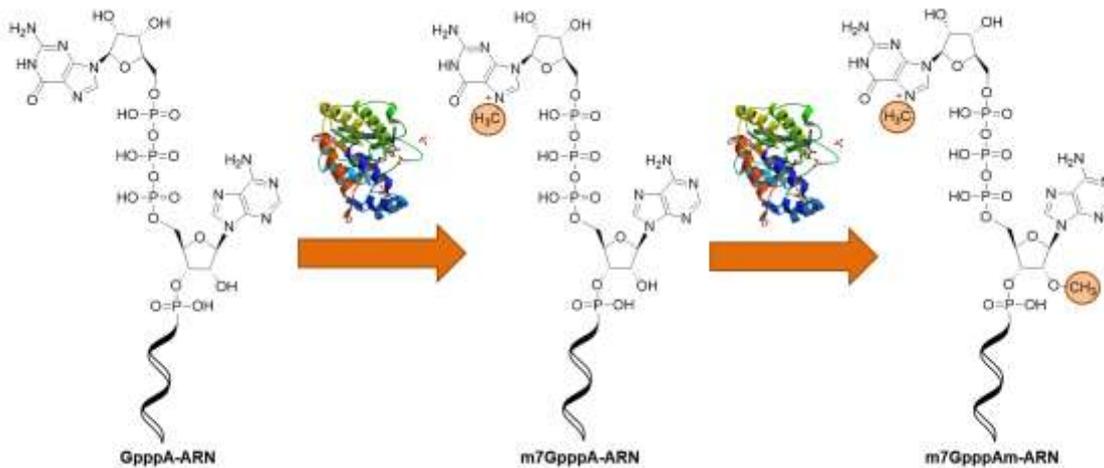


Figura 2.5: Metilaciones realizadas en el cap-ARNm

Los autores Li H. y Shi P.Y. et al,<sup>24</sup> reportaron la existencia de 4 aminoácidos esenciales para la actividad en las metiltransferasas de los flavivirus. La tétrada aminoacídica de K<sub>61</sub>, D<sub>146</sub>, K<sub>182</sub>, E<sub>218</sub> es esencial para la metilación en 2'O mientras que el aminoácido D<sub>146</sub> es esencial para la metilación en 7N.

Determinamos estos 4 aminoácidos esenciales en la NS5-Mtasa-Den2 tanto en la secuencia como en la estructura terciaria. Utilizando la estructura reportada

23 Dong, H.; Ren, S.; Zhang, B.; Zhou, Y.; Puig-Basagoiti, F.; Li, H.; Shi, P.Y. *J. Virol.* **2008**, *82* (9), 4295–4307.

24 Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Guo, Y.; Bernard, K. A.; Shi, P.-Y.; Li, H. *J. Virol.* **2007**, *81* (8), 3891–3903.

en el pdb como 1L9K, la tétada de aminoácidos es la siguiente: K<sub>61</sub>, D<sub>146</sub>, K<sub>181</sub>, E<sub>217</sub>. (Figura 2.6)

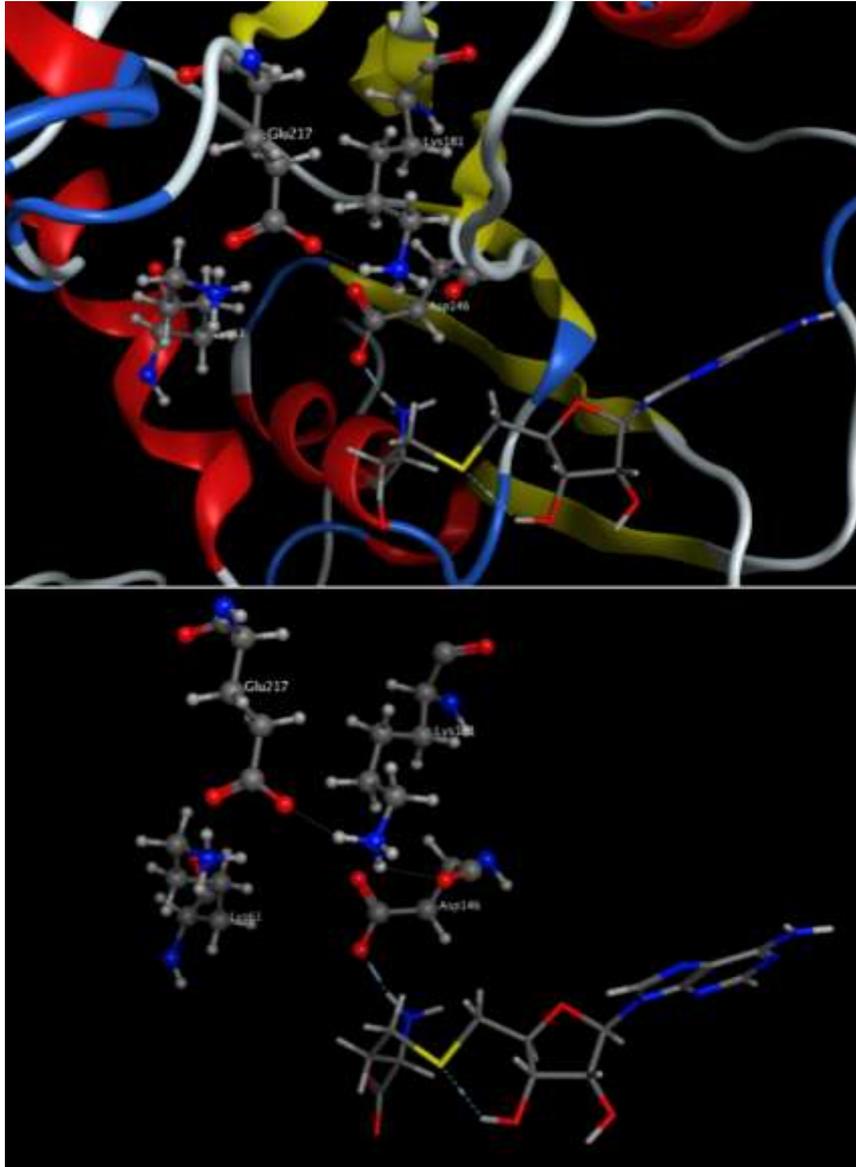


Figura 2.6: Tétada K<sub>61</sub>-D<sub>146</sub>-K<sub>181</sub>-E<sub>217</sub> en la NS5-Mtasa-Den2. En la imagen superior mostrando la estructura terciaria de la metiltransferasa y en la imagen inferior sin mostrar la estructura terciaria.

Estos aminoácidos se encuentran próximos al sitio de unión del SAM, donde el D<sub>146</sub> se presenta al final del  $\beta$ 4, el K<sub>181</sub> al final del  $\beta$ 5 y el E<sub>217</sub> se encuentra al final del  $\beta$ 7. El aminoácido K<sub>61</sub> se encuentra en el  $\alpha$ 1 antes de comenzar  $\beta$ 1. De estos 4 aminoácidos el D<sub>146</sub> es el único que interacciona con el SAM en el sitio de unión. La interacción se observó en la amina del residuo aminoacídico del SAM.

Una vez localizados estos 4 aminoácidos, se prosiguió con el estudio de las interacciones posibles entre ligando y proteína utilizando mapas de superficie.

#### 2.1.2.1. Mapas electrostáticos del receptor y del ligando SAH:

En los mapas de potencial electrostático presentados, el color azul hace referencia a un exceso de electrones (dador de electrones), en rojo una deficiencia de electrones (aceptor de electrones) y el blanco muestra las zonas hidrofóbicas (Figura 2.7)).

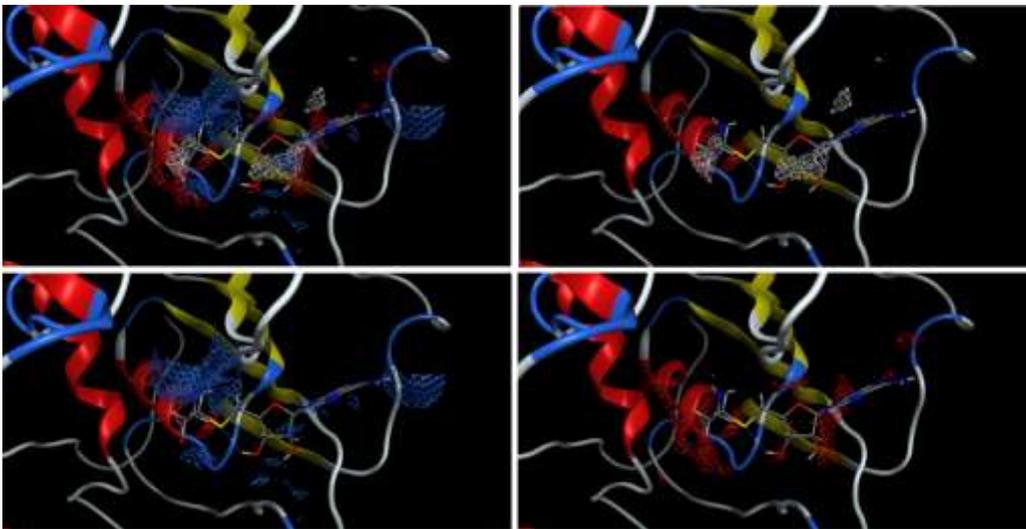


Figura 2.7: De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: Mapa del potencial electrostático del sitio de unión, visualización de la zona hidrofóbica, visualización de la zona de exceso de electrones, visualización de la zona deficiente en electrones.

Se observó que el receptor tiene una zona hidrofóbica donde se ubica la ribosa y otra zona cercana al carbono beta del residuo aminoacídico del SAH. Por otra parte, el receptor presentó dos zonas con un exceso de densidad electrónica (en azul). Una zona es donde se ubica el grupo amino del residuo aminoacídico y la otra donde se ubica la amina de la purina del SAH. Mientras que la zona deficiente de electrones, que se muestra en rojo, se observó donde se ubica el ácido carboxílico del SAH.

Realizando el mismo análisis desde el punto de vista del ligando (SAH) la zona deficiente en electrones (en rojo) se presentó en la amina del residuo aminoacídico y la amina de la purina. Mientras que el exceso de densidad electrónica se presentó en mayor medida en el ácido carboxílico del SAH (en azul). (Figura 2.8)

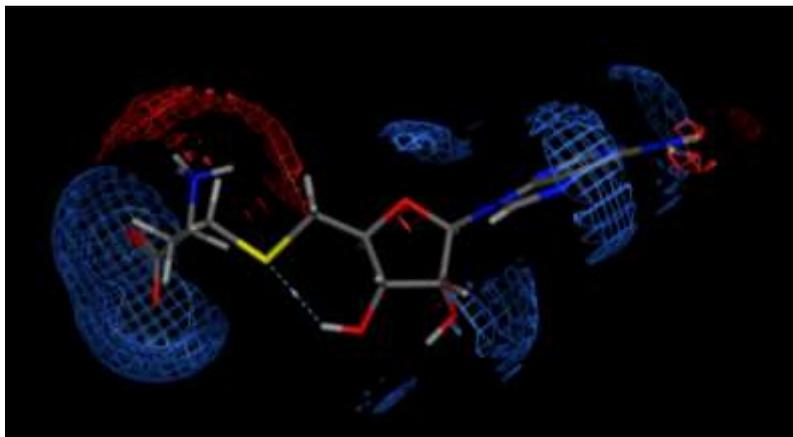


Figura 2.8: Mapa del potencial electrostático del ligando SAH.

#### 2.1.2.2. Superficie de Van der Waals (VDW)

La superficie de VDW que se obtuvo con el programa determina donde la energía de choque es cero, lo que implica una compatibilidad estructural. Esto demuestra que los solapamientos atómicos o los impedimentos estéricos son mínimos. Se observó como el ligando tiene zonas donde la forma coincide estrechamente con la superficie de interacción, lo que determinó una buena interacción entre el ligando y el receptor. Las zonas donde la superficie y el ligando no se encuentran unidos estrechamente se presentaron como puntos importantes a modificar para mejorar la interacción. En este caso, dichas zonas corresponden a la amina de la purina y al azufre del SAH. (Figura 2.9)

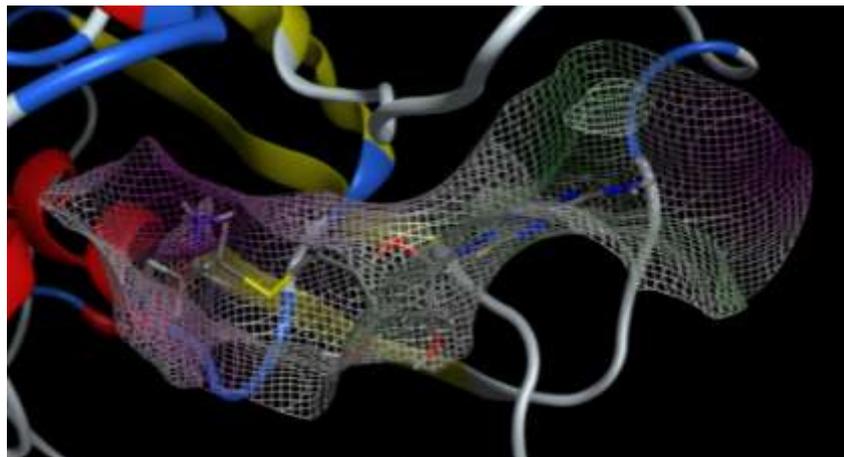


Figura 2.9: Superficie de VDW para el sitio de unión al SAH

## **2.2. Inhibidores reportados para flavivirus:**

Los inhibidores de metiltransferasas de clase I pueden actuar en dos sitios de unión. Uno de ellos corresponde al sitio de unión al co-factor (SAM) y el otro corresponde al sitio de unión al sustrato (Cap-ARNm).

Con respecto a los inhibidores reportados para la NS5-Mtasa-Den2 y otros flavivirus, nos centraremos en aquellos que actúan en el sitio de unión al SAM.<sup>25</sup> Los inhibidores reportados se pueden dividir en dos grandes grupos: los que presentan la adenosina en su estructura siendo similares al SAM y los que no.

Brecher M et al,<sup>26</sup> en la búsqueda de inhibidores a metiltransferasas de flavivirus y a partir de una selección virtual, estudiaron la biblioteca Diversity Set II de 1364 compuestos del Programa de Terapéutica del Desarrollo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI DTP). Dos compuestos (NSC 12155 y NSC 125910) presentaron actividad inhibitoria frente a las Mtasa-WNV, NS5-Mtasa-Den2 y la metiltransferasa del virus del dengue serotipo 3 (NS5-Mtasa-Den3). Ambos compuestos son ejemplos de inhibidores de metiltransferasa que actúan en el sitio de unión al SAM sin ser estructuralmente similares a este (Figura 2.10 compuestos a y b).

Los autores en Lim S. P. et al,<sup>27</sup> sintetizaron análogos al SAH variando los residuos unidos en la amina de la purina (Figura 2.10, compuesto c). Estos compuestos fueron testeados contra NS5-Mtasa-Den3 y Mtasa-WNV. De estos, el compuesto **NITD 10** presentó actividad inhibitoria en ambas metiltransferasas: NS5-Mtasa-Den3 (N7-Ki = 0.24 $\mu$ M; 2'O-Ki = 0.08 $\mu$ M) y WNV Mtase (N7-Ki = 5.68 $\mu$ M; 2'O-Ki = 0.044 $\mu$ M). (Figura 2.10, compuesto d)

---

25 Lee, M. F.; Wu, Y. S.; Poh, C. L. *Viruses* **2023**, *15* (3), 705.

26 Brecher, M.; Chen, H.; Li, Z.; Banavali, N. K.; Jones, S. A.; Zhang, J.; Kramer, L. D.; Li, H. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (8), 340–349.

27 Lim, S. P.; Sonntag, L. S.; Noble, C.; Nilar, S. H.; Ng, R. H.; Zou, G.; Monaghan, P.; Chung, K. Y.; Dong, H.; Liu, B.; Bodenreider, C.; Lee, G.; Ding, M.; Chan, W. L.; Wang, G.; Jian, Y. L.; Chao, A. T.; Lescar, J.; Yin, Z.; Vedananda, T. R.; Keller, T. H.; Shi, P.Y. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (8), 6233–6240.

De forma análoga, se han reportado inhibidores de la metiltransferasa del virus del Zika (Mtasa-Zika) que presentan como estructura base la adenosina. Jain R. et al,<sup>28</sup> realizaron el estudio del compuesto **MS2042** como inhibidor de la Mtasa-Zika reportando un  $K_D = 24.3\mu\text{M}$  (Figura 2.10, compuestos e). Por otra parte, Tao et al,<sup>17</sup> presentaron derivados a partir del sinfungin, basados en la estructura de los compuestos **NITD 10** y **EPZ004777** (inhibidor reportado de la histona metiltransferasa DOT1L).<sup>29</sup> De estos, el compuesto **1bf** presenta actividad inhibitoria frente a la Mtasa-ZIKA con un  $IC_{50}$  de  $4.56\mu\text{M}$ . (Figura 2.10, compuestos f y g)

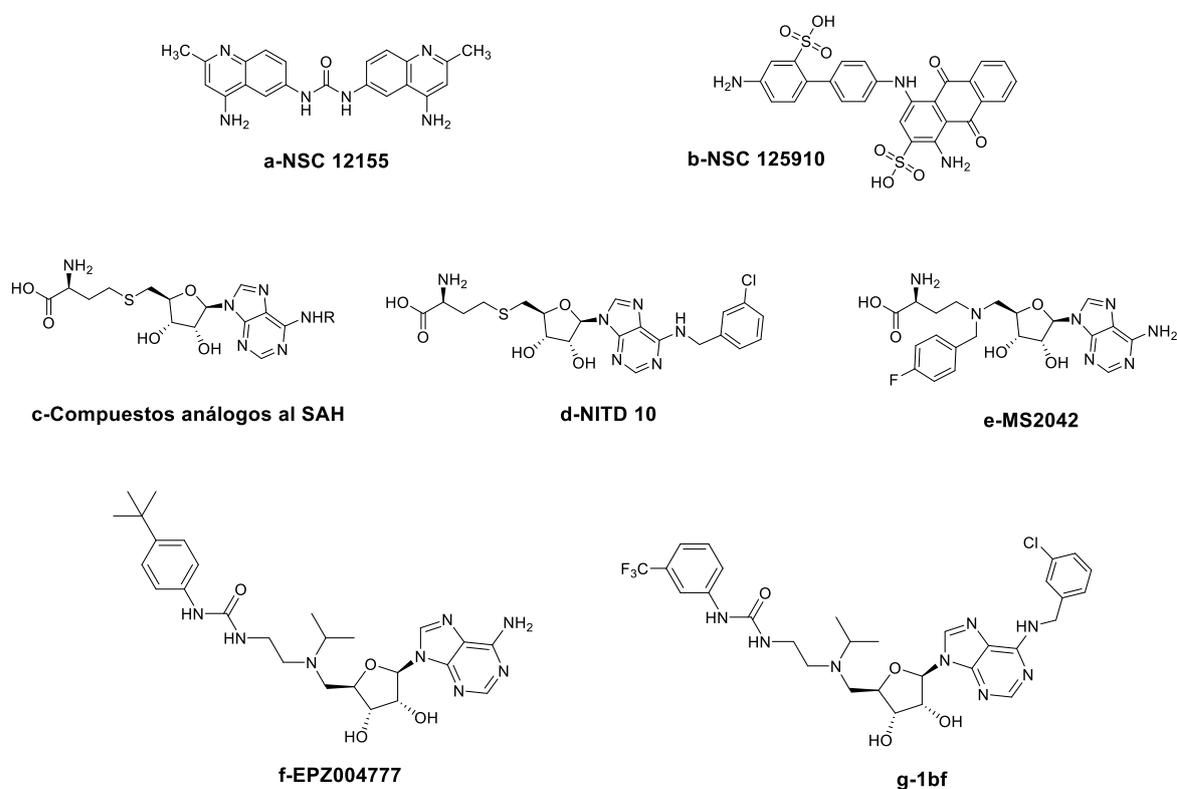


Figura 2.10: Inhibidores reportados contra la metiltransferasa de diferentes flavivirus

28 Jain, R.; Butler, K. V.; Coloma, J.; Jin, J.; Aggarwal, A. K. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 1632.

29 Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Majer, C. R.; Sneeringer, C. J.; Song, J.; Johnston, L. D.; Scott, M. P.; Smith, J. J.; Xiao, Y.; Jin, L.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Bernt, K. M.; Tseng, J.-C.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M.. *Cancer Cell* **2011**, 20 (1), 53–65.

### 2.3. Propuesta de los análogos a SAM y SFG:

Las estructuras del SFG y del SAM, el estudio preliminar del bolsillo de unión a la NS5-MTasa-Den2, así como también, los inhibidores reportados para flavivirus fueron utilizados como insumos en la propuesta de los análogos sintéticos.

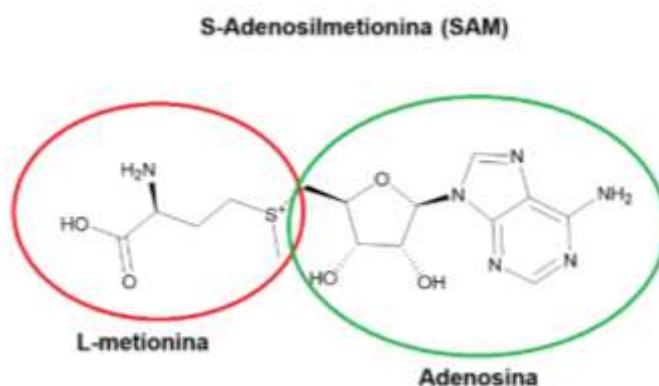


Figura 2.11: Estructura del SAM

Si comparamos las estructuras del SAM, SAH y SFG se podrían resumir como una estructura base de adenosina unida a un  $\alpha$ -aminoácido (Figura 2.11). En este trabajo, decidimos conservar la estructura de la adenosina y variar el extremo correspondiente al  $\alpha$ -aminoácido. Los cambios propuestos que darán lugar a los análogos buscados son:

**1) Sustitución del azufre de la estructura del SAM por una amina terciaria.**

La propuesta de la presencia de una amina terciaria en la estructura se basa en que los análogos reportados como inhibidores de ADN-metiltransferasas y ARN-metiltransferasas presentan una tendencia general de inhibición decreciente determinado por el siguiente orden: amida < amina secundaria < amina terciaria.<sup>30,31</sup>

30 Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (18), 8066–8074.

31 Schwickert, M.; Fischer, T. R.; Zimmermann, R. A.; Hoba, S. N.; Meidner, J. L.; Weber, M.; Weber, M.; Stark, M. M.; Koch, J.; Jung, N.; Kersten, C.; Windbergs, M.; Lyko, F.; Helm, M.; Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (14), 9750–9788.

**2) Sustitución del residuo aminoacídico de las estructuras originales (SAM, SAH y SFG).**

A pH fisiológico estas tres estructuras se presentan como un zwitterion (Figura 2.1). Como se dijo anteriormente, la estructura de zwitterion suponemos que ocasionaría la falta de permeabilidad en el SFG.

A partir de los cambios propuestos, la estructura general de los análogos se muestra en la figura 2.12. A partir de esta estructura general, se decidió estudiar la influencia de cada grupo R (R y R<sub>1</sub>) por separado.

Para el estudio de las variaciones en R<sub>1</sub> se seleccionó: un grupo éster, un grupo amida, y un grupo triazol. El grupo éster seleccionado fue el etiléster; este tipo de ésteres es fácilmente hidrolizado por esterasas al ingresar a la célula.

Para este estudio, se dejó invariante el sustituyente de la amina terciaria. Seleccionamos un grupo etilo como sustituyente ya que presenta una alta estabilidad y baja voluminosidad. Además, considerando la ruta sintética, se prefirió el grupo etilo frente al grupo metilo. La formación de la amina terciaria conteniendo un grupo etilo, puede realizarse a partir de una aminación reductiva entre el compuesto de interés y acetaldehído. La introducción del grupo metilo en este tipo de compuestos se ha reportado a partir de la síntesis de un intermediario N-metilbenzosulfonamida.<sup>31</sup>

Para el estudio de la influencia del grupo R, se dejó invariante el grupo etiléster como sustituyente de la cadena aminoacídica y los R seleccionados fueron anillos aromáticos.

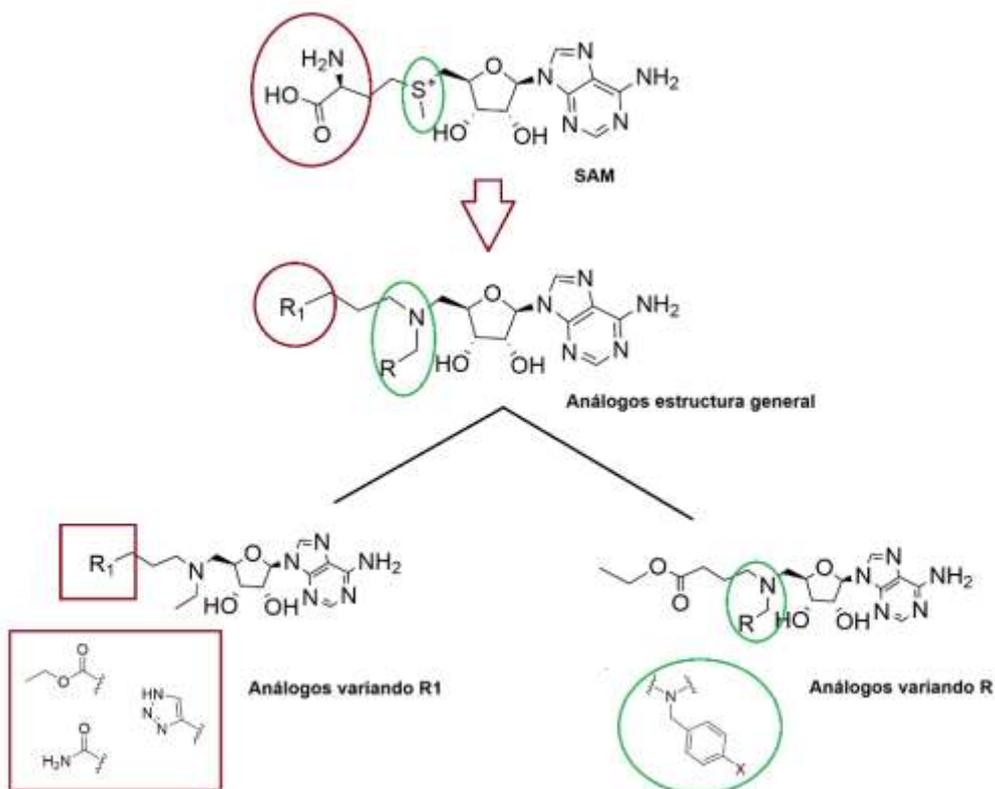


Figura 2.12: Esquema de los cambios estructurales propuestos sobre el SAM.





## **Capítulo 3:**

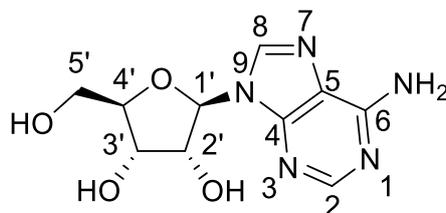
**Primera aproximación a los  
compuestos de interés:**

**Síntesis de la Serie A**



### Antecedentes:

La adenosina es un nucleósido purínico formado por una base nitrogenada (adenina) y un azúcar (ribosa) unidos mediante un enlace  $\beta$ -N9-glicosídico (Figura 3.1). Este compuesto orgánico participa en varios procesos celulares relacionándose con la transferencia de energía, traducción de señales, entre otras.<sup>1</sup>



Adenosina

Figura 3.1: Estructura y numeración de la adenosina.

Seleccionamos a la adenosina como precursor sintético en la síntesis de los análogos a SAM detallados en el Capítulo 2 (figura 2.12). Observando la estructura química de estos análogos, se evidencia la necesidad de la formación de un enlace C-N en el C5' de la ribosa de la adenosina.

Las reacciones de formación del enlace C-N en el C5' de la ribosa se realizan a partir del hidroxilo primario unido a C5', por lo que, es necesario proteger los alcoholes secundarios en C2' y C3'. Varios autores seleccionaron a la 2',3'-O-isopropilidenadenosina de origen comercial como precursor sintético ya que presenta a los alcoholes en C2' y C3' protegidos formando un grupo acetónido. (Figura 3.2)

En la figura 3.2 se resumen los intermediarios de las aproximaciones sintéticas reportadas anteriormente partiendo de 2',3'-O-isopropilidenadenosina para la formación del enlace C-N en C5'.

<sup>1</sup> Noji, T.; Karasawa, A.; Kusaka, H. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 495 (1), 1–16.

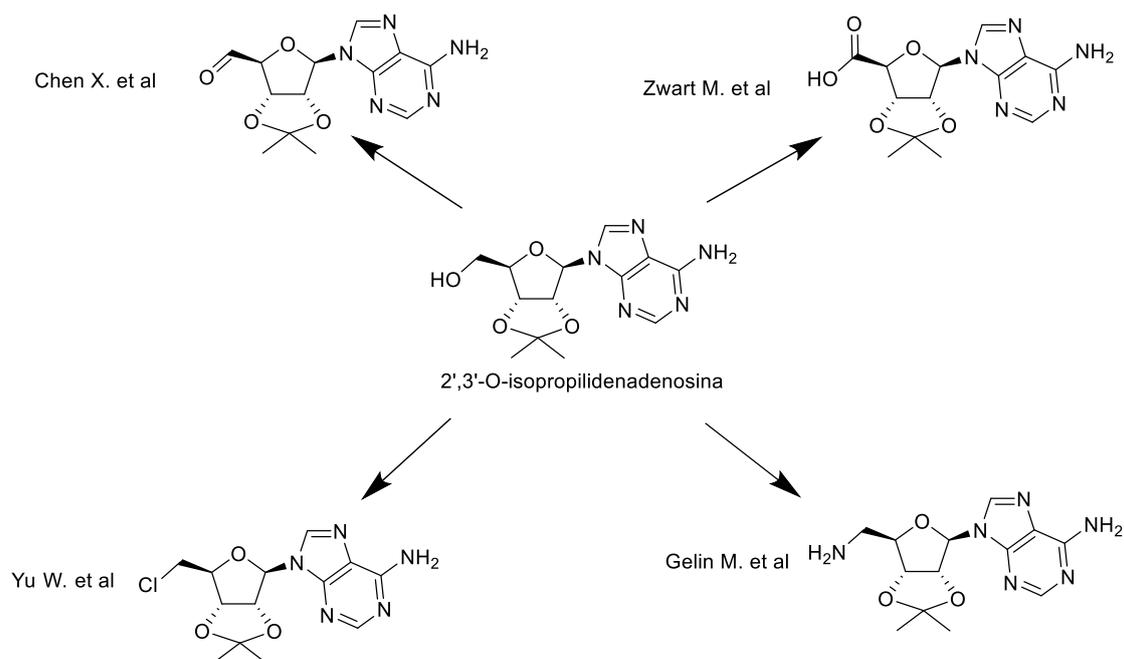


Figura 3.2: Resumen de las rutas sintéticas reportadas en bibliografía para formar un enlace C-N a partir de 2',3'-O-isopropilidenoadenosina.

Los autores Chen X. et al,<sup>2</sup> partieron de 2',3'-O-isopropilidenoadenosina en la síntesis de derivados de 5'-amino adenosina como potenciales inhibidores del virus del Zika. Para esto llevaron a cabo la oxidación del alcohol primario utilizando el periodinano de Dess-Martin (DMP) para obtener el aldehído correspondiente. Por otro lado, De Zwart M. et al.,<sup>3</sup> partieron del mismo compuesto para la síntesis de diversas carboxamidoadenosinas 5'-N-sustituidas para evaluar su actividad frente a receptores de adenosina. La síntesis de estos compuestos se realizó a partir de la formación de un grupo amida partiendo de la oxidación de la 2',3'-O-isopropilidenoadenosina al respectivo ácido carboxílico. En cambio, Yu W. et al.,<sup>4</sup> plantearon la síntesis de uno de sus compuestos de interés a partir de la sustitución del alcohol primario de la 2',3'-O-isopropilidenoadenosina por un átomo de cloro para luego realizar la sustitución

2 Chen, X.; Yan, Y.; Song, H.; Wang, Z.; Wang, A.; Yang, J.; Zhou, R.; Xu, S.; Yang, S.; Li, W.; Qin, X.; Dai, Q.; Liu, M.; Lv, K.; Cao, R.; Zhong, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *261*, 115852.

3 De Zwart, M.; Kourounakis, A.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Link, R.; Von Frijtag Drabbe Künzel, J. K.; IJzerman, A. P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (8), 1384–1392.

4 Yu, W.; Chory, E. J.; Wernimont, A. K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J. J.; Qi, J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Yi, J.; Marcellus, R.; Iacob, R. E.; Engen, J. R.; Griffin, C.; Aman, A.; Wienholds, E.; Li, F.; Pineda, J.; Estiu, G.; Shatseva, T.; Hajian, T.; Al-awar, R.; Dick, J. E.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Bradner, J. E.; Schapira, M. *Nat. Commun.* **2012**, *3* (1), 1288.

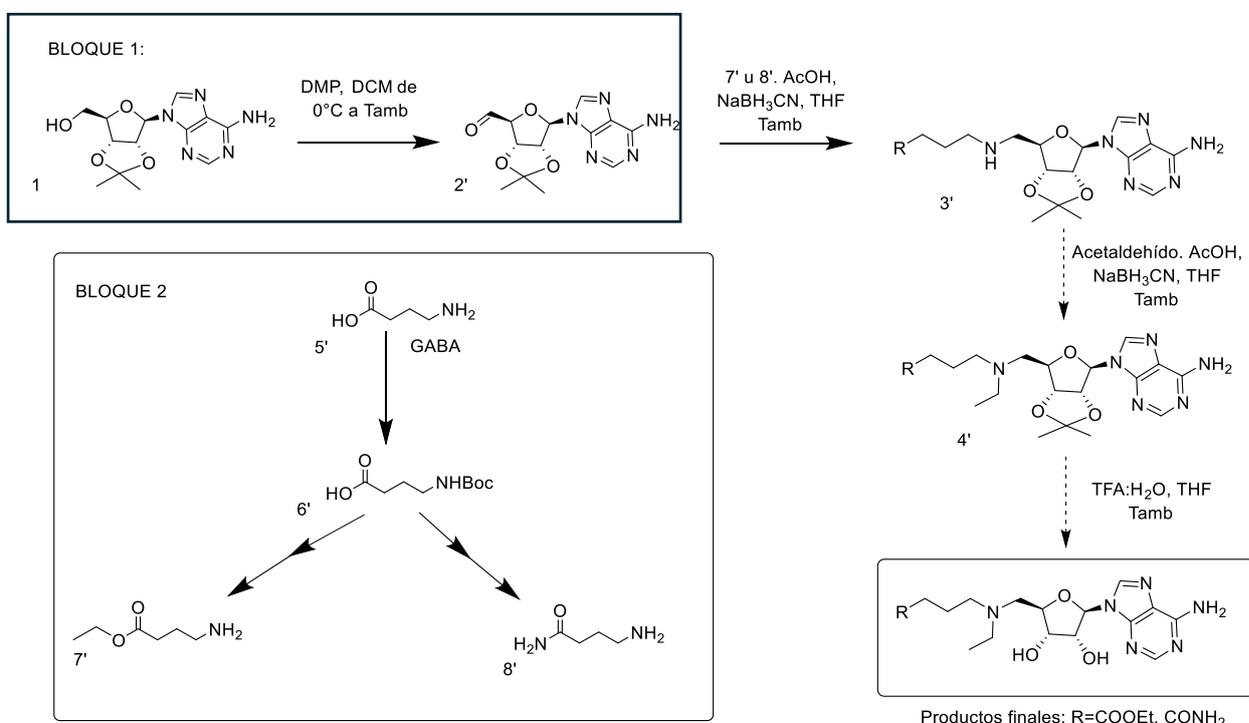
correspondiente. Por último, los autores Gelin M. et al.,<sup>5</sup> realizaron la síntesis y evaluación de compuestos que presentaban adenosina en su estructura. Para ello, formaron la amina primaria en la adenosina sobre C5' y luego realizaron una reacción de aminación reductiva para la formación del enlace C-N.

---

5 Gelin, M.; Paoletti, J.; Nahori, M.-A.; Huteau, V.; Leseigneur, C.; Jouvion, G.; Dugué, L.; Clément, D.; J.-L.; Assairi, L.; Pochet, S.; Labesse, G.; Dussurget, O. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (3), 422–435.

### 3.1. Ruta sintética 1: Primeras aproximaciones de síntesis

Para comenzar con la síntesis de los compuestos propuestos en el capítulo anterior, planteamos una primera ruta sintética: "Ruta sintética 1". La estrategia utilizada fue una síntesis convergente mediante el acople de dos bloques principales. Para la obtención del bloque 1 se utilizó 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**1**) como precursor y para sintetizar el bloque 2, se partió del ácido gamma-aminobutírico (**5'**) conocido como GABA. Se decidió comenzar con la síntesis del bloque 1. (Esquema 3.1)



Esquema 3.1: Ruta sintética 1.

El primer paso de esta ruta sintética fue la oxidación de **1** para la obtención del aldehído **2'** utilizando el periodinano de Dess-Martin (DMP). Se utilizaron las condiciones i reportadas en la tabla 3.1, y se siguió el avance de reacción por TLC. Con estas condiciones no se observó la desaparición de reactivos ni la formación de productos. Por <sup>1</sup>H-RMN no se observó la aparición del pico característico de aldehído (singulete entre 9-10 ppm), y al asignar el espectro se

determinó que correspondía al reactivo (compuesto 1). Se decidió probar otras condiciones de oxidación de alcoholes a aldehídos (Tabla 3.1).

	Condiciones	Resultados	Observaciones
<b>i</b>	DMP (1,2 eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub>	ND	No se observa señal en el espectro de <sup>1</sup> H-RMN correspondiente a aldehído
<b>ii</b>	Cloruro de Oxalilo (1,2eq), DMSO (2,4eq), Et <sub>3</sub> N (5eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub> . -70°C <sup>6</sup>	ND	
<b>iii</b>	DMSO (9.7eq), Et <sub>3</sub> N (4.9eq), SO <sub>3</sub> Py (29eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub> <sup>7</sup>	ND	
<b>iv</b>	IBX (3eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub> <sup>8</sup>	ND	

Tabla 3.1: Condiciones utilizadas para la obtención del compuesto **2'**. ND: No da resultado la reacción.

Se probaron reacciones de oxidación de alcoholes a aldehídos ampliamente utilizadas en química orgánica como la oxidación de Swern (condiciones **ii**), donde se comienza con la activación del DMSO por parte del cloruro de oxalilo a una temperatura de -70°C y termina en la obtención del aldehído de interés y gas de sulfuro de dimetilo. Al emplear estas condiciones no se obtuvo el compuesto de interés. Asimismo, se utilizó la reacción de oxidación de Parikh-Doering que en forma similar a la reacción de Swern, el DMSO es activado, pero en este caso, por el complejo SO<sub>3</sub>Py. La ventaja de esta reacción frente a la de Swern es que no necesita temperaturas criogénicas para llevar a cabo la oxidación. Nuevamente, no se obtuvo el compuesto de interés.

6 Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I.; Petricci, E.; Vogel, P. *J. Org. Chem.* **2004**, 69 (13), 4487–4491.

7 Parikh, J. R.; Doering, W. V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (21), 5505–5507.

8 More, J. D.; Finney, N. S. A. *Org. Lett.* **2002**, 4 (17), 3001–3003.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió explorar en bibliografía otras alternativas para la síntesis del aldehído de interés. Los autores Voorneveld J et al.,<sup>9</sup> reportan la síntesis del aldehído de interés utilizando DMP partiendo de adenosina. En esta ruta sintética planteada por los autores, protegieron los alcoholes secundarios con TBS y la amina de la purina con un grupo Boc.

Esta protección de la amina a priori podría deberse a dos motivos. Uno de ellos podría ser que la amina genera algún tipo de interferencia en la reacción de oxidación al utilizar DMP por interacción o descomposición del reactivo. El otro motivo, podría ser que el aldehído formado sobre C5' interaccione con la amina del anillo purínico de forma intermolecular para formar una imina.

Este último no parecería posible ya que se han reportado reacciones de aminación reductivas para la formación del enlace C-N en C5' donde el grupo amina de la purina se encontraba libre y no se observó reacción por parte de esta, demostrando así su baja reactividad.<sup>5,10</sup> Realizando un estudio detallado de la estructura, esta amina perteneciente al anillo purínico sufre la deslocalización de sus electrones hacia dicho anillo. Esto genera que estos electrones no se encuentren disponibles con gran facilidad (Figura 3.3). Por lo que es poco probable que ocurriera la formación de la imina intermolecular entre el aldehído formado y la amina de la purina.

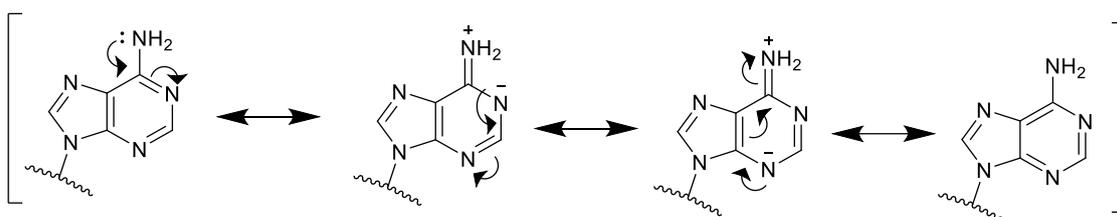


Figura 3.3: Estructuras resonantes de la adenina

9 Voorneveld, J.; Rack, J. G. M.; Van Gijlswijk, L.; Meeuwenoord, N. J.; Liu, Q.; Overkleef, H. S.; Van Der Marel, G. A.; Ahel, I.; Filippov, D. V. *Chem. – Eur. J.* **2021**, 27 (41), 10621–10627.

10 Schwickert, M.; Fischer, T. R.; Zimmermann, R. A.; Hoba, S. N.; Meidner, J. L.; Weber, M.; Weber, M.; Stark, M. M.; Koch, J.; Jung, N.; Kersten, C.; Windbergs, M.; Lyko, F.; Helm, M.; Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (14), 9750–9788.

En el mecanismo de la reacción de oxidación utilizando DMP, el átomo de iodo hipervalente que presenta la estructura del DMP (Figura 3.4) es atacado por el alcohol de interés y se libera ácido acético, por lo que si se da una interacción entre el DMP y la amina del anillo purínico dejaría menos DMP disponible para la interacción de este con el alcohol de interés. Adicionalmente, el ácido acético producido podría ocasionar la hidrólisis del acetónido generando un compuesto insoluble en DCM.

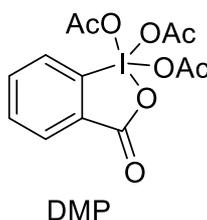
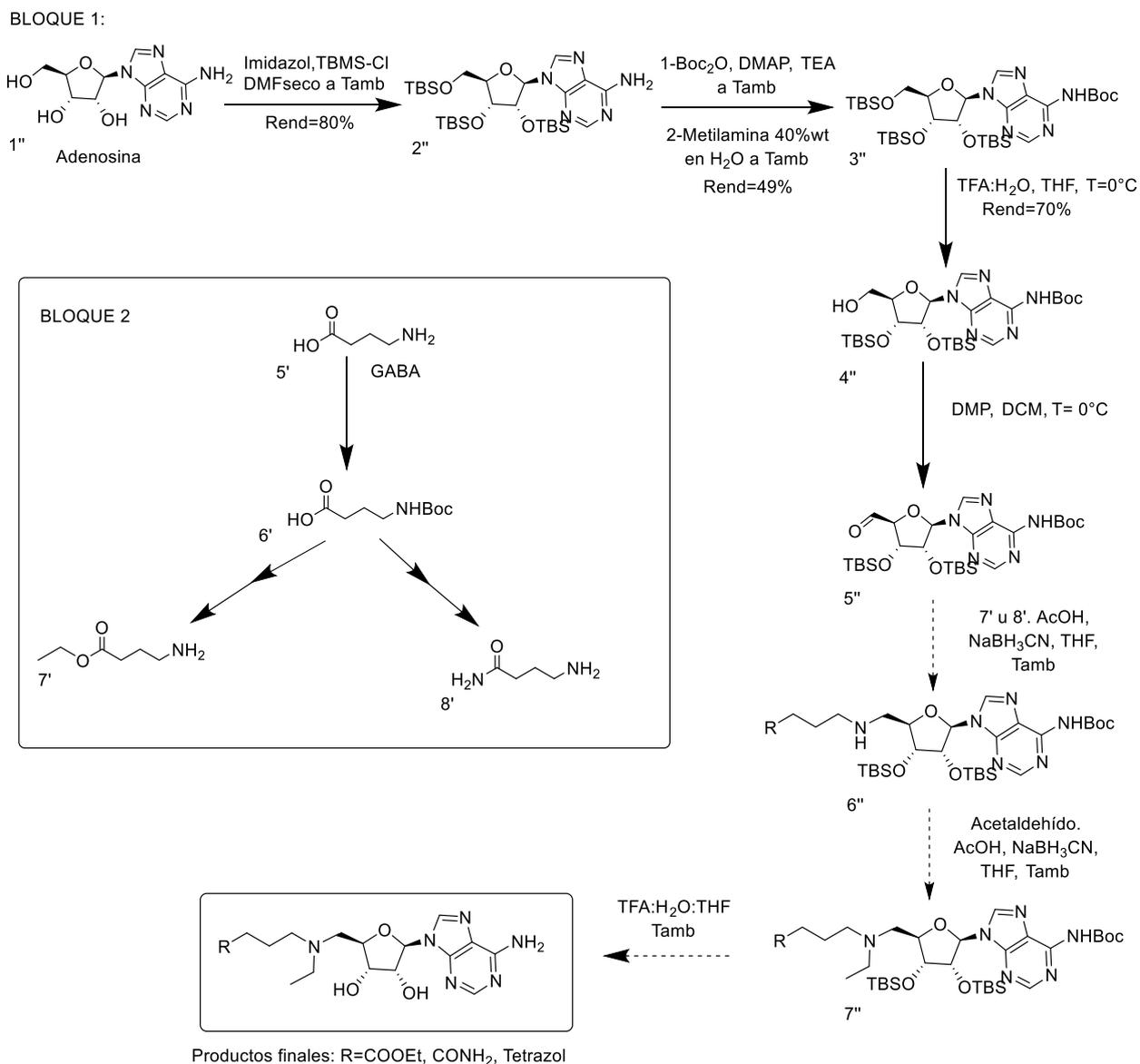


Figura 3.4: Estructura del periodinano de Dess-Martin (DMP)

A partir de esto, se planteó una ruta sintética alternativa: “Ruta sintética 1, alternativa” (Esquema 3.2), donde la síntesis del bloque 1 se realizó según lo reportado en Voorneveld J et al.<sup>9</sup> Se partió de adenosina y se protegieron los alcoholes con TBS-Cl. Posteriormente, la amina de la purina se protegió con Boc para la formación del compuesto **3**”. Se desprotegió el alcohol primario para obtener **4**” con TFA, para luego formar el aldehído con DMP. Se obtuvieron los compuestos deseados desde el compuesto **2**” al **4**” como fue reportado por estos autores.



Esquema 3.2: Ruta sintética 1, alternativa.

Con esta nueva estrategia se ensayaron varias condiciones para la reacción de oxidación. Se comenzó con un estudio del avance de reacción por <sup>1</sup>H-RMN, en donde se preparó una muestra con el compuesto 4'' y DMP en CDCl<sub>3</sub> y se colocó en el tubo de RMN. En las figuras 3.5 y 3.6 se presentan los espectros obtenidos para el compuesto 4'', el compuesto 4'' y 0.2 eq de DMP, el compuesto 4'' y 1.2 eq de DMP y, por último, el compuesto 4'' y 1.4 eq de DMP.

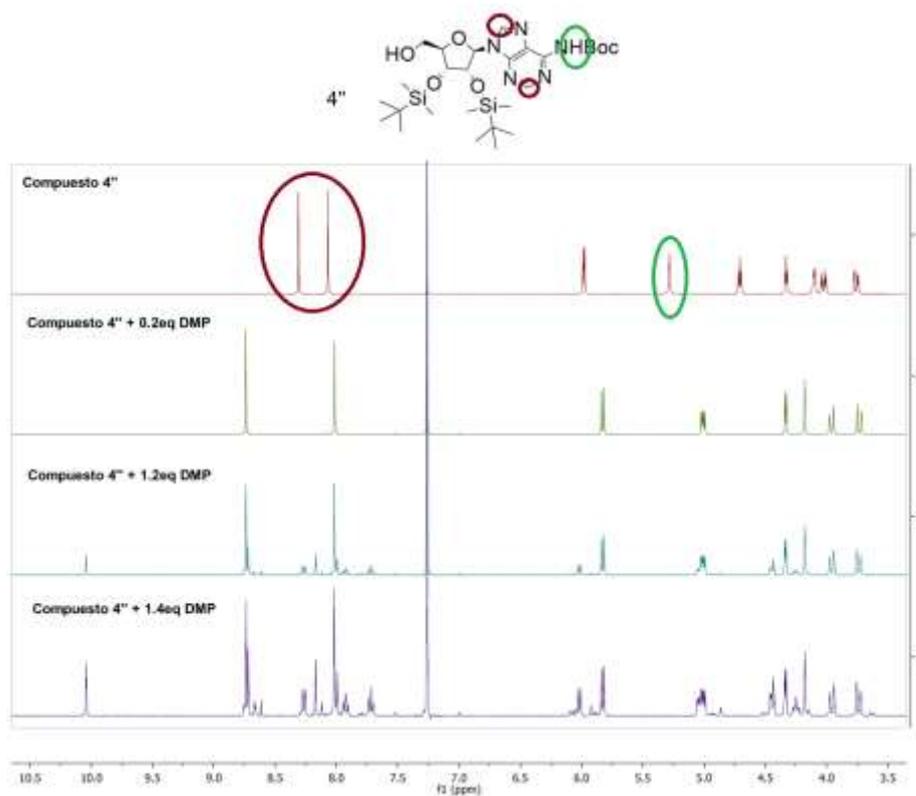


Figura 3.5: Superposición de los espectros del compuesto 4'' al aumentar los equivalentes de DMP. Espectro <sup>1</sup>H-RMN desde 3.5 ppm a 10.5 ppm.

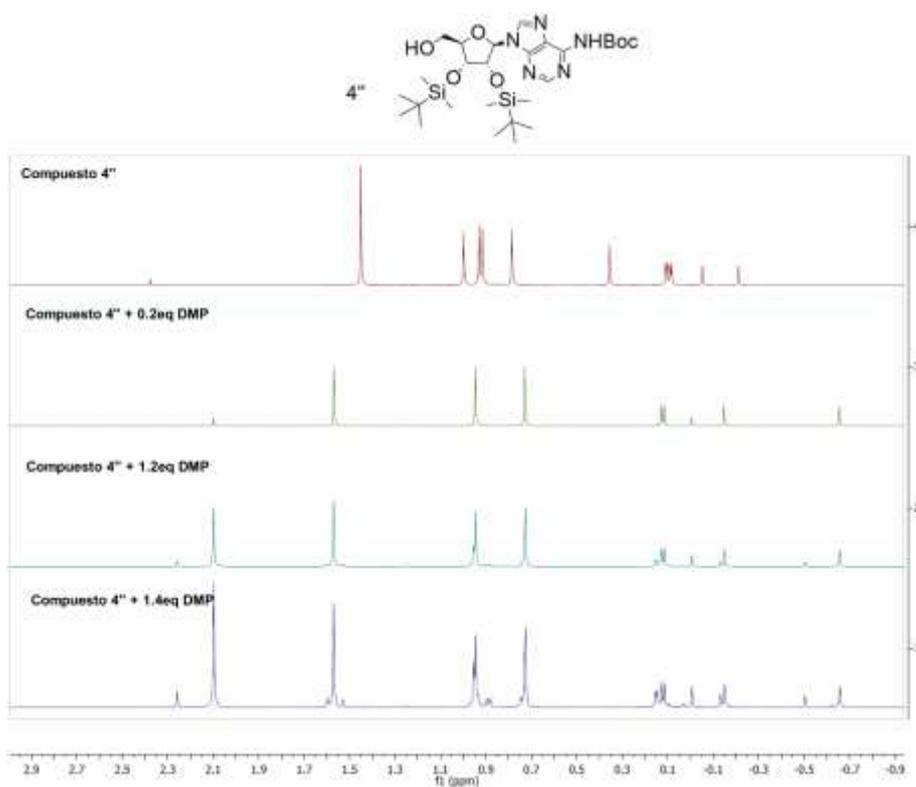


Figura 3.6: Superposición de los espectros del compuesto 4'' al aumentar los equivalentes de DMP. Espectro <sup>1</sup>H-RMN desde -0.9 ppm a 2.9 ppm.

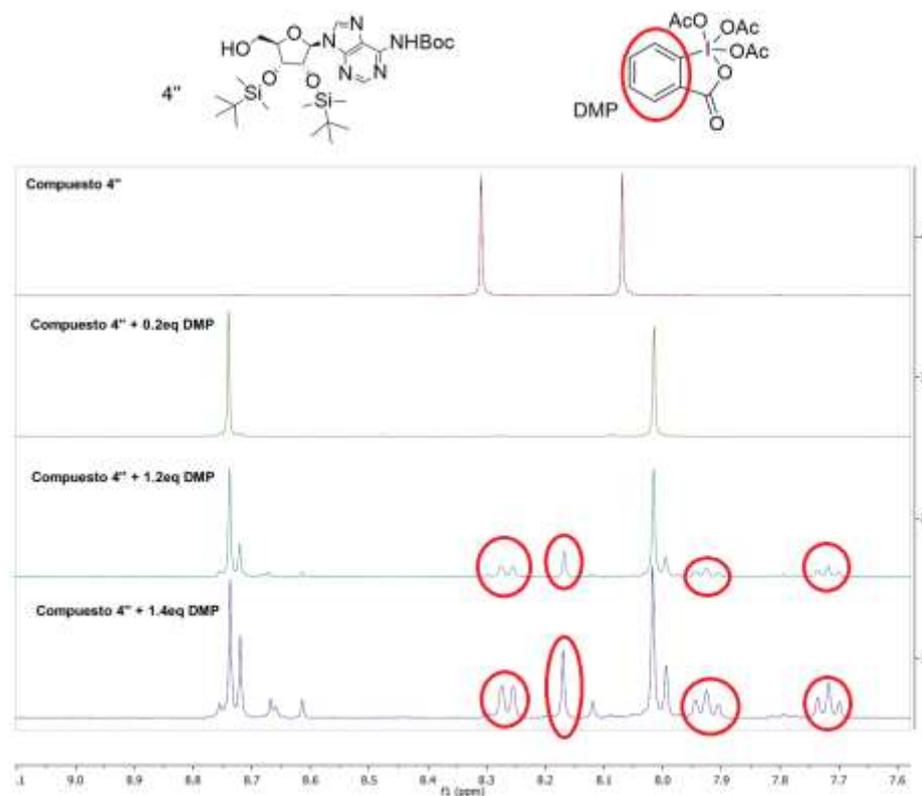


Figura 3.7: Ampliación de la superposición de los espectros del compuesto **4''** al aumentar los equivalentes de DMP. En rojo se muestran las señales correspondientes al reactivo DMP.

En el espectro del compuesto **4''** con 0.2 eq de DMP no se observaron cambios respecto al espectro del compuesto en ausencia de DMP. Al utilizar 1.2 eq y 1.4 eq de DMP se observó una señal característica de aldehído a 10 ppm. Sin embargo, también aumentan las señales correspondientes a productos secundarios. Esto se observa claramente en la figura 3.7, donde se realizó una ampliación en la zona de aromáticos. Si nos enfocamos en el pico a 8.74 ppm correspondiente a uno de los protones del anillo purínico del compuesto **4''**, al aumentar la concentración de DMP se observaba un aumento en señales próximas a este protón. La señal a 8.74 ppm corresponde al compuesto **4''** mientras que la señal a 8.71 ppm corresponde al aldehído de interés, las demás señales se presumen productos secundarios presentes en baja proporción.

Cabe mencionar que las señales del compuesto **4''** en presencia de DMP (señales mayoritarias), presentan un desplazamiento diferente en comparación a las señales reportadas para el compuesto **4''** en ausencia de DMP. Un ejemplo de esto es el desplazamiento que presenta el protón en 8.74 ppm, el cual se

encuentra a mayor desplazamiento en presencia de DMP. Análogamente se deja de observar la señal de protón correspondiente al NH del carbamato en el anillo purínico. Esto podría determinar que el compuesto **4''** se encuentra interaccionando con el DMP. Ver Figuras 3.5 y 3.7.

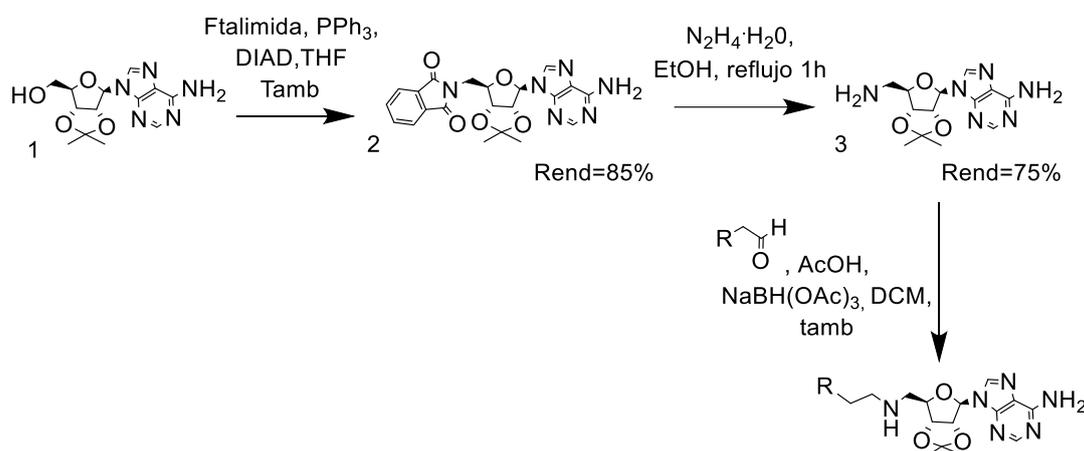
Con el fin de replicar los resultados obtenidos anteriormente, se utilizaron las condiciones que se muestran en la tabla 3.2 con el fin de escalar la reacción. De estas, solo en las condiciones **vii** se obtuvo el compuesto de interés, pero el resultado no fue reproducible.

	<b>Condiciones</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
<b>v</b>	DMP (1,2 eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub>	ND	-
<b>vi</b>	DMP (1,5 eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub> . 0°C-Tamb	ND	El DMP se agregó a 0°C con baño de hielo.
<b>vii</b>	DMP (4 eq), DCM seco, atm N <sub>2</sub> . 0°C-Tamb	ND	El DMP se agregó a 0°C con baño de hielo.
<b>viii</b>	DMP (1,2 eq), DCM seco, atm Ar, tamices moleculares 4 Å. 0°C-Tamb	Se observa señal de aldehído en el crudo (10 ppm)	No se pudo reproducir el resultado

Tabla 3.2: Condiciones utilizadas para la obtención del compuesto **5'**. ND: No da resultado la reacción.

### 3.2. Ruta sintética 2: Nueva estrategia sintética.

La imposibilidad de generar el aldehído sobre el C5' de la ribosa de la adenosina a una escala de laboratorio, nos llevó a plantear una nueva ruta sintética para la formación del enlace C-N. En la misma, seguimos utilizando una estrategia convergente de dos bloques sintéticos a partir de una reacción de aminación reductiva. En esta nueva ruta sintética, a la que denominamos “Ruta sintética 2”, seguimos el enfoque reportado por los autores Gelin M. et al.,<sup>5</sup> Como se mencionó anteriormente, estos autores sintetizaron la amina primaria sobre el C5' de la adenosina y posteriormente realizaron una aminación reductiva para la formación del enlace C-N. (Figura 3.2)



Esquema 3.3: Ruta sintética 2: Aproximación preliminar

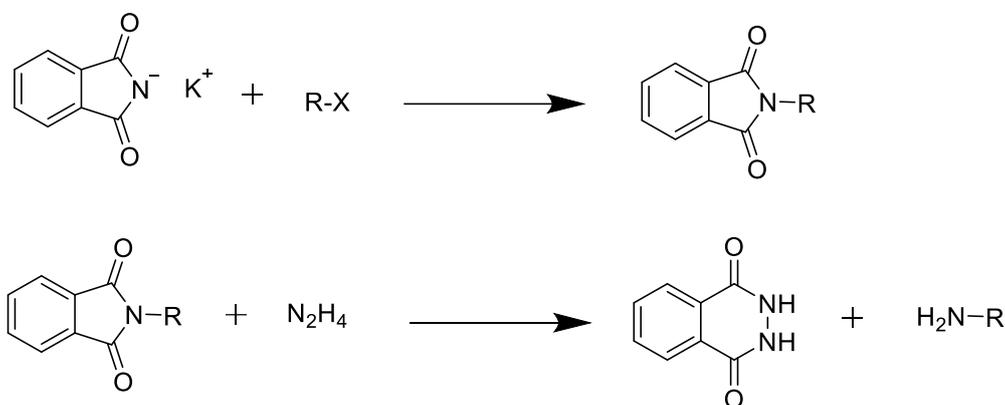
Comenzamos con una aproximación preliminar de la ruta sintética 2 (Esquema 3.3), donde seleccionamos la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**1**) como precursor sintético. La formación de la amina **3**, insumo de la aminación reductiva, se obtuvo a partir de la reacción de Gabriel modificada.

La reacción de Gabriel es ampliamente utilizada para la formación de aminas primarias,<sup>11,12</sup> donde se forma el anión ftalimida, generalmente como una sal de

11 Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. Amines and Amides. In *Organic Chemistry*; Elsevier, **2014**; pp 803–842.

12 Marson C.M.; Savy P. Comprehensive Organic Functional Group Transformations II. *Elsevier*, **2005**, 255-300.

potasio, y se hace reaccionar con un agente alquilante. Posteriormente se realiza la eliminación del grupo ftaloílo utilizando hidrazina en etanol, dando lugar a ftalhidrazina y la amina de interés. (Figura 3.11)



Esquema 3.4: Reacción de Gabriel

Como partimos de un alcohol primario, la primera reacción de la síntesis de Gabriel se realizó mediante una reacción de Mitsunobu.<sup>13</sup>

La reacción de Mitsunobu, nombrada en honor a su descubridor Oyo Mitsunobu en 1967, es ampliamente utilizada en síntesis orgánica y química medicinal. Esta reacción parte de un alcohol (primario o secundario) que en presencia de agentes oxidantes (azodicarboxilatos), reductores (fosfinas) y un pronucleófilo permite la formación de enlaces: C-C, C-N, C-O y C-S.<sup>14,15</sup>

En nuestro caso, el azodicarboxilato seleccionado fue el DIAD, la fosfina fue trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) y el pronucleófilo, la ftalimida.

El mecanismo de esta reacción sigue siendo objeto de estudio, sin embargo, se ha propuesto un mecanismo ampliamente aceptado reportado en Swamy K.C et al.<sup>16</sup> El primer paso en este mecanismo es la adición nucleofílica de la PPh<sub>3</sub> al

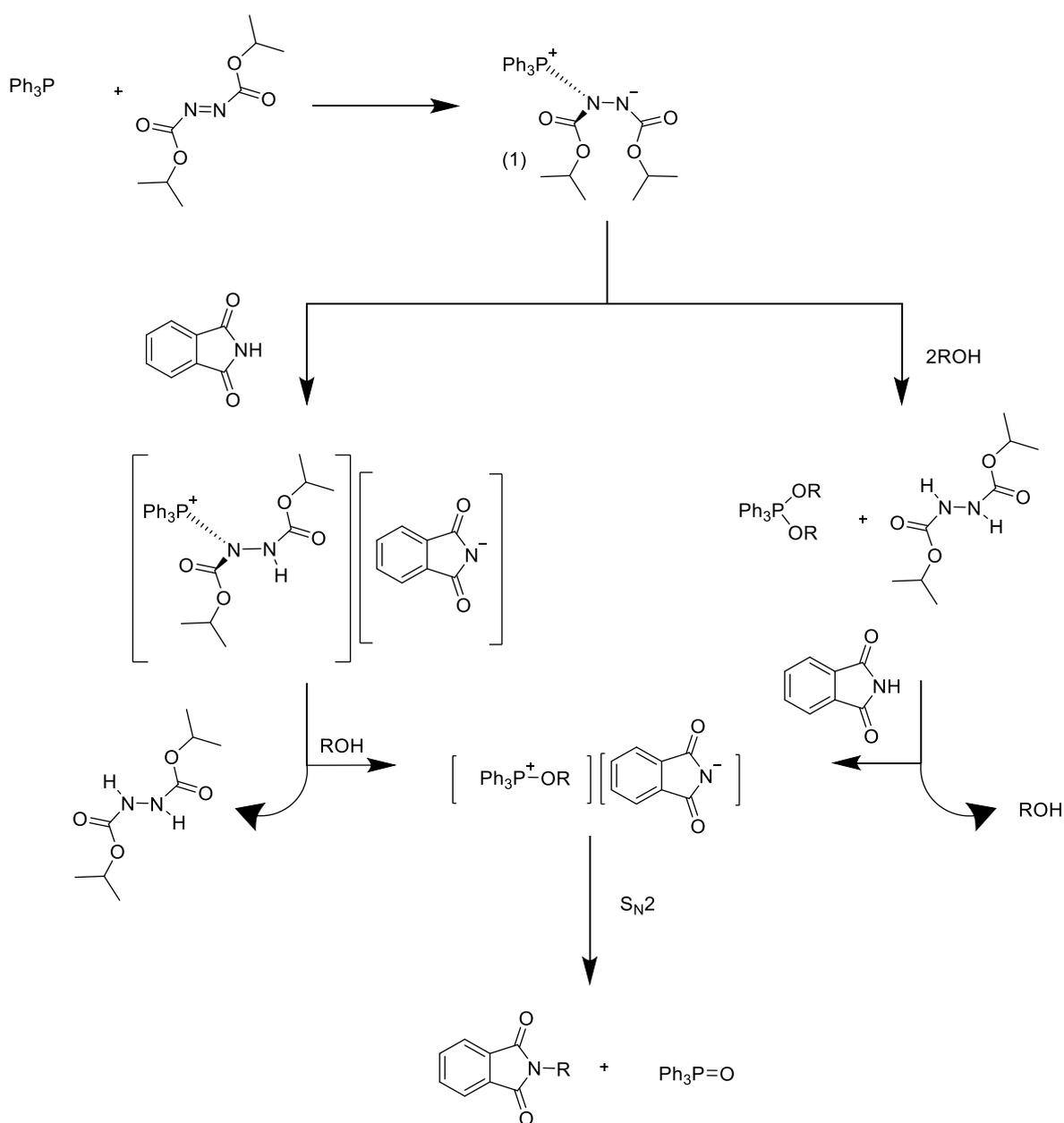
13 Sen S.E.; Roach S.L. *Synthesis*, **1995**, 7, 756-758.

14 Munawar, S.; Zahoor, A. F.; Ali, S.; Javed, S.; Irfan, M.; Irfan, A.; Kotwica-Mojzych, K.; Mojzych, M. *Molecules* **2022**, 27 (20), 6953.

15 Marvin, C. C. 6.02 Synthesis of Amines and Ammonium Salts. In *Comprehensive Organic Synthesis*; Elsevier, **2014**; pp 34–99.

16 Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (6), 2551–2651.

DIAD para formar el intermediario (1). En este punto los autores proponen dos rutas, una donde el intermediario (1) desprotona al nucleófilo y la otra donde (1) reacciona con 2 moléculas del alcohol. El ataque del nucleófilo transcurre por un mecanismo  $S_N2$ , lo que conlleva una inversión en la configuración absoluta del producto final en el caso de que se trate de un alcohol secundario quiral (ver mecanismo en el esquema 3.5).



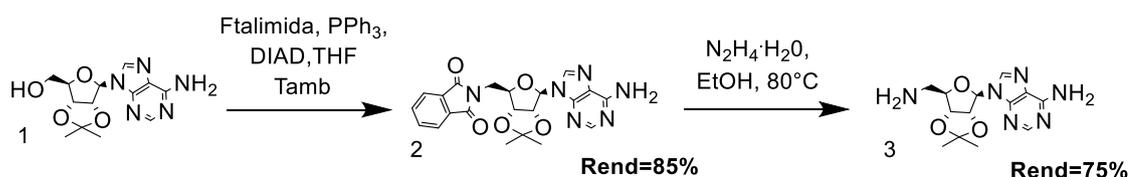
Esquema 3.5: Mecanismo adaptado a partir del reportado.<sup>15,16</sup>

Se sintetizó de esta forma el compuesto **2** y el compuesto **3** con buenos rendimientos.

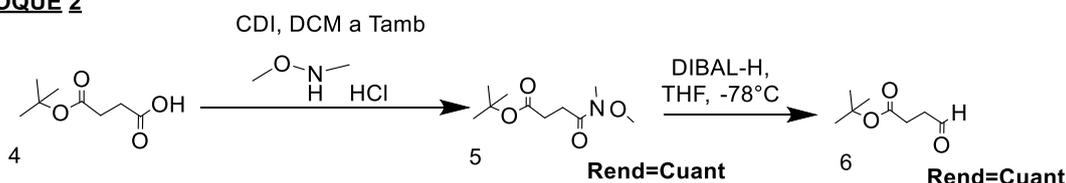
La continuación de esta ruta sintética se llevó a cabo en una pasantía en el grupo de la Prof. Dra. Tanja Schirmeister de la Universidad de Mainz, Alemania.

Como parte de esta pasantía y siguiendo las condiciones ya establecidas por el grupo AK Schirmeister,<sup>10</sup> se plantea la ruta sintética del bloque 2 partiendo del ácido 4-(tert-butoxi)-4-oxobutanoico (**4**) para formar la amida del tipo Weinreb (amida a partir del clorhidrato N,O-dimetilhidroxilamina) y luego realizar una reducción de la amida de Weinreb con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) para la obtención del aldehído **6**, (Esquema 3.6).<sup>17</sup>

#### BLOQUE 1



#### BLOQUE 2



Esquema 3.6: Obtención de Bloque 1 y Bloque 2 de la ruta sintética 2. Realizado en la Universidad de Mainz

Dado que al momento de realizar la amida de Weinreb en nuestro laboratorio no se contaba con reactivo CDI para la formación de la N,O-dimetilhidroxilamida (**5**), se decidió realizar la optimización para su obtención utilizando otras condiciones reportadas para la formación de amidas, Tabla 3.3.<sup>18</sup>

17 Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Letters*, **1981**, 22, 39, 3815-3818.

18 Martínez, V.; Davyt, D. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, 24 (24), 1572–1575.

	Condiciones	Resultado	Observaciones
i	HBTU, DIPEA, N,O-dimetilhidroxilamina clorhidrato , DMF, atm N <sub>2</sub>	ND	-
ii	DIPEA, Cloroformiato de etilo, N,O-dimetilhidroxilamina clorhidrato, THF seco a 0°C	ND	Se observa la formación de anhídrido
iii	DIPEA, Cloroformiato de etilo, N,O-dimetilhidroxilamina clorhidrato (disuelto en DCM seco y DIPEA), DCM seco a 0°C	Rend=89%	Se observa la formación de anhídrido

Tablas 3.3: Condiciones para la formación de la amida de Weinreb, compuesto 5.

Dado que CDI es utilizado como agente acoplante en la síntesis de péptidos,<sup>19</sup> decidimos probar con otro agente acoplante: el HBTU. Al utilizar estas condiciones no observamos avance de la reacción por TLC.

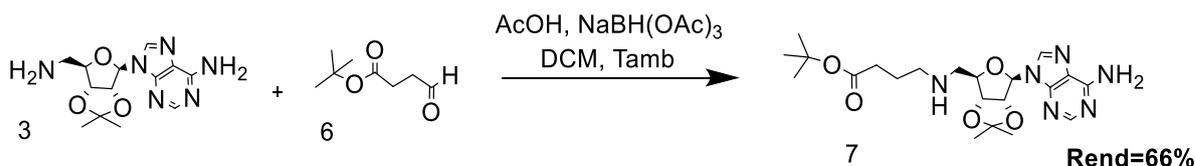
Luego se decidió explorar la síntesis de la N,O-dimetilhidroxilamida de interés a partir de la formación del anhídrido del compuesto 4 utilizando DIPEA y cloroformiato de etilo. La formación del compuesto 5 ocurre a partir del ataque del nitrógeno de la N,O-dimetilhidroxilamina al anhídrido formado.

Al realizar esta reacción según las condiciones ii se observó la formación del anhídrido correspondiente por TLC, por lo que se prosiguió al agregado de la N,O-dimetilhidroxilamina clorhidrato y se dejó con agitación toda la noche. Al día siguiente, se realizó una TLC no observándose la formación del compuesto 5. Dado que, al llevar a cabo esta reacción, se notó que al agregar la N,O-dimetilhidroxilamina clorhidrato no se disolvió en el medio de reacción, se decidió repetir la reacción con el agregado de la N,O-dimetilhidroxilamina disuelto en DCM seco y DIPEA. Con estas condiciones, descritas en el punto iii, se obtuvo

19 Anderson, N. G. Reagent Selection. In Practical Process Research and Development; *Elsevier*, 2012; pp 89–120.

el compuesto **5**. El rendimiento obtenido se consideró apropiado para continuar la síntesis del bloque 2 con el producto sin mayor purificación.

Una vez optimizados los dos bloques sintéticos, se procedió a la convergencia de ambos bloques a través de una aminación reductiva. (Esquema 3.7).

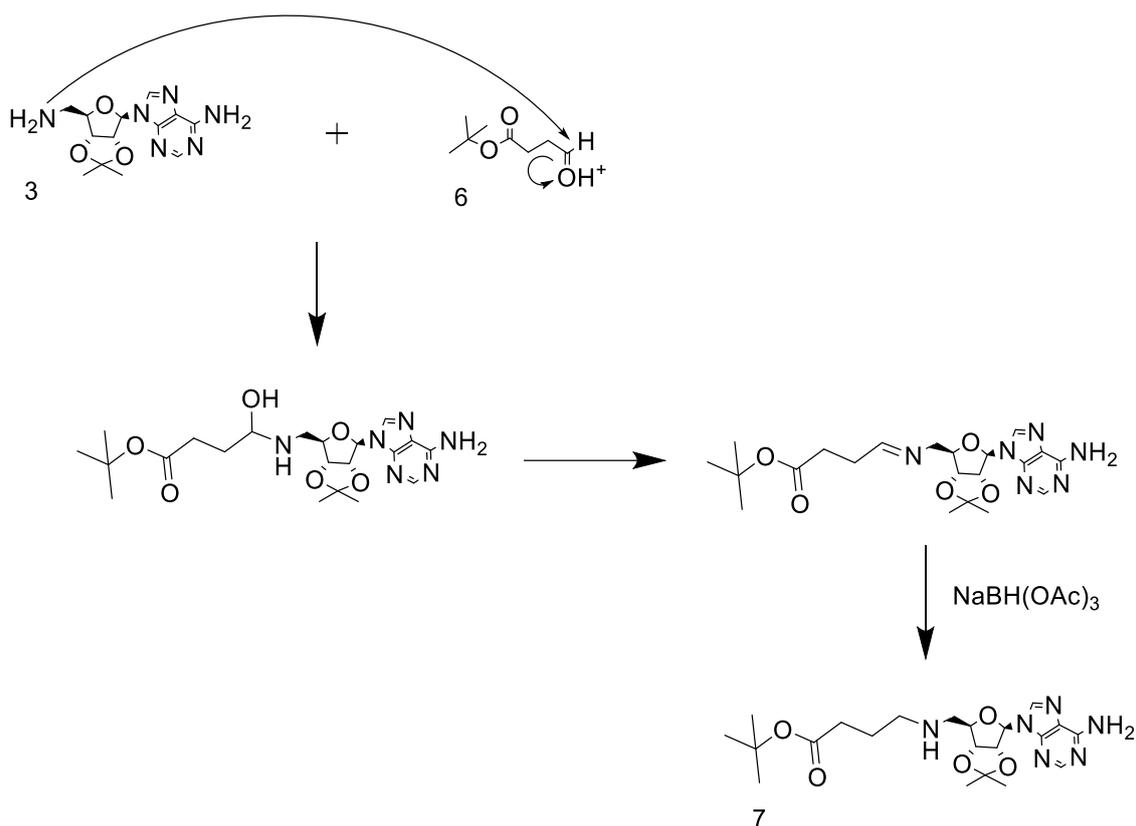


Esquema 3.7: Aminación reductiva, convergencia del bloque 1 y el bloque 2.

Esta reacción se emplea ampliamente en la síntesis de fármacos,<sup>20</sup> para la formación de enlaces C-N a partir de una amina y un compuesto carbonílico. En este caso, al tratarse de la amina primaria **3** y el aldehído **6** forman un heminal que luego pierde una molécula de agua para formar la imina correspondiente. Esta imina es reducida por el  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  para producir la amina secundaria deseada **7**, con un rendimiento del 66%, (Esquema 3.8).

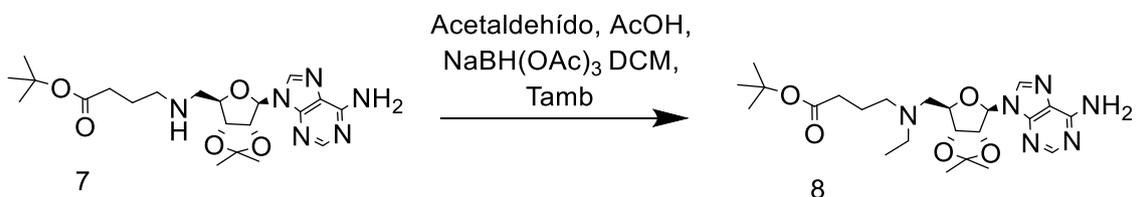
Al realizar el seguimiento de la reacción por TLC, se observó la formación del compuesto **7** y algunos compuestos secundarios. Uno de ellos se visualizó con  $R_f$  superior al del compuesto **7** y se pudieron aislar unos pocos mg, resultando en el compuesto disustituido. El otro compuesto secundario observado se presentó por debajo de la amina **3**. Si bien no se pudo aislar este compuesto se presume que puede ser un derivado de la amina **3** y/o del compuesto **7** al ocurrir la hidrólisis del acetónido con el ácido acético. Por otro lado, no se observó la desaparición total de la amina **3**. Si bien a partir de esta reacción se obtienen varios compuestos secundarios se consideró que un rendimiento de 66% es aceptable para continuar con la ruta sintética sin mayor optimización de las condiciones de reacción utilizadas.

20 Afanasyev, O. I.; Kuchuk, E.; Usanov, D. L.; Chusov, D. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (23), 11857–11911.



Esquema 3.8: Mecanismo de la reacción de aminación-reductiva

El próximo paso en la metodología de síntesis propuesta es la formación de la amina terciaria **8** a partir del compuesto **7**. Para esto realizamos una reacción de aminación reductiva con acetaldehído, la cual presentó inicialmente un rendimiento bajo. (Esquema 3.9). Se decidió, entonces, explorar otras reacciones para mejorar el rendimiento de obtención de **8**, (Tabla 3.3) y optimizar las condiciones de reacción de la misma.

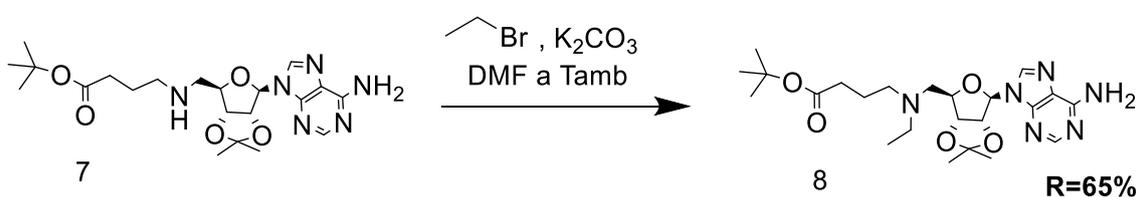


Esquema 3.9: Formación de la amina terciaria, síntesis del compuesto 8.

	Condiciones	Rendimiento de <b>8</b>
<b>i</b>	Acetaldehído (3 eq), AcOH (1,5 eq), NaBH(OAc) <sub>3</sub> (1.7 eq), 1,2-DCE	31%
<b>ii</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 eq), Bromuro de etilo (2 eq), DMF seco, atm N <sub>2</sub> por 24hs <sup>21</sup>	32%
<b>iii</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 eq), Bromuro de etilo (2 eq), DMF seco, atm N <sub>2</sub> por 72hs	65%

Tabla 3.3: Condiciones de reacciones utilizadas para la obtención del compuesto **8** y sus rendimientos.

A partir de los datos obtenidos, se observó que la aminación reductiva con acetaldehído no presentaba buenos rendimientos. Entonces, se seleccionaron las condiciones descritas en **iii** para la obtención del compuesto **8** con un rendimiento del 65%. (Esquema 3.10)



Esquema 3.10: Etilación del compuesto **7** para la obtención del compuesto de interés **8**.

Al realizar el seguimiento de la reacción por TLC, si bien se aprecia un avance de la reacción hacia los productos, la reacción no llega a completarse, observándose reactivo al comenzar el tratamiento (work-up) de la reacción.

21 Chang, C.-D.; Coward, J. K. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (5), 684–691.

Como se mencionó anteriormente, la amina de la purina no presenta una alta reactividad debido a la resonancia de su par de electrones en el anillo, por lo cual se espera que no se vea afectada durante la aminación reductiva o en la etilación del compuesto **7**. Se realizó y analizó la espectroscopia completa por RMN del compuesto obtenido con el fin de confirmar la estructura del compuesto **8** y comprobar que el NH<sub>2</sub> de la purina no fue afectado.

En las figuras 3.8 y 3.9 se presentan los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, HSQC-RMN y HMBC-RMN del compuesto **8**. En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN a 5,68 ppm se observa un singulete ancho que integra 2H que no presenta señal en el espectro de HSQC-RMN. En el espectro de HMBC-RMN, se puede observar la correlación del protón en 5,68 ppm con el carbono cuaternario 13, confirmando así que la señal corresponde al NH<sub>2</sub> de la adenosina. Esto sumado a que en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN se observan las señales correspondientes al etilo con la integración adecuada, nos lleva a concluir que la etilación ocurrió únicamente en la amina secundaria, obteniéndose el producto deseado.

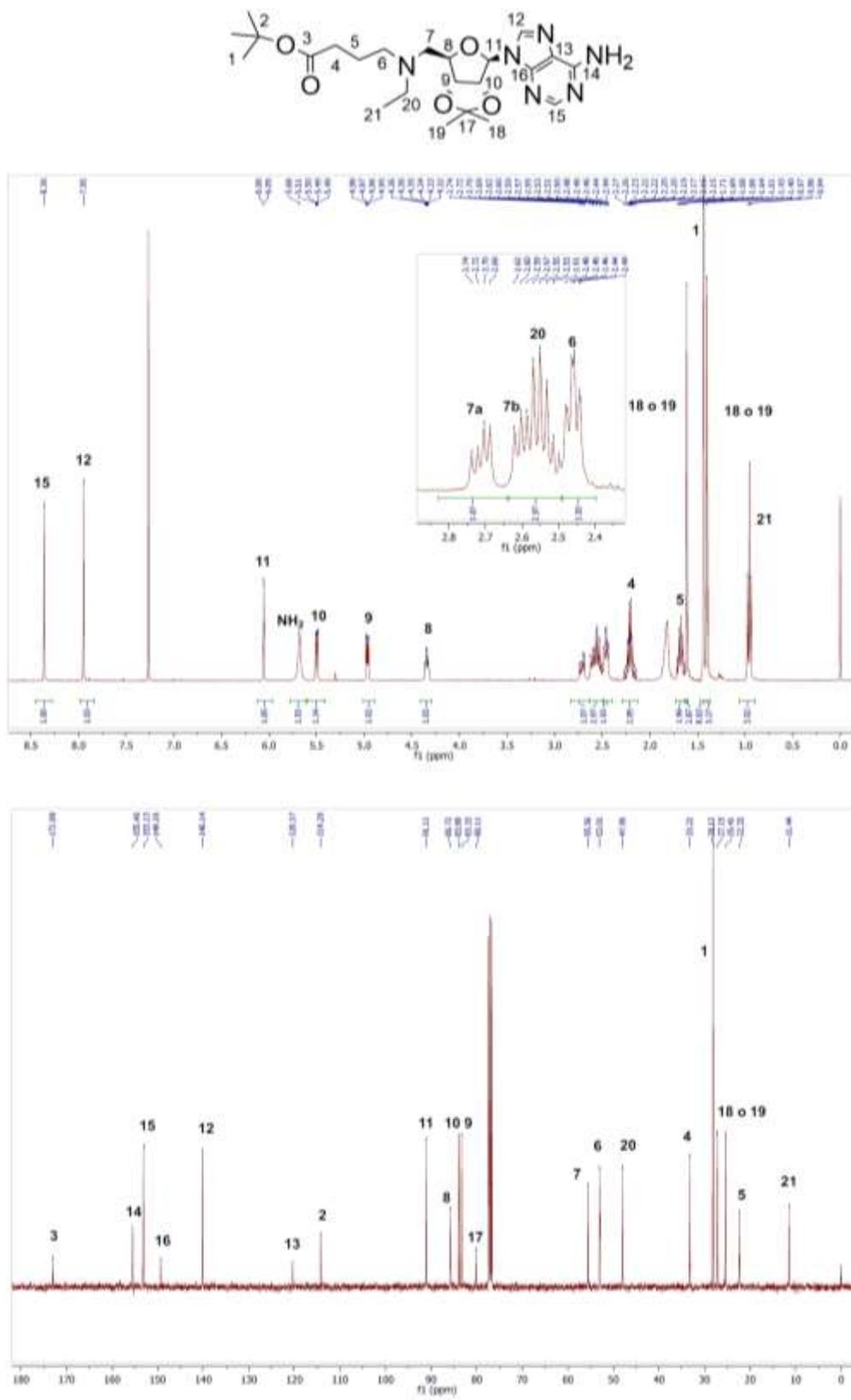


Figura 3.8: Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **8** asignados

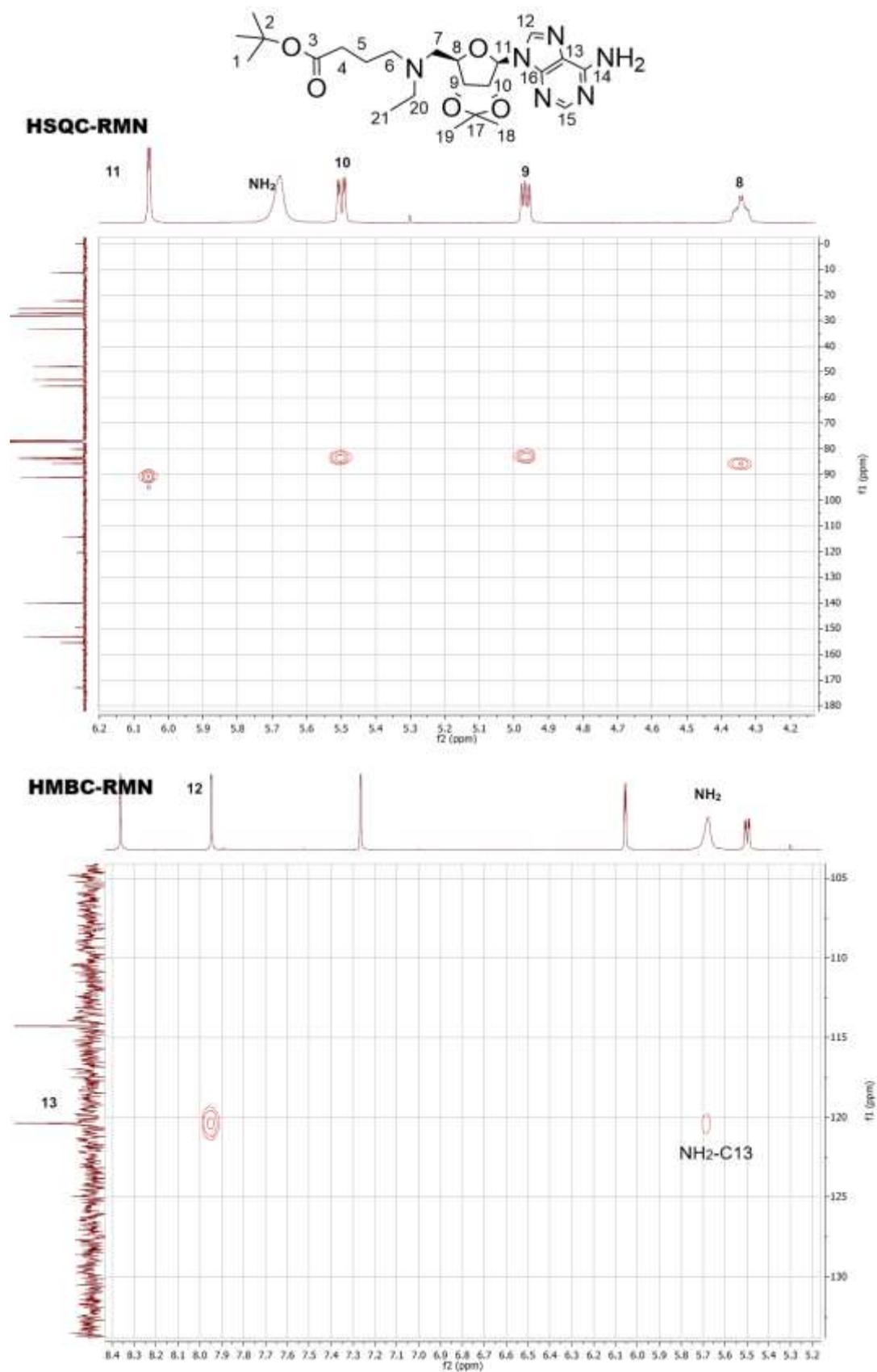


Figura 3.9: Espectros de HSQC-RMN y HMBC-RMN asignación del NH<sub>2</sub> de la adenosina en el compuesto **8**.

Una vez obtenido el compuesto **8**, se continuó con la hidrólisis del grupo acetónido y del tert-butil éster en medio ácido. Esta reacción se lleva a cabo con TFA en DCM y H<sub>2</sub>O. (Esquema 3.11)



Esquema 3.11: Hidrólisis en medio ácido del acetónido y el tert-butil éster para la obtención del compuesto **8**.

Para comprobar la pureza y la efectividad de la hidrólisis del grupo acetónido y del tert-butil éster, realizamos un espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O del compuesto obtenido. Nos encontramos con un espectro más complejo del esperado donde las señales del compuesto se presentaban como dos sets de señales. Esto puede tener dos posibles causas, una es la formación de un diasterómero a partir de la epimerización de alguno de los carbonos quirales que presenta la adenosina y la otra a la presencia de distintas conformaciones del compuesto.

Como la hidrólisis del grupo acetónido involucra a los átomos de oxígeno y no a los C2' y C3', la formación de diasterómeros del compuesto **9** no debería suceder. Por lo cual, nos inclinaríamos a pensar que la explicación más acertada sería la presencia de confórmeros.

Con el fin de confirmar lo mencionado, se realizaron espectros de <sup>1</sup>H-RMN a distintas temperaturas, uno de los espectros fue adquirido a 25°C y el otro a 60°C. Los confórmeros son distintas disposiciones de una molécula que existen en equilibrio dinámico debido a la rotación alrededor de enlaces sencillos. Este equilibrio se ve afectado con el aumento de la temperatura, ya que favorece que el intercambio entre ambas conformaciones ocurra a una mayor velocidad. En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN las señales se observan como un promedio ponderado de las especies colapsando ambos sets de señales en una sola. Esto puede apreciarse en la figura 3.10, donde se seleccionó la zona de aromáticos para evidenciar este efecto.

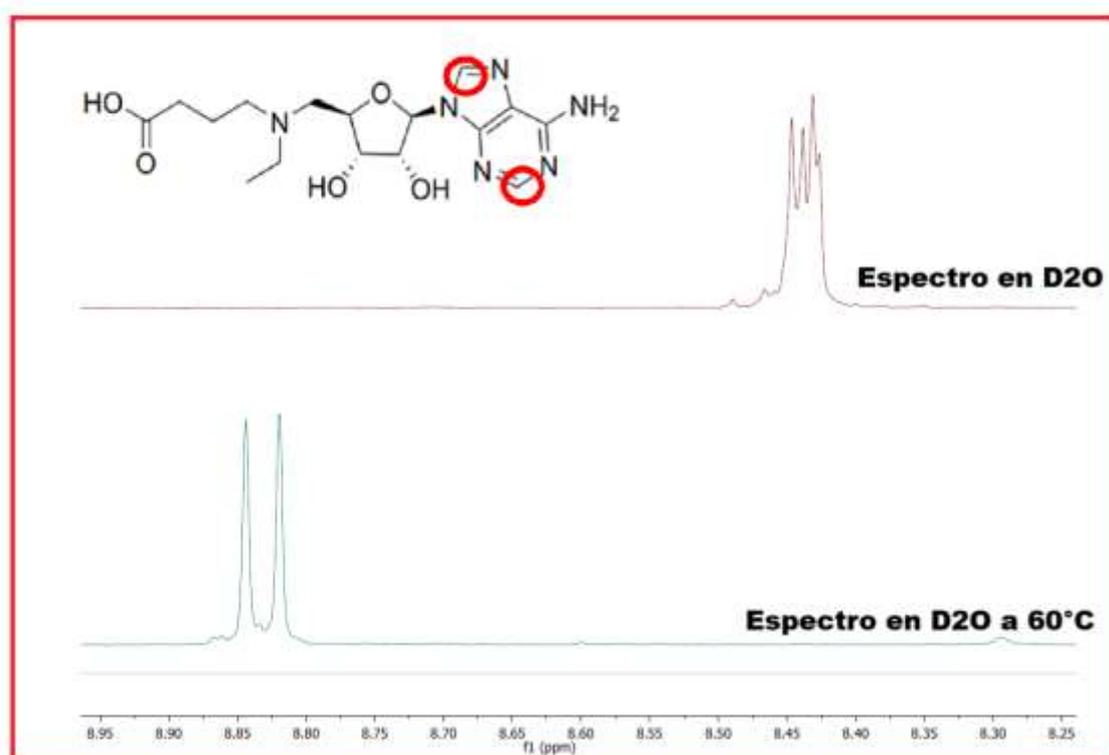
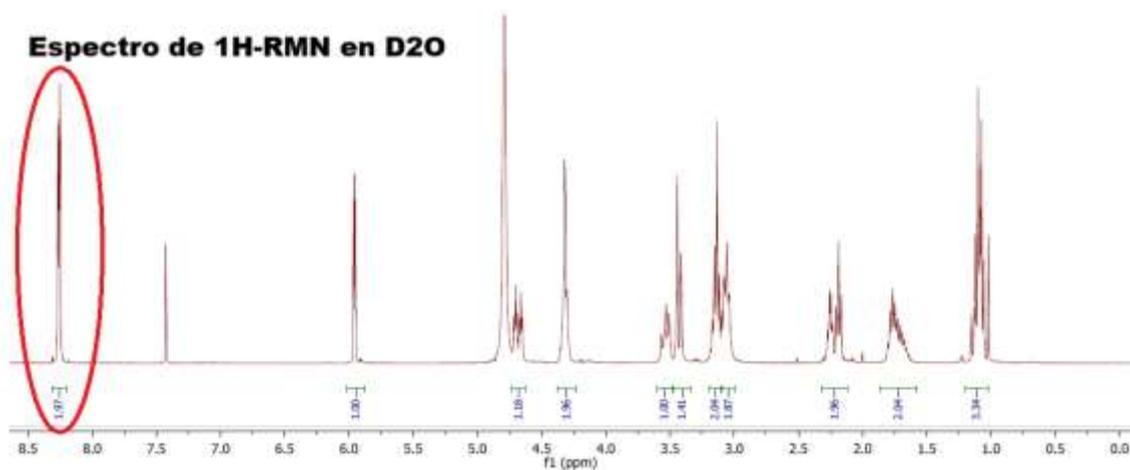


Figura 3.10: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **9** en  $\text{D}_2\text{O}$ , debajo se muestra una ampliación de la zona de aromáticos y se compara el espectro con el espectro tomado a  $60^\circ\text{C}$

A partir de estos resultados, se confirma que el compuesto **9** se presenta confórmeros en estas condiciones.

Una posible explicación para que el compuesto **9** presentara confórmeros es la formación del zwitterion a pH 7 (figura 3.11), lo que genera una carga negativa sobre el ácido carboxílico y una carga positiva sobre el nitrógeno de la amina terciaria. El ingreso de este protón puede ocurrir de dos formas, lo que podría generar que la interacción entre este y el carbonilo den lugar a los problemas conformacionales observados. En principio, esto podría determinarse realizando varios espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto a diferentes pH, con el fin de determinar si la formación del zwitterion genera el espectro observado. Otro factor que se debe de tener en cuenta es que la molécula del compuesto **9** presenta varios grupos funcionales que podrían dar lugar a enlaces de hidrógeno entre ellos o las moléculas de agua que los rodean resultado en las señales duplicadas observadas.

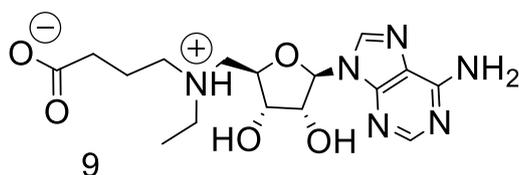
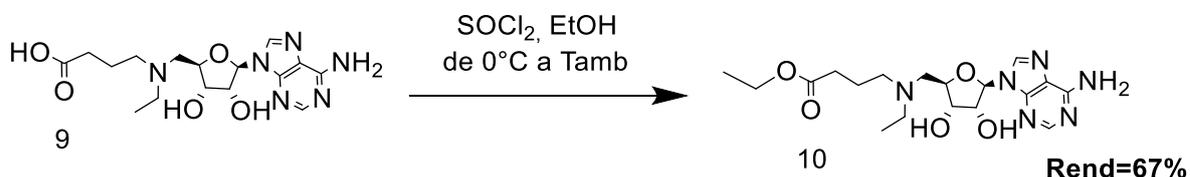


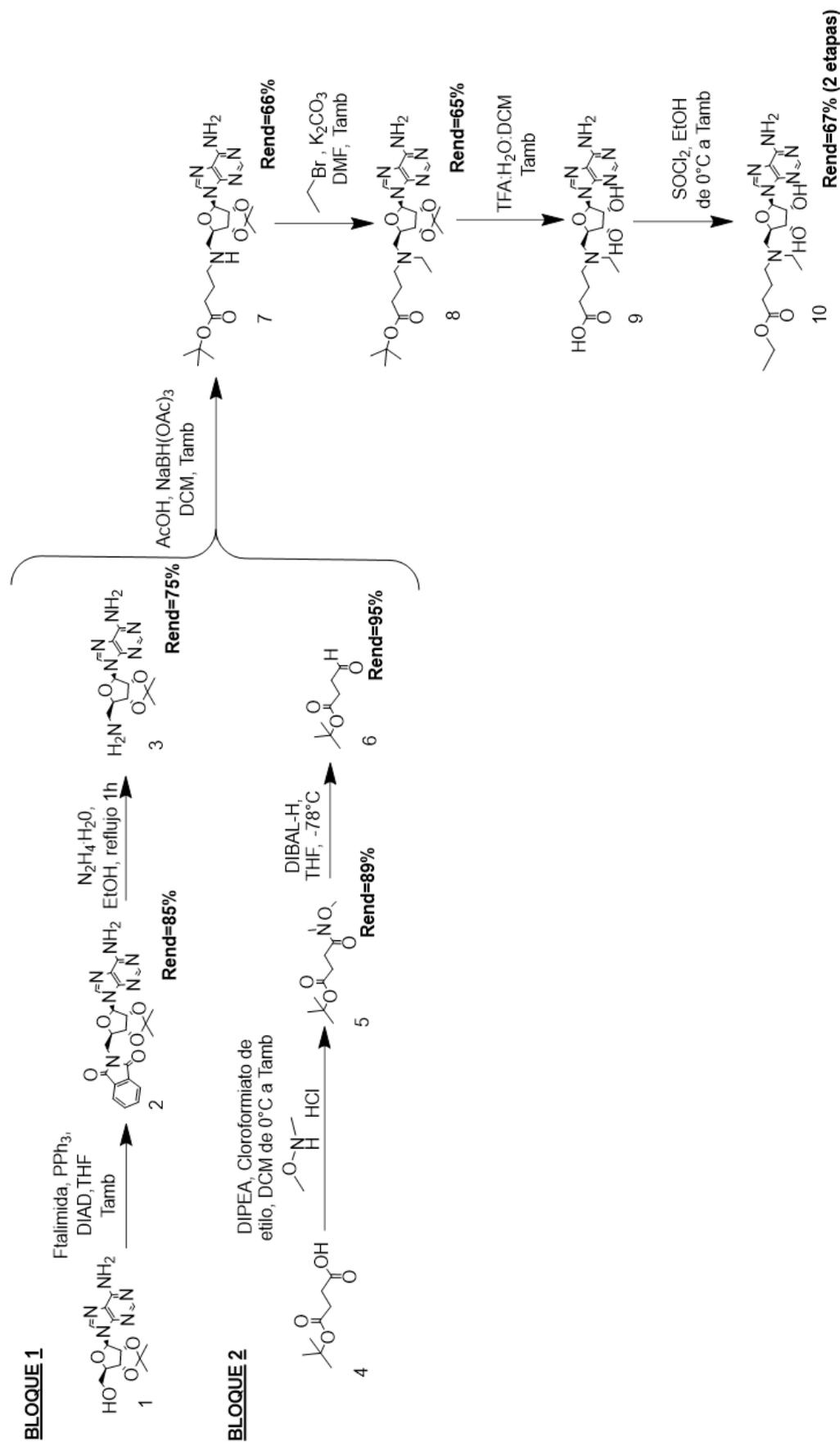
Figura 3.11: zwitterion a pH 7 del compuesto **9**

Luego de la obtención del compuesto **9** se llevó a cabo la formación del éster etílico a partir del cloruro de ácido formado in-situ con  $\text{SOCl}_2$  en EtOH, dando lugar al compuesto **10** con un rendimiento de 67%. (Esquema 3.12)



Esquema 3.12: Reacción de esterificación del compuesto **9** para la obtención del compuesto **10**.

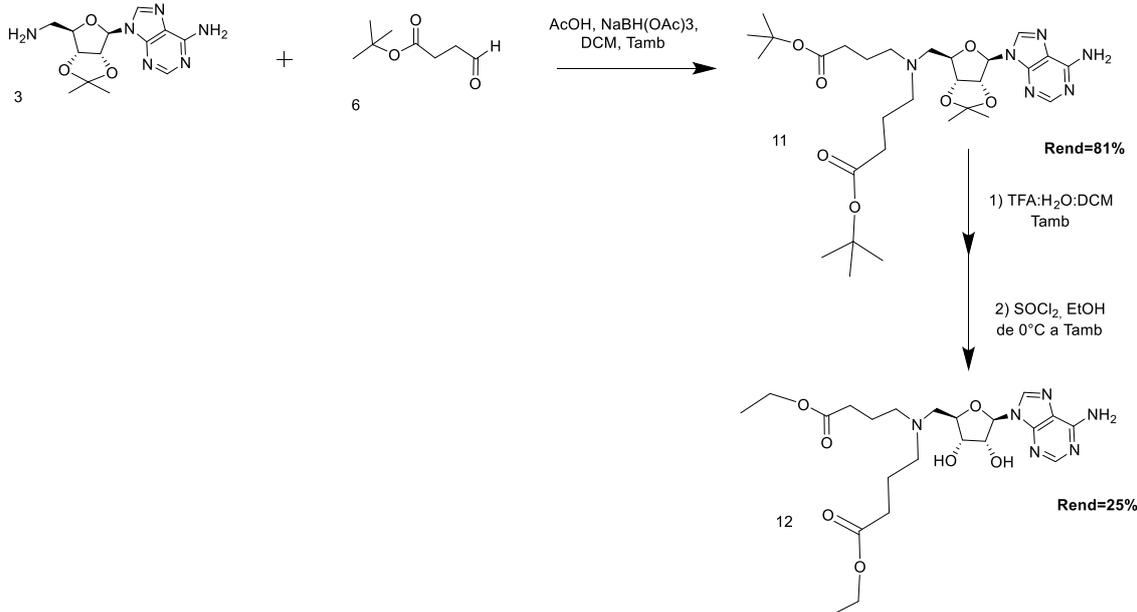
Con la síntesis del compuesto **10**, la ruta sintética 2 quedó finalizada. La misma se muestra en el esquema 3.13 con los rendimientos correspondientes para cada reacción.



Esquema 3.13: Ruta sintética 2: Síntesis del compuesto 10.

A partir de la propuesta de la ruta sintética 2, se pudieron sintetizar otros análogos a los planteados en el capítulo 2. Esto se debió a la puesta a punto de las condiciones de reacción utilizadas y la generación de productos secundarios en la optimización de la ruta sintética 2.

Uno de estos ejemplos es la obtención del compuesto **12**, que surge a partir de la aminación reductiva para la obtención de **7**. Al sintetizar este compuesto se obtuvieron unos pocos miligramos del compuesto disustituido **11**. A partir de esto, decidimos sintetizar el compuesto **11** a partir del compuesto **3** y el compuesto **6**, utilizando 2 equivalentes de este último. Obteniendo de esta manera el compuesto **11** con un 81% de rendimiento. El compuesto **11** fue sometido a la hidrólisis del tert-butil éster y del acetónido con TFA:H<sub>2</sub>O:DCM para luego formar el etiléster de interés con SOCl<sub>2</sub> en EtOH, obteniendo finalmente al compuesto **12** con un 25% de rendimiento luego de las dos reacciones (Esquema 3.14).



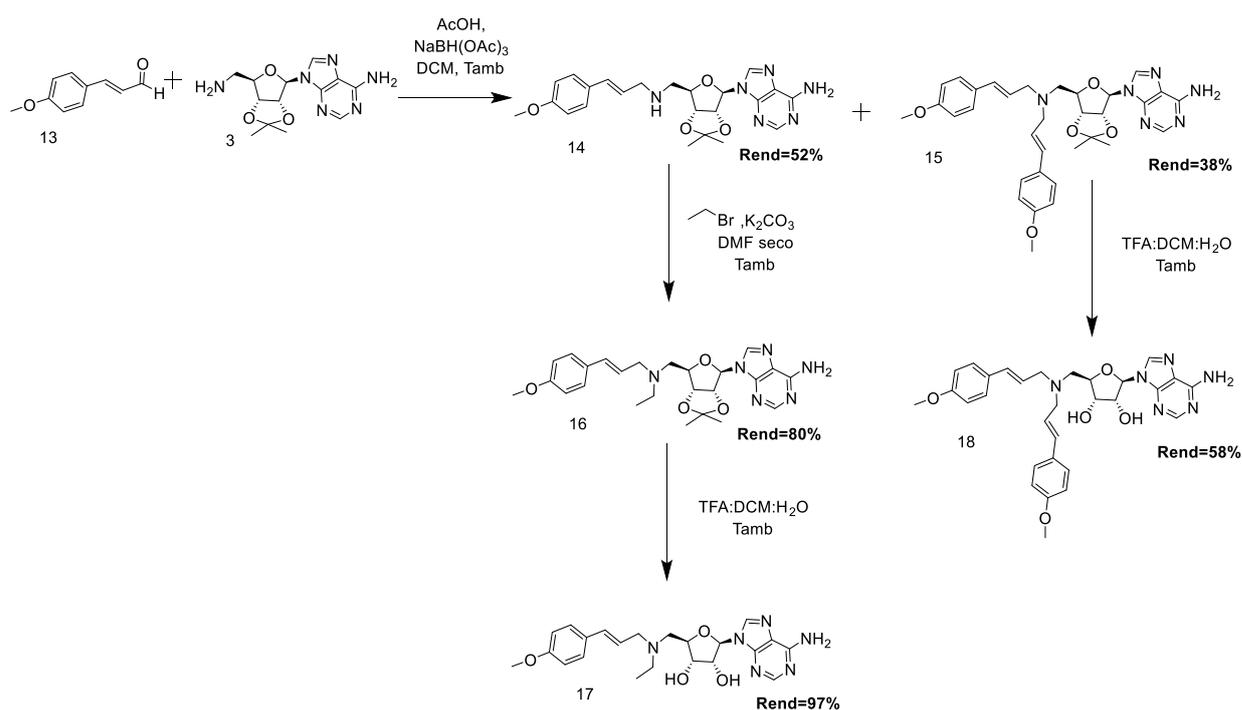
Esquema 3.14: Síntesis del compuesto **12**

Otro ejemplo fue el caso de los compuestos **17** y **18**, con la adquisición del agente reductor NaBH(OAc)<sub>3</sub> y el escalado en la síntesis del compuesto **3**, decidimos realizar la aminación reductiva entre el compuesto **3** y el 4-metoxicinamaldehído

(13) con el fin de poner a prueba las condiciones ensayadas con anterioridad. (Esquema 3.15)

A partir de esta reacción se obtuvieron el compuesto monosustituido (14) con un 52% de rendimiento y el compuesto disustituido (15) con un 38% de rendimiento. Se decide continuar según la ruta sintética 2 detallada anteriormente para la síntesis de los compuestos finales correspondientes.

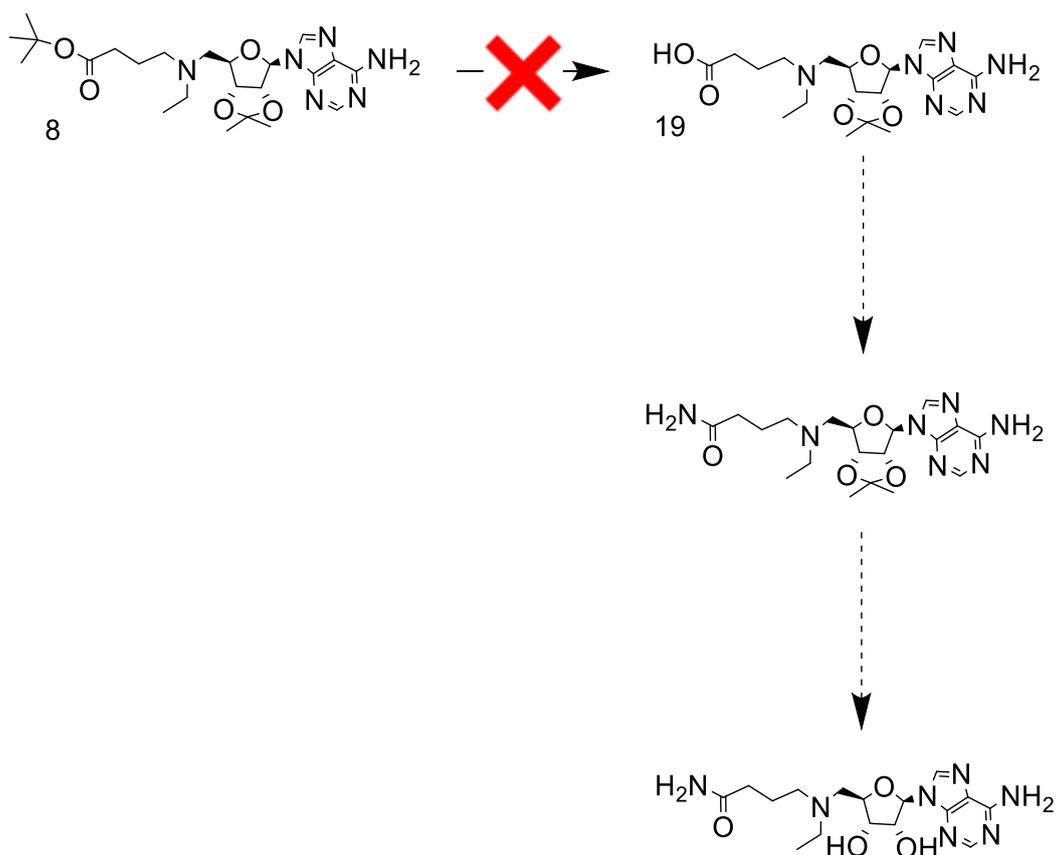
El compuesto 14 fue etilado según las condiciones optimizadas anteriormente obteniendo el compuesto 16 con un rendimiento de 80%. Posteriormente, este compuesto fue hidrolizado con TFA:H<sub>2</sub>O:DCM para dar lugar al compuesto final 17 con un rendimiento del 97%. Por otra parte, el acetónido del compuesto 15 fue hidrolizado en TFA:H<sub>2</sub>O:DCM para la obtención del compuesto final 18 con un rendimiento del 58%.



Esquema 3.15: Síntesis de los compuestos 17 y 18 a partir del compuesto 3.

### 3.3. Ruta sintética 3: Formación de la amida

Para la obtención del análogo que presenta la amida en vez del residuo aminoacídico se evaluó la posibilidad de obtenerlo a partir de la Ruta sintética 2, hidrolizando el éster del compuesto **8** para obtener el compuesto **19**. Según bibliografía,<sup>22</sup> los tert-butil esteres son estables en medio básico y se hidrolizan en medio ácido, especialmente con TFA, lo cual debido al acetónido, no es una opción factible (Esquema 3.16).



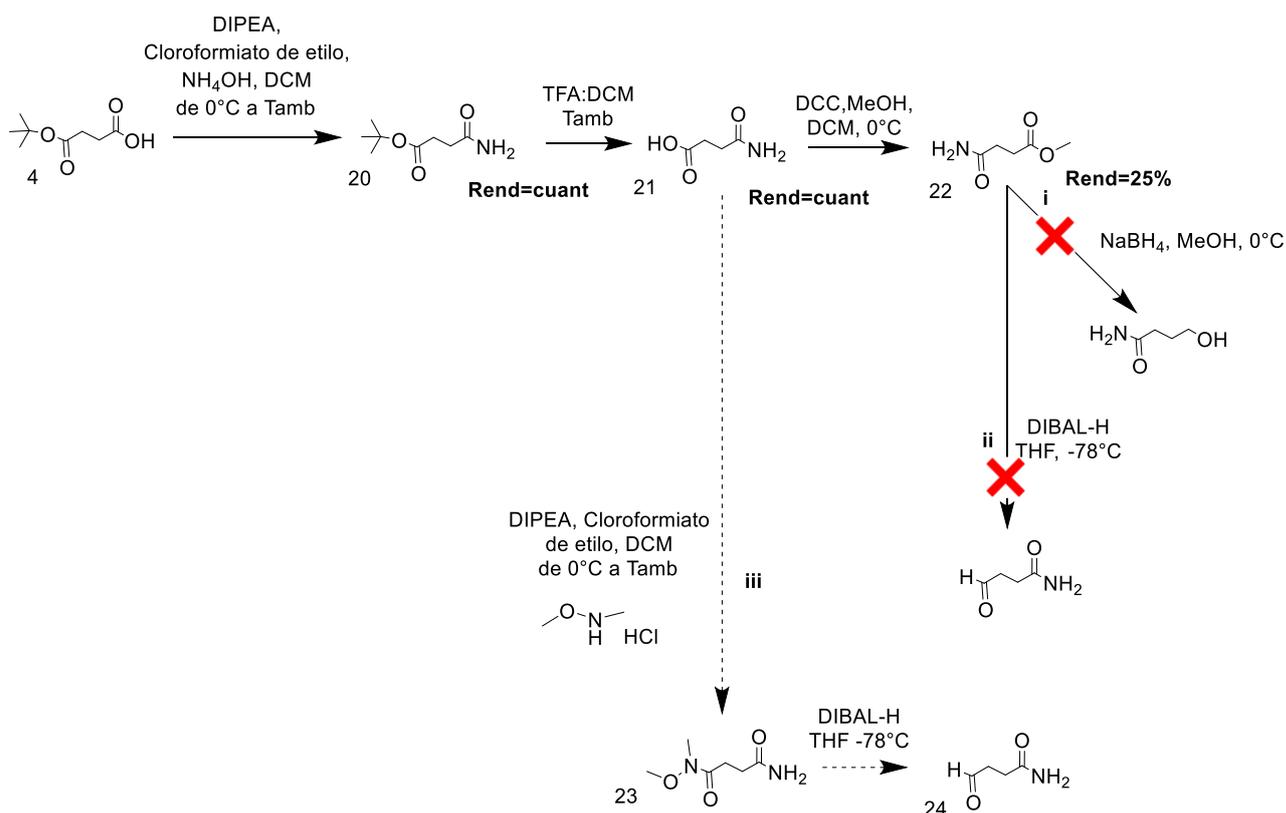
Esquema 3.16: Propuesta de síntesis para la formación del compuesto de interés.

Frente a esto, se planteó una nueva ruta sintética con diversas estrategias para la obtención del compuesto de interés. Todas estas estrategias tuvieron en común la síntesis de una amida primaria en uno de los extremos del **ácido 4-(tert-butoxi)-4-oxobutanoico (4)** y en el otro extremo la incorporación de un aldehído. La primera estrategia realizada comienza con la síntesis del compuesto **20** utilizando las condiciones optimizadas para la síntesis del

<sup>22</sup> *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 1st ed.; Wuts, P. G. M., Ed.; Wiley, 2014.

compuesto **5** utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  en vez del clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina. Se continuó con la síntesis del compuesto **21** a partir de la hidrólisis del éster en medio ácido con TFA. A partir de la síntesis del compuesto **21** se ensayaron 3 estrategias. Se comenzó con la obtención de compuesto **22** a partir de una esterificación con DCC y MeOH en DCM del compuesto **21**. Este compuesto se trató de reducir al alcohol correspondiente utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor sin resultado. Las condiciones utilizadas fueron las reportadas por Bianco, A et al,<sup>23</sup> donde utilizan  $\text{NaBH}_4$  para reducir el éster etílico del ácido 4-metoxi-4-oxobutanoico a alcohol obteniendo así el ácido 4-hidroxi-4-oxobutanoico.

En la estrategia ii, se intentó sintetizar el aldehído derivado de **22** utilizando DIBAL-H,<sup>24</sup> nuevamente sin resultado positivo. Únicamente la estrategia iii mostró resultados alentadores (Esquema 3.17).

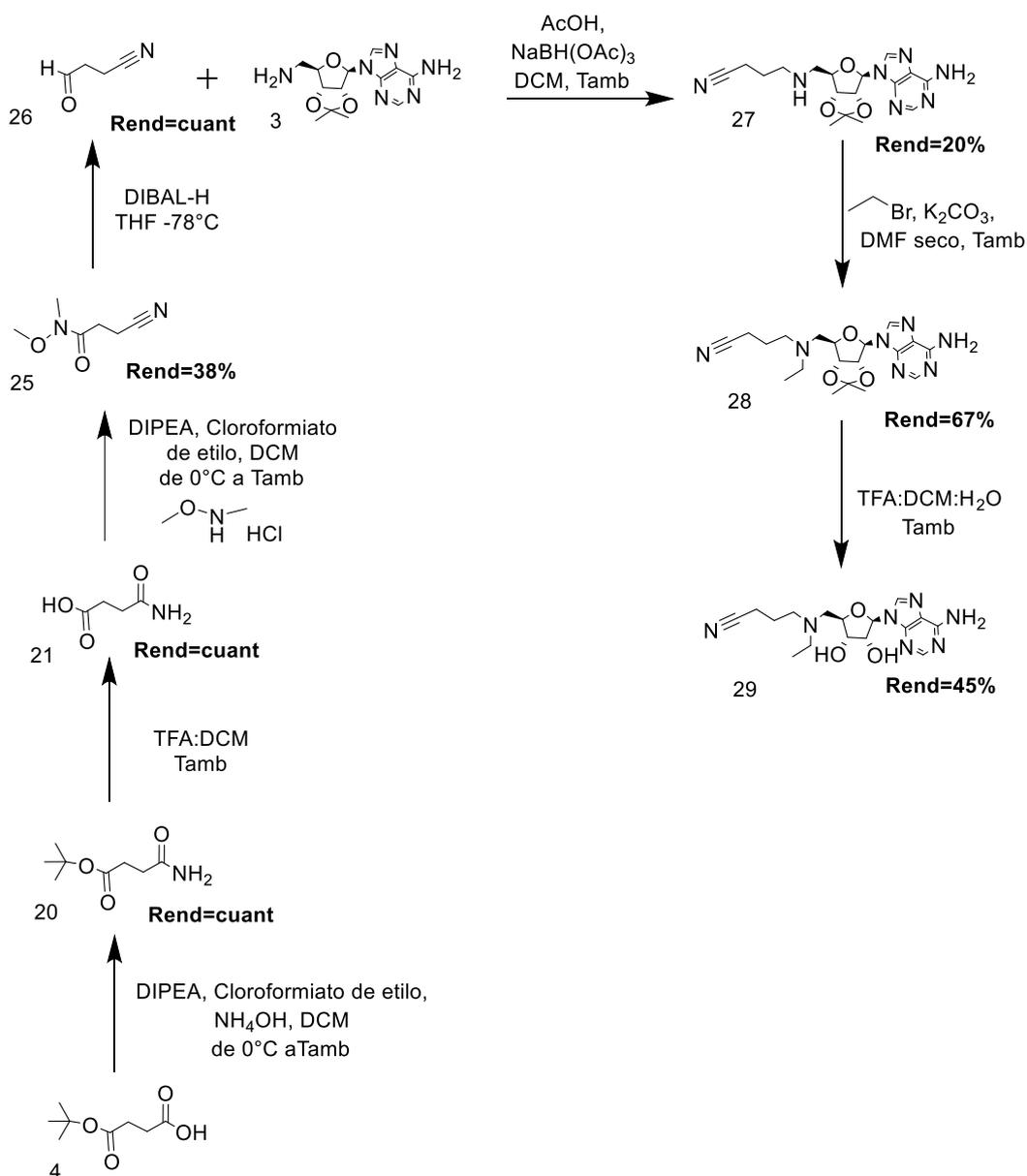


Esquema 3.17: Estrategias propuestas para la síntesis del 4-oxobutanamida **23**.

23 Bianco, A.; Passacantilli, P.; Righi, G. Improved Procedure for the Reduction of Esters to Alcohols by Sodium Borohydride. *Synth. Commun.* **1988**, *18* (15), 1765–1771.

24 Heo, Y. J.; Kim, H. T.; Jaladi, A. K.; An, D. K. *RSC Adv.* **2021**, *11* (53), 33809–33813.

En esta estrategia se formó el aldehído a partir de la amida tipo Weinreb análogo a la síntesis de **6**. A partir del análisis de los espectros de RMN, concluimos que el producto obtenido no era la amida **23** sino el nitrilo **25** (Esquema 3.18), ya que en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN no se apreciaba el carbono cuaternario correspondiente a un grupo carbonilo (175 ppm) sino que se observaba un C cuaternario a 118 ppm característico de CN. No se realizó la purificación del compuesto **25** ya que se consideró una pureza aceptable, con un 38% de rendimiento luego de tres reacciones. A pesar de estos resultados inesperados, se continuó con los siguientes pasos de síntesis para obtener el compuesto final **29**, utilizando las condiciones optimizadas en la ruta sintética 2.



Esquema 3.18: Síntesis del compuesto **29**, Ruta sintética 3.

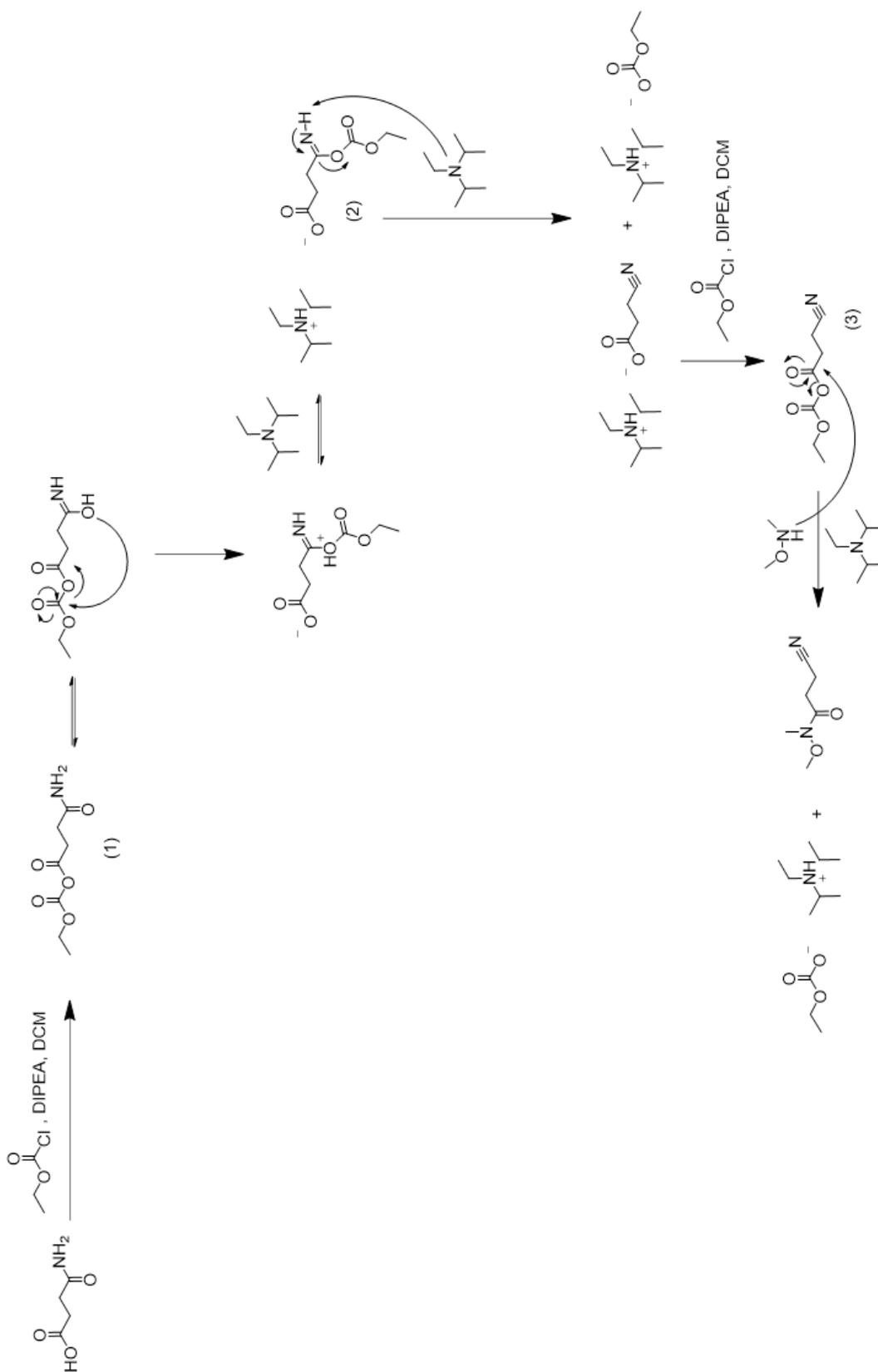
Se propone que la formación del nitrilo del compuesto **25** ocurriría según el mecanismo de reacción que se muestra en el esquema 3.19. Este mecanismo se basa en el mecanismo propuesto para la síntesis de nitrilos a partir de amidas con anhídrido trifluoroacético y piridina, por ejemplo, el mecanismo publicado por Gao, Z. et al.<sup>25</sup> y Xiong, J. et al.<sup>26</sup>

El primer paso es la formación del anhídrido del compuesto **24** al reaccionar este con el cloroformiato de etilo, compuesto (1). Este compuesto (1) experimenta un equilibrio tautomérico entre la amida y la imina-alcohol correspondiente. Este grupo hidroxilo atacaría al anhídrido formado para dar lugar al intermediario (2), el cual da lugar al grupo nitrilo observado. Adicionalmente el grupo carboxílico atacaría al cloroformiato de etilo nuevamente, dando lugar al anhídrido (3) que luego sería atacado por la N,O-dimetilhidroxilamina resultando en el compuesto **25** de interés. Ocurre así la formación de la N,O-dimetilamida de interés y la deshidratación de la amida para dar lugar al nitrilo observado, ver esquema 3.19.

---

25 Gao, Z.; Wang, M.; Wang, S.; Wang, Y.; Peng, R.; Yu, P.; Luo, Y. *R. Soc. Open Sci.* **2019**, 6 (3), 181751.

26 Xiong, J.; Hou, H.; Wang, B. *Molecules* **2024**, 29 (16), 3952.



Esquema 3.19: Mecanismo propuesto para la formación del compuesto **25**.

De los análogos planteados en el capítulo 2, fue posible la síntesis del análogo con R<sub>1</sub> como etiléster (compuesto **10**), pero no fue posible la obtención de R<sub>1</sub> como amida (figura 2.12). Sin embargo, a partir de las rutas sintéticas abordadas y de las optimizaciones realizadas se obtuvieron otros seis compuestos que no se habían propuesto al inicio. Este conjunto de siete compuestos formó la Serie A preliminar (Figura 3.11).

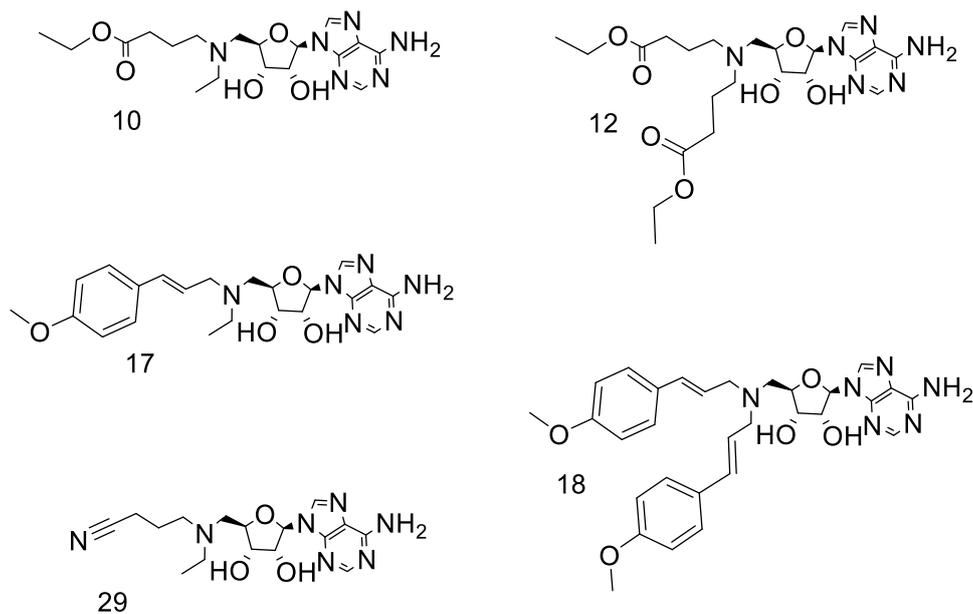


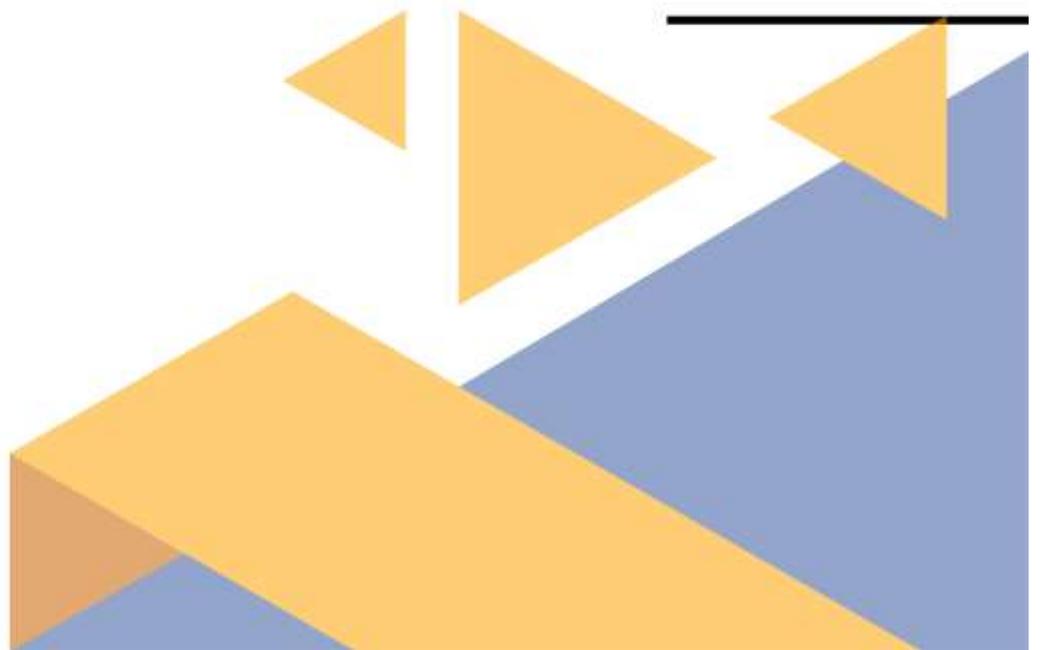
Figura 3.11: Serie A preliminar: Compuesto **10**, Compuesto **12**, Compuesto **18**, Compuesto **17**, Compuesto **29**.



# Capítulo 3:



## Parte Experimental



Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando solventes recientemente destilados. Las reacciones en condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno empleando solventes secos según literatura.<sup>27</sup>

Todos los rendimientos informados se refieren a productos espectroscópicamente puros (determinado mediante <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN). Para los compuestos que presentan impurezas conocidas, el rendimiento de la reacción se calculó en base al espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Advance NEO-400. Los desplazamientos químicos reportados son referenciados al TMS utilizado como referencia interna.

Las purificaciones por cromatografía en columna fueron realizadas con Silica gel 60M 0.04-0.063 mm.

Los seguimientos de reacción y de separaciones cromatográficas se realizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> sobre plástico.

La pureza de los productos finales se determinó utilizando un equipo HPLC analítico Shimadzu LC-2050C equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm). Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>O-0.1% de Ácido Fórmico y CH<sub>3</sub>CN. Las muestras se disolvieron en MeOH calidad HPLC. Las corridas se efectuaron en 16 min con el siguiente programa de gradiente de: 0-10 min (CH<sub>3</sub>CN 5% a 95%) de 10-13 min (CH<sub>3</sub>CN 95%) y de 13-16 min (CH<sub>3</sub>CN de 95% a 5%). Se reportaron los valores de pureza a 220 nm y 250 nm.

Los espectros de masas de alta resolución de estos compuestos se determinaron en el Instituto Pasteur de Montevideo en un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific, USA) por inyección directa (10 uL/min) usando 100% Metanol calidad HPLC como solvente y una fuente Ion Max API con una sonda HESI-II. Los espectros de masa fueron obtenidos en modo positivo con voltaje de spray de ion a 4.0 kV y una temperatura capilar de 250°C. El espectro

---

27 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. ed., reprinted.; Pergamon Press: Oxford, 1993.

obtenido en modo negativo se utilizó un voltaje de espray de ion a 2.5kV y una temperatura de 250°C

Por último, se determinó la desviación de luz polarizada en los compuestos finales utilizando un polarímetro Jasco P-2000 con lámpara de sodio a 589 nm. Se tomaron 3 medidas de 5 ciclos cada una y se reportó el promedio de estas. La temperatura varió de los 23.5°C a los 24.5°C a lo largo de las mediciones.

### **Metodologías generales:**

#### **A. Metodología general de aminación reductiva:**

A una suspensión de la amina **3** en THF o DCM se agregó 1 eq del aldehído de interés y AcOH (1 eq). Transcurrida una hora (o 30 min), se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.5 eq). Luego de 19hs se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con DCM. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y eliminó el solvente a presión reducida.

#### **B. Metodología general de etilación:**

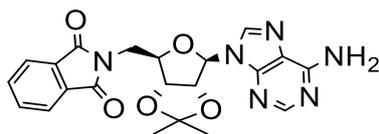
Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el compuesto a etilar en DMF seco. Se agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (2 eq) con agitación y posteriormente bromuro de etilo (2 eq) gota a gota. Transcurridos al menos 3 días, se corroboró la formación del producto de interés por TLC. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y eliminó el solvente a presión reducida.

#### **C. Metodología general de hidrólisis del éster y/o del acetónido:**

El compuesto de interés se disolvió en DCM, se agregó H<sub>2</sub>O y TFA. Se dejó la reacción con agitación toda una noche. La reacción se lleva a sequedad a presión reducida con posteriores lavados con CHCl<sub>3</sub> y AcOEt para eliminar el TFA.

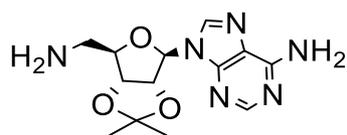
#### **D. Metodología general de esterificación a partir de la formación del cloruro de ácido in-situ:**

A una solución del compuesto de interés en EtOH absoluto, se agregó 5 eq de SOCl<sub>2</sub> gota a gota a 0°C en baño de hielo. Se dejó con agitación de un día para el otro, se eliminó el solvente a presión reducida y el residuo se lavó con CHCl<sub>3</sub>.



**2-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)metil)isoindolina-1,3-diona (2)**

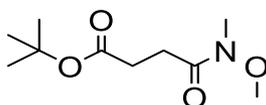
A una solución de **2',3'-O-Isopropilideneadenosina (1)** (5.0 g, 16.3 mmol) en 200 mL de THF se agregó ftalimida (4.8 g, 32.6 mmol, 2 eq) y PPh<sub>3</sub> (8.5 g, 32.6 mmol, 2 eq). Transcurridos 15 min se agregó DIAD (6.4 mL, 32.6 mmol, 2 eq) gota a gota. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición de **(1)**. Se evaporó el solvente a presión reducida. Se purificó el producto por cromatografía de columna (AcOEt: MeOH 5%) obteniendo **2** como un sólido blanco. (6.07 g, 85%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.07 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.79 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 2H), 6.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.89 (s, 2H- NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.54 (dd, *J* = 6.3, 1.8 Hz, 1H), 5.26 (dd, *J* = 6.3, 3.5 Hz, 1H), 4.55 (td, *J* = 6.3, 3.5 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 14.1, 6.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.07, 153.36, 150.74, 147.11, 138.30, 131.95, 129.86, 121.29, 118.24, 112.43, 88.64, 82.99, 82.04, 80.41, 37.40, 25.06, 23.36.



**9-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(aminometil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-amina (3)**

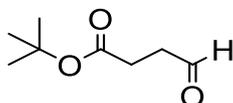
A una suspensión de **2** (1.0 g, 2.3 mmol) en 25 mL de EtOH absoluto se agregó hidrato de hidrazina (1.2 mL, 36.6 mmol, 16 eq) y se llevó a 80°C durante una hora. Se dejó enfriar la reacción y se filtró a vacío utilizando un embudo Büchner. Se eliminó el solvente a presión reducida. Se purificó por cromatografía de columna (DCM: MeOH 10% + 0,1% Et<sub>3</sub>N) obteniendo **3** como un sólido blanco. (550 mg, 78%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.38 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.35 (s, ancho, 2H- NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 6.14 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 6.3, 3.0 Hz, 1H), 5.03 (dd, *J* = 6.3, 3.0 Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 2.85 (dd superpuestos,

$J = 7.1, 6.4 \text{ Hz, 2H}$ ),  $1.55(\text{s}, 3\text{H})$ ,  $1.33 (\text{s}, 3\text{H})$ .  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  156.63, 153.18, 149.33, 140.55, 119.66, 113.76, 89.64, 86.18, 83.30, 82.04, 43.33, 27.50, 25.69.



#### 4-(metoxi(metil)amino)-4-oxobutanoato de terbutilo (5)

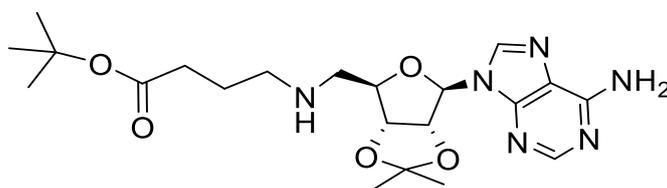
Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el **ácido 4-(tert-butoxi)-4-oxobutanoico (4)** (1.0 g, 5.8 mmol) en 20 mL de DCM seco. La reacción se llevó a  $0^\circ\text{C}$  con baño de hielo y se agregó DIPEA (1.5 mL, 8.7 mmol, 1.5 eq). Luego de 30 min se agregó cloroformiato de etilo (0.6 mL, 7.0 mmol, 1.2 eq). Transcurrida una hora se realizó una TLC para comprobar la formación del anhídrido correspondiente. Se agregó el Clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (832.0 mg, 8.7 mmol, 1.5 eq) disuelto en 5 mL DCM seco y 0,5 mL de DIPEA. Al día siguiente se agregó 20 mL de DCM y se extrajo con 60 mL de HCl 1M, 60 mL de  $\text{NaHCO}_3$  solución saturada y 60 mL de salmuera. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo **5** como un aceite amarillo. (1250 mg, cuant). Se decide continuar sin mayor purificación.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.72 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.70 (t,  $J = 7.0 \text{ Hz, 2H}$ ), 2.56 (t,  $J = 7.0 \text{ Hz, 2H}$ ), 1.45 (s, 9H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.71, 171.92, 80.07, 60.84, 29.42, 27.73, 27.70, 26.62.



#### 4-oxobutanoato de terbutilo (6)

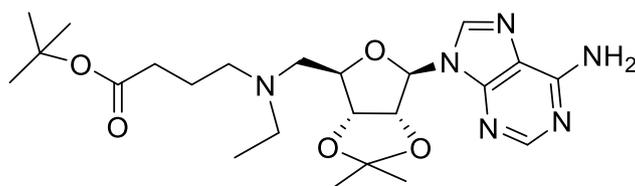
Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió **5** (1.2 g, 5.5 mmol) en 35 mL de THF seco. Se llevó a  $-78^\circ\text{C}$  y se agregó DIBAL-H 1M en THF (8.3 mL, 8.3 mmol, 1.5 eq) gota a gota. Luego de dos horas se agregó 2 mL de MeOH y 2 mL de una solución saturada de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se dejó a la reacción alcanzar temperatura ambiente lentamente y se agregó 28 mL de una solución saturada

de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se agregan 40 mL de HCl 1M y se extrajo con AcOEt (100 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 100 mL de HCl 1M, 100 mL de  $\text{NaHCO}_3$  solución saturada y 100 mL de salmuera. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo **6** como un líquido incoloro. (950 mg, cuant). Se decidió continuar sin mayor purificación.  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.81 (s, ancho, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.73 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.55 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  199.56, 170.67, 80.10, 37.90, 28.96, 27.21.



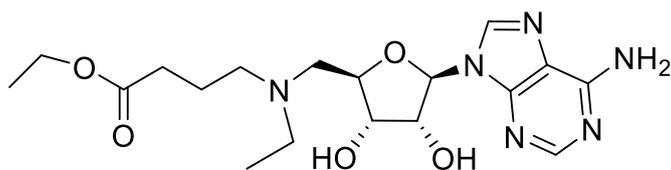
**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)amino)butanoato de terbutilo (7)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 3** (1.2 g, 3.9 mmol), **6** (619.0 mg, 3.9 mmol), AcOH (0.22 mL, 3.9 mmol) en THF (70 mL). A la media hora se agregó el  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (1079.0 mg, 5.1 mmol). Se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  (200 mL) y DCM (100 mL x 3). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 5% + 0.1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) obteniendo **7** como un aceite amarillo (1160 mg, 66%).  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.34 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 6.01 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 5.90 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.46 (dd,  $J = 6.4, 3$  Hz, 1H), 5.04 (dd,  $J = 6.4, 3.3$  Hz, 1H), 4.45 – 4.30 (m, 1H), 2.98 – 2.83 (m, 2H), 2.63 (qt,  $J = 11.7, 7.1$  Hz, 2H), 2.26 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.75 (p,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (s, 3H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**   $\delta$  172.86, 155.63, 153.16, 149.45, 139.93, 120.43, 114.59, 90.91, 85.50, 83.44, 82.28, 80.21, 51.25, 49.09, 33.29, 28.11, 27.31, 25.45, 25.30.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)(etilamino)butanoato de terbutilo (8)**

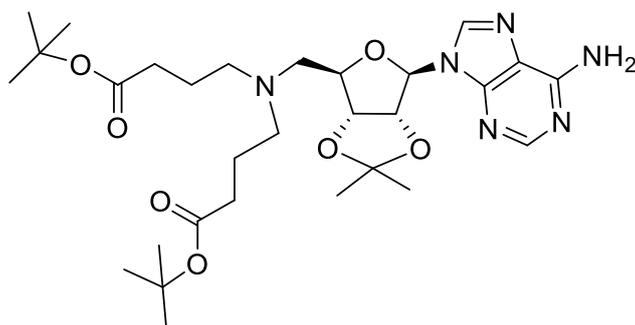
Se utilizaron condiciones descritas en **B. 7** (496 mg, 1.10 mmol),  $K_2CO_3$  (308 mg, 2.22 mmol), bromuro de etilo (0.16 mL, 2.22 mmol) en DMF seco (6 mL). Se extrajo con  $H_2O$  (60 mL) y AcOEt (30 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **8** como un aceite amarillo (342 mg, 65%).  **$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.36 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.06 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 5.68 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.50 (dd,  $J = 6.5, 2.2$  Hz, 1H), 4.97 (dd,  $J = 6.5, 3.2$  Hz, 1H), 4.34 (td,  $J = 6.8, 3.1$  Hz, 1H), 2.71 (dd,  $J = 13.4, 6.8$  Hz, 1H), 2.64 – 2.48 (m, 3H), 2.46 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.21 (td,  $J = 7.4, 4.9$  Hz, 2H), 1.68 (p,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 0.96 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  **$^{13}C$ -RMN** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172.98, 155.46, 153.13, 149.35, 140.14, 120.37, 114.26, 91.11, 85.72, 83.89, 83.33, 80.11, 55.56, 53.01, 47.95, 33.22, 28.12, 27.15, 25.41, 22.33, 11.44.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-yl)methyl)(etilamino)butanoato de etilo (10)**

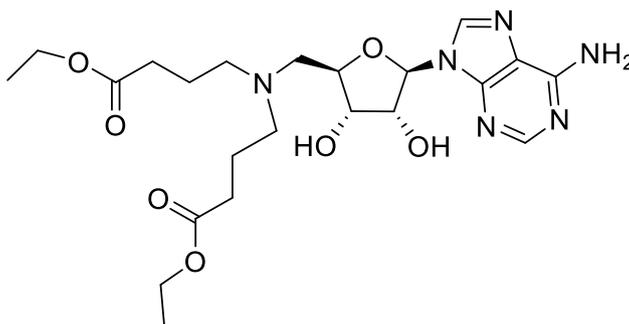
Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 8** (100.0 mg, 0.21 mmol) en DCM:  $H_2O$ : TFA (1.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtiene un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D. 9**,  $SOCl_2$  (0.1 mL) en 2 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna ( $CHCl_3$ : MeOH (1:1)) obteniendo **10** como un aceite incoloro (71 mg, 67%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **10** es de 72% (220 nm) y de 70% (250nm) con un tiempo de retención de 3.894 s.  **$^1H$ -RMN** (400 MHz, MeOD)

$\delta$  8.27 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.01 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 4.80 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 4.36 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.33 – 4.25 (m, 1H), 4.07 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.28 – 3.14 (m, 2H), 2.95 (q,  $J = 6.1, 5.5$  Hz, 2H), 2.92 – 2.84 (m, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.93 – 1.75 (m, 2H), 1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.16 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$ -RMN** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  171.76, 154.51, 151.03, 147.51, 138.98, 117.95, 88.31, 79.20, 71.47, 70.71, 58.73, 53.42, 50.78, 46.63, 29.22, 18.61, 11.57, 7.56. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 409.2194, observada 409.2190.  **$[\alpha]_D$** : 4.8453.



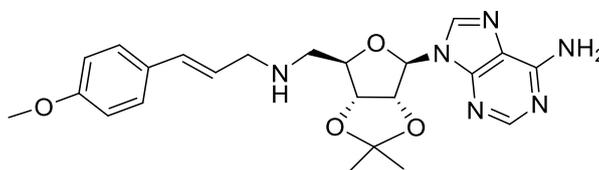
**4,4'-((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)metil)azanedi) dibutirato de diterbutilo (11)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 3** (100.0 mg, 0.3 mmol), **6** (103.0 mg, 0.6 mmol, 2 eq), AcOH (0.03 mL, 0.6 mmol, 2 eq) en THF (7 mL). A la hora se agregó el NaBH(OAc)<sub>3</sub> (207.0 mg, 0.98 mmol, 3 eq). Se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) y DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **11** como un aceite amarillo (144 mg, 81%).  **$^1\text{H}$ -RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.05 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 5.69 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.50 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.97 (dd,  $J = 6.4, 3.7$  Hz, 1H), 4.33 (s ancho, 1H), 2.85 – 2.55 (m, 2H), 2.54 – 2.38 (m, 4H), 2.20 (q,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 1.75 – 1.63 (m, 4H), 1.61 (s, 3H), 1.43 (s, 18H), 1.39 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$ -RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  175.65, 155.74, 152.60, 148.93, 140.01, 119.77, 114.62, 91.08, 84.80 (por HSQC-RMN), 83.86, 83.31, 80.38, 55.58, 53.31, 32.77, 28.09, 27.12, 25.40, 21.15.



**4,4'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metil)azanedil)dibutirato de dietilo (12)**

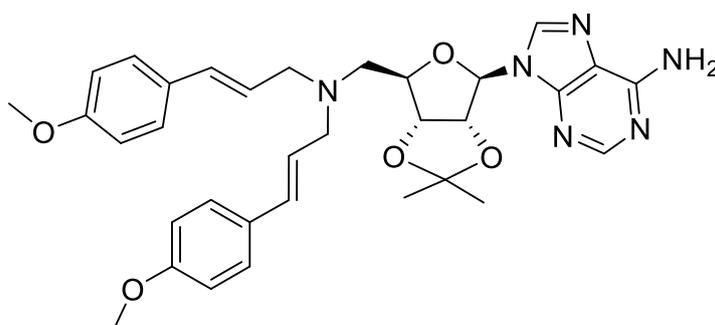
Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 11** (144.0 mg, 0.33 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (1.5 mL: 1.5 mL: 1.5 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtiene un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D. SOCl<sub>2</sub>** (0.12 mL) en 3 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>: MeOH (1:1)) obteniendo **12** como un aceite incoloro (41.3 mg, 25%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **12** es de 73% (220nm) y de 76% (250nm) con un tiempo de retención de 4.485 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.28 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 5.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.77 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.27 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.19-4.13 (m, 1H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.91 (dd, *J* = 14.1, 4.1 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 14.1, 7.5 Hz, 1H), 2.56 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.75 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 173.98, 155.94, 152.49, 149.19, 140.26, 119.30, 89.23, 82.78, 73.14, 72.14, 60.03, 56.03, 53.41, 31.22, 21.90, 13.13. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 495.2562, observada 495.2560. [ $\alpha$ <sub>D</sub>]: 0.8488.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((E)-3-(4-metoxifenil)alil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (14)**

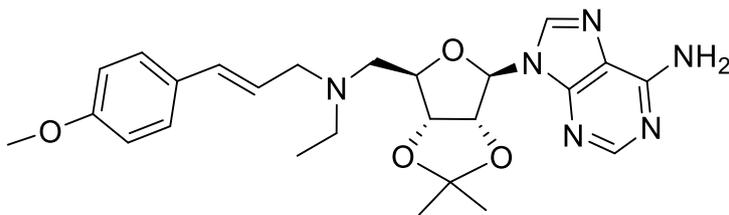
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 3** (200.0 mg, 0.65 mmol), **4-metoxicinamaldehído (13)** (106.0 mg, 0.65 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.65 mmol) en THF (14 mL), a la hora se agregó el NaBH(OAc)<sub>3</sub> (207.0 mg, 0.98 mmol). Se

extraído con NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) y DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo dos compuestos. Se observó el compuesto disustituido (**15**) como un aceite amarillo (150 mg, 38%) y el compuesto de interés **14**, como un aceite amarillo (170 mg, 58%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.34 – 7.24 (m, 2H), 6.95 – 6.75 (m, 2H), 6.45 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.11 (dt, *J* = 15.8, 6.4 Hz, 1H), 5.99 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.61 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.47 (dd, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.45-3.36 (m, 2H), 3.01 – 2.90 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.12, 155.51, 153.17, 149.45, 140.04, 131.28, 129.74, 127.46, 125.55, 120.52, 114.64, 114.00, 91.10, 85.39, 83.34, 82.29, 55.30, 51.97, 50.79, 27.34, 25.45.



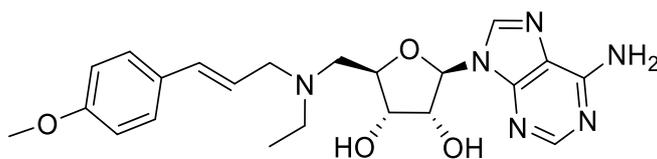
**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-((bis((*E*)-3-(4-metoxifenil)alil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (**15**)**

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.28-7.21 (m, 4H), 6.88 – 6.80 (m, 4H), 6.40 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 6.14 – 6.06 (m, 2H), 6.05 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.57 (s ancho, 2H), 5.41 (dd, *J* = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 4.98 (dd, *J* = 6.5, 3.6 Hz, 1H), 4.48-4.41 (m, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.32 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.87-2.84 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.12, 155.36, 153.09, 149.34, 139.98, 132.44, 129.75, 127.43, 124.49, 120.35, 114.45, 113.98, 90.79, 85.47, 83.98, 83.29, 57.13, 55.32 (2C, por HSCQ-RMN), 27.19, 25.44.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-((etil((E)-3-(4-metoxifenil)alil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (16)**

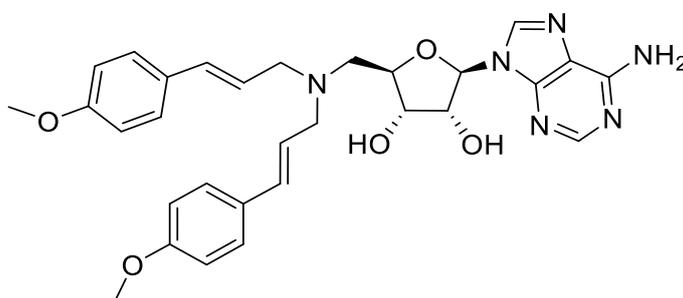
Se utilizaron condiciones descritas en **B. 14** (200.0 mg, 0.44 mmol),  $K_2CO_3$  (122.0 mg, 0.88 mmol), bromuro de etilo (0.07 mL, 0.88 mmol) en DMF seco (2 mL). Se extrajo con  $H_2O$  (60 mL) y AcOEt (60 mL x 3). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **16** como un aceite amarillo (170 mg, 80%).  **$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.29 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 6.86 – 6.79 (m, 2H), 6.38 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.14 – 6.00 (m, 2H), 5.81 (s ancho, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.44 (dd,  $J = 6.5, 2.2$  Hz, 1H), 4.99 (dd,  $J = 6.5, 3.6$  Hz, 1H), 4.47-4.39 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.35 – 3.25 (m, 2H), 2.85 – 2.70 (m, 2H), 2.64 (q,  $J = 7.0, 6.4$  Hz, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.02 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  **$^{13}C$ -RMN**  $\delta$  159.13, 155.51, 153.09, 149.30, 140.05, 132.42 (por HSCQ-RMN), 129.67, 127.43, 124.23 (por HSCQ-RMN), 120.35, 114.43, 113.97, 90.88, 85.42, 83.97, 83.29, 56.67, 55.31, 54.98, 48.17, 27.18, 25.43, 11.48.



**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-((etil((E)-3-(4-metoxifenil)alil)amino)metil)tetrahidrofuran-3,4-diol (17)**

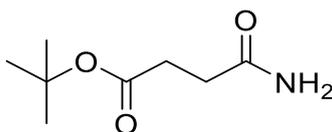
Se utilizaron condiciones descritas en **C. 17** (170 mg, 0.35 mmol) en DCM:  $H_2O$ : TFA (2 mL: 2 mL: 2 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 20%) obteniendo **17** como un aceite amarillo (150 mg, 97%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **17** es de 88% (220 nm) y de 98% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.520 s.  **$^1H$ -RMN** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.26 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.75 (d,  $J = 15.8$  Hz,

1H), 6.09 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 6.06 – 5.91 (m, 1H), 4.83 – 4.74 (m, 2H), 4.58 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.00 (d,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 3.85 (dd,  $J = 13.9, 10.1$  Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.59 (dd,  $J = 13.9, 2.1$  Hz, 1H), 3.35 (2H-asignado por COSY-RMN), 1.37 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$ -RMN** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  161.90, 157.51, 153.90, 150.16, 142.21, 141.80, 129.30, 129.19, 121.18, 115.16, 114.19, 92.29, 80.04 (por HSQC-RMN), 74.39, 73.71, 56.38 (por HSQC-RMN), 55.77, 55.01 (por HSQC-RMN), 49.85, 9.38. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 441.2245, observada 441.2250.  **$[\alpha]_D$** : -7.6385.



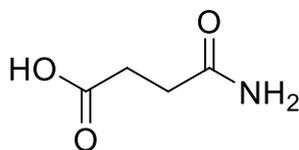
**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((bis((E)-3-(4-metoxifenil)alil)amino)metil)tetrahydrofuran-3,4-diol (18)**

Se utilizaron condiciones descritas en **C. 15** (200 mg, 0.33 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2 mL: 2 mL: 2 mL). Se purifica por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **18** como un aceite amarillo (96.8 mg, 58%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **18** es de 87% (220 nm) y de 98% (250 nm) con un tiempo de retención de 5.814 s.  **$^1\text{H}$ -RMN** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.26 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.35 – 7.16 (m, 4H), 6.88 (d,  $J = 8.6$  Hz, 4H), 6.76 (d,  $J = 15.8$  Hz, 2H), 6.15 – 6.03 (m, 3H), 4.72 (dd,  $J = 5.2, 3.6$  Hz, 1H), 4.63 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 4.55 – 4.48 (m, 1H), 4.12 – 3.95 (m, 4H), 3.86 (dd,  $J = 13.9, 9.9$  Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.62 (dd,  $J = 13.8, 1.9$  Hz, 1H).  **$^{13}\text{C}$ -RMN** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  160.56, 154.71 (por HMBC-RMN), 151.48, 147.94 (por HMBC-RMN), 141.12, 140.59, 127.97, 127.78, 119.33 (por HMBC-RMN), 113.79, 112.96, 91.16, 78.75, 73.21, 72.36, 55.60 (por HSQC-RMN), 54.38, 53.42. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 559.2664, observada 559.267.  **$[\alpha]_D$** : -0.6744.



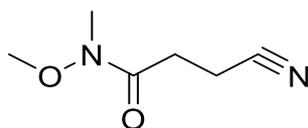
**4-amino-4-oxobutanoato de terbutilo (20)**

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el **ácido 4-(tert-butoxi)-4-oxobutanoico (4)** (1.0 g, 5.8 mmol) en 30 mL de DCM seco. La reacción se llevó a 0°C con baño de hielo y se agregó DIPEA (1.5 mL, 8.7 mmol, 1.5 eq). Luego de 30 min se agregó cloroformiato de etilo (0.6 mL, 7.0 mmol, 1.2 eq). Transcurrida una hora se realizó una TLC para comprobar la formación del anhídrido correspondiente y se agregó NH<sub>4</sub>OH 30% (2 mL). Se dejó la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Se agregaron 60 mL de agua y se extrajo con DCM (30 mL x 4). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo **20** como un aceite amarillo. (1297.2 mg, cuant). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.01 – 2.51 (m, 2H), 2.51 – 2.38 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.19, 172.30, 80.95, 30.61, 30.53, 28.07.



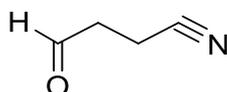
**Ácido 4-amino-4-oxobutanoico (21)**

Se utilizaron condiciones descriptas en **C. 20** (807.0 mg, 4.66 mmol) en DCM: TFA (5.0 mL: 5.0 mL). obteniendo **21** como un sólido blanco (545 mg, cuant). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, MeOD) δ 2.78 – 2.54 (m, 1H), 2.56 – 2.42 (m, 1H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, MeOD) δ 175.68, 173.54, 29.37, 28.60.



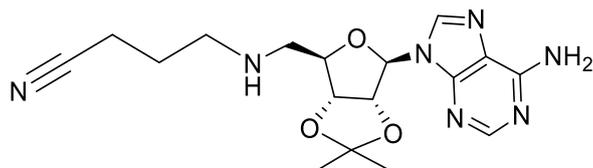
### 3-cyano-N-metoxi-N-metilpropanamida (25)

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió **21** (545.0 mg, 4.65 mmol) en 10 mL de DCM seco. La reacción se llevó a 0°C con baño de hielo y se agregó DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 1.5 eq). Luego de 30 min se agregó cloroformiato de etilo (0.5 mL, 5.6 mmol, 1.2 eq). Transcurrida una hora se realizó una TLC para comprobar la formación del anhídrido correspondiente. Se agregó el Clorhidrato de N,O-dimetilhydroxilamina (668.0 mg, 7.0 mmol, 1.5 eq) disuelto en 5 mL DCM seco y 0,5 mL de DIPEA. Se dejó la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Se agregaron 40 mL de agua y se extrajo con DCM (30 mL x 4). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo **25** como un aceite amarillo. (285.7 mg, 31% en 2 reacciones). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.72 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.67 (dd, *J* = 8.3, 6.5 Hz, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.89, 118.80, 60.94, 31.87, 27.77, 12.04.



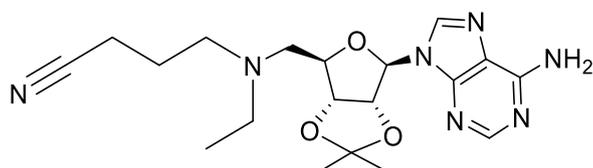
### 4-oxobutanitrilo (26)

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió **25** (285.0 mg, 1.78 mmol) en 8 mL de THF seco. Se llevó a -78°C y se agregó DIBAL-H 1M en THF (2.7 mL, 2.7 mmol, 1.5 eq) gota a gota. Luego de dos horas se agregó 20 mL de solución NaHSO<sub>4</sub> y se extrajo con DCM (40 mL x 4). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvo **26** como un líquido incoloro. (590.0 mg, cuant). En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN se observó que el compuesto estaba impuro, pero se identificó un pico en 10 ppm correspondiente a aldehído. Se continuó sin mayor purificación.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)amino)butanenitrilo (27)**

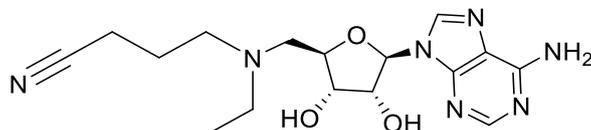
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 3** (545.0 mg, 1.78 mmol), **26** (179.0 mg, 1.78 mmol), AcOH (0.1 mL, 1.78 mmol) en THF (12 mL). A la media hora se agregó el NaBH(OAc)<sub>3</sub> (566.0 mg, 2.67 mmol). Se extrajo con NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) y DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **27** como un aceite amarillo (135.0 mg, 20%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 5.98 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.82 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.49 (dd, *J* = 6.5, 3.3 Hz, 1H), 5.06 (dd, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 4.37 (dt, *J* = 6.1, 3.8 Hz, 1H), 2.91 (qd, *J* = 12.5, 5.1 Hz, 2H), 2.83 – 2.66 (m, 2H), 2.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.80 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.63, 153.06, 149.41, 140.14, 120.52, 119.70, 114.68, 91.03, 85.34, 83.21, 82.17, 51.08, 47.89, 27.34, 25.63, 25.43, 14.91.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)ethyl)amino)butanenitrilo (28).**

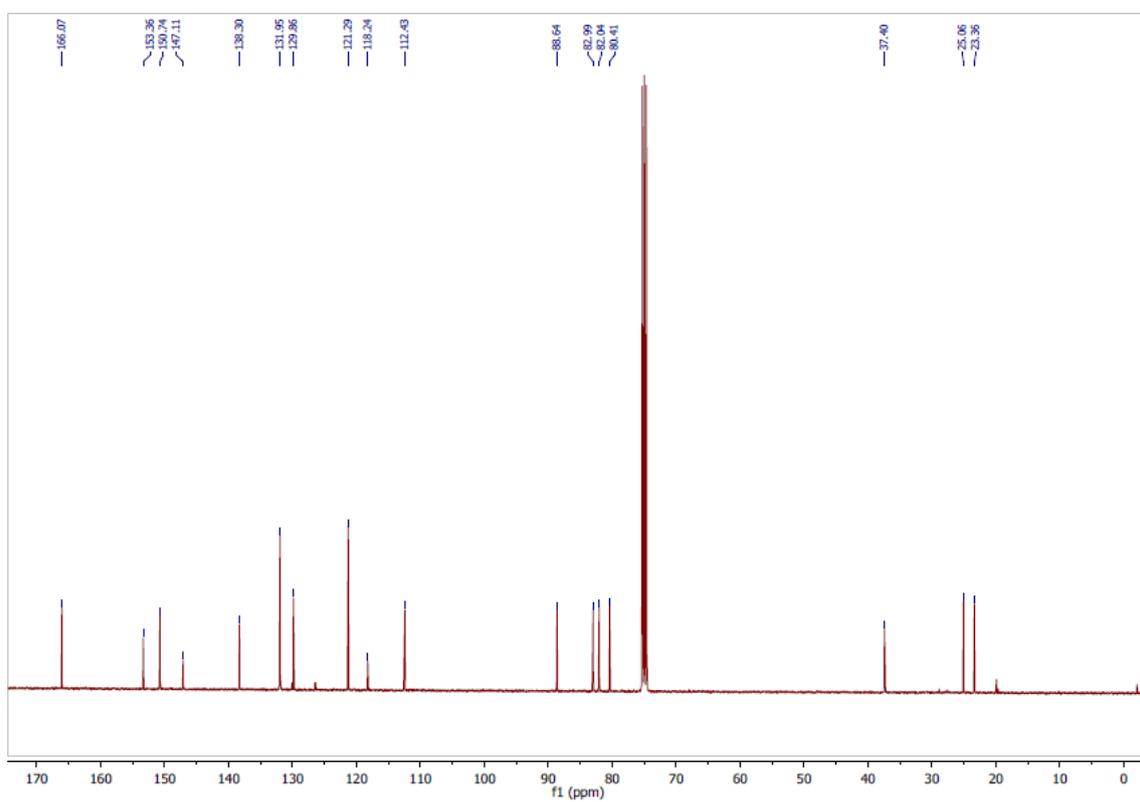
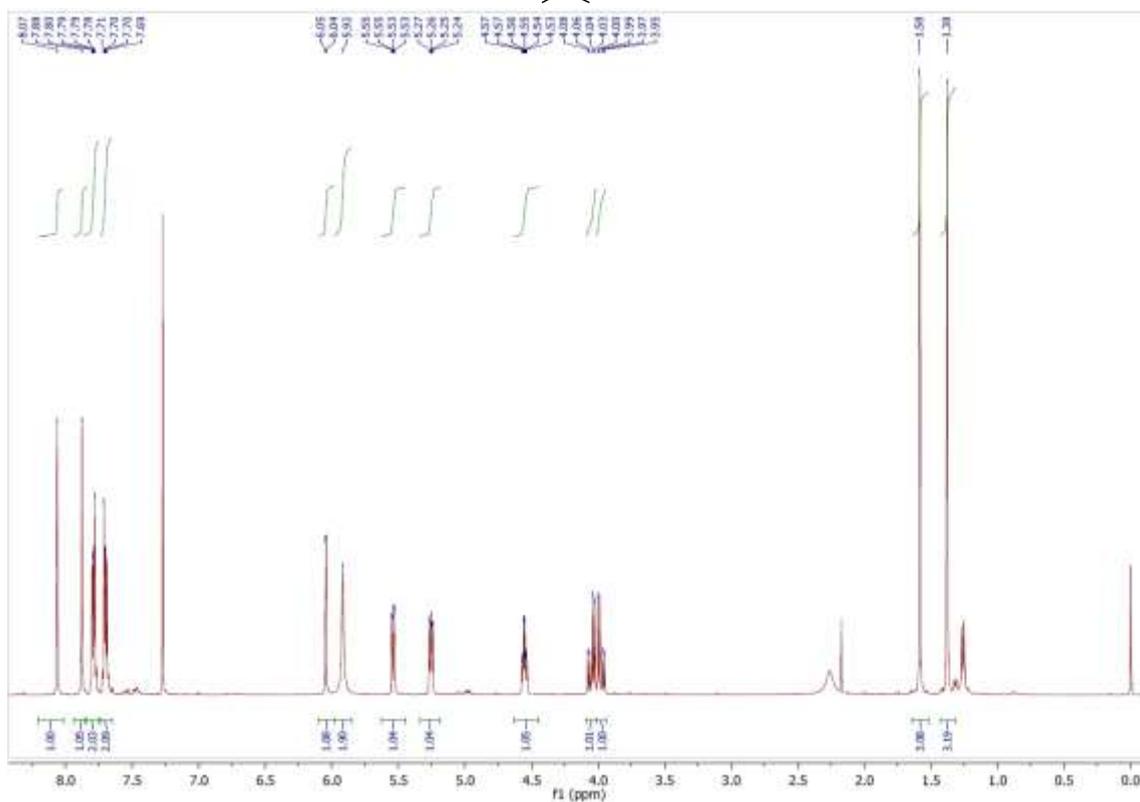
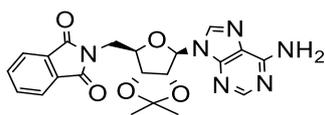
Se utilizaron condiciones descritas en **B. 27** (124.0 mg, 0.33 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (87.6 mg, 0.6 mmol), bromuro de etilo (0.05 mL, 0.6 mmol) en DMF seco (5 mL). Se extrajo con H<sub>2</sub>O (10 mL) y AcOEt (20 mL x 3). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **28** como un aceite amarillo (90 mg, 67%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.80 (d, *J* = 14.9 Hz, 2H), 5.51 (dt, *J* = 6.5, 3.3 Hz, 1H), 5.03 (ddd, *J* = 19.6, 6.4, 3.5 Hz, 1H), 4.22 – 4.01 (m, 1H), 3.24 (dt, *J* = 14.0, 6.8 Hz, 1H), 3.12 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.36 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.69 (dq, *J* = 22.3, 8.5, 7.6 Hz, 1H), 1.40 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H), 1.31 – 1.15 (m, 3H), 1.00 (t, *J* = 7.1 Hz,

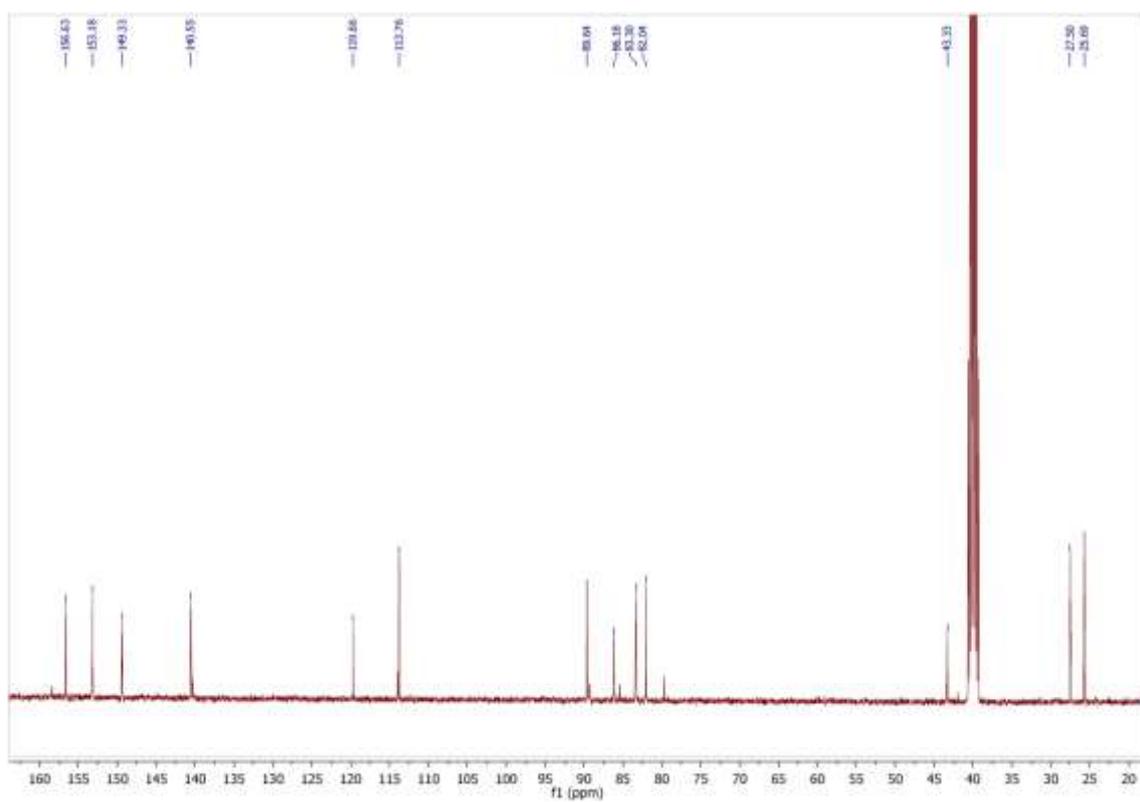
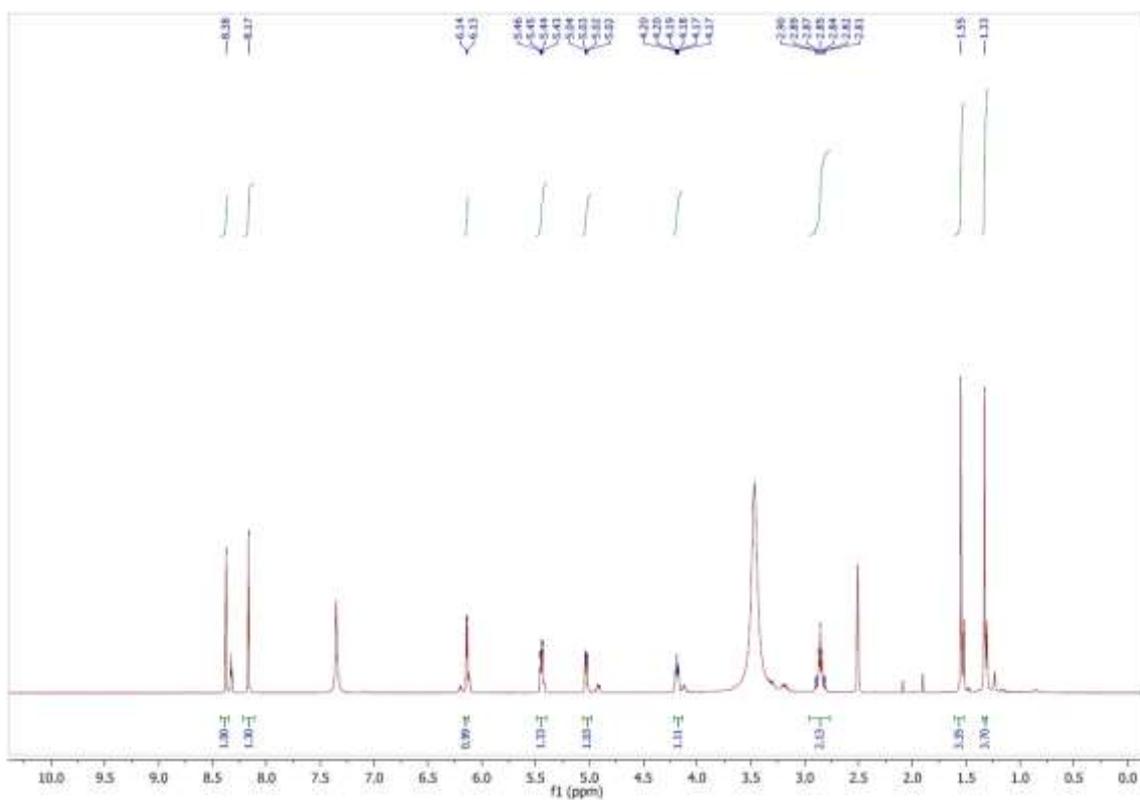
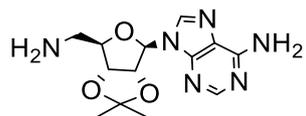
2H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.65, 153.26, 150.19, 149.32, 140.51, 120.61, 114.76, 91.06, 83.93, 83.49, 77.36, 35.39, 29.85, 27.30, 25.55, 14.81.

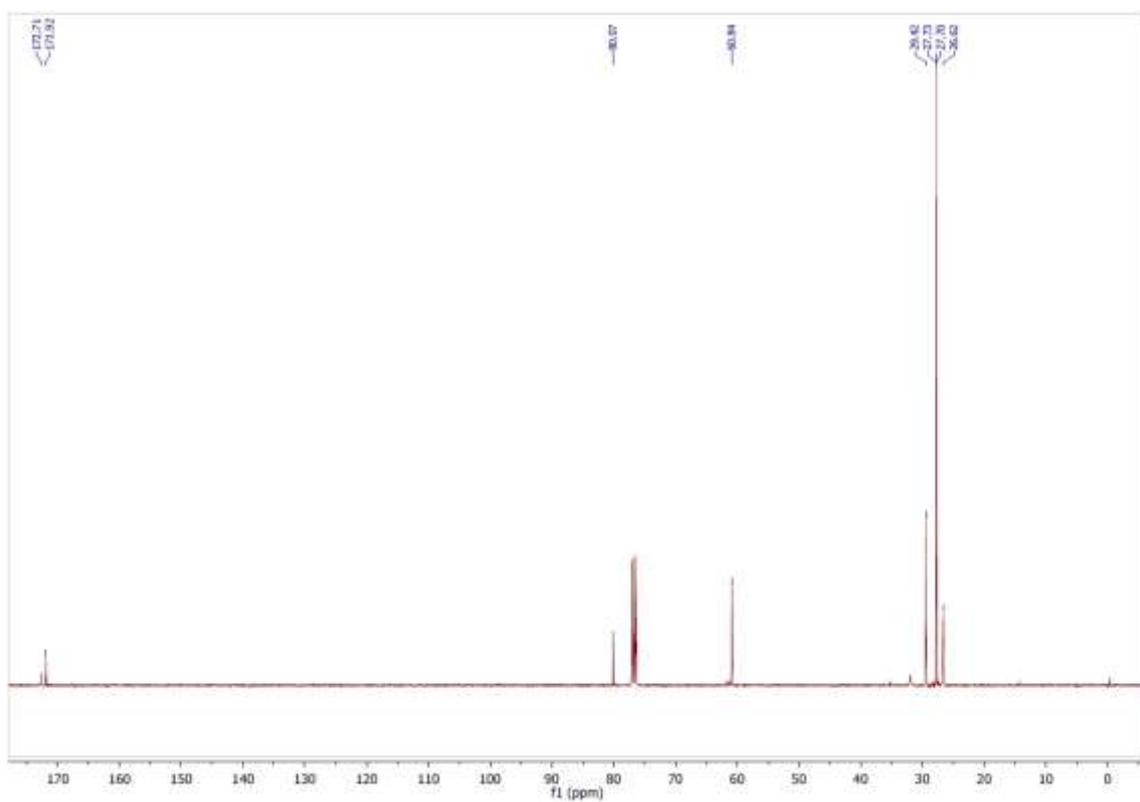
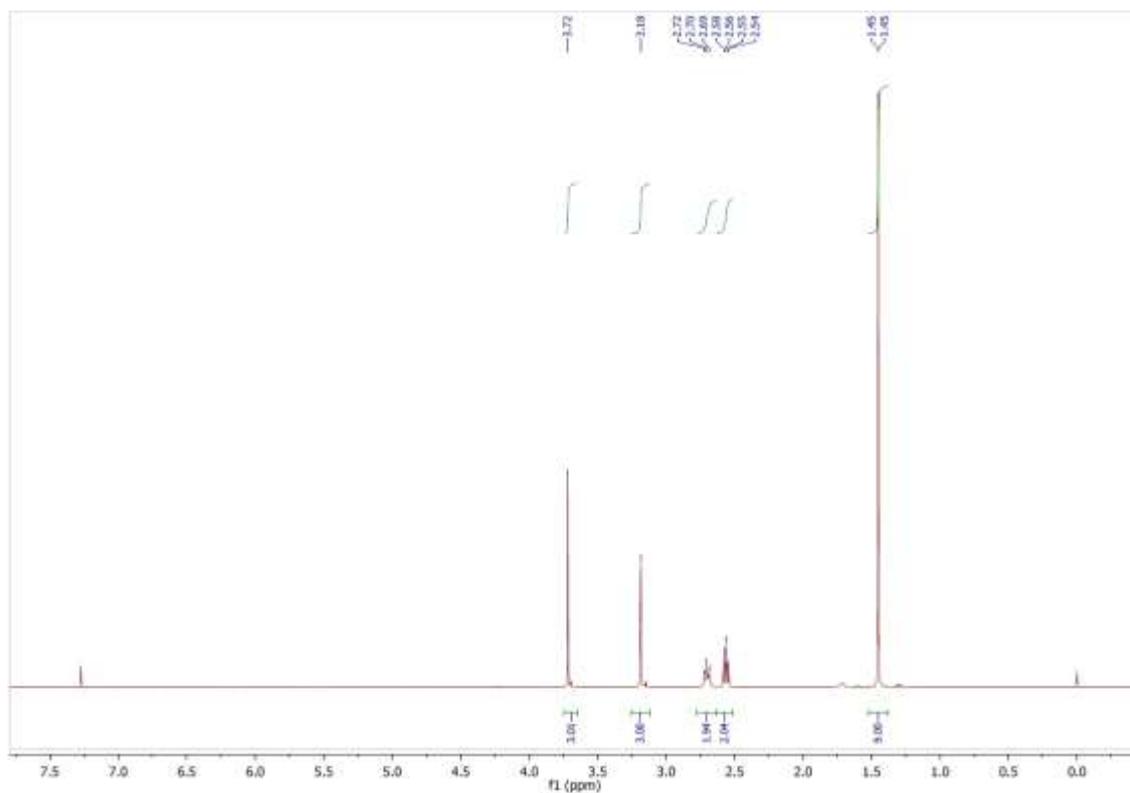
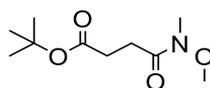


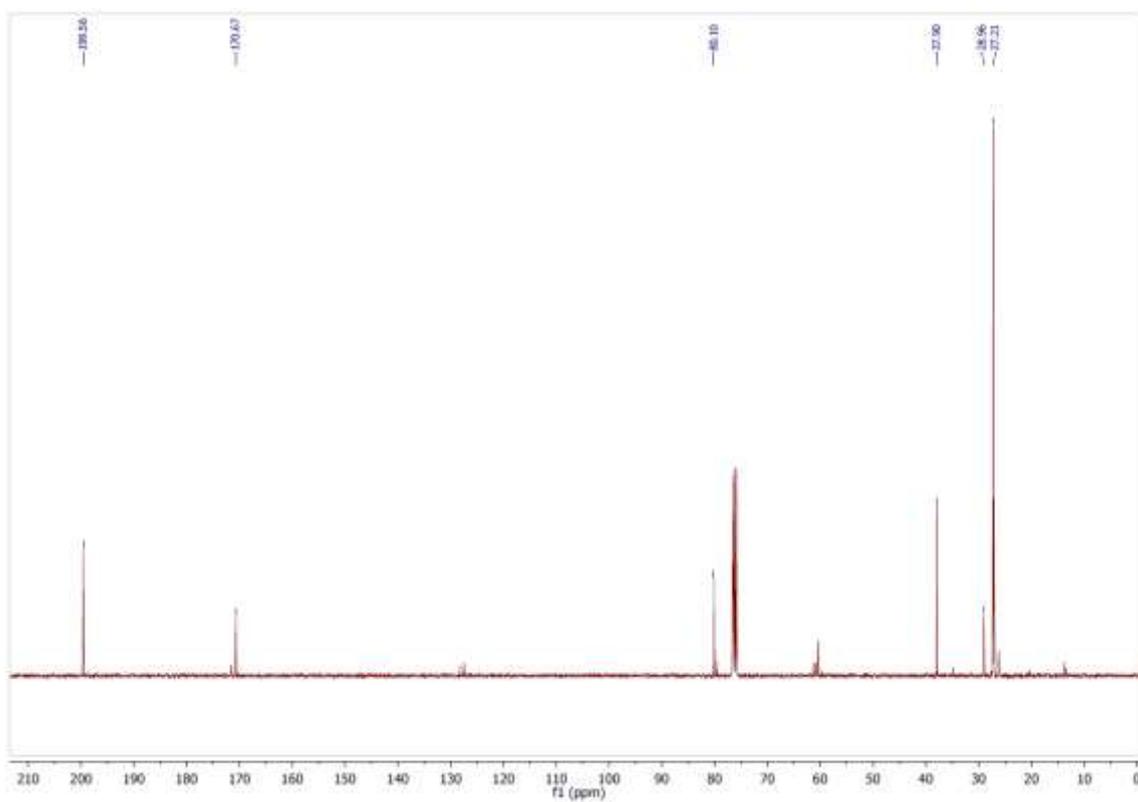
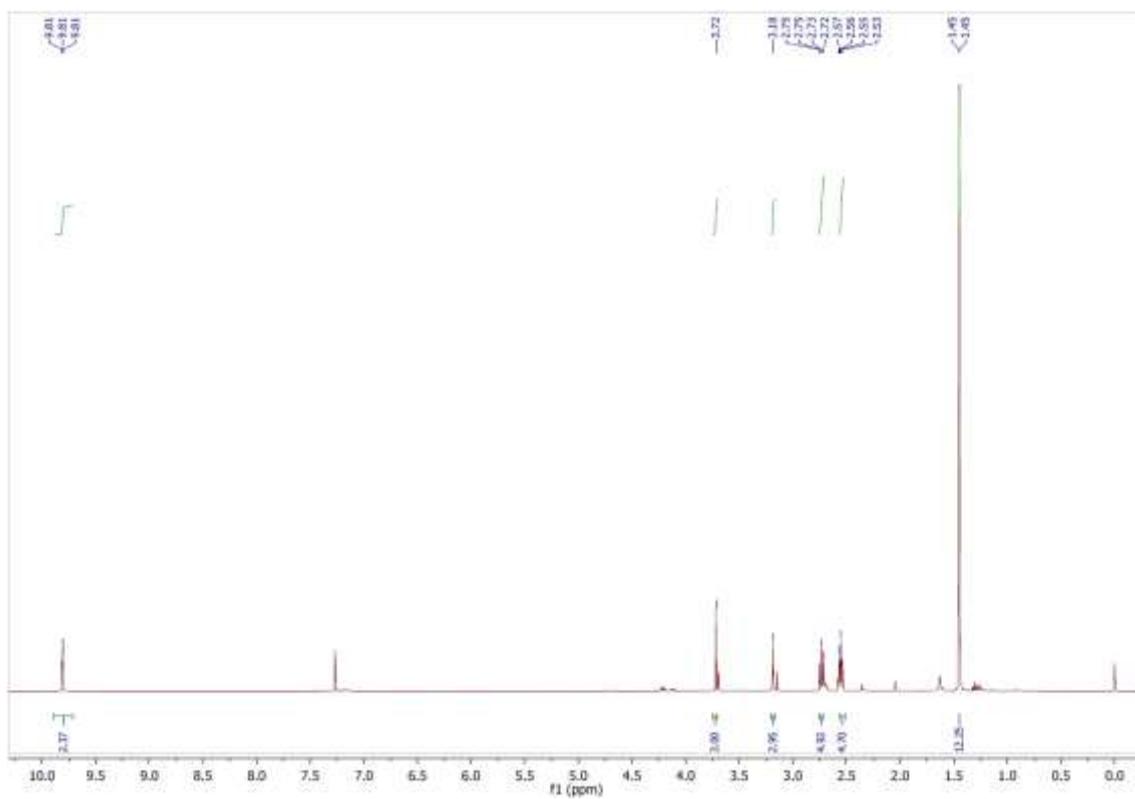
**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxitetrahydrofuran-2-yl)metil)(etil)amino)butanonitrilo (29)**

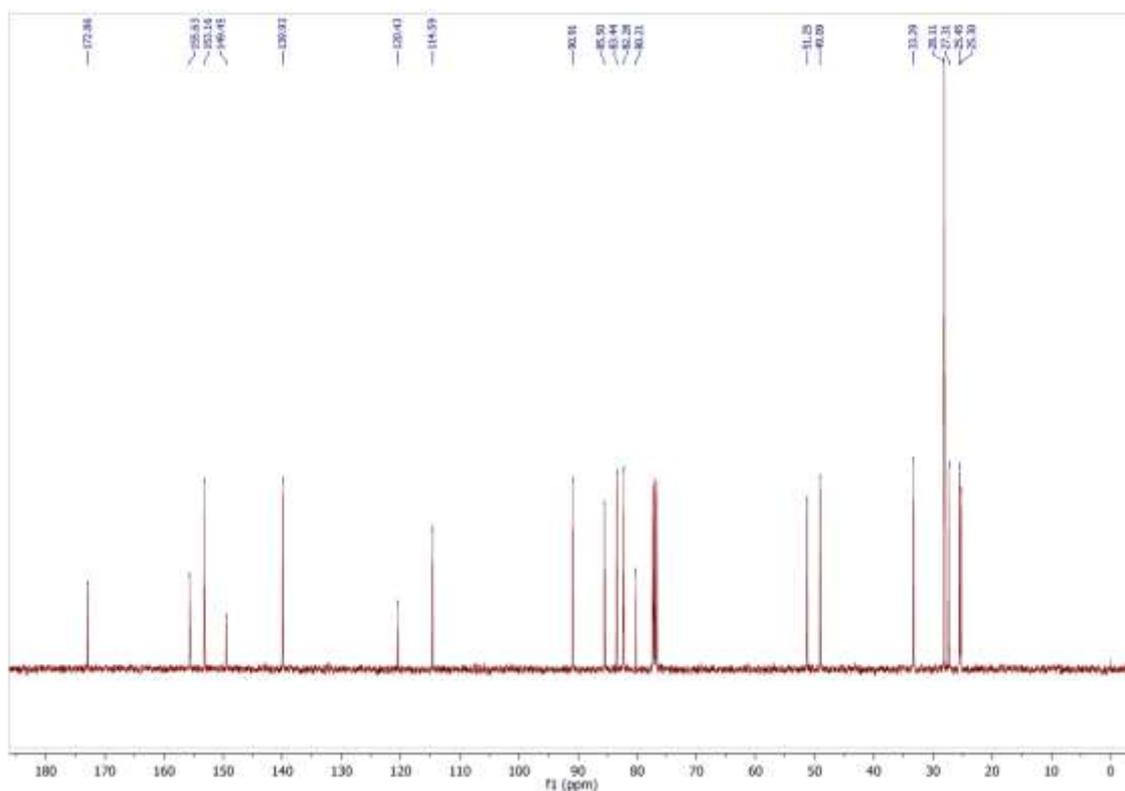
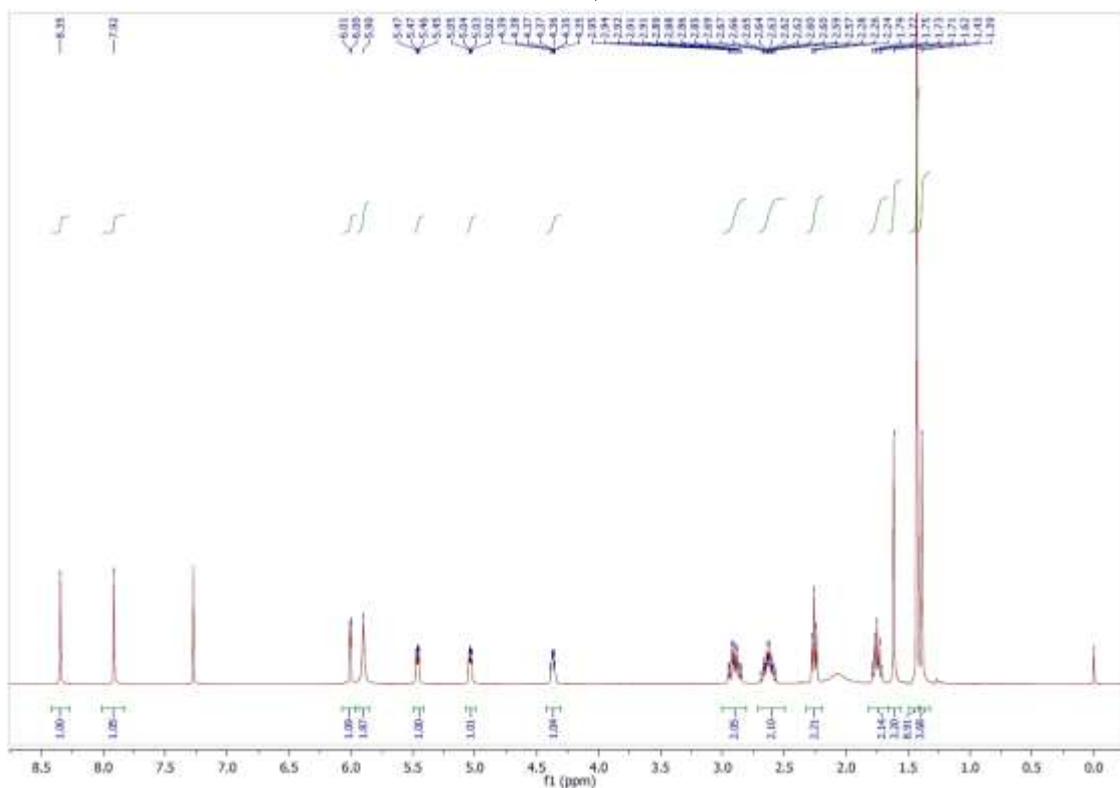
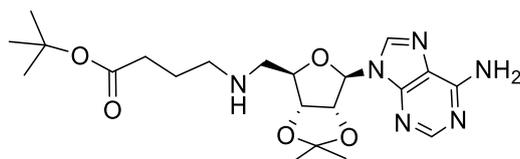
Se utilizaron condiciones descritas en **C. 28** (90.0 mg, 0.23 mmol) en DCM:  $\text{H}_2\text{O}$ : TFA (0.5 mL: 0.5 mL: 0.5 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 15%) obteniendo **29** como un aceite incoloro (32.6 mg, 45%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **35** es de 72% (220 nm) y de 98% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.813 s.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.30 (d ancho, 1H) 8.24 (s, 1H), 5.99 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.29 (d,  $J = 22.2$  Hz, 2H), 4.15 (s, 2H), 3.84 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H), 3.58 (dd,  $J = 14.7, 8.2$  Hz, 1H), 3.44 – 3.37 (m, 2H-por COSY), 2.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.84 (p,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.33 – 1.21 (m, 3H).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, MeOD,  $50^\circ\text{C}$ )  $\delta$  8.25 (s, 2H), 5.99 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.86 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 4.34 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 4.15 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.84 (dd,  $J = 14.8, 3.9$  Hz, 1H), 3.58 (dd,  $J = 14.8, 8.1$  Hz, 1H), 3.44 – 3.37 (m, 2H-por COSY), 2.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.85 (p,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, MeOD)  $\delta$  156.88, 155.89, 152.34, 149.16, 140.57, 119.35, 89.50, 89.17, 83.21, 82.87, 73.11, 71.80, 61.53, 49.46, 46.47, 23.99, 23.56, 13.49, 13.45. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+Br) $^-$ ) 440.1051,  $m/z$ , observada en modo negativo: 440.1445.  $[\alpha]_D^{25}$ : 26.8812.

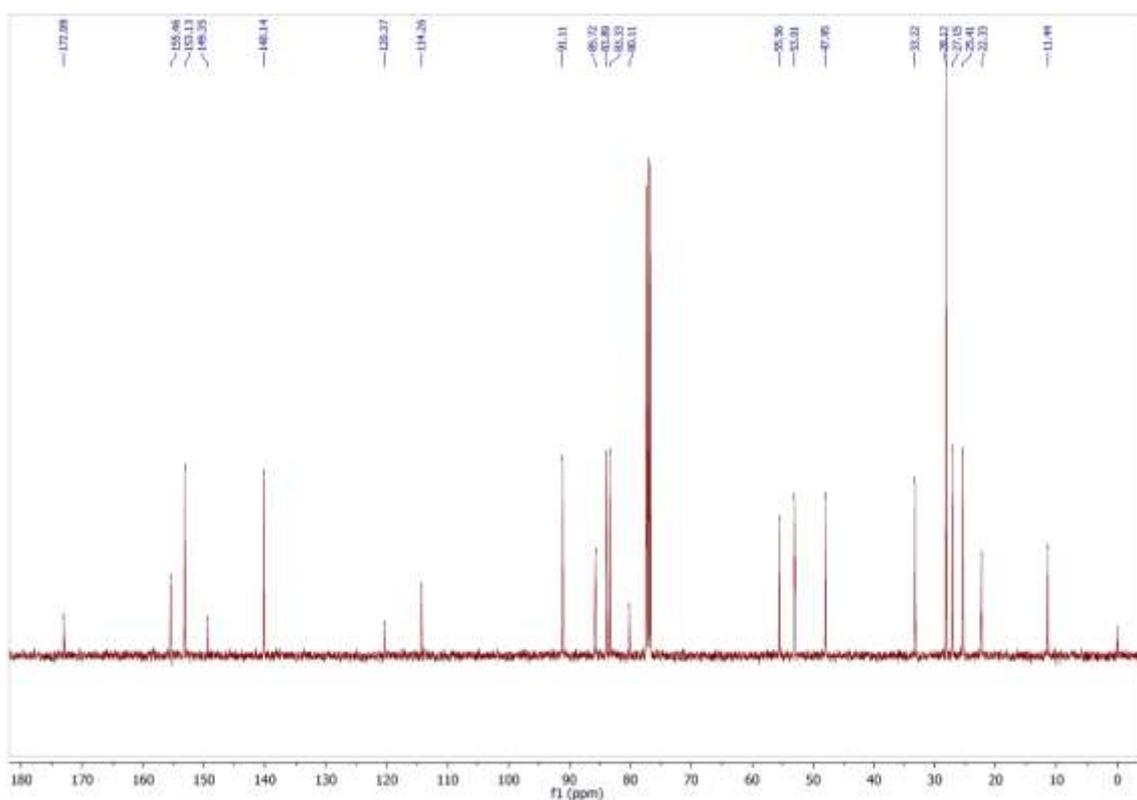
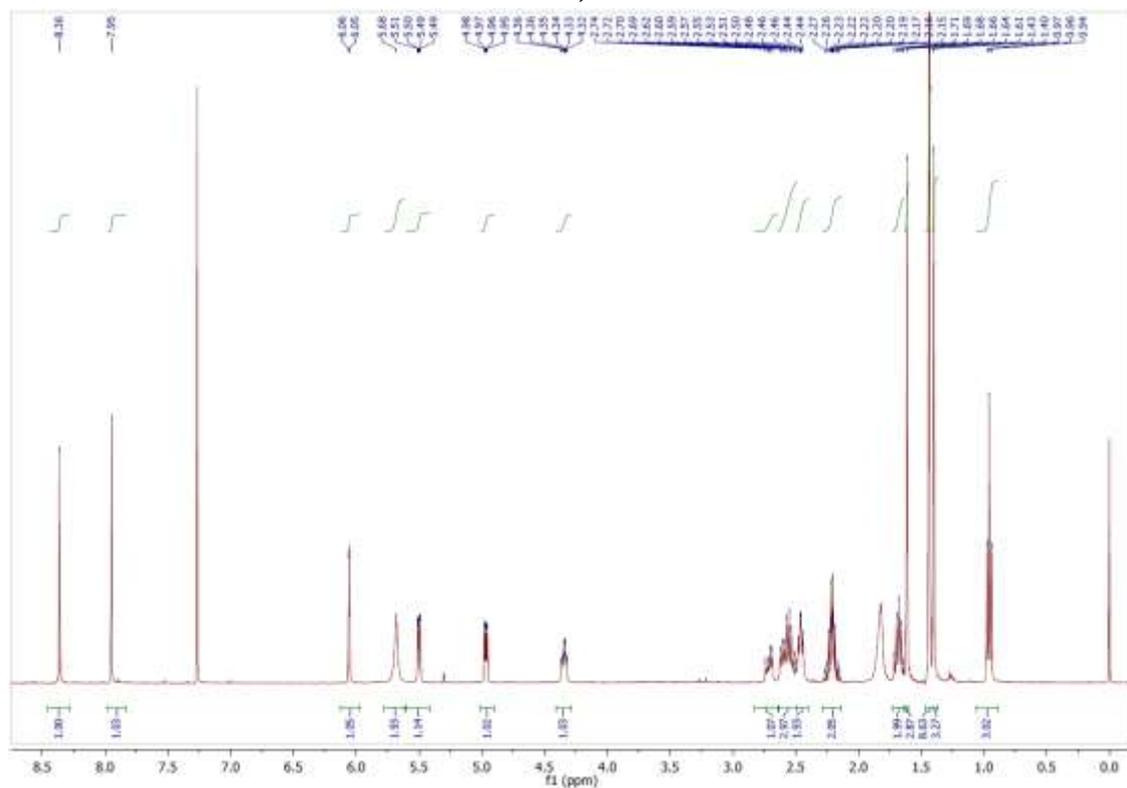
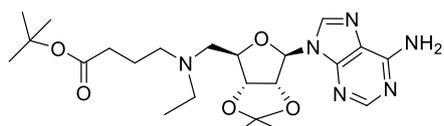


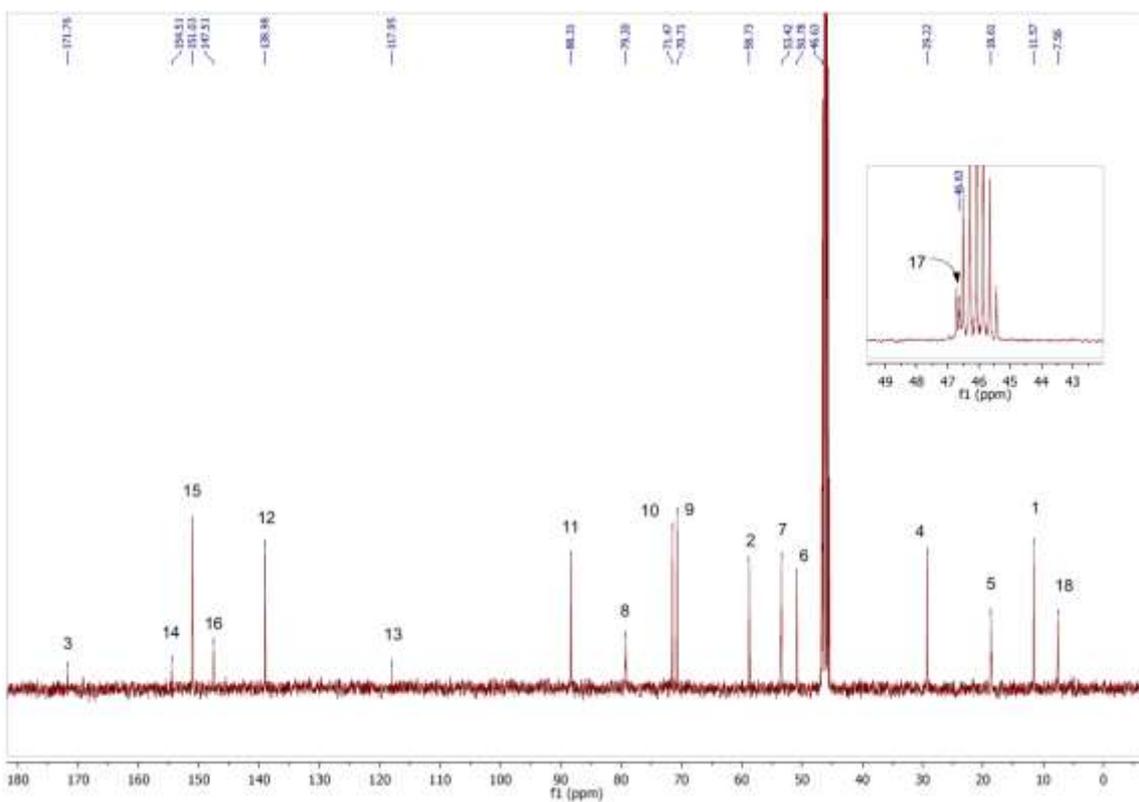
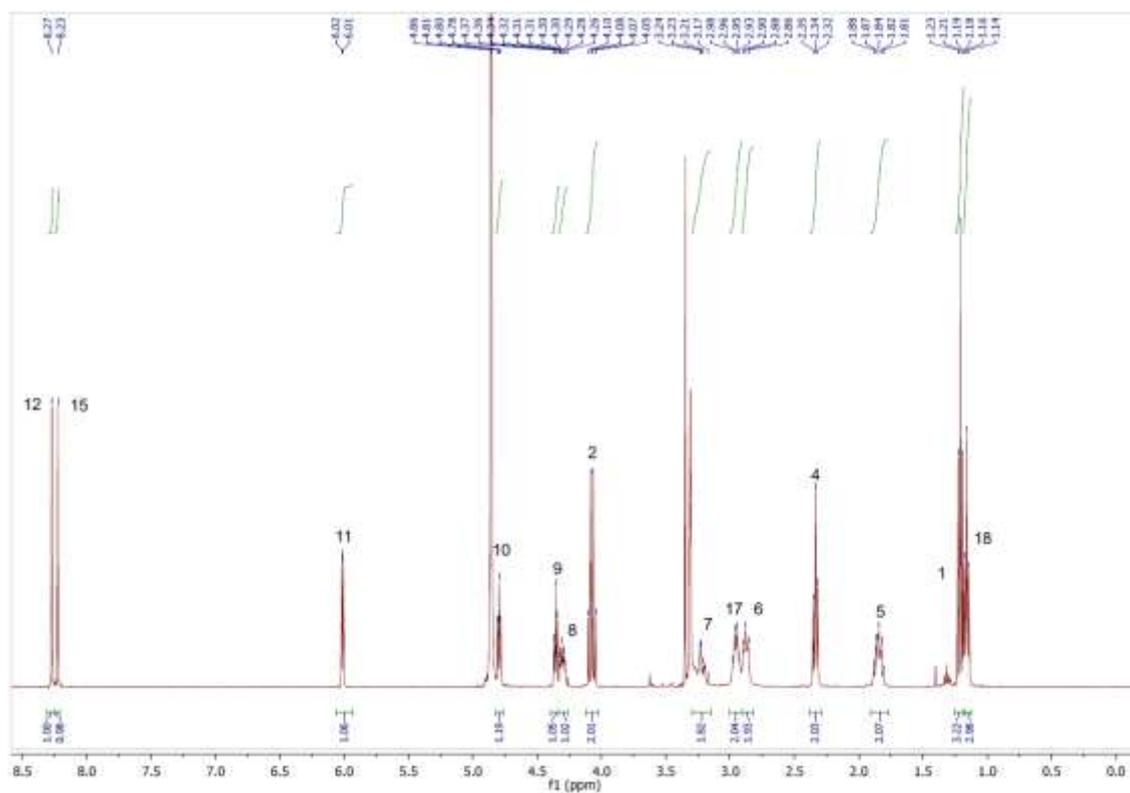
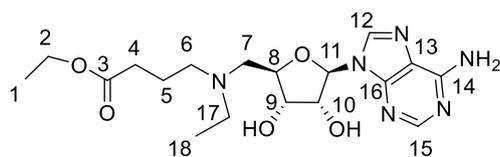


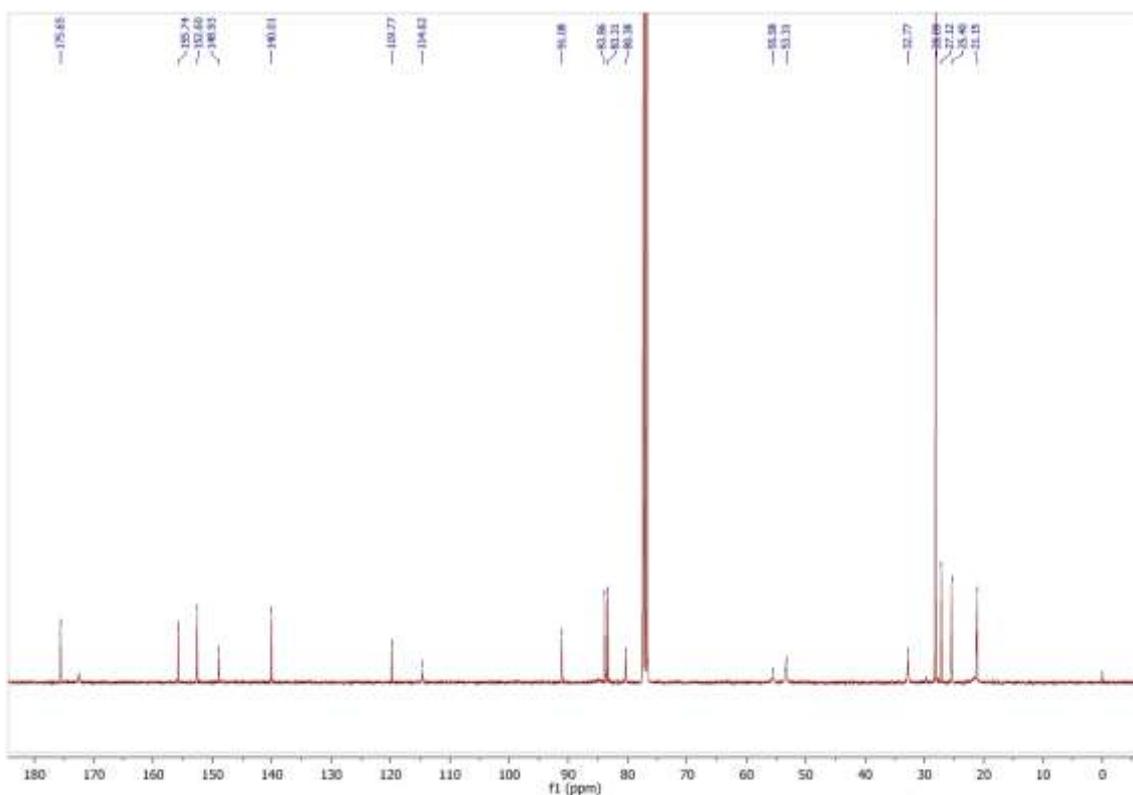
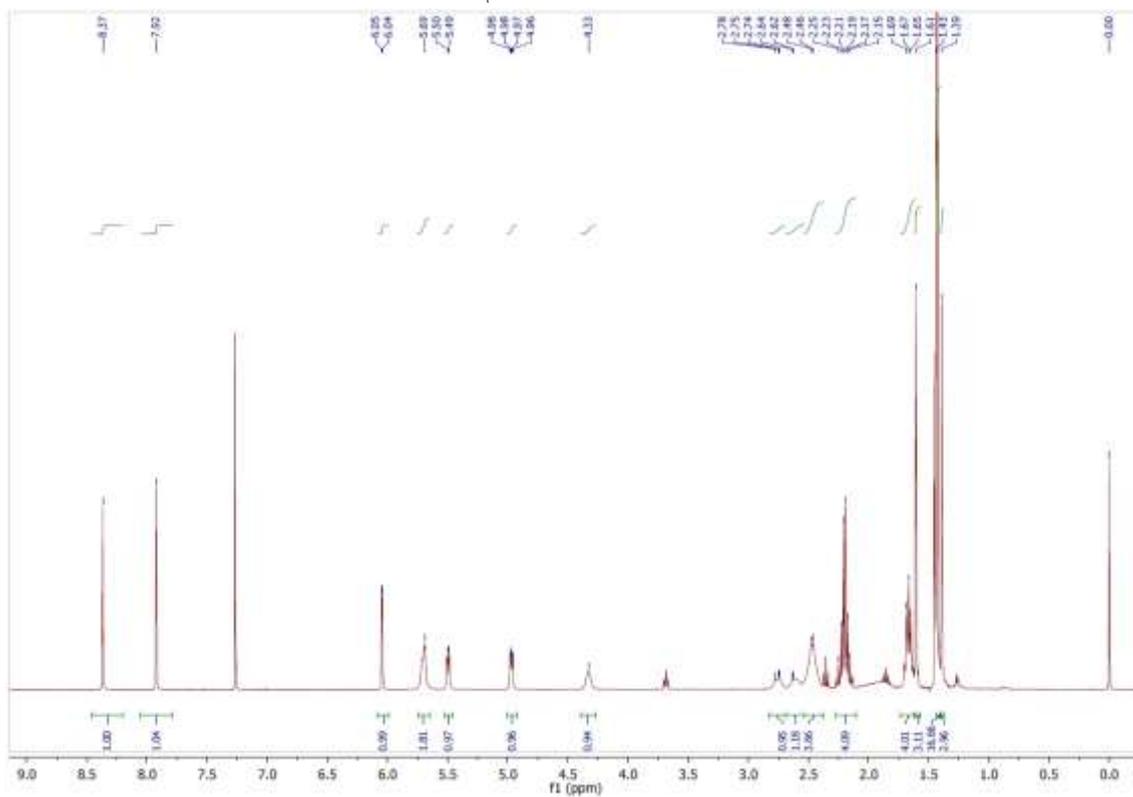
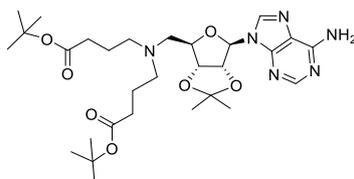




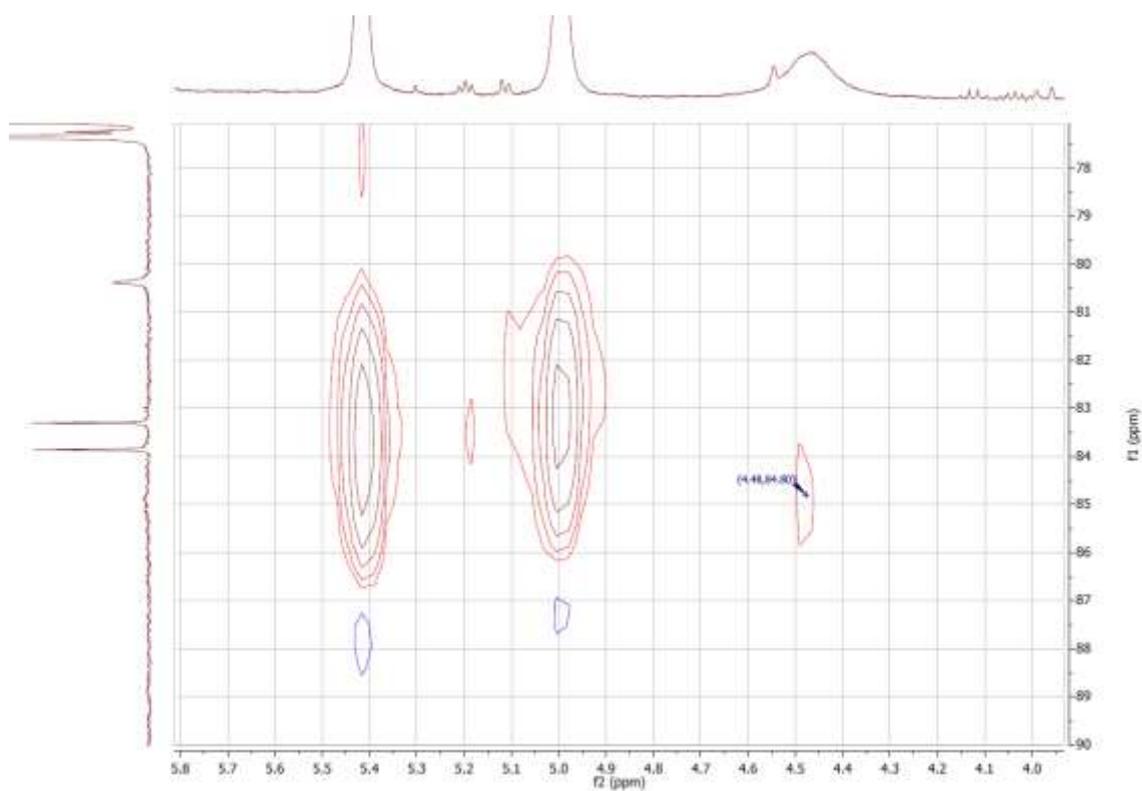


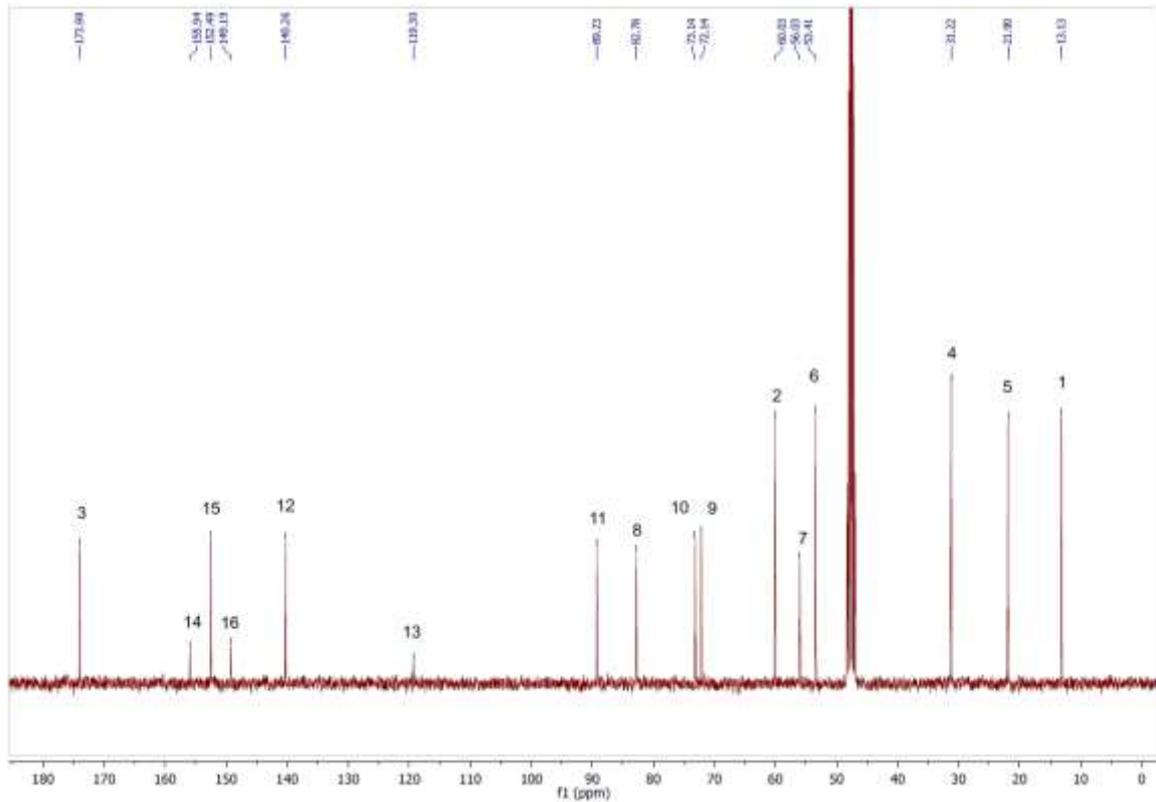
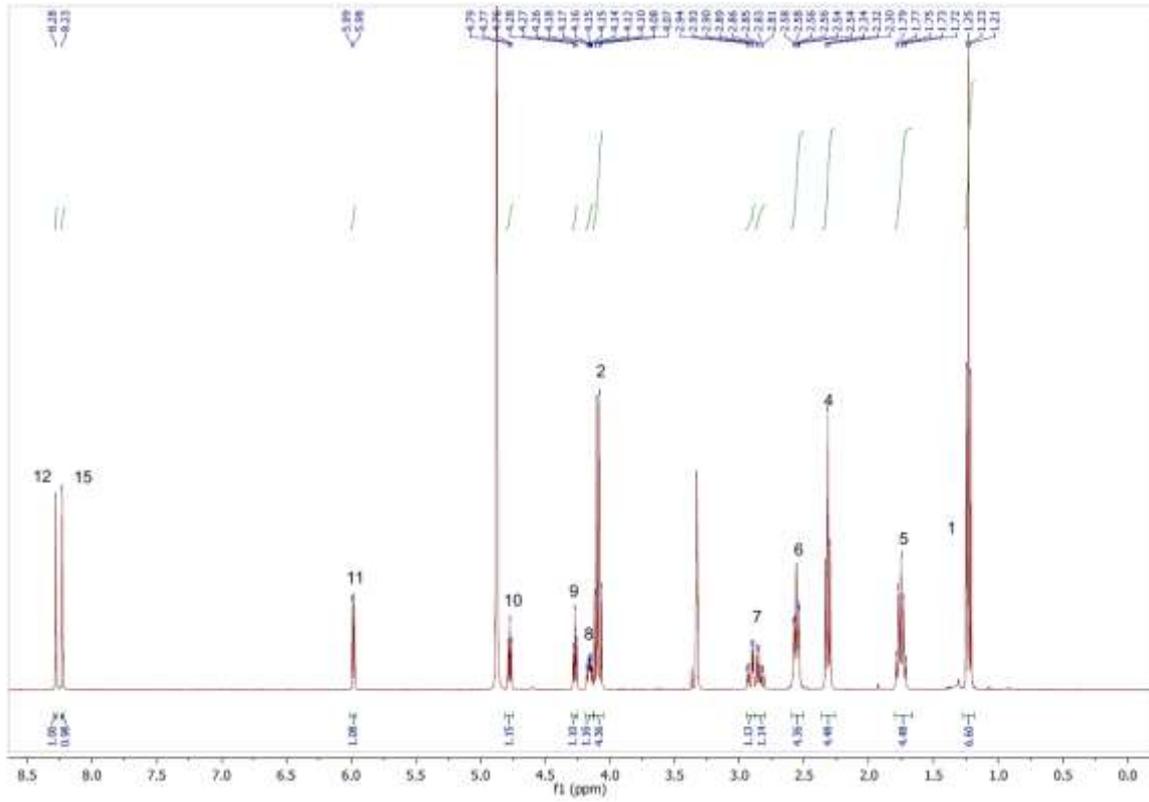
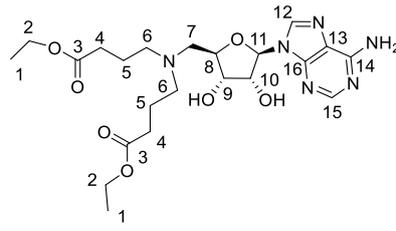


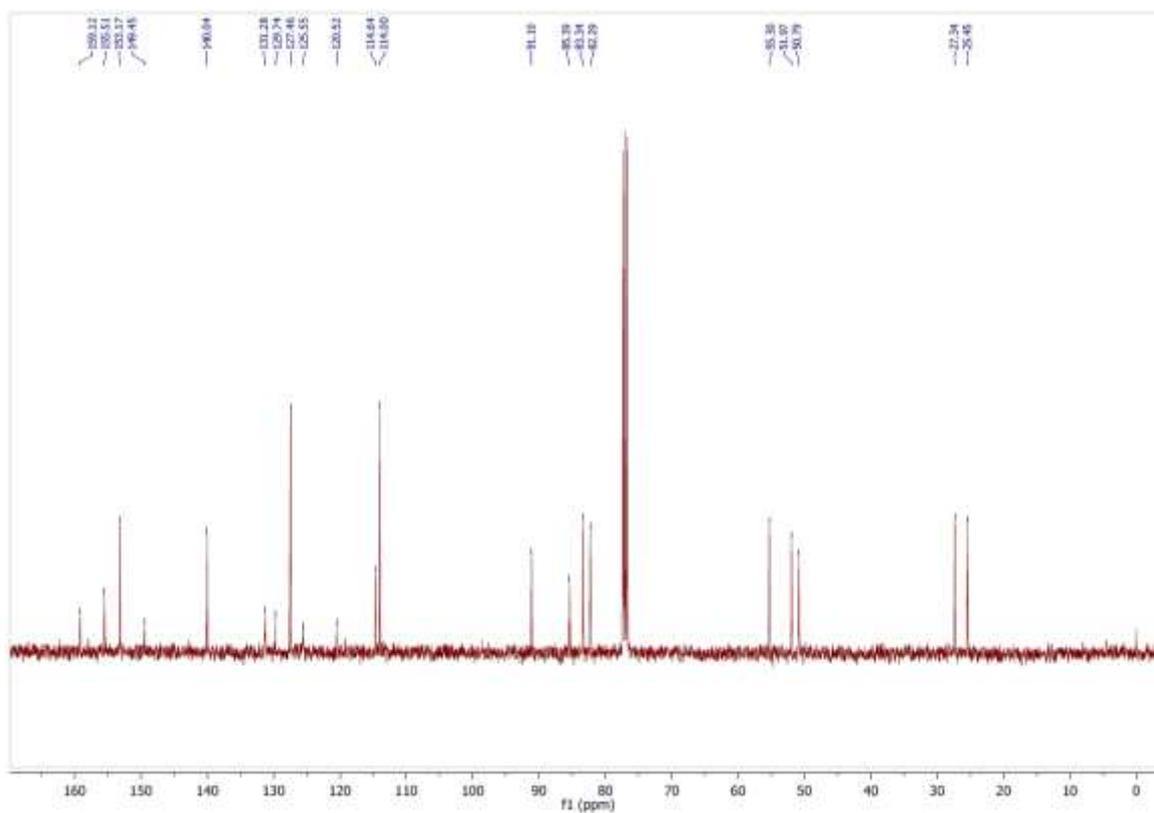
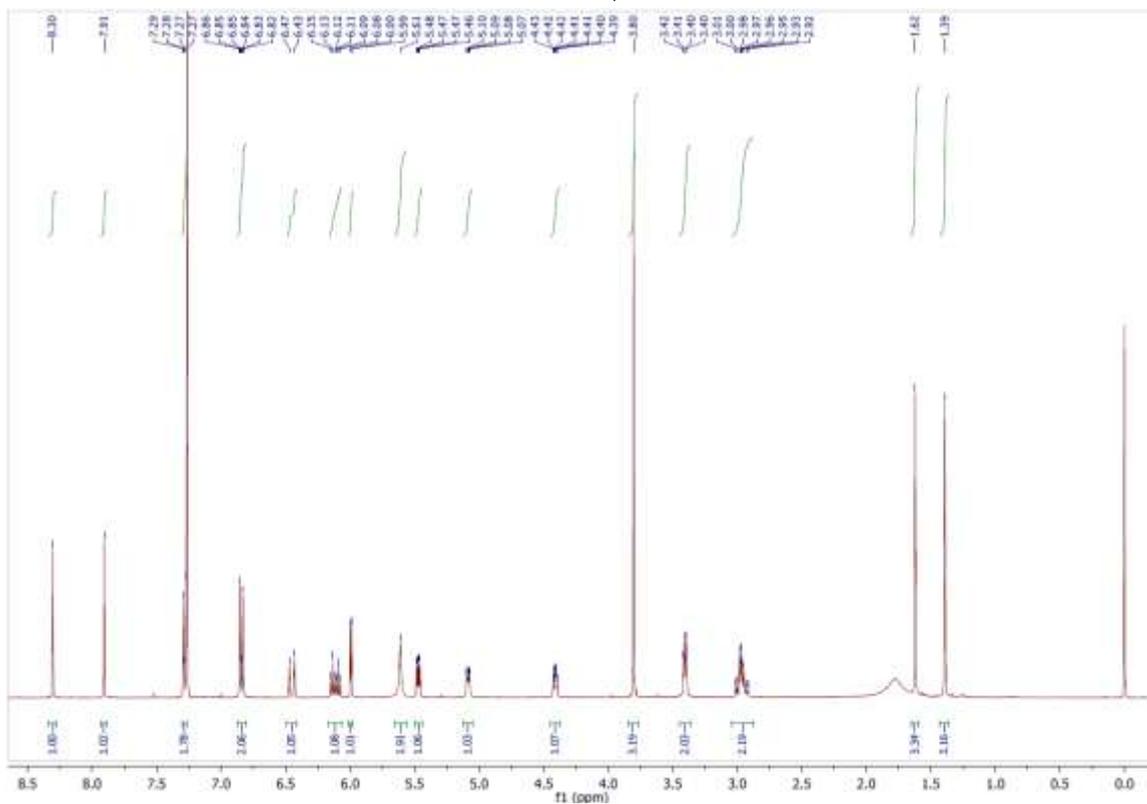
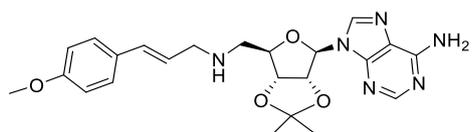


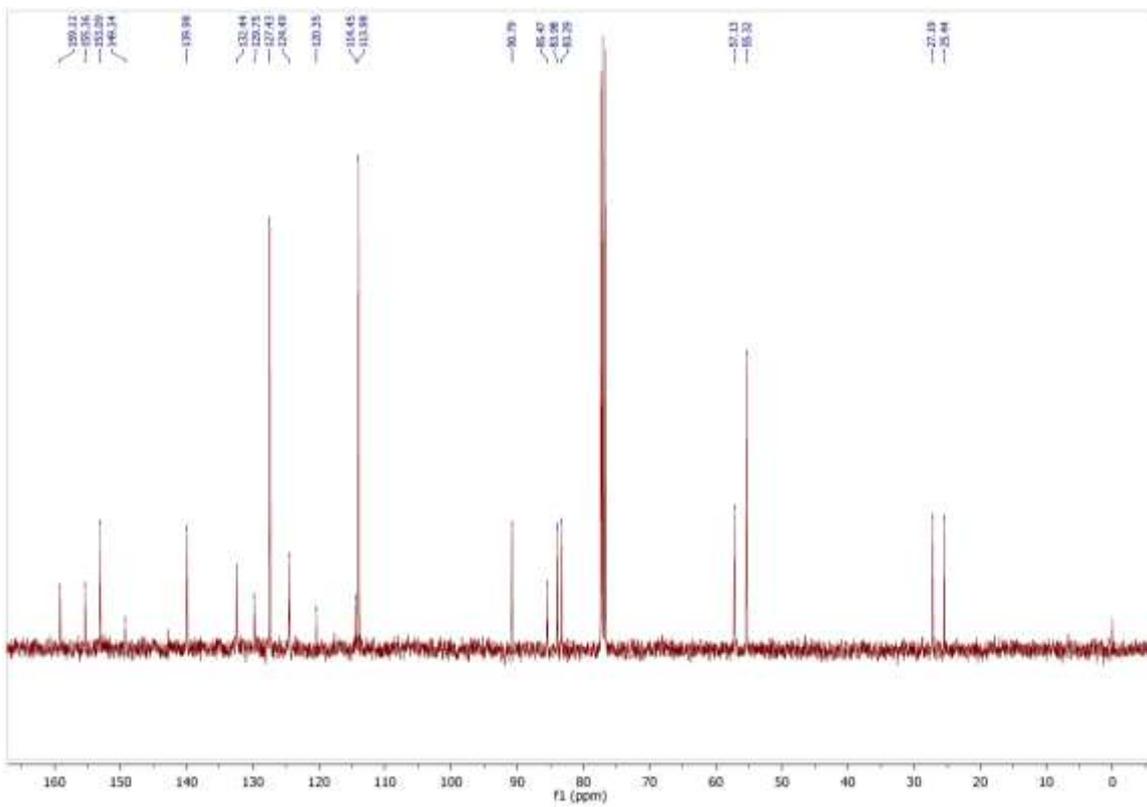
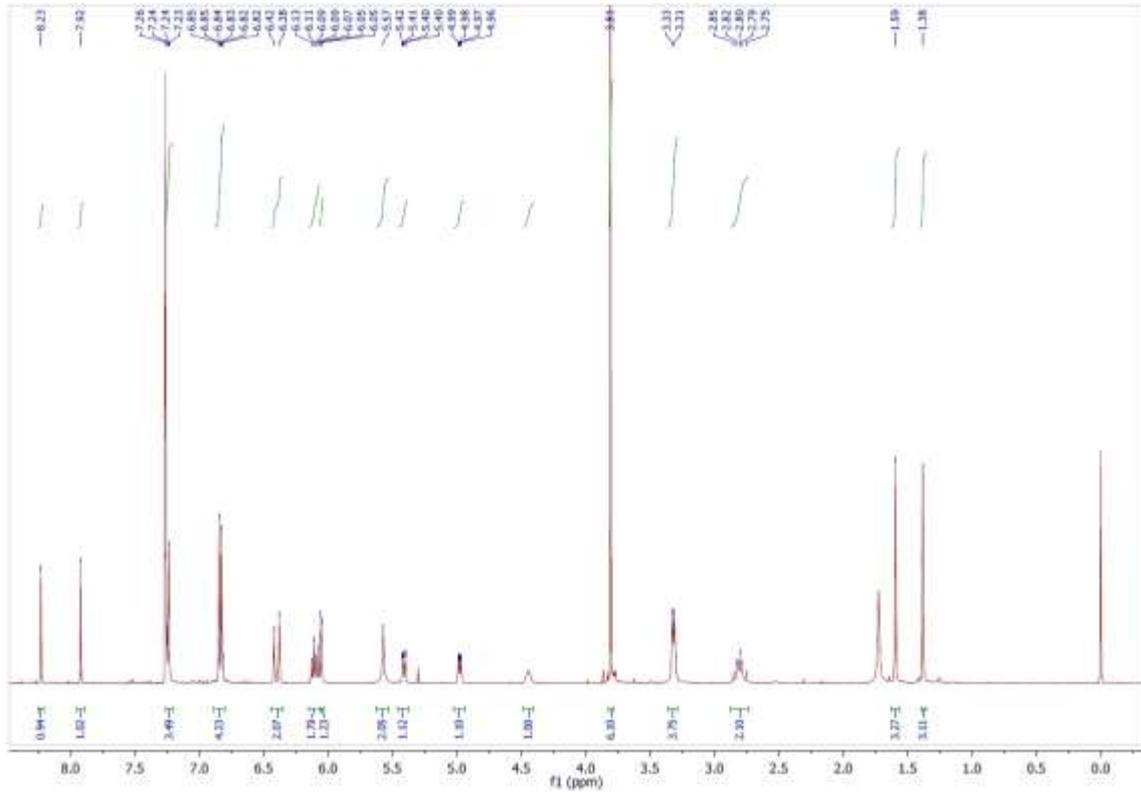
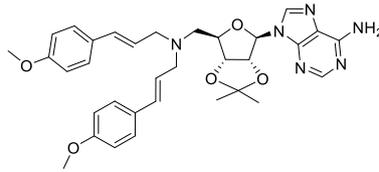


### HSQC-RMN

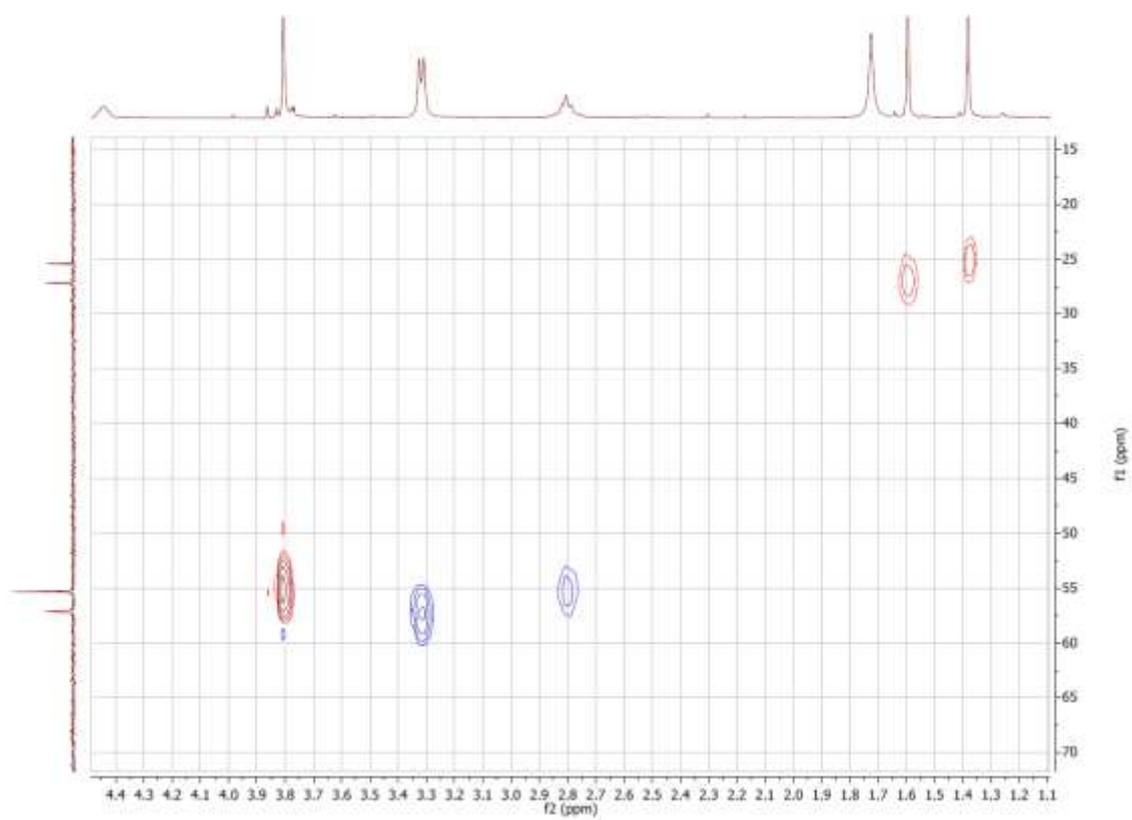


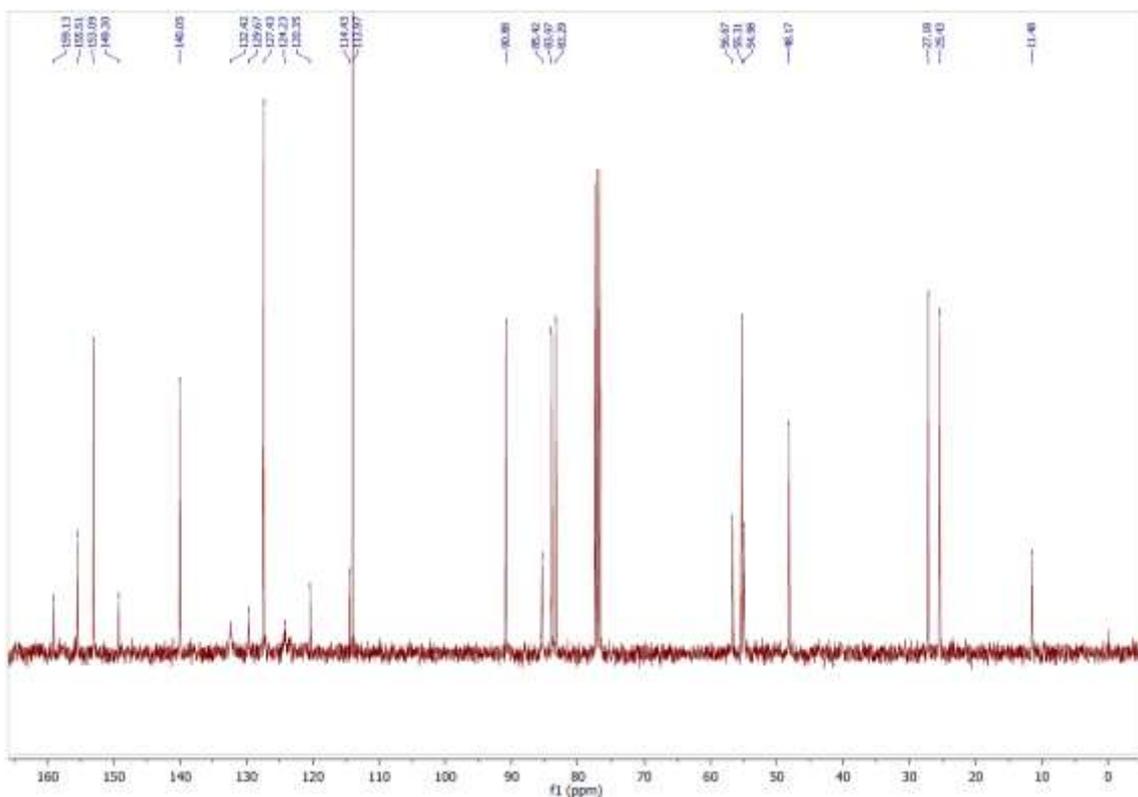
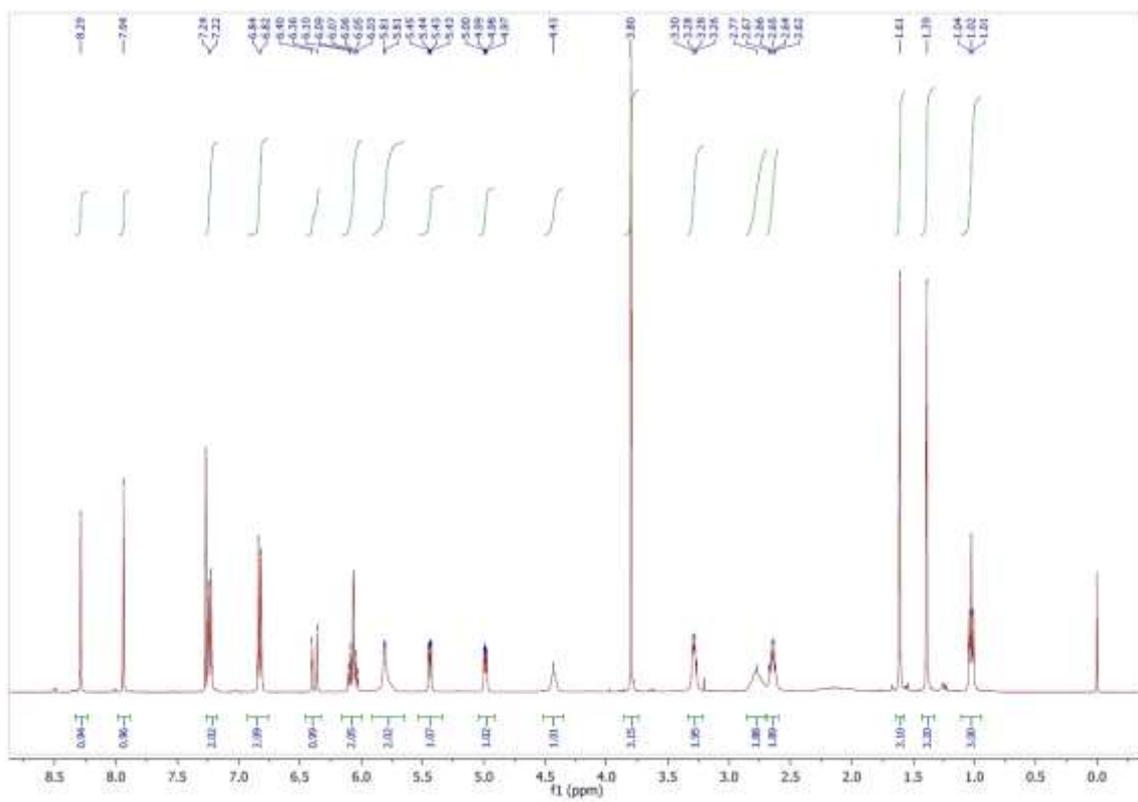
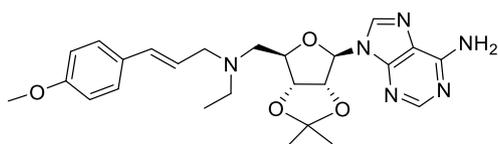




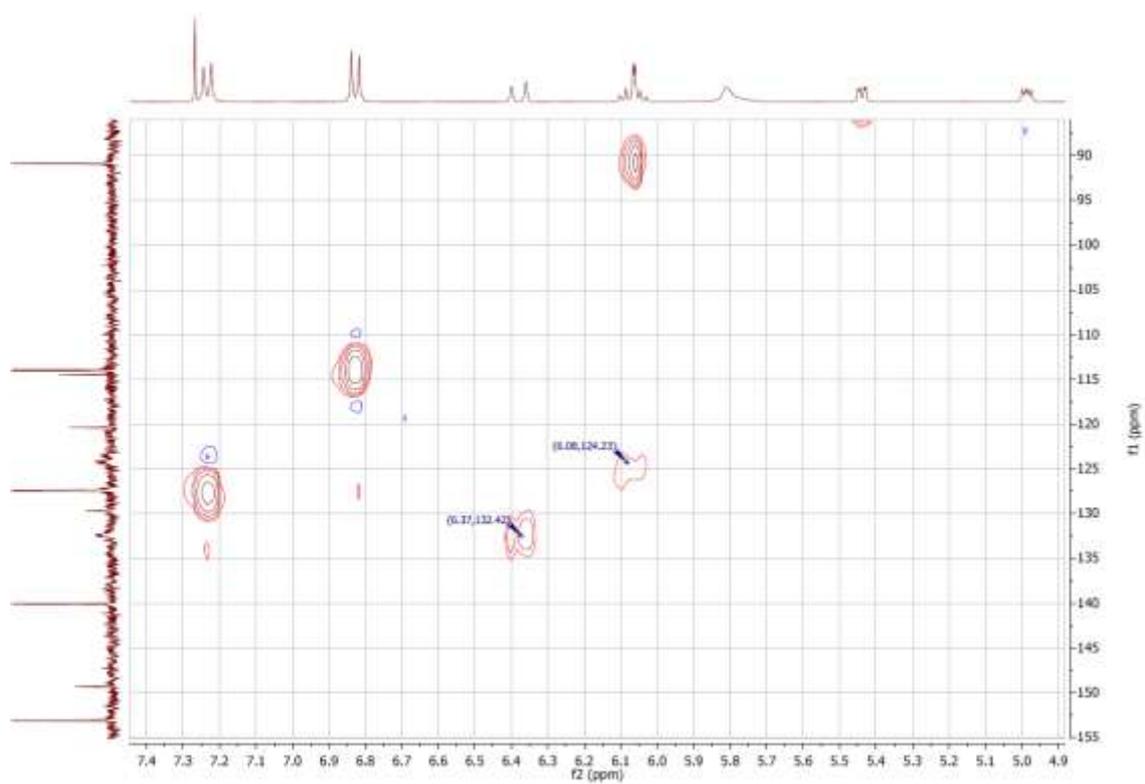


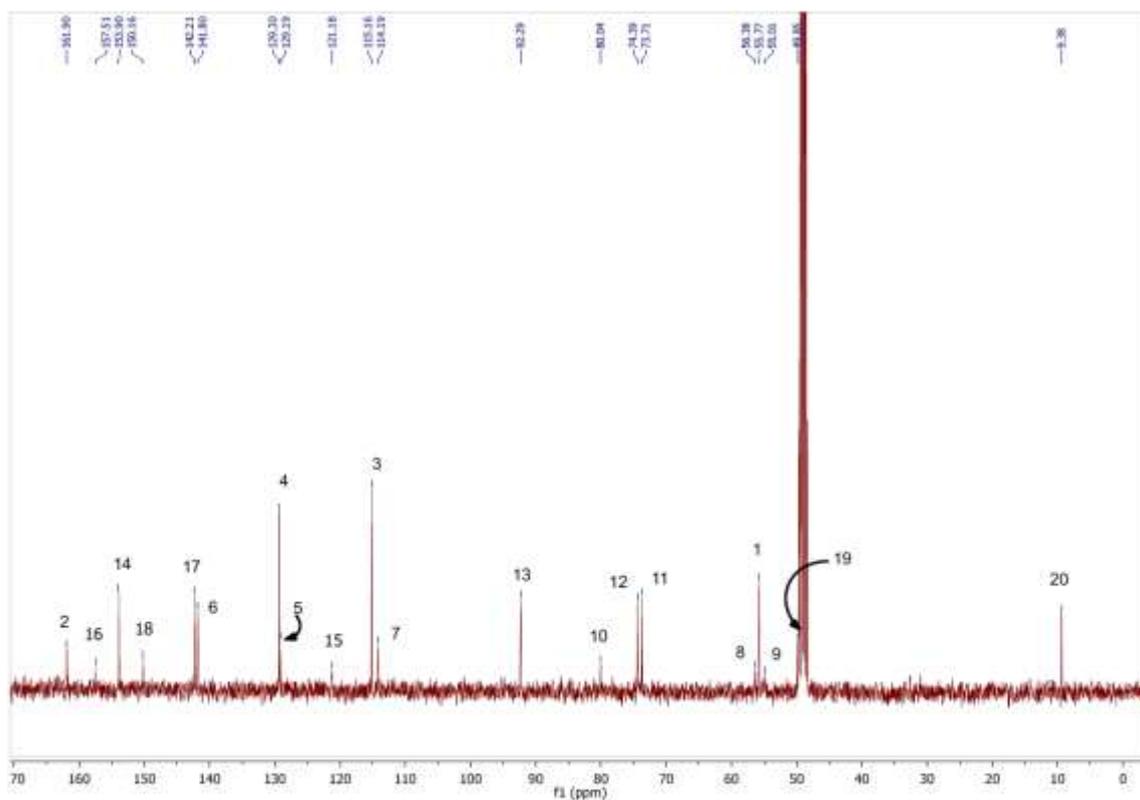
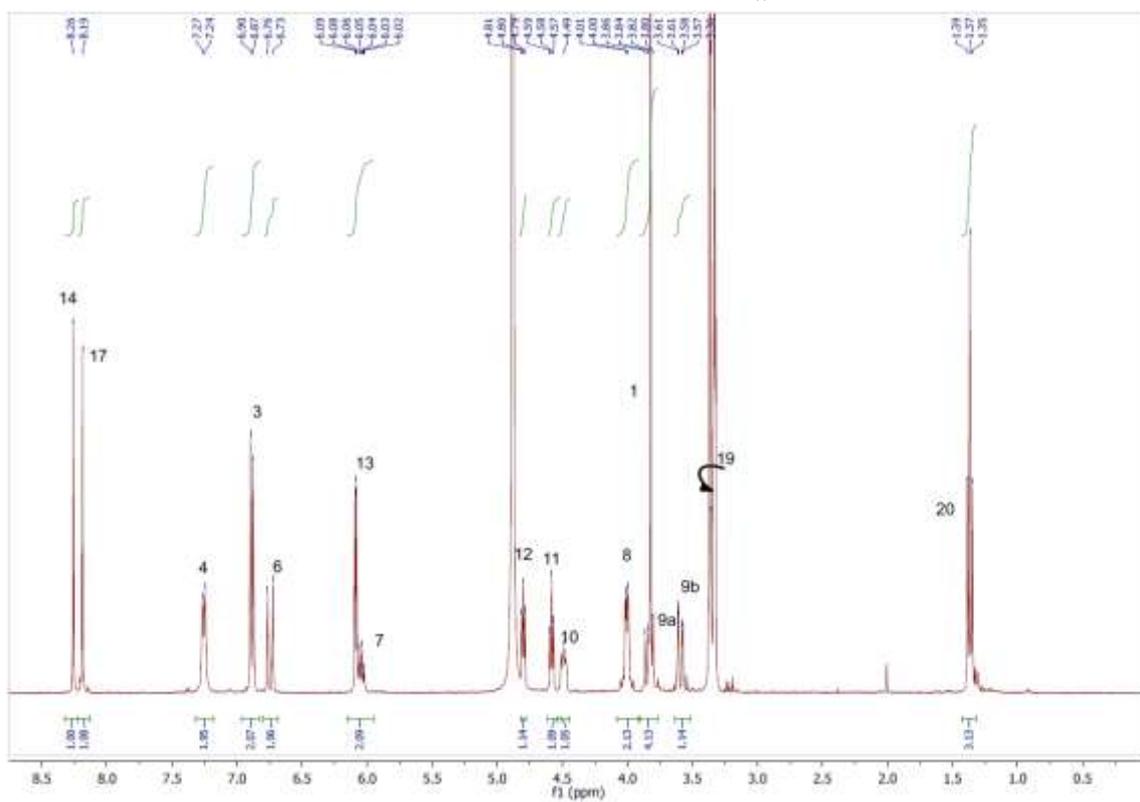
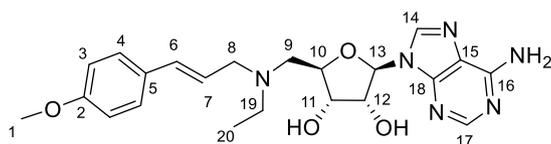
### HSQC-RMN



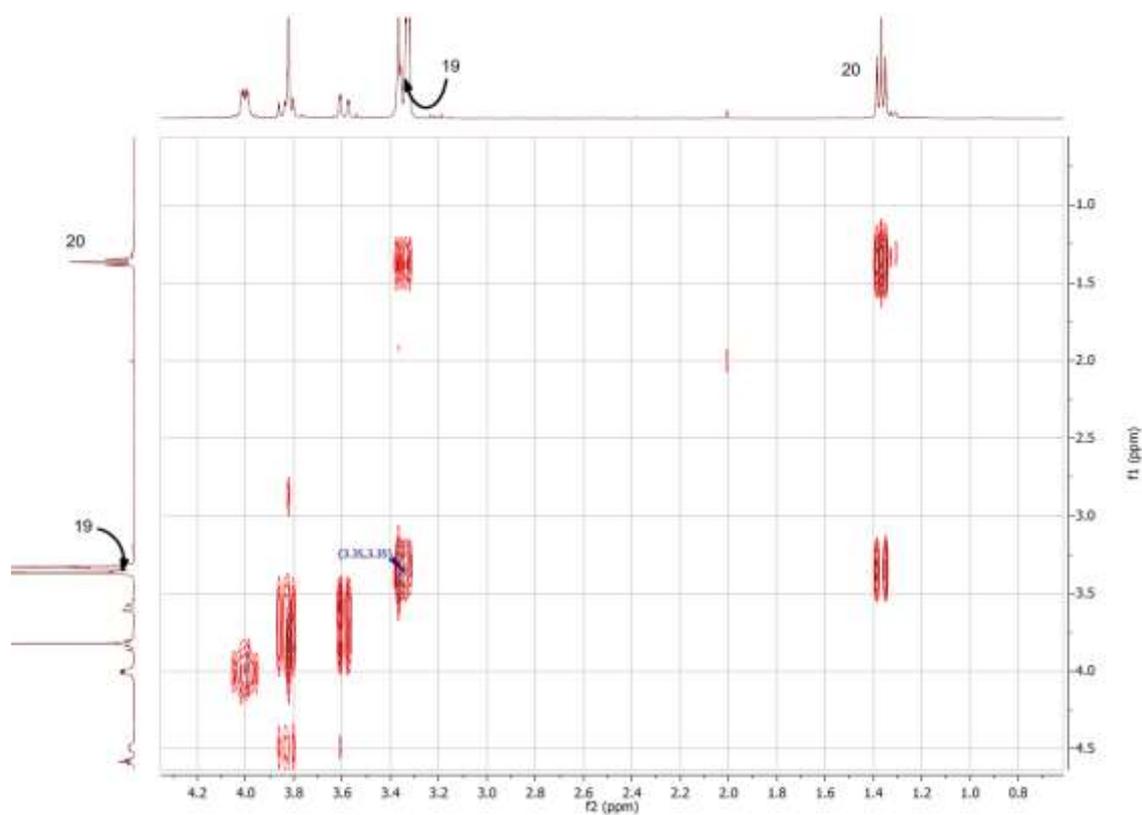


### HMBC-RMN

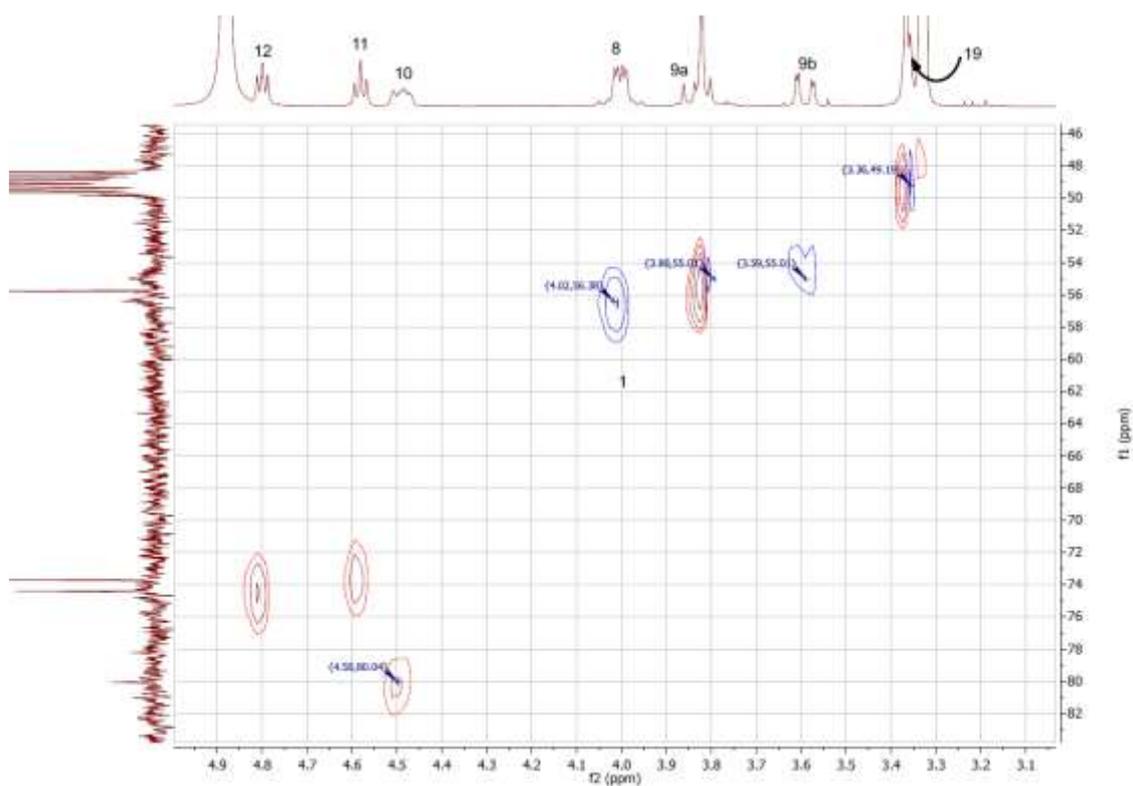


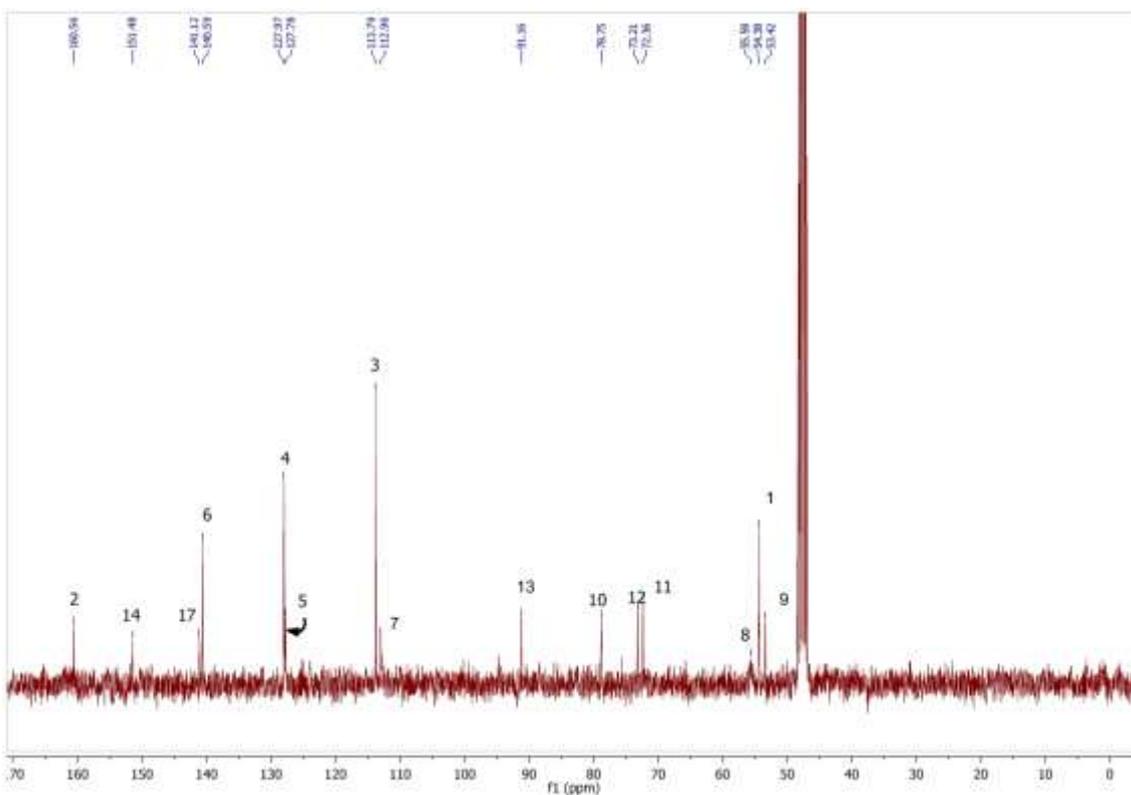
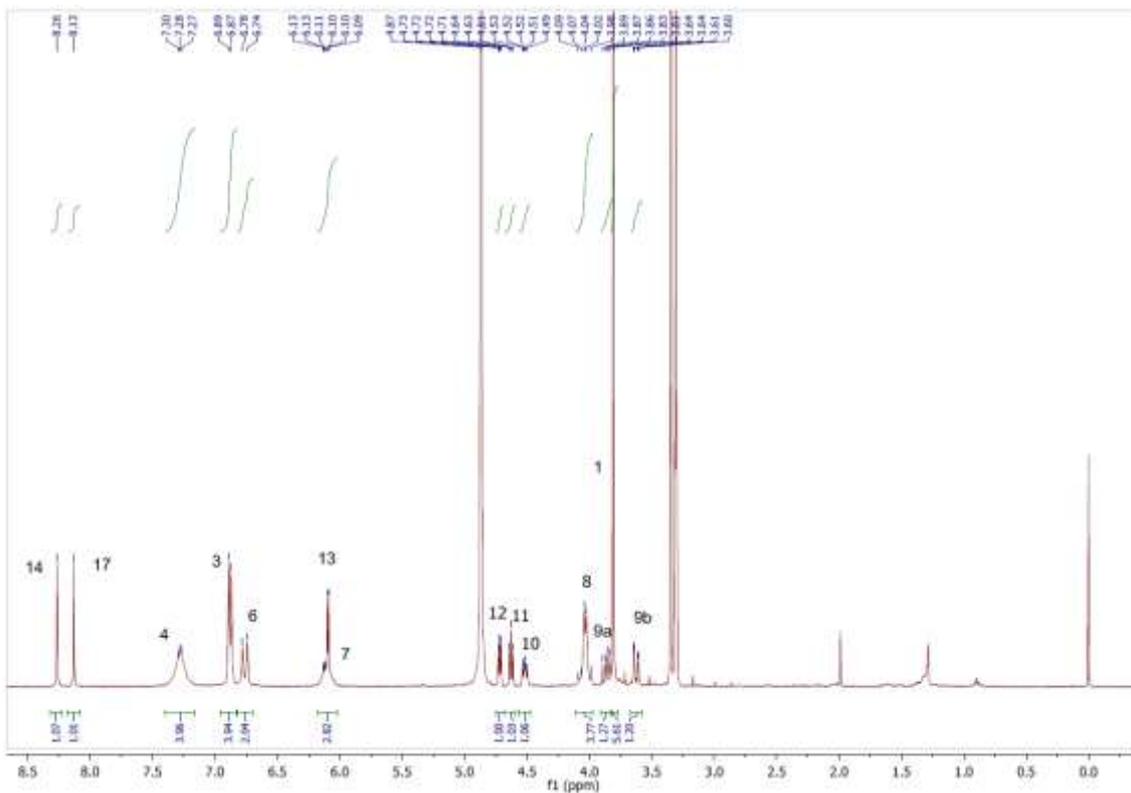
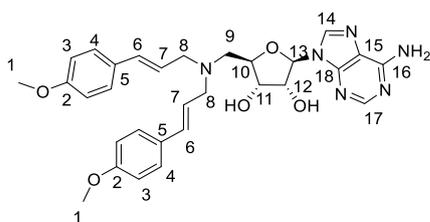


### COSY-RMN

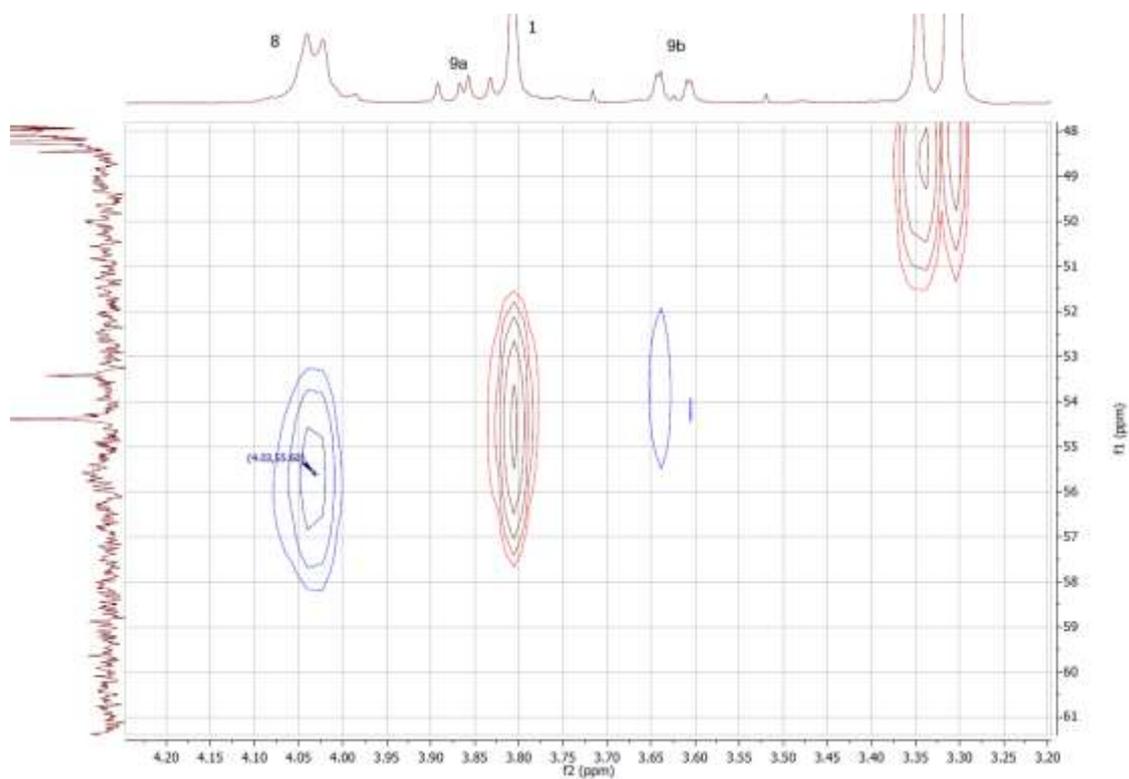


### HSQC-RMN

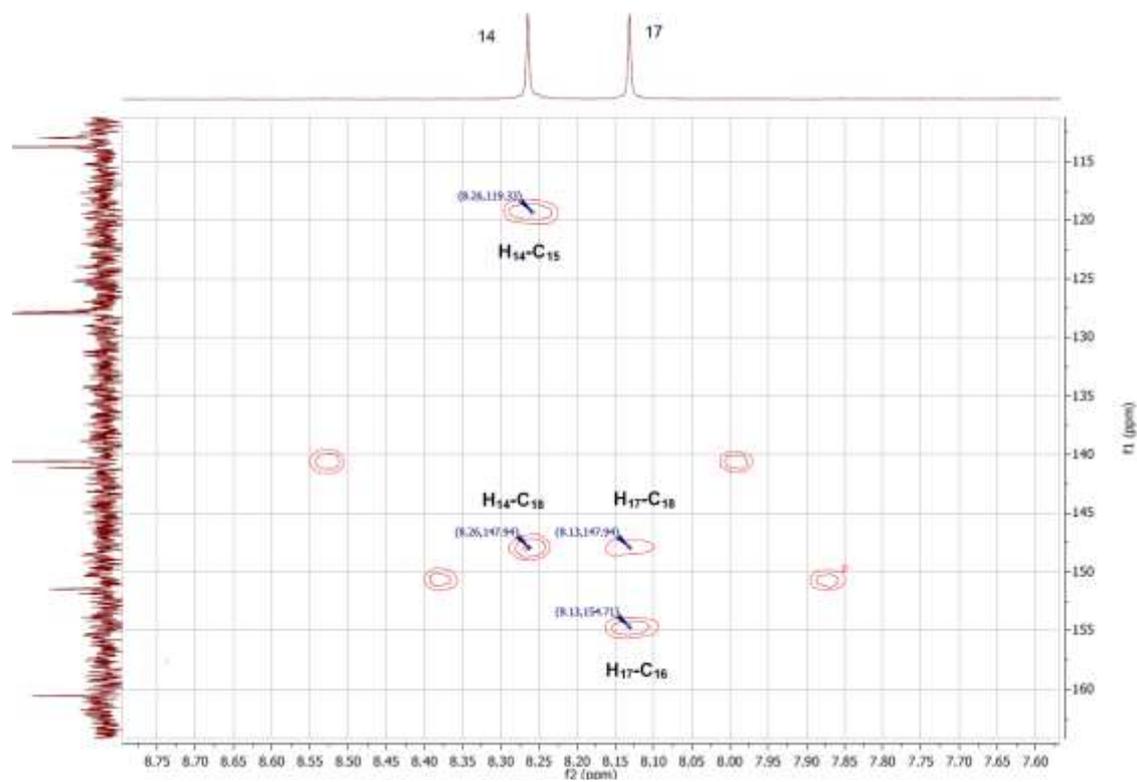


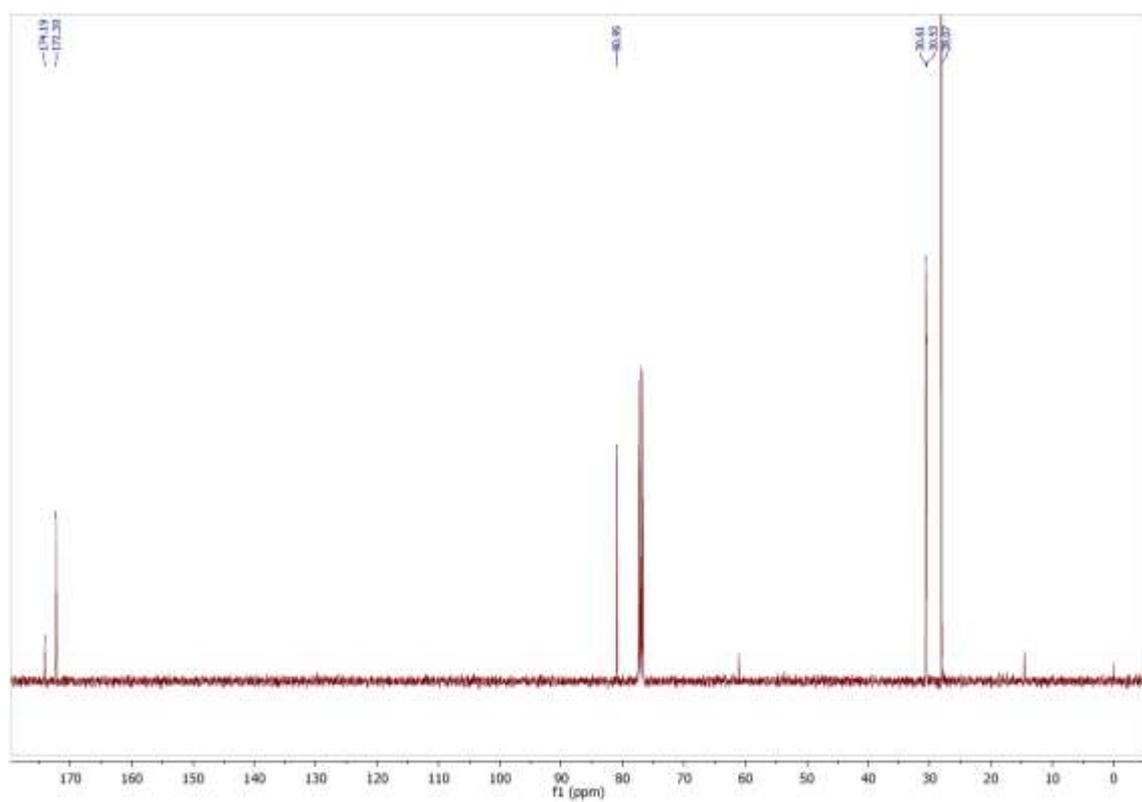
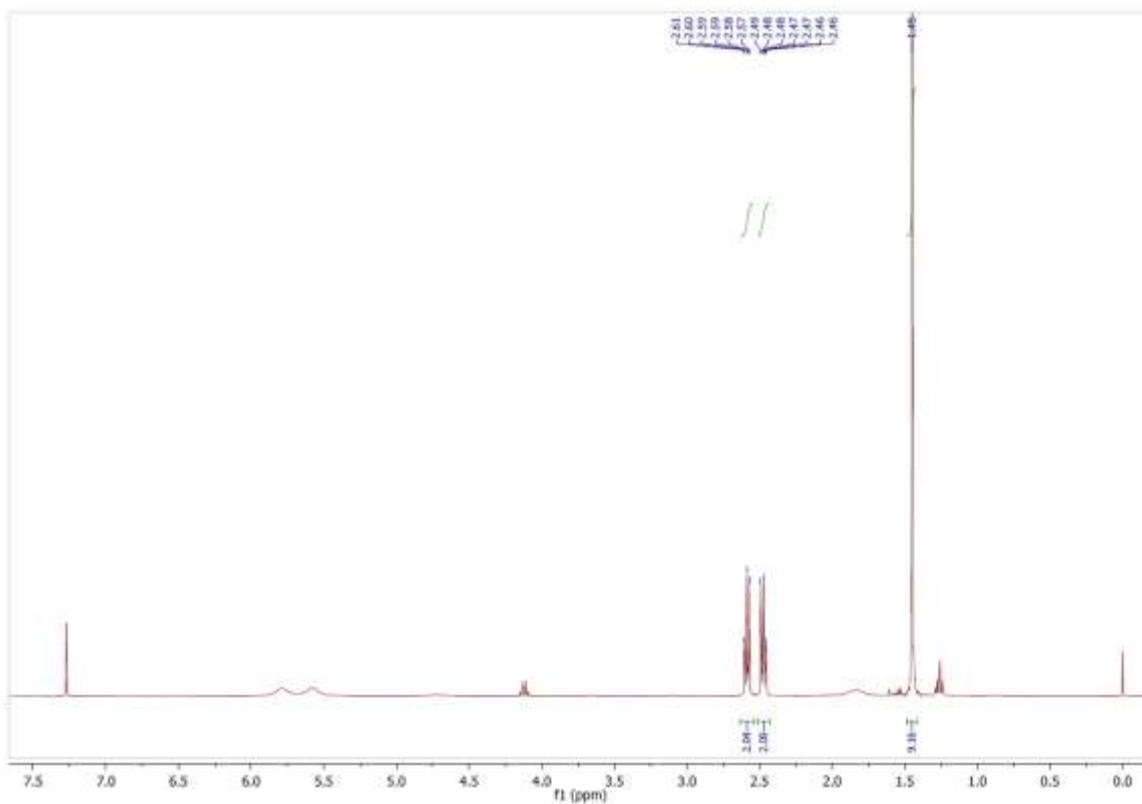
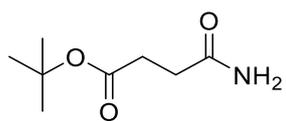


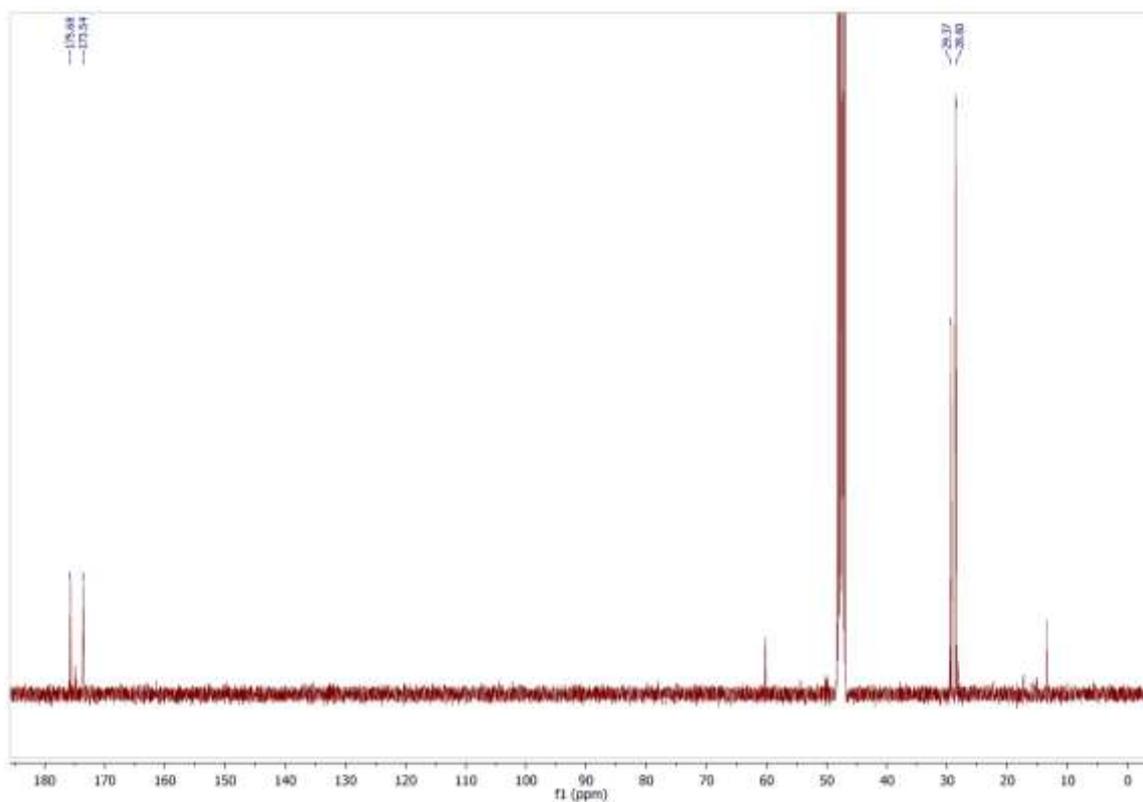
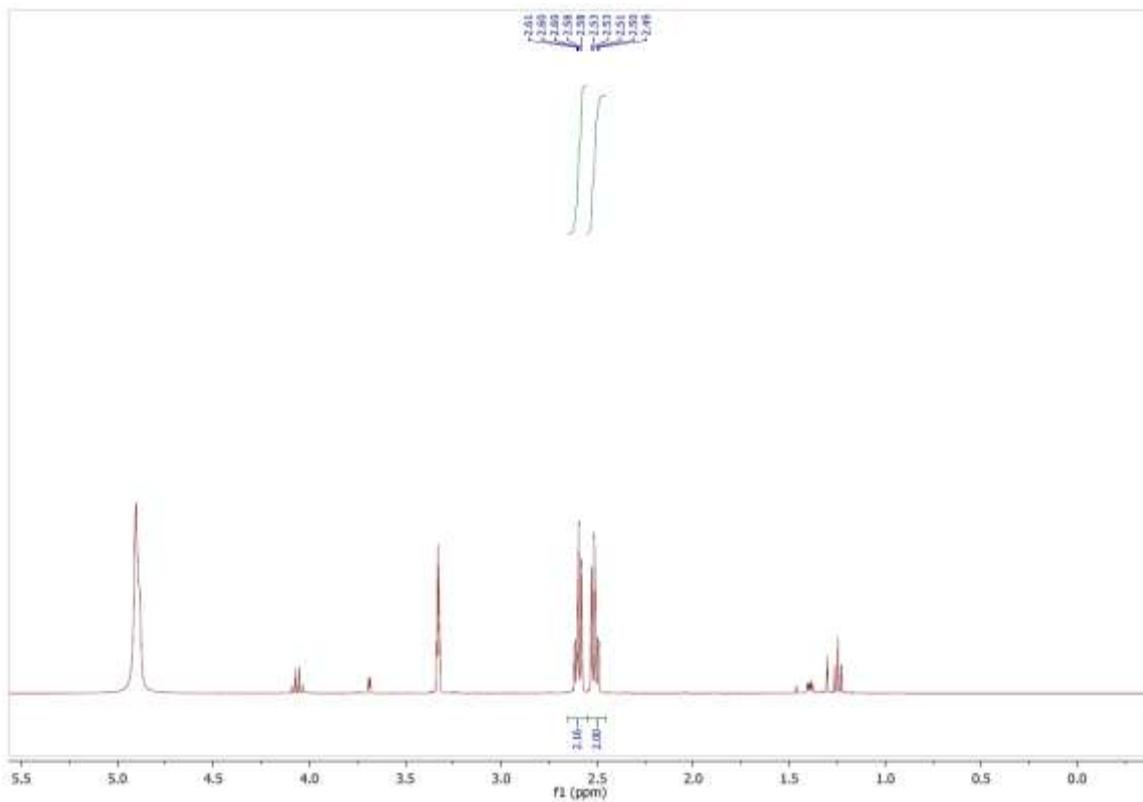
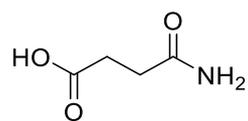
### HSQC-RMN

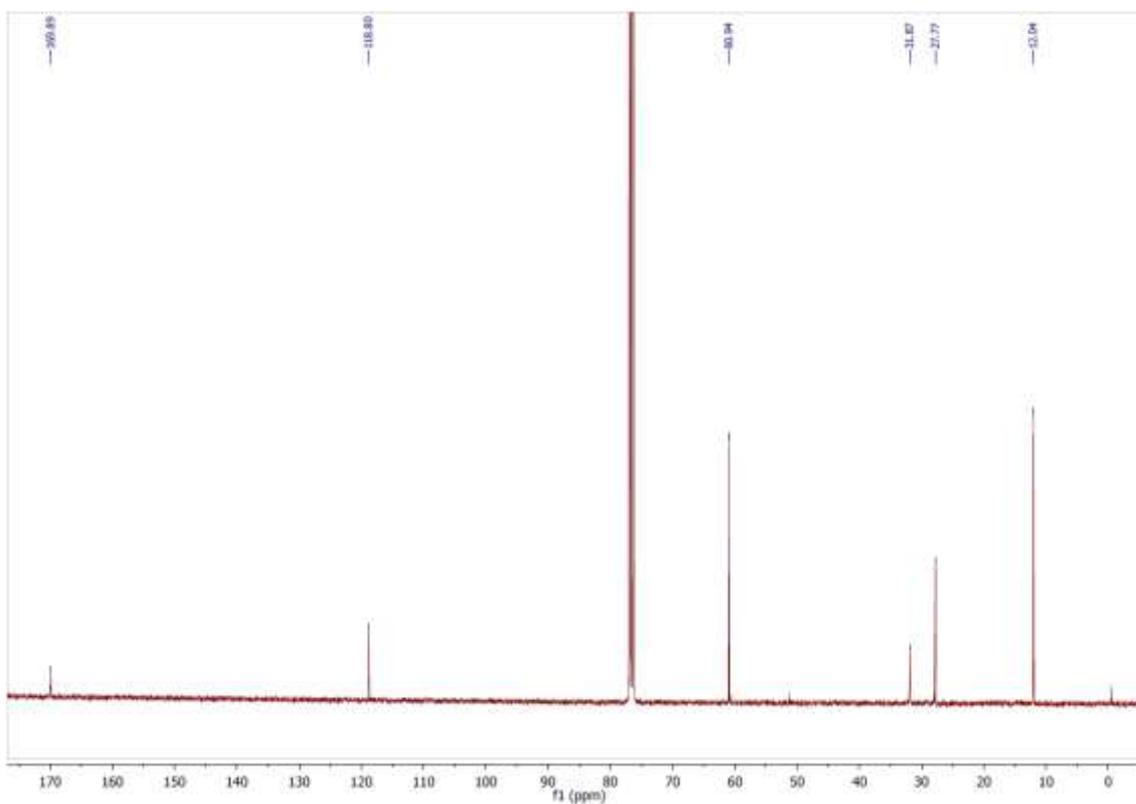
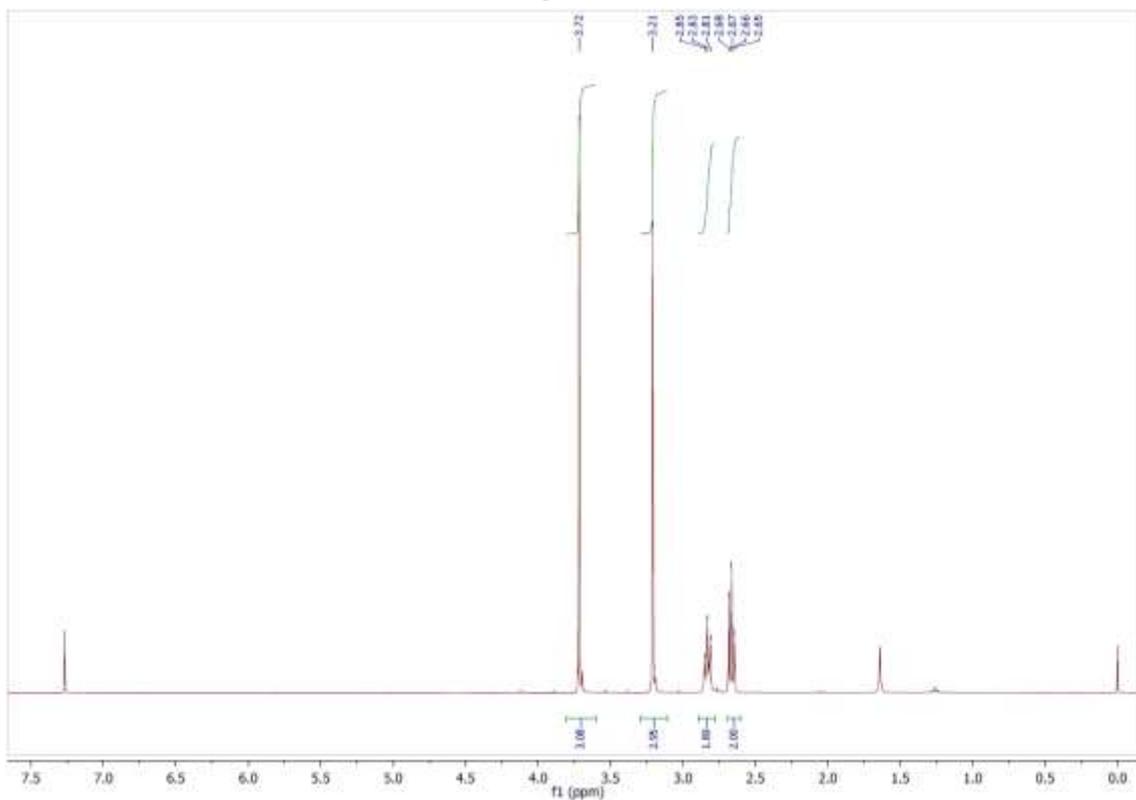
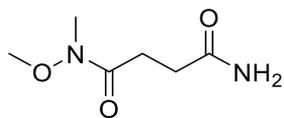


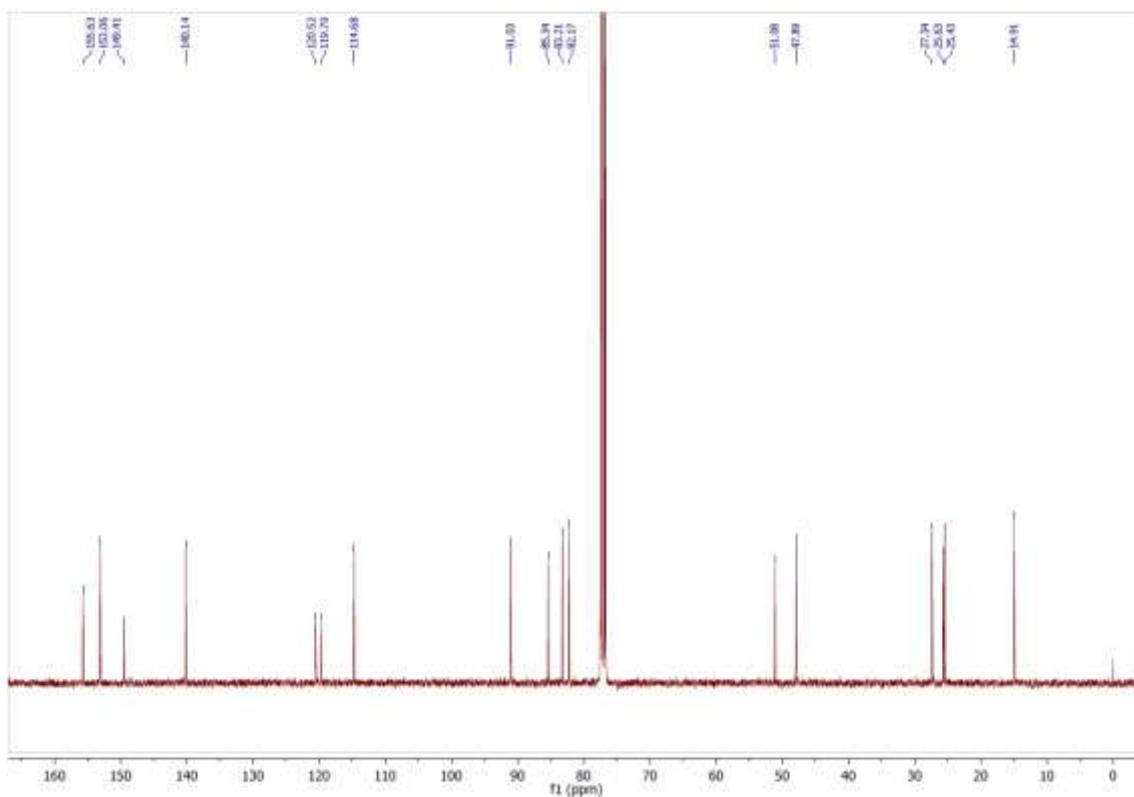
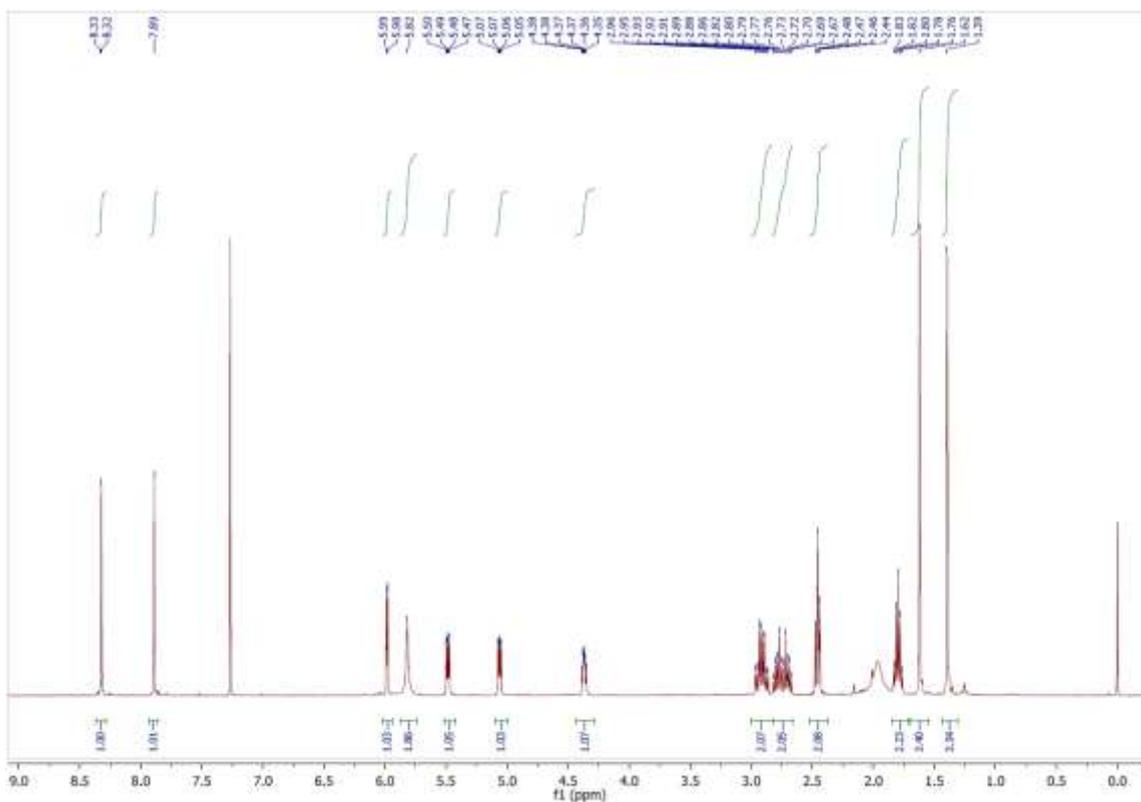
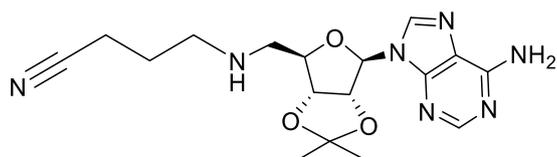
### HMBC-RMN

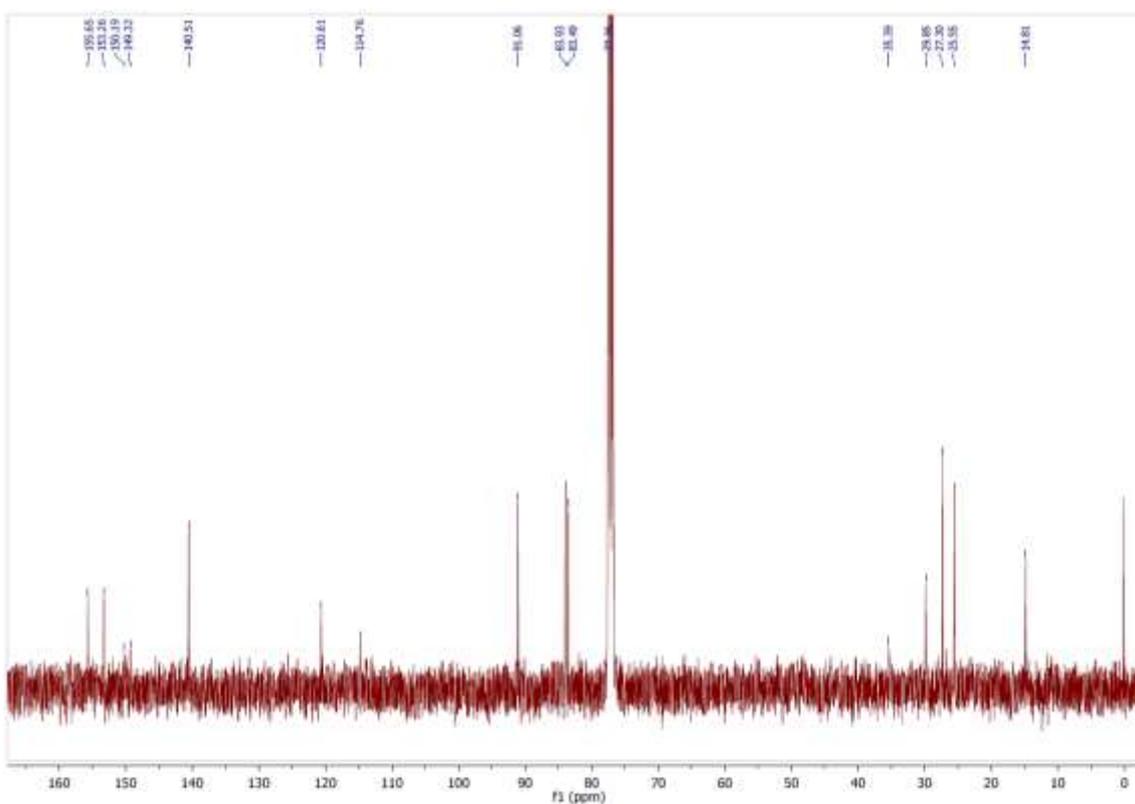
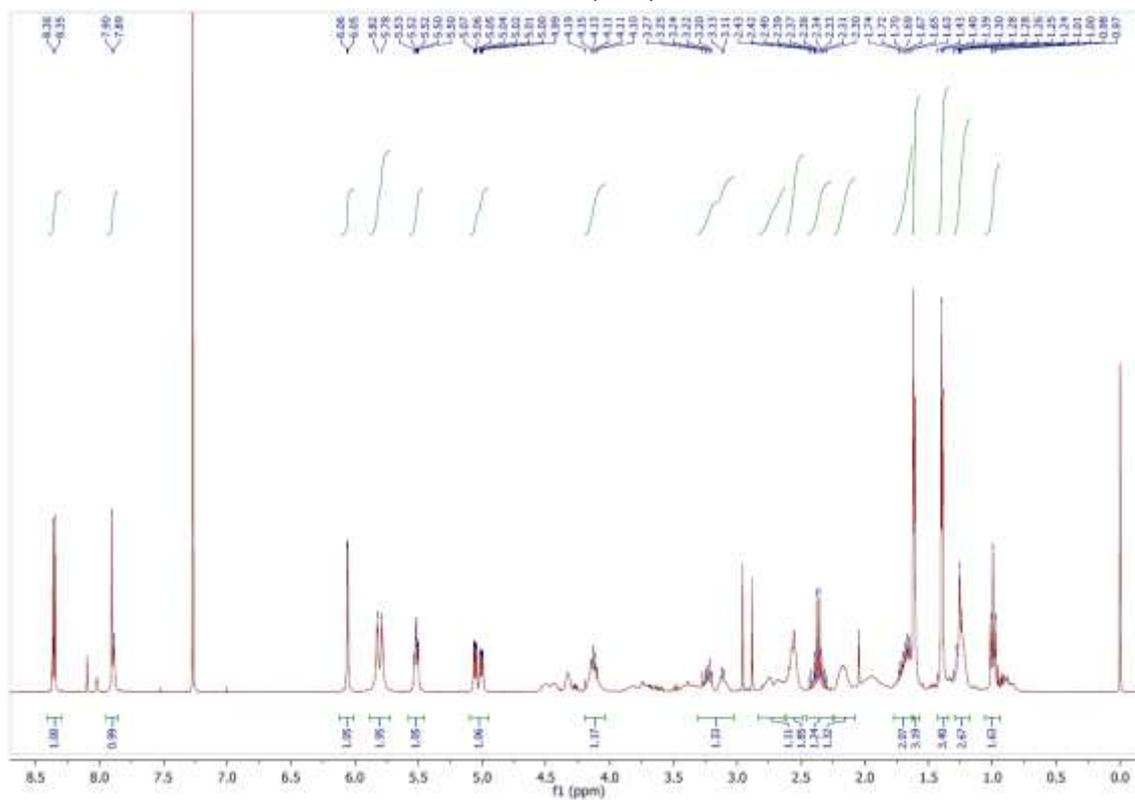
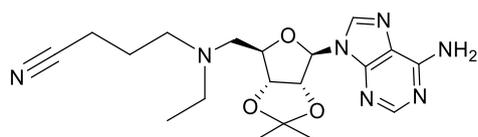


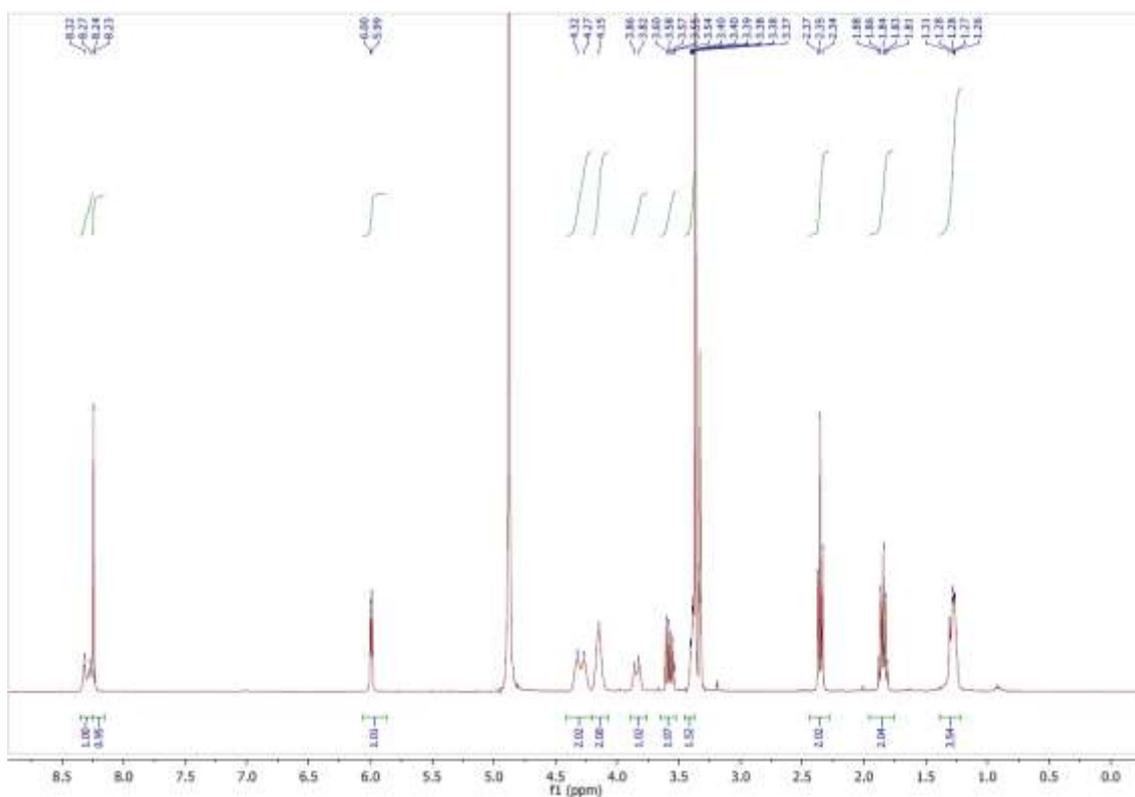
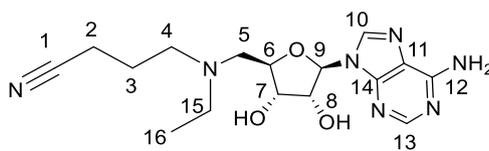




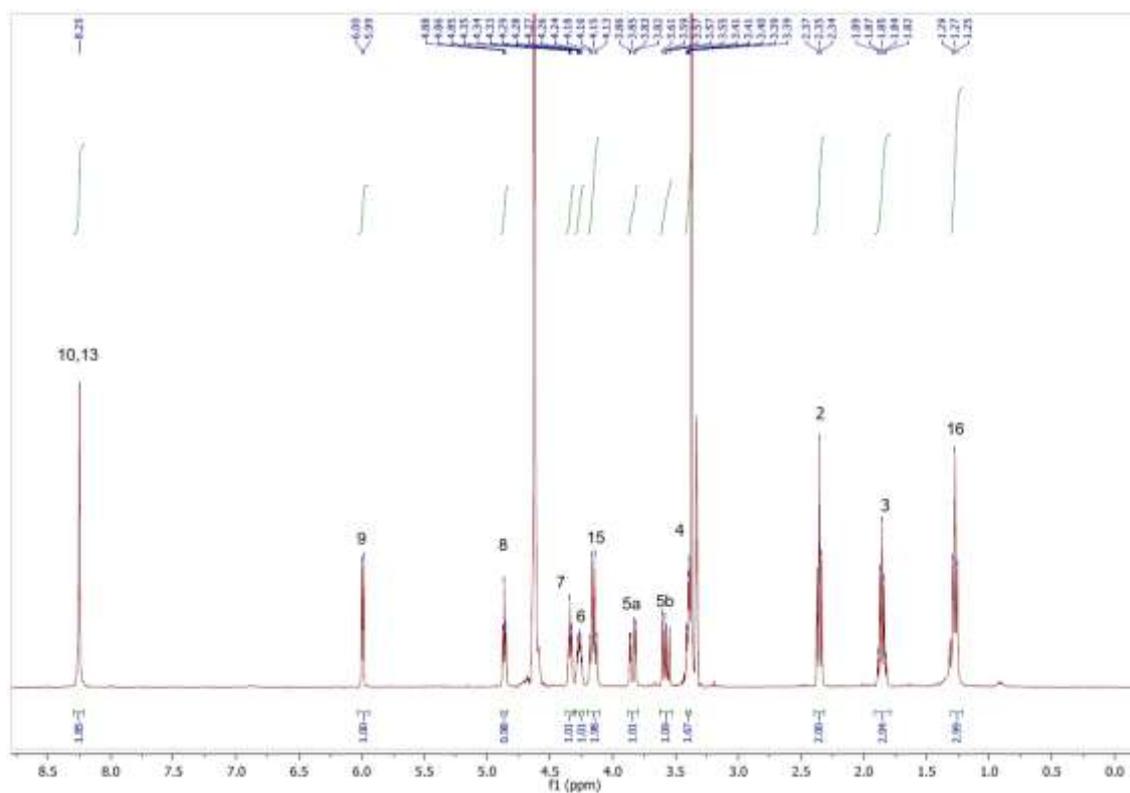


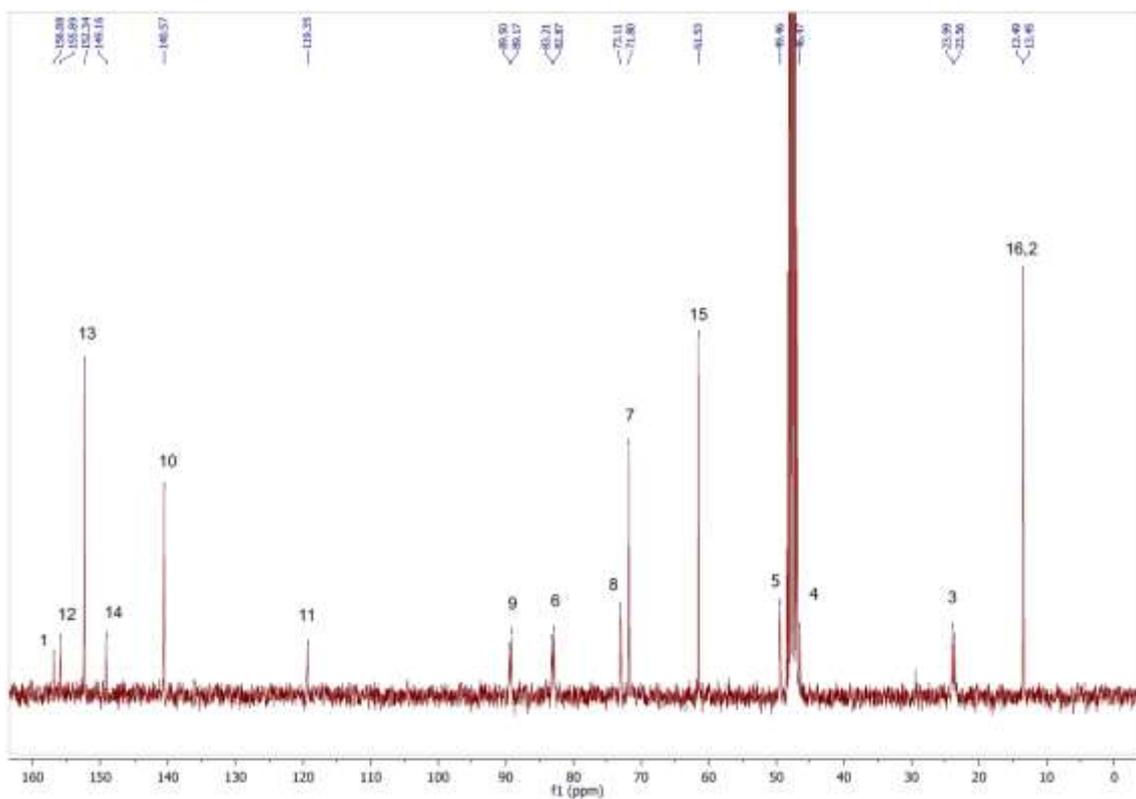




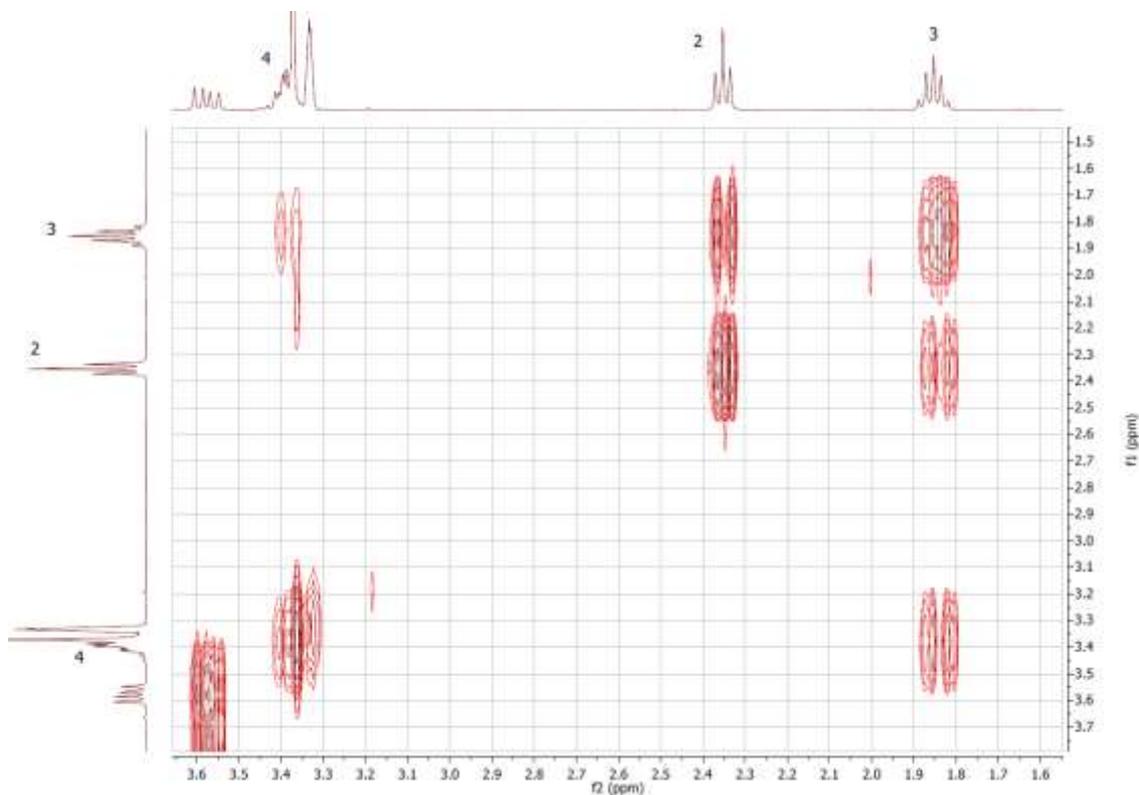


$^1\text{H-RMN}$  a  $60^\circ\text{C}$

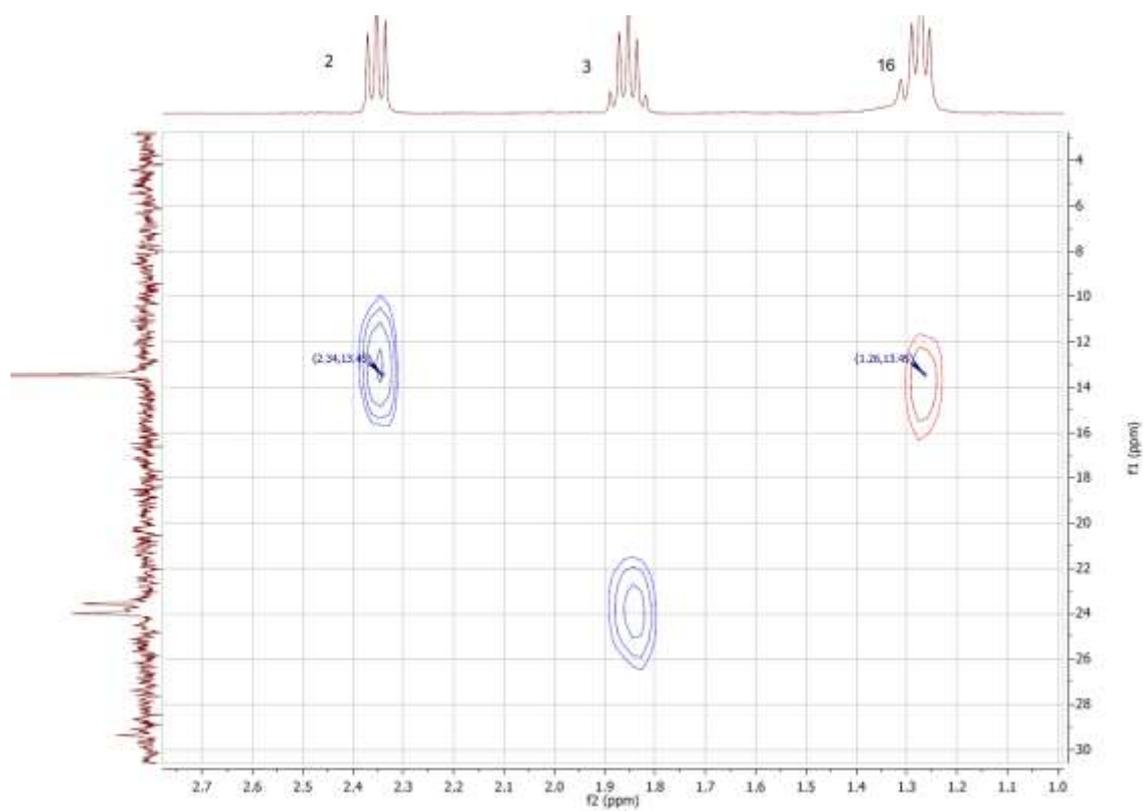




COSY-RMN



### HSQC-RMN





## **Capítulo 4:**

# **Síntesis de los compuestos de la Serie B**



### Antecedentes:

En Jain R et al.<sup>1</sup> los autores presentaron la estructura cristalográfica de la metiltransferasa NS5 del virus del Zika (Zika-Mtasa) unida a un análogo estructural del SAM, denominado **MS2042**. Este análogo conserva la estructura de la adenosina del SAM, así como la cadena de cuatro carbonos con un grupo ácido y un grupo amino en el carbono  $\alpha$ . A diferencia del SAM, que presenta en su estructura un átomo de azufre cargado positivamente que soporta un grupo metilo, el **MS2042** intercambia este S-CH<sub>3</sub> por un grupo 4-F-bencilamina (Figura 4.1).

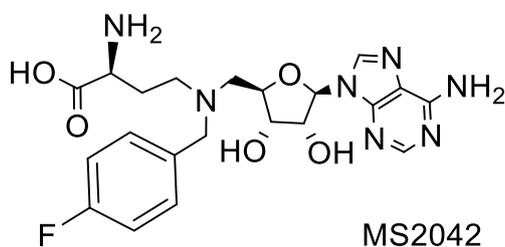


Figura 4.1: Estructura del compuesto **MS2042**.

Los autores determinaron que cuando **MS2042** se une a la Zika-Mtasa, en el sitio de unión al co-factor SAM, el grupo fenilo se extiende hacia el sitio de unión del sustrato. Al igual que la enzima NS5-Mtasa-Den2, esta metiltransferasa realiza dos metilaciones en la caperuza (cap5') del ARN viral: en la posición N7 de la guanosina y en la 2'O de la primera adenosina.

A partir de estas observaciones, se deduce que un estudio sobre posibles sustituciones del anillo bencénico podría otorgar a los compuestos un grado de selectividad mayor hacia este tipo de metiltransferasas que frente a metiltransferasas de origen humano.

1 Jain, R.; Butler, K. V.; Coloma, J.; Jin, J.; Aggarwal, A. K. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 1632.

#### 4.1. Síntesis de los compuestos de la serie B

Teniendo en cuenta los cambios propuestos a partir de la estructura del SAM en el capítulo 2, en conjunto a lo discutido anteriormente, propusimos una nueva serie de análogos. En estos compuestos se sustituyó el residuo aminoacídico por una cadena conteniendo un grupo etiléster y el tioéter por un grupo bencilamina *para*-sustituído, obteniendo así compuestos análogos tanto al SAM como al **MS2042**. Se realizaron variaciones en el sustituyente del anillo bencílico en la posición *para*. Adicionalmente, se seleccionaron otros sustituyentes distintos al grupo fenilo donde se emplearon heterociclos aromáticos de 5 miembros.

El conjunto de estos compuestos los englobamos en la denominada Serie B, donde los compuestos comparten la misma estructura base presente en la Figura 4.2.

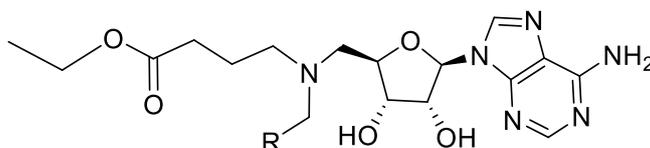
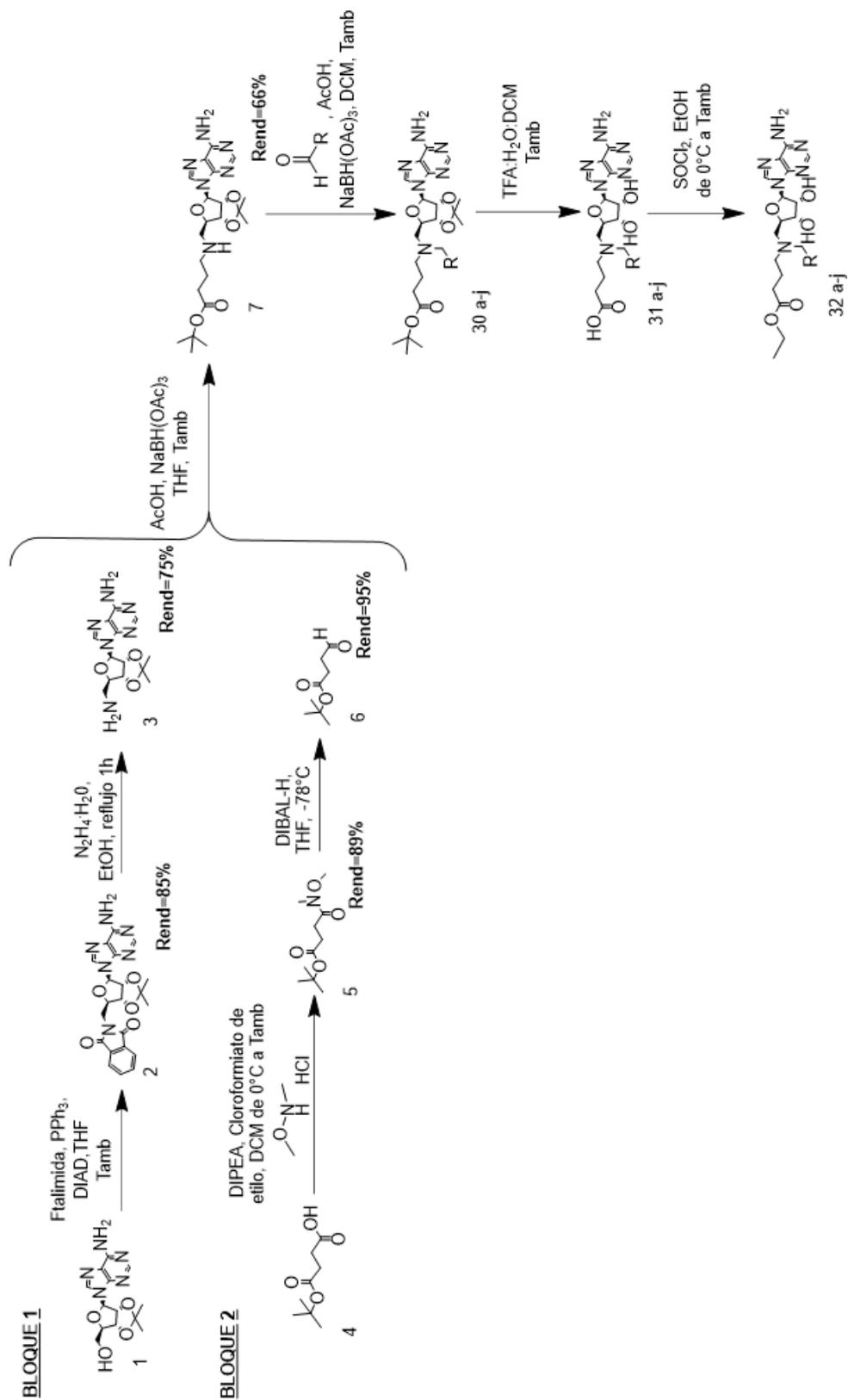


Figura 4.2: Estructura general de la serie B.

Para la síntesis de los compuestos de la serie B, decidimos utilizar la ruta sintética 2, desarrollada en el capítulo anterior, con ciertas modificaciones.

Se partió de la síntesis del bloque 1 y del bloque 2 hasta la obtención del compuesto **7**, de forma análoga al caso anterior. Posteriormente, se sustituyó la reacción de sustitución con bromuro de etilo del compuesto **7**, por una segunda aminación reductiva con el aldehído adecuado para la obtención del compuesto de interés. Las reacciones de hidrólisis y formación del éster etílico se realizaron de forma análoga al caso anterior (Esquema 4.1).



Esquema 4. 1: Ruta sintética para la obtención de la serie B

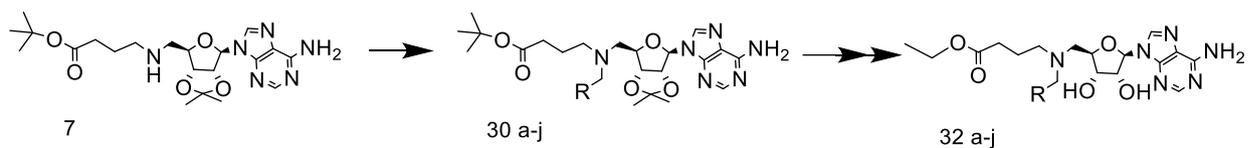
Los *N*-sustituyentes seleccionados para la síntesis de los compuestos de la serie B pueden dividirse en dos grupos. Un primer grupo donde los sustituyentes son derivados de benceno sustituidos en posición *para* (compuestos a-g); y un segundo grupo donde los sustituyentes son anillos heterocíclicos de cinco miembros (compuestos h-j). Ver Tabla 4.1

Los compuestos **32 a-g** fueron seleccionados como derivados bencénicos con sustituyentes en posición *para* por analogía estructural a **MS2042**.

El compuesto **MS2042** presenta como sustituyente un anillo benceno con un átomo de flúor, por lo que se decidió estudiar la influencia de este tipo de sustituyentes en la interacción entre el ligando y la proteína. Se sintetizó el compuesto **32a** con un grupo fenilo como sustituyente, para evaluar la incidencia del anillo aromático sin sustituir. Posteriormente, se sintetizaron los compuestos **32b-d** con los halógenos F, Cl, Br con el fin de determinar la influencia de estos sustituyentes en la interacción proteína-ligando. Así mismo, se prepararon los compuestos **32e-g** donde los sustituyentes en *para* fueron grupos más complejos: N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>.

Por último, se sintetizaron los compuestos **32h-j** donde el sustituyente fue un anillo heterocíclico de cinco miembros furano, tiofeno y tiazol.

Se realizó la síntesis total de los compuestos propuestos siguiendo la ruta sintética del esquema 4.1, con buenos rendimientos. Estos rendimientos se informan, para facilitar la comparación, en la tabla 4.1. Allí, se presentan los compuestos **30a-j** (siendo este el producto de la segunda aminación reductiva) y los compuestos finales **32a-j** (cuyo rendimiento corresponde a 2 etapas de reacciones, la primera la hidrólisis del éster y del acetónido y la segunda la formación del etiléster).



	<b>R</b>	<b>Rend. compuesto 30</b>	<b>Rend. compuesto 32 (2 reacciones)</b>
<b>a</b>		55%	29%
<b>b</b>		50%	43%
<b>c</b>		27%	64%
<b>d</b>		65%	45%
<b>e</b>		21%	30%
<b>f</b>		37%	82%
<b>g</b>		73%	76%
<b>h</b>		74%	64%
<b>i</b>		35%	49%
<b>j</b>		34%	56%

Tabla 4.1: Rendimientos de los compuestos sintetizados para los compuestos **30 a-j** y **32 a-j**.

Para los compuestos que presentan un grupo fenilo, en el caso de la segunda aminación reductiva el compuesto **30g** fue el que presentó el mayor rendimiento siendo éste del 73%. Mientras que los rendimientos más bajos fueron los de los compuestos **30c** y **30e** con un rendimiento del 27% y 21% respectivamente.

El alto rendimiento en la formación del compuesto **30g** puede explicarse debido a la alta deficiencia electrónica propia del sustituyente  $-CF_3$ , debido a que genera un efecto inductivo en el anillo de benceno, retirando electrones del anillo aromático a través del enlace, lo que reduce la densidad electrónica del anillo aromático aumentando la electrofilia del carbono del aldehído, aumentando su reactividad. Esto genera que la formación de la imina a partir del ataque de la amina de la adenosina 3 sea más favorable.

Debido a la influencia de los sustituyentes discutida, se esperaba que el rendimiento de la aminación reductiva en el caso de los halógenos fuera  $F > Cl > Br > H$ , en concordancia con los valores de electronegatividad de estos átomos. Sin embargo, los rendimientos obtenidos para esta reacción se pueden ordenar como:  $Cl (65\%) > H (55\%) > F (50\%) > Br (27\%)$ . Si bien los resultados obtenidos no corresponden a lo esperado según la electronegatividad de los sustituyentes hay otros factores a tener en cuenta. Por ejemplo, se deben contemplar efectos prácticos en la síntesis, la terminación de la reacción y la purificación por columna de estos compuestos en las diferencias de los rendimientos obtenidos con los esperados.

Por último, el compuesto **30e** puede presentar un menor rendimiento respecto a los demás análogos ya que puede verse afectada su solubilidad en el medio debido a la formación de una sal al reaccionar la dietilamina del compuesto con el ácido acético agregado en la reacción de aminación reductiva. Adicionalmente al utilizar 1,5 eq de ácido acético, la formación de la sal mencionada consumiría parte del ácido acético necesario para la reacción, disminuyendo así el rendimiento en la obtención del compuesto **30e**.

Con respecto a los compuestos heterocíclicos de cinco miembros, el compuesto **30h** presentó el mejor rendimiento en la segunda aminación reductiva, siendo este del 76%. Los compuestos **30i** y **30j** presentaron rendimientos similares.

En el caso de la síntesis del compuesto **30h**, es de esperarse que presente mejores rendimientos en la aminación reductiva respecto al tiofeno y al tiazol (Figura 4.3). Los heteroátomos que se presentan en estos anillos tienen electrones disponibles para generar resonancia en el anillo, lo que aumenta su densidad electrónica (Ver esquema 4.2). Sumado a esto, estos heteroátomos presentan cierta electronegatividad que aporta el efecto inductivo de quitar electrones. El oxígeno presenta una mayor electronegatividad que el azufre y el nitrógeno, lo que genera una mayor influencia del efecto inductivo en el anillo sumado a que sus electrones no se encuentran disponibles con tanta facilidad para la resonancia mostrada en el Esquema 4.2, con respecto a los otros heteroátomos. Adicionalmente, debemos de considerar que el tiazol presenta un grupo metilo, que es un dador de electrones por efecto inductivo en el anillo, aunque puede que su influencia sea despreciable. De este razonamiento podemos concluir que de estos 3 compuestos el furfural será el que presenta un aldehído más electrófilo lo que se traduce en un mejor rendimiento en la reacción de aminación reductiva.

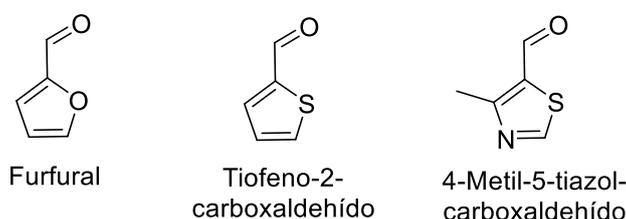
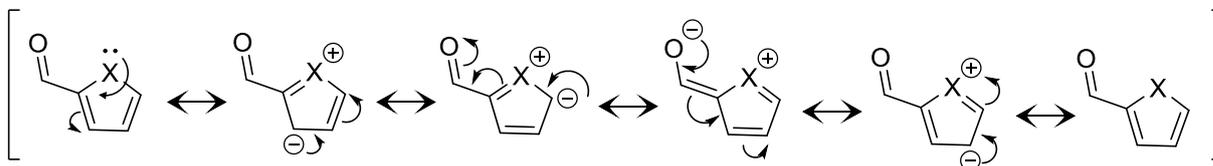


Figura 4.3: Estructura de los aldehídos: Fufural, Tiofeno-2-carboxaldehído y 4-Metil-5-tiazol-carboxaldehído



Esquema 4.2: Deslocalización en el anillo heterocíclico de 5 miembros.

Cabe aclarar que, al igual que lo discutido en el capítulo 3, el ácido acético utilizado en la reacción de aminación reductiva afecta la estabilidad del acetónido provocando su hidrólisis, lo que podría provocar una disminución en el

rendimiento en dicha reacción. La cantidad obtenida de los compuestos **30a-j** fueron aceptables como para continuar con la síntesis de los compuestos finales por lo que, se decidió no optimizar esta reacción.

Los rendimientos de los compuestos finales **32a-j**, son muy variables. Si bien este rendimiento corresponde a 2 etapas de reacciones, la hidrólisis del éster y del acetónido y la formación del etiléster, los compuestos finales fueron sometidos a distinto número de purificaciones por cromatografía por columna.

#### 4.2. Asignación de los espectros de RMN realizados. Caracterización de los compuestos sintetizados.

Una vez obtenidos los compuestos **32a-j** fueron caracterizados por HRMS y espectroscopía de RMN. A modo de ejemplo, a continuación, se muestra la asignación de los espectros de RMN realizados al compuesto **32b**. Este mismo procedimiento se aplicó a los demás compuestos. En la parte experimental se encuentra la asignación final de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN para los compuestos **32a-j**.

Comenzamos integrando e identificando las señales correspondientes a los solventes, en este caso al MeOD y al H<sub>2</sub>O. Numeramos la estructura del compuesto **32b** para facilitar la asignación del espectro (Figura 4.4). En la figura 4.5 se identificaron la zona azul que corresponde a los protones de grupos metilos (entre 0.5 ppm y 1.5 ppm) y la zona verde que corresponde a los protones aromáticos (entre 7 ppm y 9 ppm). A partir de esto, se asignaron los protones 1 correspondiente a los protones del CH<sub>3</sub> y se identificaron los protones 12 y 15 los cuales se encuentran en la zona de aromáticos. Los protones 12 y 15, integran 1H cada uno y se presentan como singuletes, en este caso se observó la superposición de estas dos señales.

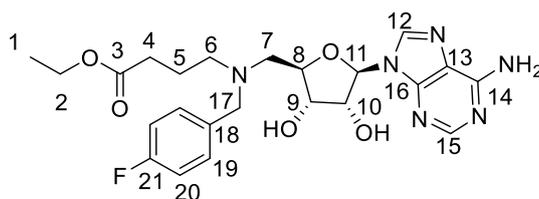


Figura 4.4: asignación numérica del compuesto **32b**.

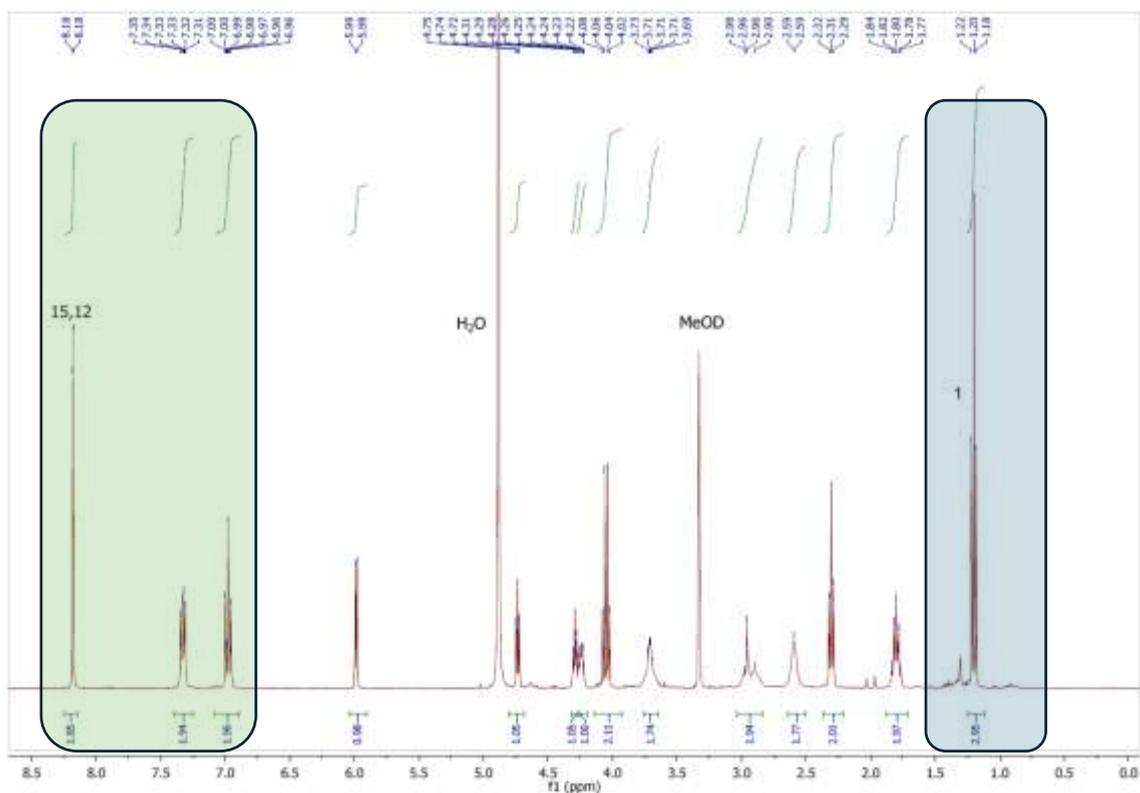


Figura 4.5: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **32b** con las señales correspondientes a los solventes identificados, así como las zonas relevantes del espectro para comenzar la asignación.

A partir de la asignación realizada, fue posible asignar los protones 2 a partir del espectro de COSY-RMN, como se muestra en la figura 4.6. Debido a la cercanía entre los protones 1 y 2, estos deberían presentar un acoplamiento escalar entre ellos, por lo cual es posible observar esta correlación en el espectro de COSY-RMN. Por otro lado, en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  la señal de los protones 1 se presentó como un triplete que integraba 3H y las señales de los protones 2 como un cuarteto que integraba 2H, lo que concuerda con la asignación realizada.

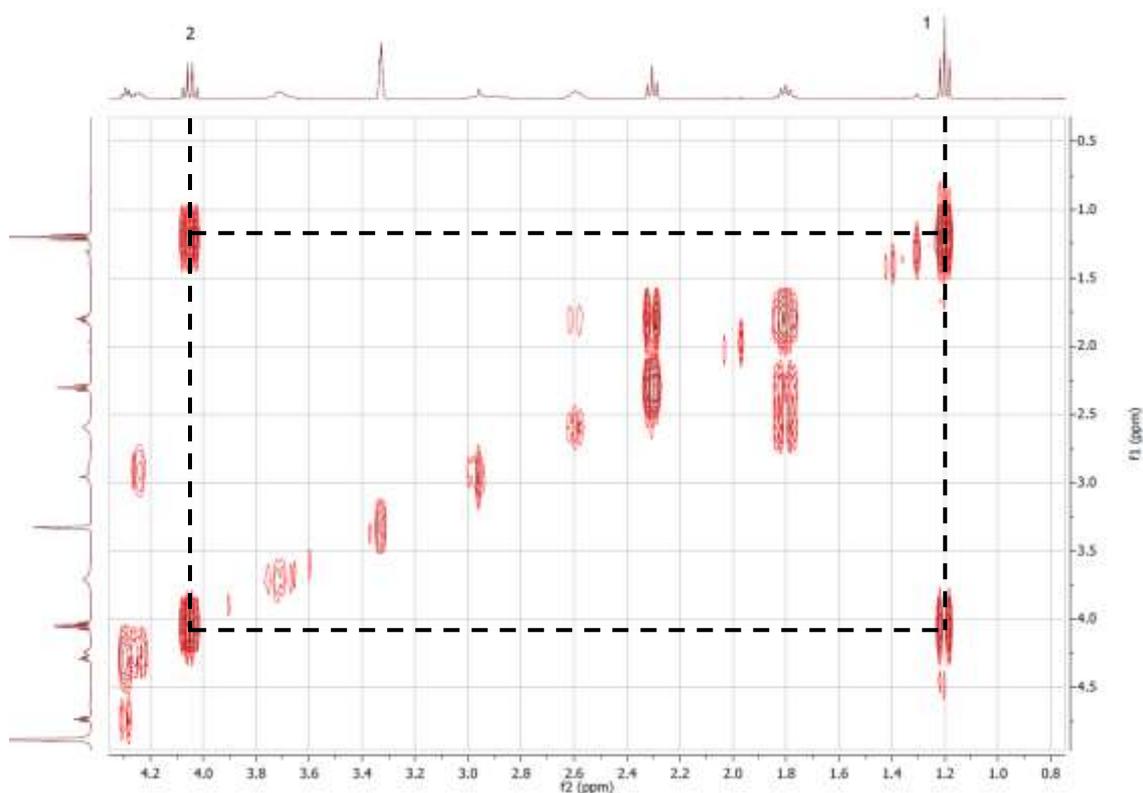


Figura 4.6: Ampliación del espectro de COSY-RMN para la asignación de los protones 2 a partir de la señal de los protones 1.

Se continuó con la asignación de los protones correspondientes a la ribosa. La cual debe de presentar cuatro señales en el experimento de  $^1\text{H}$ -RMN que integren 1H cada una. Además, en el espectro de HSQC-RMN estas señales deben de corresponder a CH. El experimento de HSQC-RMN realizado se diferencian las correlaciones de protones con carbonos CH y  $\text{CH}_3$  (en rojo) de las correlaciones de protones con  $\text{CH}_2$  (en azul). A partir de estos 2 experimentos se pudo determinar que las cuatro señales correspondientes a la ribosa se presentaron entre 4.2 ppm y 6.0 ppm. (Ver figura 4.7). De estas cuatro señales fue posible asignar al portón 11 ya que este fue el único que presentó señal de correlación en el espectro de HMBC-RMN con carbonos mayores a 100 ppm, correspondientes a carbonos aromáticos (figura 4.8). Este tipo de experimentos permiten el estudio de acoplamiento a través del enlace, en particular el acoplamiento carbono-protón a 3 o 4 enlaces de distancia. Una vez localizada la señal del protón 11 y utilizando nuevamente el espectro de COSY-RMN fue posible la asignación de los protones 10, 9 y 8 correspondientes a la ribosa del

compuesto **32b**. Utilizando el mismo razonamiento fue posible la asignación de los protones del CH<sub>2</sub> denominado como 7, a partir del acople escalar existente entre los protones 8 y 7. (Ver figura 4.9)

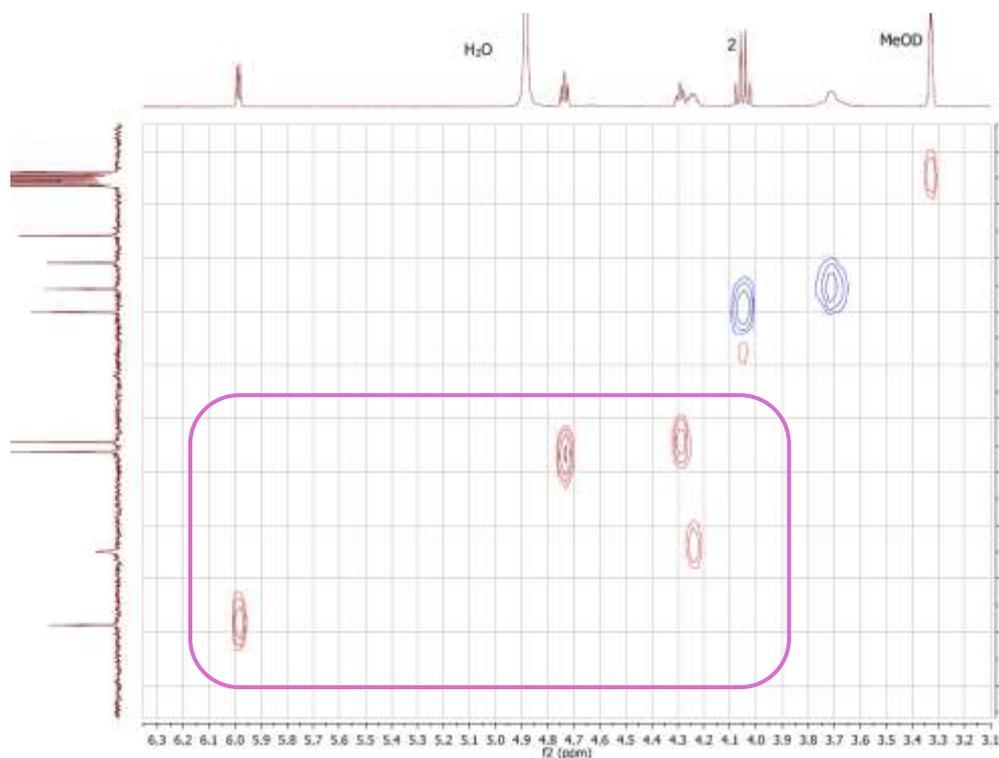


Figura 4.7: Ampliación del espectro de HSQC-RMN correspondientes a los protones de la ribosa.

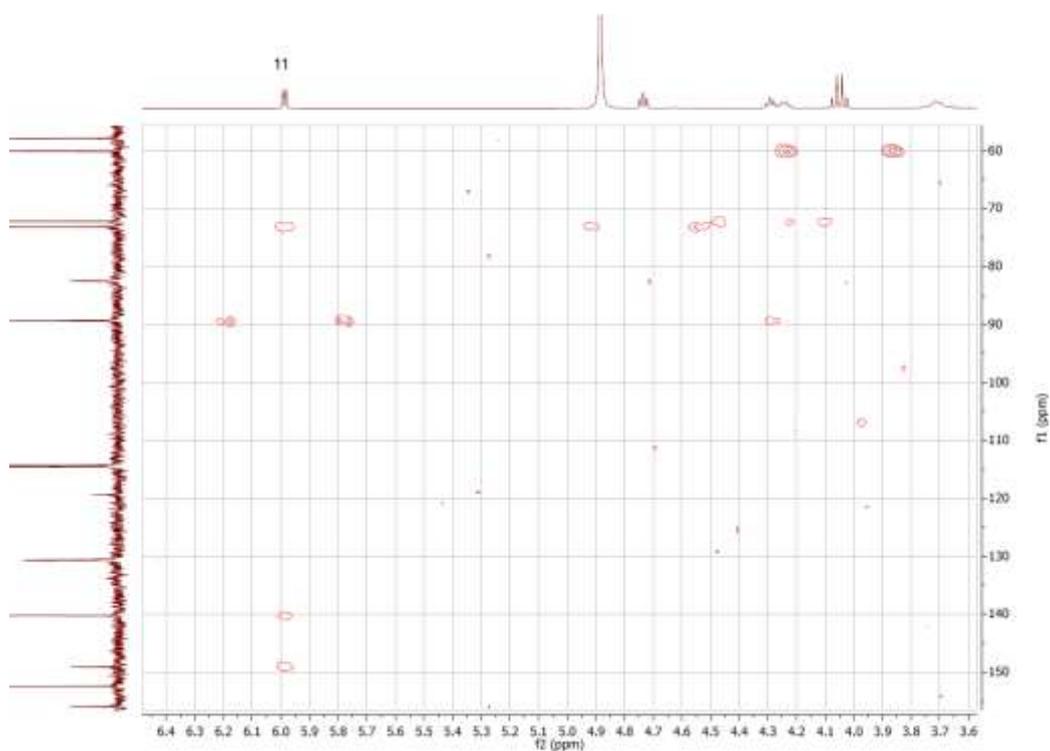


Figura 4.8: Ampliación del espectro de HMBC-RMN correspondientes a los protones de la ribosa.

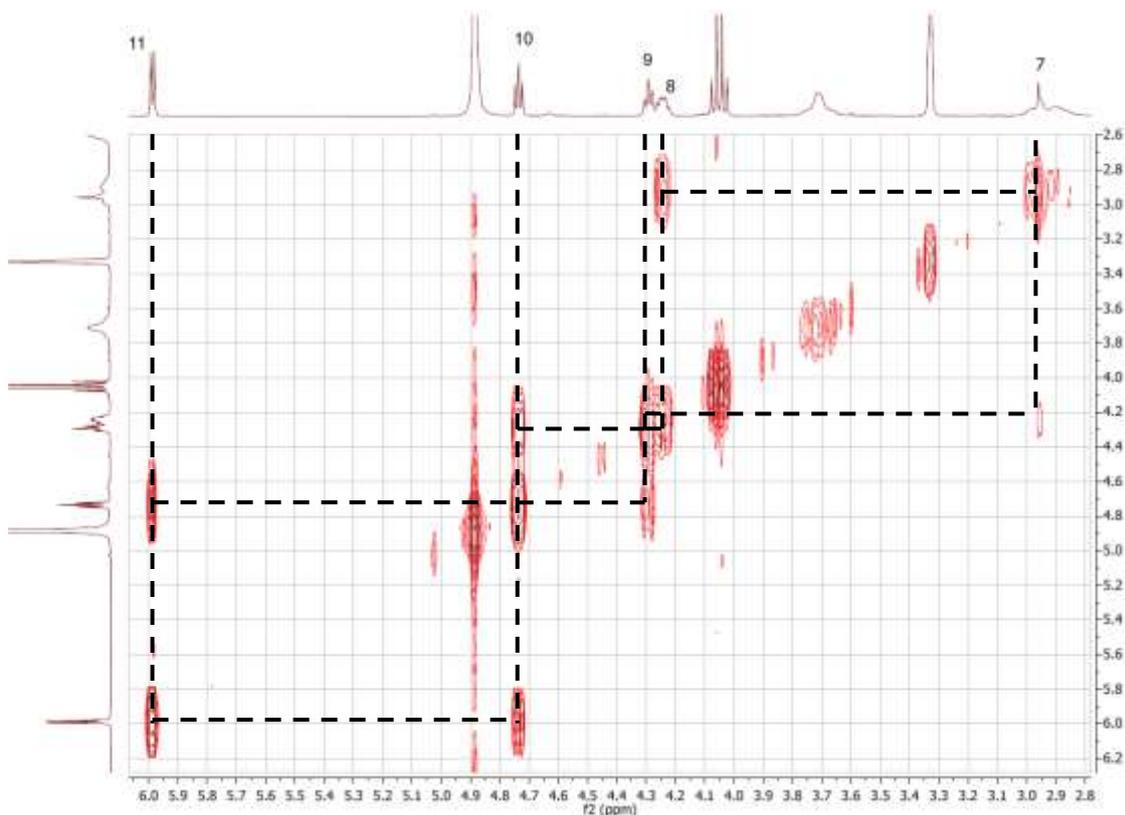


Figura 4.9: Ampliación del espectro de COSY-RMN para la asignación de los protones de la ribosa.

Las asignaciones realizadas hasta el momento se observan en la figura 4.10, donde además se muestra una zona marcada en rosado, entre 1.4 ppm y 2.6 ppm, donde se presentan tres señales de  $^1\text{H}$ -RMN. Cada una de estas tres señales integran 2H y en el espectro de HSQC-RMN se correlacionan con carbonos  $\text{CH}_2$ , adicionalmente, en el espectro de COSY-RMN se observa que existe acoplamiento escalar entre ellas. Con estos datos se podría correlacionar estas tres señales con los protones 4, 5 y 6. Observando la estructura del compuesto **32b** y en base al entorno químico que experimenta cada uno de estos protones la señal que presenta mayor desplazamiento correspondería al protón 6 ya que este protón está sobre un carbono unido directamente a un heteroátomo, mientras que el protón 5 se encuentra unido a dos  $\text{CH}_2$  por lo que presentaría el menor desplazamiento químico. Por último, el protón 4 se encuentra unido a un  $\text{CH}_2$  y a un carbono de un grupo carbonilo, por lo que debería de presentar un desplazamiento intermedio entre el protón 5 y el protón 6. En la figura 4.11 se observa la conectividad de estos tres protones.

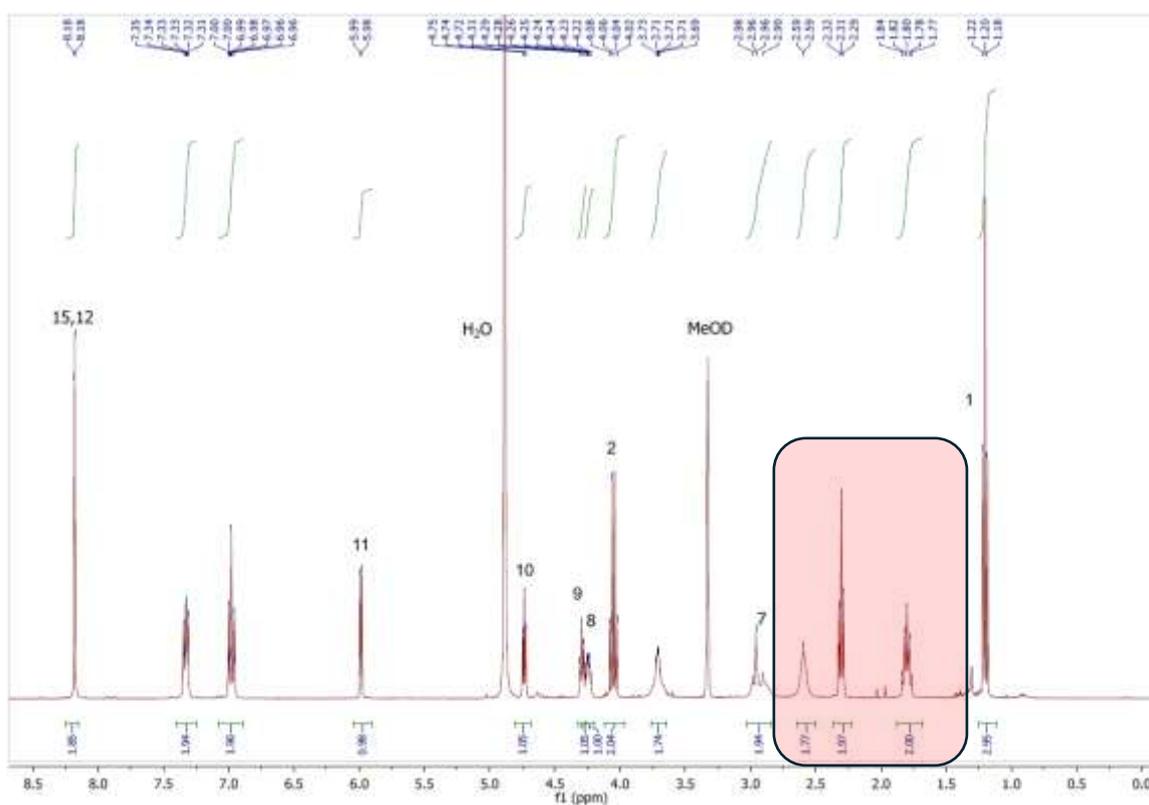


Figura 4.10: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  con los protones de la ribosa, la purina y el etilo asignados. En la zona rosada se observan las señales de los protones 4, 5 y 6.

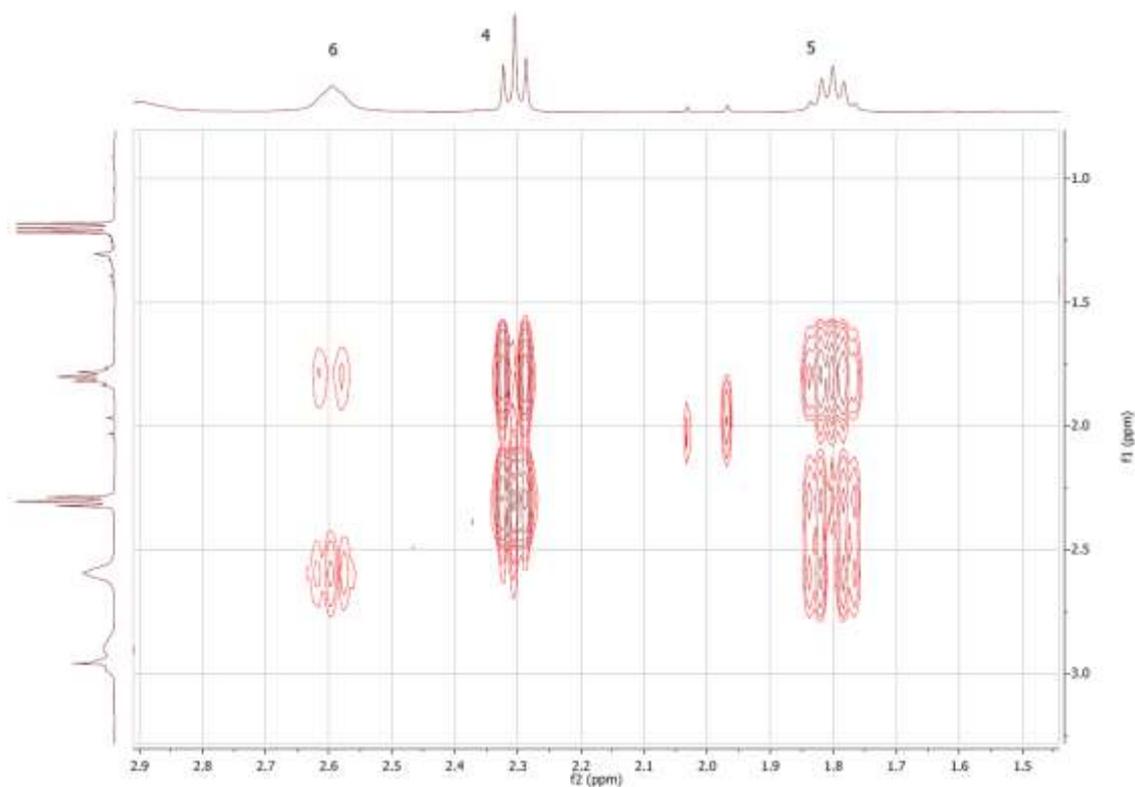


Figura 4.11: Espectro de COSY-RMN de los protones 4, 5 y 6.

Para finalizar la asignación del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se asignó la señal a 3,71 ppm, correspondiente a un  $\text{CH}_2$ , como los protones 17. Estos corresponden al  $\text{CH}_2$  unidos al nitrógeno que soportan al grupo 4-F-benceno. Se continuó con la asignación de los carbonos unidos a protón con el espectro de HSQC-RMN, esta asignación se observa en la figura 4.12. Cabe aclarar, que la asignación de los carbonos 15 y 12 se realizó en base a los desplazamientos presentados con anterioridad en los espectros realizados a los precursores del compuesto **32b**.

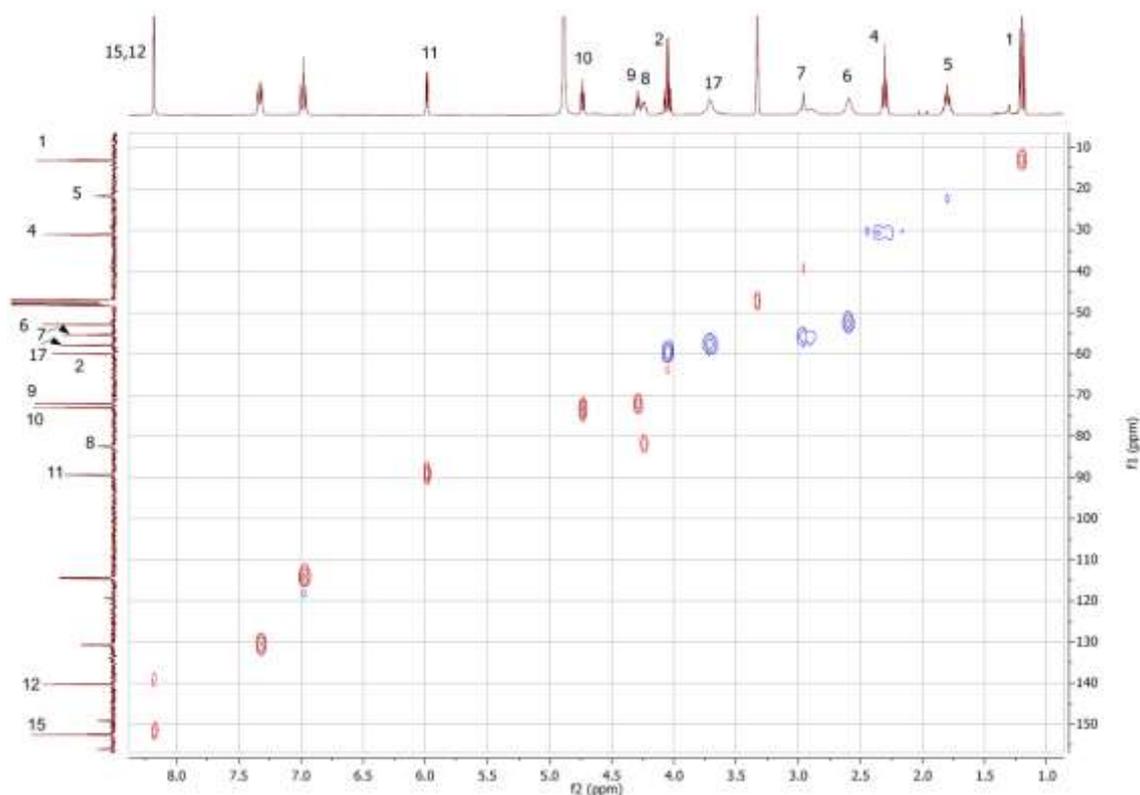


Figura 4.12: Espectro de HSQC-RMN con la asignación correspondiente a los protones asignados y el carbono correspondiente.

Una vez asignado el carbono 17 se recurrió al espectro de HMBC-RMN para la asignación de los protones 19 y 20 correspondientes al anillo aromático. Se observó que el protón a 7.33 ppm mostraba una correlación con el carbono 17, asignándose esta señal a los protones 19. (Figura 4.13) Con esto, quedó por finalizada la asignación de las señales de protón por lo que se presenta en la figura 4.14 la asignación completa del compuesto **32b** en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.

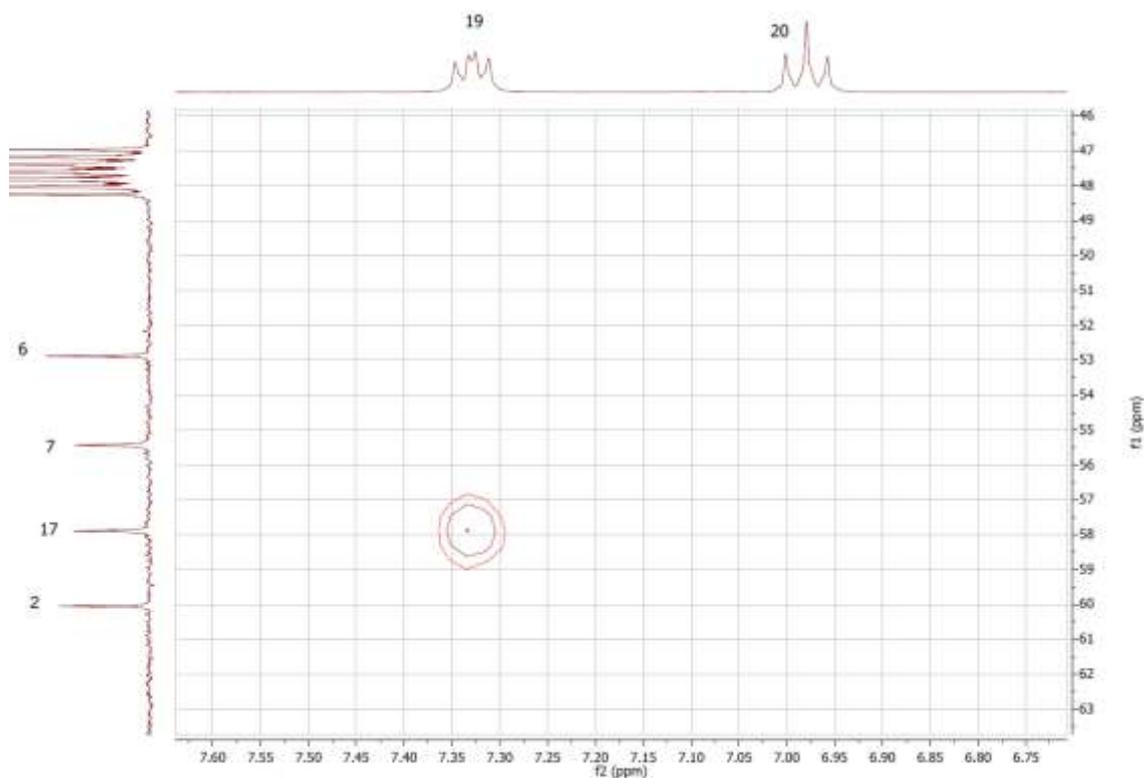


Figura 4.13: Ampliación del espectro de HMBC-RMN para la asignación de los portones 19 y 20.

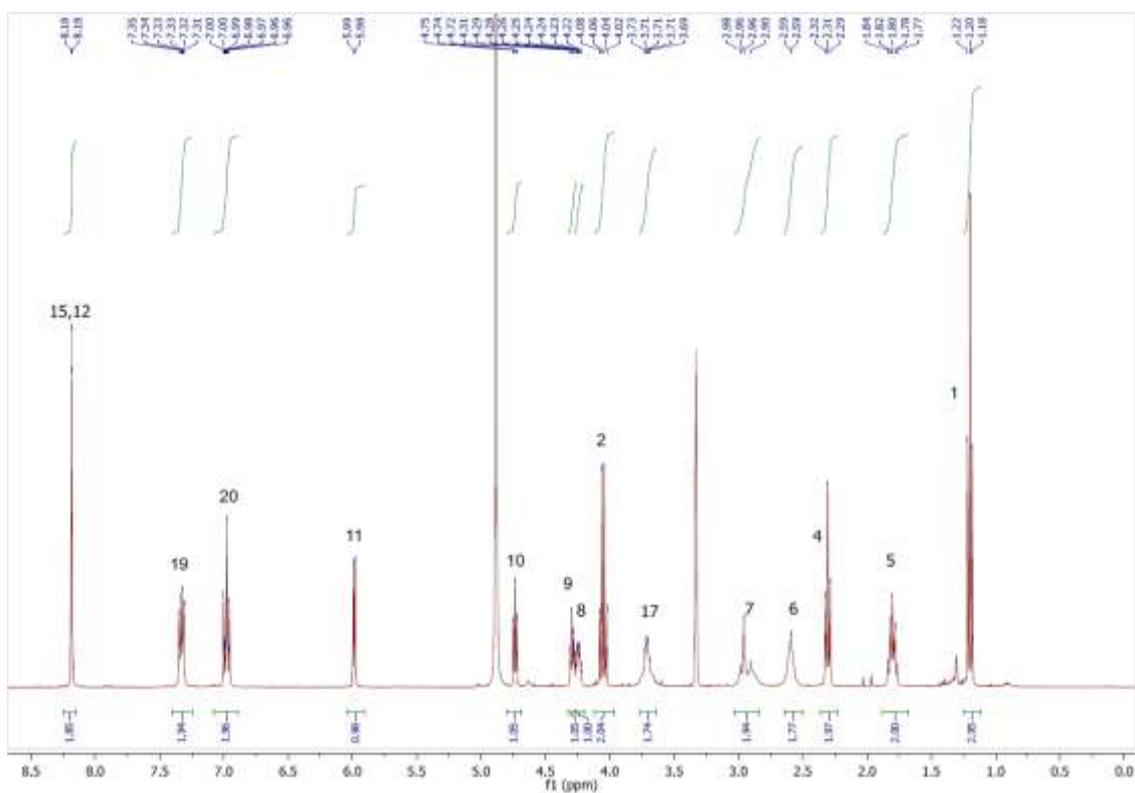
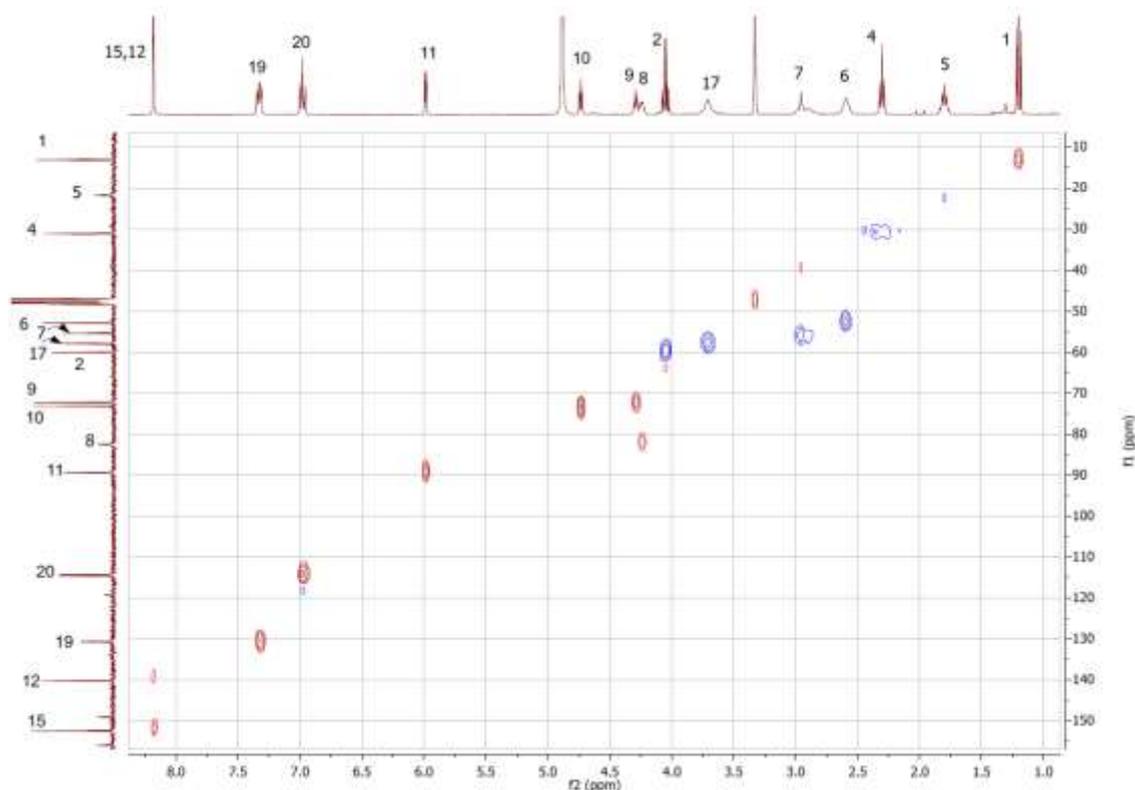


Figura 4.14: Asignación completa del espectro  $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto **32b**.

A partir de la asignación completa del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN fue posible finalizar la asignación de los carbonos que soportan protones a partir del espectro de HSQC-RMN. Esta asignación se muestra en la figura 4.15.



4.15: Asignación completa de espectro de HSQC-RMN para el compuesto **32b**.

Por último, se asignaron las señales de los carbonos cuaternarios. Comenzando con el carbono de mayor desplazamiento, el carbono cuaternario a 173.92 ppm corresponde al carbono 3 por desplazamiento químico del grupo carbonilo. En la figura 4.16 se observa la correlación de este carbono con los protones 4, 5 y 12, lo que confirma que se trata del carbono 3 y que efectivamente ocurrió la formación del etiléster.

Por otro lado, los carbonos cuaternarios 13, 14 y 16 corresponden a la purina del compuesto **32b**. En la figura 4.16 se observa que los carbonos cuaternarios que presentan correlación por HMBC-RMN con los protones de la purina 12 y 15 salen a 160.85 ppm, 149.11 ppm y 119.32 ppm. Es de esperar que el carbono 14 sea el de mayor desplazamiento químico ya que este es el único de los tres que presenta un enlace simple y un enlace doble a átomos de nitrógeno. Por otra

parte, el carbono a 149.11 ppm presenta una correlación por HMBC-RMN con el protón 11 lo que indicaría que este carbono corresponde al carbono cuaternario 16. Por último, el carbono cuaternario 13 es el de menor desplazamiento químico ya que solamente posee enlaces a carbono y no a heteroátomos. Si bien no es tan sencilla la asignación de estos carbonos debido a la superposición de las señales de los protones 12 y 15, la asignación realizada concuerda con la asignación obtenida para el compuesto **30b** y los demás análogos finales **32**.

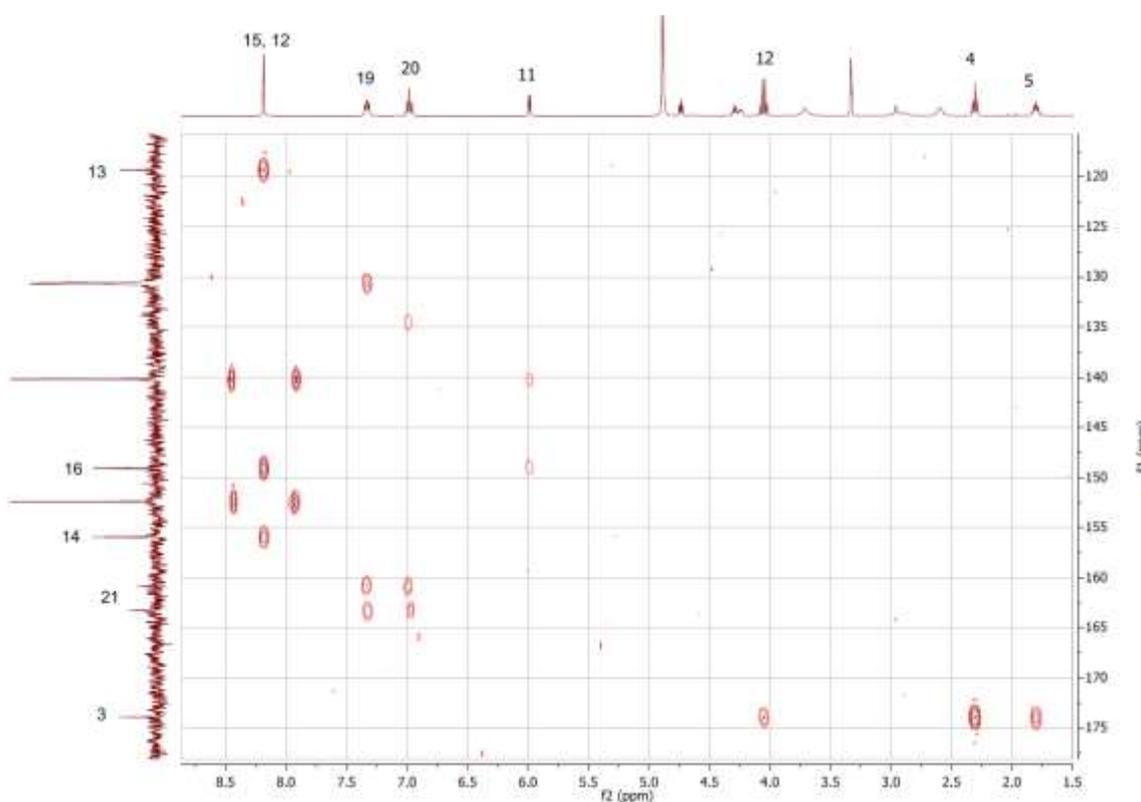


Figura 4.16: Ampliación del espectro de HMBC-RMN para la asignación de los carbonos cuaternarios.

Por último, se realizó la asignación de los carbonos cuaternarios del anillo aromático. Para esto, se recurrió al espectro de HMBC-RMN para los protones aromáticos como se muestra en la figura 4.17, donde se observa la correlación del protón 20 con el carbono 18 aunque este no se observó en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Así mismo, se observa que todos los protones aromáticos 19 y 20 presentan una correlación con el carbono 21. (Ver figura 4.17).

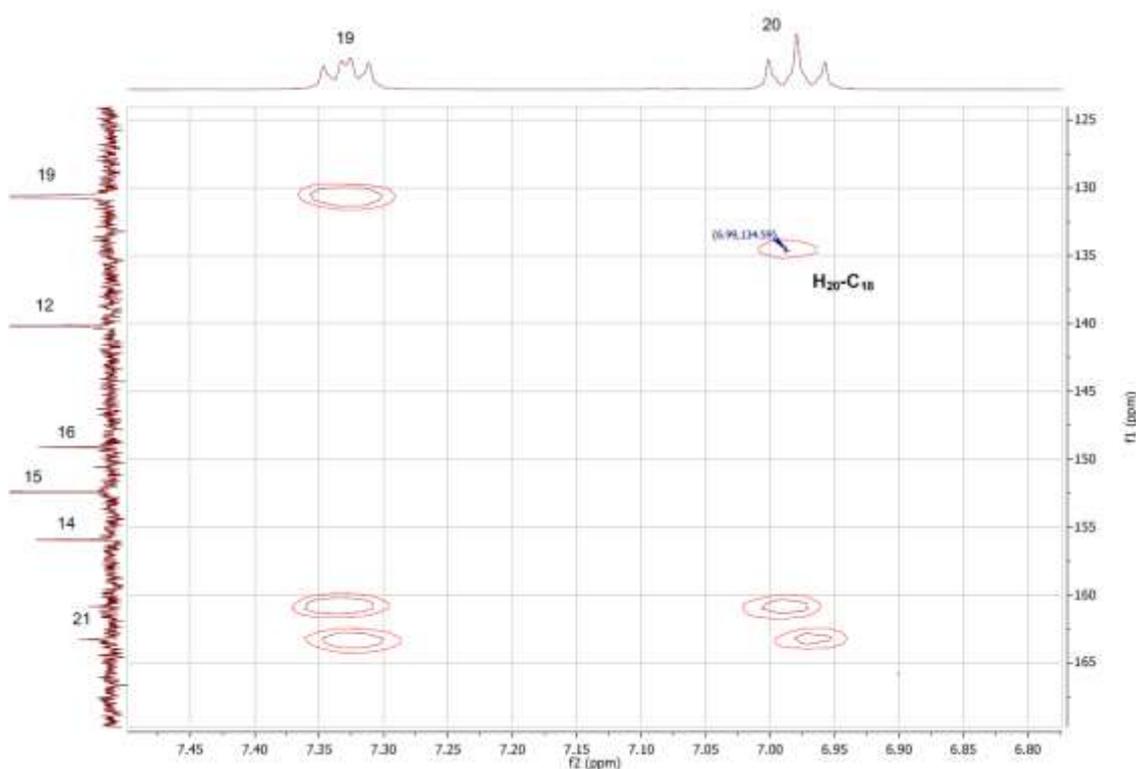


Figura 4.17: Ampliación del espectro de HMBC-RMN para los portones 19 y 20.

Cabe aclarar que los carbonos 19, 20 y 21 presentan un desdoblamiento de la señal en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN debido al acople existente entre estos carbonos y el átomo de flúor. En la figura 4.18 se observa claramente las señales desdobladas y como la  $J_{\text{C-F}}$  (constante de acoplamiento C-F) de cada una de estas señales aumenta a medida que el carbono se encuentra más cercano al átomo de flúor. De forma tal que la  $J$  calculadas para estos carbonos fueron de 244.5 Hz para el carbono 21, de 21.5 Hz para el carbono 20 y de 5.9 Hz para el carbono 19. Si bien no se observa, es de esperar que el carbono 18 no presente desdoblamiento de la señal o que sea de pocos Hz, debido a que es el carbono más alejado del átomo de flúor perteneciente al anillo aromático.

En la figura 4.19 se presenta el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN con la asignación correspondiente para el compuesto **32b**.

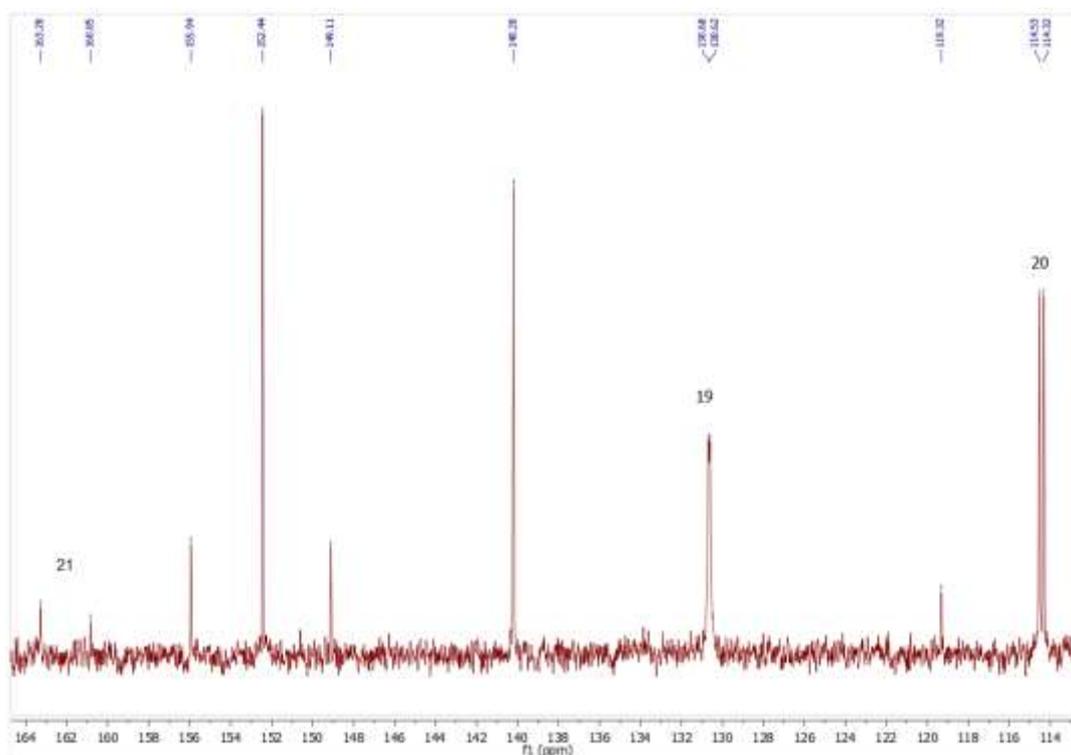


Figura 4.18: Ampliación del espectro de <sup>13</sup>C-RMN. Apreciación del desdoblamiento de las señales para los carbonos 21, 20 y 19.

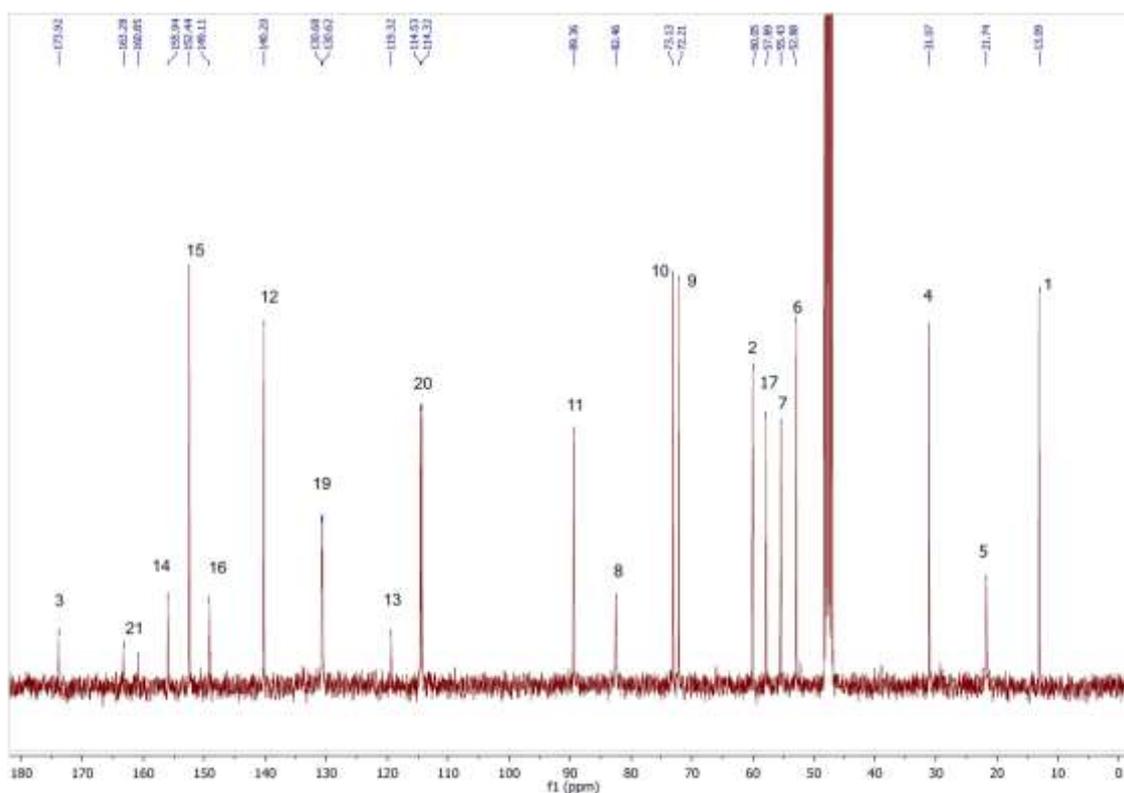


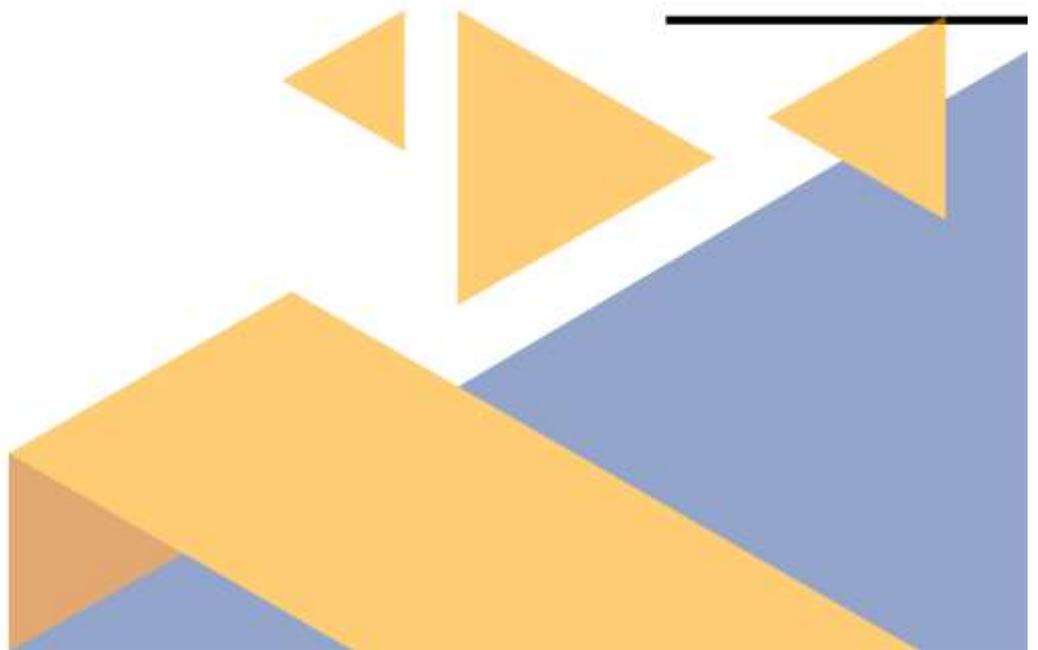
Figura 4.19: Asignación completa del espectro de <sup>13</sup>C-RMN para el compuesto **32b**.



# Capítulo 4:



## Parte Experimental



Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando solventes recientemente destilados. Las reacciones en condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno empleando solventes secos según literatura.<sup>2</sup>

Todos los rendimientos informados se refieren a productos espectroscópicamente puros (determinado mediante <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN). Para los compuestos que presentan impurezas conocidas, el rendimiento de la reacción se calculó en base al espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Advance NEO-400. Los desplazamientos químicos reportados son referenciados al TMS utilizado como referencia interna. El 2,2,2-Trifluoroetano (-77.16 ppm) fue utilizado como referencia interna, en un capilar dentro del tubo de RMN, para los espectros de <sup>19</sup>F-RMN.<sup>3</sup>

Las purificaciones por cromatografía en columna fueron realizadas con Silica gel 60M 0.04-0.063 mm.

Los seguimientos de reacción y de separaciones cromatográficas se realizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> sobre plástico.

La pureza de los productos finales se determinó utilizando un equipo HPLC analítico Shimadzu LC-2050C equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm). Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>O-0.1% de Ácido Fórmico y CH<sub>3</sub>CN. Las muestras se disolvieron en MeOH calidad HPLC. Las corridas se efectuaron en 16min con el siguiente programa de gradiente de: 0-10 min (CH<sub>3</sub>CN 5% a 95%) de 10-13 min (CH<sub>3</sub>CN 95%) y de 13-16 min (CH<sub>3</sub>CN de 95% a 5%). Se reportaron los valores de pureza a 220 nm y 250 nm.

Los espectros de masas de alta resolución de estos compuestos se determinaron en el Instituto Pasteur de Montevideo en un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific, USA) por inyección directa (10 μL/min) usando 100% Metanol calidad HPLC como solvente y una fuente Ion Max API con una sonda HESI-II. Los espectros de masa fueron obtenidos en

---

2 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. ed., reprinted.; Pergamon Press: Oxford, 1993.

3 Plaunt A.J.; Clear k.J.; Smith B.D. *Chem. Commun.* **2014**, 72, 10499 —10501.

modo positivo con voltaje de spray de ion a 4.0 kV y una temperatura capilar de 250°C.

Por último, se determinó la desviación de luz polarizada en los compuestos finales utilizando un polarímetro Jasco P-2000 con lámpara de sodio a 589 nm. Se tomaron 3 medidas de 5 ciclos cada una y se reportó el promedio de estas. La temperatura varió de los 23.5°C a los 24.5°C a lo largo de las mediciones.

### Cálculo de los rendimientos a partir de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN

La impureza identificada corresponde a la reducción del aldehído utilizado en la aminación reductiva. Se seleccionó la integral del metileno para realizar los cálculos. A modo de ejemplo, a continuación, se desarrollan los cálculos realizados para el compuesto **30a**. El cálculo se realizó de forma análoga para los demás compuestos.

Para la obtención del compuesto **30a** se partió de benzaldehído y se obtuvo el compuesto **30a** y el alcohol bencílico como producto secundario (Figura 4.20)

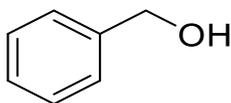


Figura 4.20: Estructura del alcohol bencílico

En 4.71 ppm se observa un singulete correspondiente a los 2 protones del metileno del alcohol bencílico, cuya integral es de 0.91 respecto al compuesto **30a** (ver espectro <sup>1</sup>H-RMN)

1. Se calculó el porcentaje que representa cada protón del metileno del alcohol bencílico obtenido respecto al compuesto **30a**:  $\frac{100 \times 0.91}{2} = 45.5\%$
2. Se calculó un nuevo peso molecular con el alcohol en el porcentaje calculado en 1.:

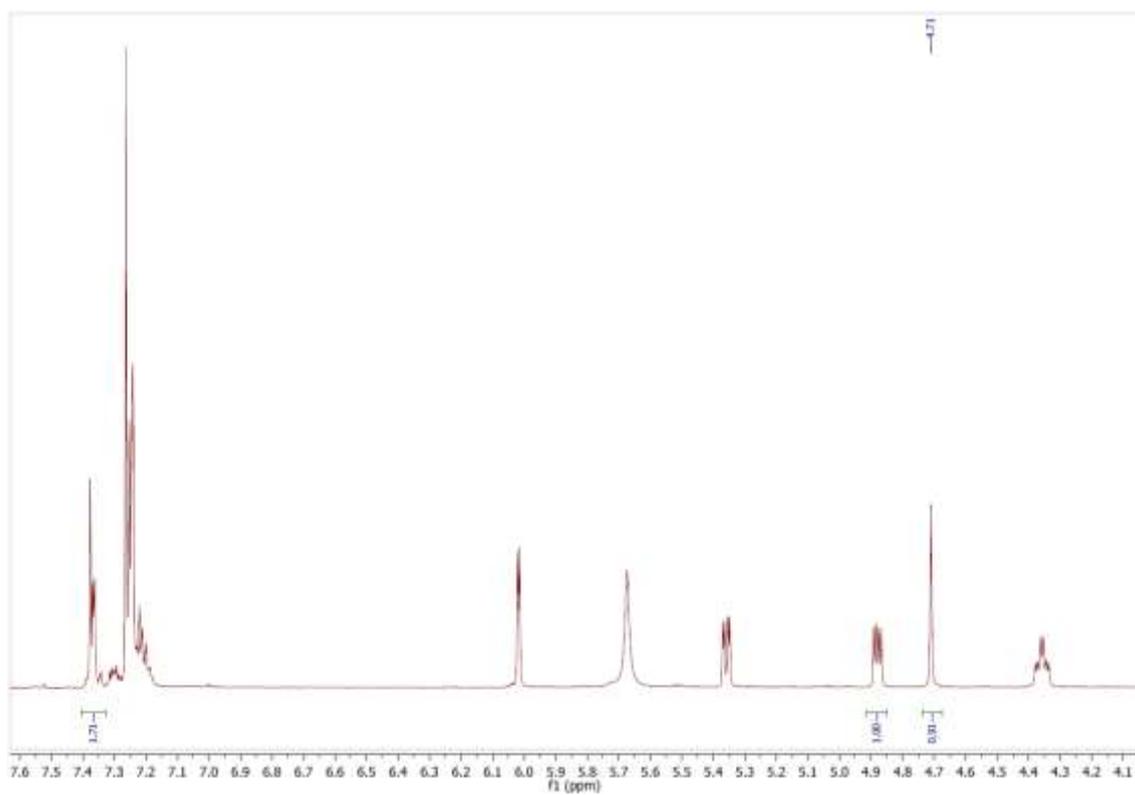
538.65 g/mol (PM del compuesto **30a**) + 108.14 g/mol x 0.455 (PM del alcohol bencílico) = 587.85 g/mol

3. Se calculó la cantidad de moles a partir de este nuevo peso molecular:

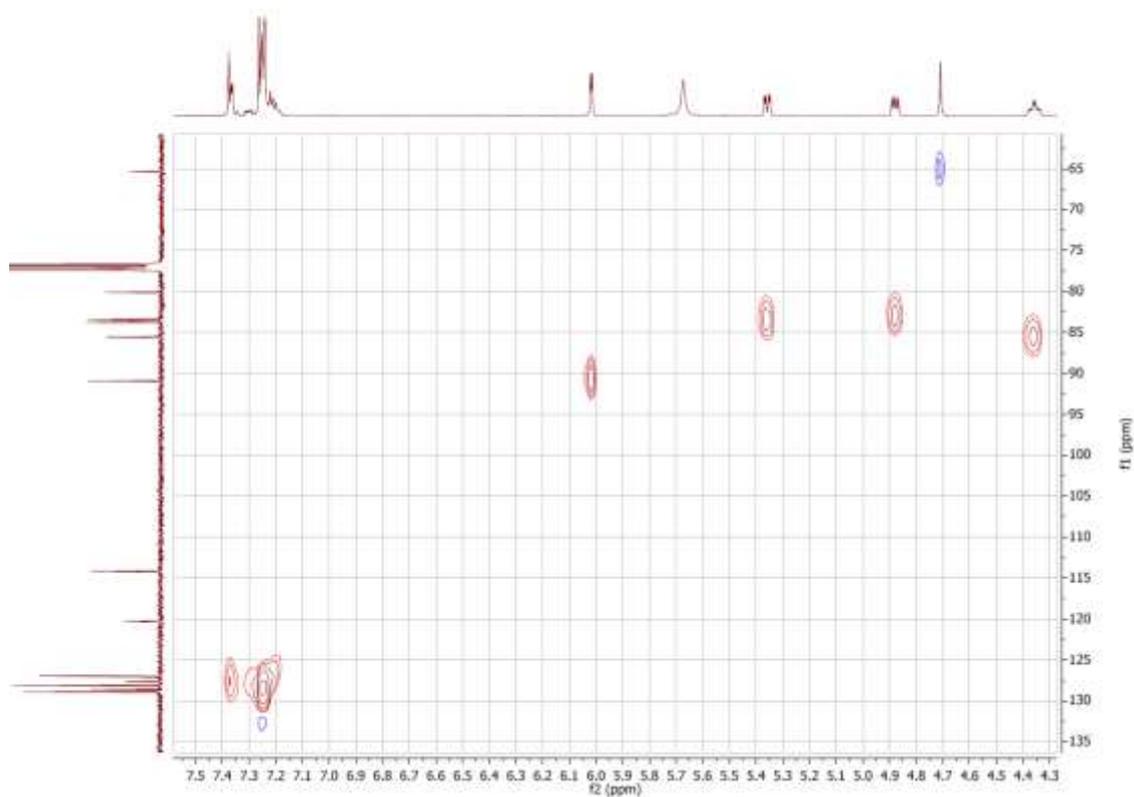
$$\frac{149.5 \text{ mg (masa obtenido)}}{587.85 \text{ g/mol}} = 0.25 \text{ mmol}$$

4. Se calculó el rendimiento a partir de este valor y el valor de la masa del compuesto **30a**:  $0.25 \text{ mmol} \times 538.65 \text{ g/mol} = 136.99 \text{ mg}$

$^1\text{H}$ -RMN del compuesto **30a** y el alcohol bencílico



HSQC-RMN  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **30a** y el alcohol bencílico



## **Metodologías generales**

### **A. Metodología general de aminación reductiva:**

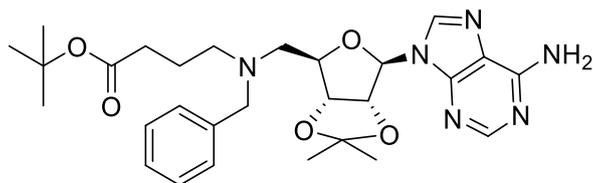
A una suspensión de la amina **3** en THF o DCM se agregó 1 eq del aldehído de interés y AcOH (1 eq). Transcurrida una hora (o 30 min), se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.5 eq). Luego de 19 hs se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con DCM. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y eliminó el solvente a presión reducida.

### **C. Metodología general de hidrólisis del éster y/o del acetónido:**

El compuesto de interés se disolvió en DCM, se agregó H<sub>2</sub>O y TFA. Se dejó la reacción con agitación toda una noche y la reacción se lleva a sequedad a presión reducida con posteriores lavados con CHCl<sub>3</sub> y AcOEt para eliminar el TFA.

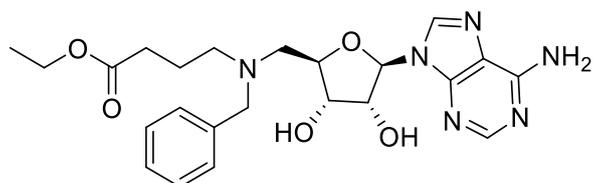
### **D. Metodología general de esterificación a partir de la formación del cloruro de ácido in-situ:**

A una solución del compuesto de interés en EtOH absoluto, se agregó 5 eq de SOCl<sub>2</sub> gota a gota a 0°C en baño de hielo. Se dejó con agitación de un día para el otro, se eliminó el solvente a presión reducida y el residuo se lavó con CHCl<sub>3</sub>.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)metil)(bencil)amino)butanoato de terbutilo (30a)**

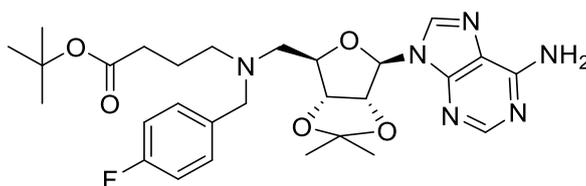
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 7** (200.0 mg, 0.45 mmol), **benzaldehído** (0.14 mL, 1.33 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.66 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (162.0 mg, 0.77 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM:MeOH 10%) obteniendo **36a** como un aceite incoloro (137.0 mg, 55%, calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 5H), 6.02 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.36 (dd, *J* = 6.4, 2.2 Hz, 1H), 4.88 (dd, *J* = 6.4, 3.2 Hz, 1H), 4.36 (td, *J* = 6.8, 3.1 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 13.5, 7.1 Hz, 1H), 2.62 (dd, *J* = 13.5, 6.6 Hz, 1H), 2.55 – 2.42 (m, 2H), 2.29 – 2.11 (m, 2H), 1.74 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.37 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.97, 155.40, 153.08, 149.28, 139.86, 139.05, 128.93, 128.58, 128.14, 120.28, 114.19, 90.96, 85.55, 83.78, 83.41, 80.12, 58.97, 55.58, 53.53, 33.12, 28.11, 27.14, 25.39, 22.40.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)metil)(bencil)amino)butanoato de etilo (32a)**

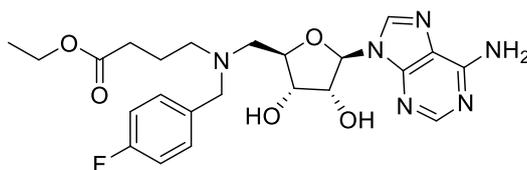
Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 30a** (137.0 mg, 0.27 mmol) en DCM: TFA (2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31a** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D. SOCl<sub>2</sub>** (0.12 mL) en 3 mL de EtOH absoluto. Se purificó dos veces consecutivas por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32a**

como un aceite incoloro (37.4 mg, 29%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32a** es de 78% (220 nm) y de 96% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.611 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.18 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 2H), 7.30 – 7.18 (m, 3H), 5.98 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.34 – 4.19 (m, 2H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.79 – 3.65 (m, 2H), 2.96 (dd, *J* = 13.9, 3.8 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 6.8 Hz, 1H), 2.59 (td, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 173.98, 155.92, 152.45, 149.14, 140.14, 138.54, 128.91, 127.83, 126.79, 119.30 (por HMBC-RMN), 89.29, 82.57, 73.16, 72.20, 60.03, 58.80, 55.54, 52.97, 31.15, 21.83, 13.10. **HRMS** *m/z* calculada ((*M*+*H*)<sup>+</sup>) 471.2351, observada 471.2339. [ $\alpha_D$ ]: -9.7606.



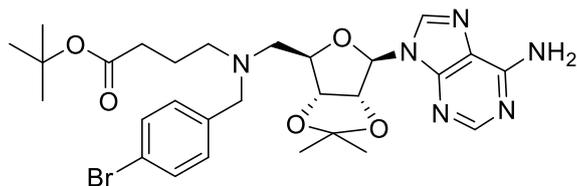
**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-il)-2,2-dimetil tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)(4-fluorobencil) amino) butanoato de terbutilo (30b)**

Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 7** (200.0 mg, 0.45 mmol), **4-fluorobenzaldehído** (0.14 mL, 1.33 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.66 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (162.0 mg, 0.77 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30b** como un aceite incoloro (128.2 mg, 50% calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.26 – 7.14 (m, 2H), 6.98 – 6.81 (m, 2H), , 6.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.68 (s ancho, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.40 (dd, *J* = 6.5, 2.1 Hz, 1H), 4.90 (dd, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 4.34 (td, *J* = 6.8, 3.3 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 3.47 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.75 – 2.67 (m, 1H), 2.63 (dd, *J* = 13.5, 6.9 Hz, 1H), 2.52 – 2.38 (m, 2H), 2.26 – 2.08 (m, 2H), 1.71 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.75, 161.93, 159.50, 154.28, 151.88, 148.02, 138.83, 133.63 (d, *J* = 3.1 Hz), 129.11 (d, *J* = 7.9 Hz), 119.11, 113.80, 113.33 (d, *J* = 21.1 Hz) 89.76, 84.53, 82.48 (d, *J* = 33.8 Hz), 79.00, 57.01, 54.52, 52.20, 31.89, 26.94, 25.98, 24.23, 21.20.



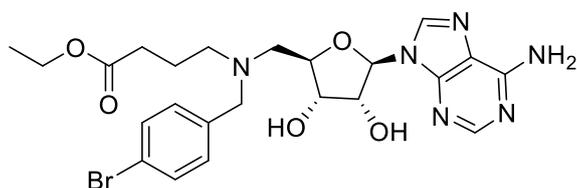
**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxitetrahydrofuran-2-yl)methyl)(4-fluorobencil)amino)butanoato de etilo (32b)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 30b** (128.0 mg, 0.22 mmol) en DCM: TFA (2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31b** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D.** SOCl<sub>2</sub> (0.10 mL) en 3 mL de EtOH absoluto. Se purificó dos veces consecutivas por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32b** como un aceite incoloro (47.2 mg, 43%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32b** es de 87% (220 nm) y de 96% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.748 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.18 (s, 2H), 7.42 – 7.23 (m, 2H), 7.05 – 6.87 (m, 2H), 5.99 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.29 – 4.20 (m, 1H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.77 – 3.66 (m, 2H), 3.03 – 2.82 (m, 2H), 2.67 – 2.53 (m, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.80 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 173.92, 163.56 (d, *J* = 244.5 Hz), 155.94, 152.44, 149.11, 140.20, 134.59 (por HMBC-RMN), 130.65 (d, *J* = 5.9 Hz), 119.32, 114.42 (d, *J* = 21.5 Hz), 89.36, 82.46, 73.13, 72.21, 60.05, 57.89, 55.43, 52.88, 31.07, 21.74, 13.00. **<sup>19</sup>F-RMN** (376 MHz, MeOD) δ -117.24. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 489.2257, observada 489.2257. **[α]<sub>D</sub>**: -6.835.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)(4-bromobencil)amino)butanoato de terbutilo (30c)**

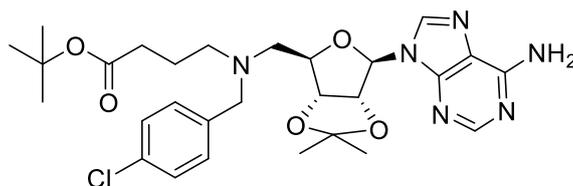
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 7** (209.0 mg, 0.47 mmol), **4-bromobenzaldehído** (258.0 mg, 1.39 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.70 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (168.0 mg, 0.79 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30c** como un aceite incoloro (77.8 mg, 27%, calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.40 (dd, *J* = 6.4, 2.1 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 6.5, 3.4 Hz, 1H), 4.42 – 4.29 (m, 1H), 3.60 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 3.48 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.84 – 2.60 (m, 2H), 2.55 – 2.38 (m, 2H), 2.28 – 2.09 (m, 2H), 1.73 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.79, 155.43, 153.01, 149.15, 140.03, 131.23, 130.56, 120.82, 120.31, 114.33, 90.87, 85.50, 83.81, 83.46, 80.23, 58.29, 55.62, 53.37, 32.94, 28.09, 27.15, 25.40, 22.19.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)methyl)(4-bromobencil)amino)butanoato de etilo (32c)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 30c** (77.8 mg, 0.13 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31c** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D. SOCl<sub>2</sub>** (0.06 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por

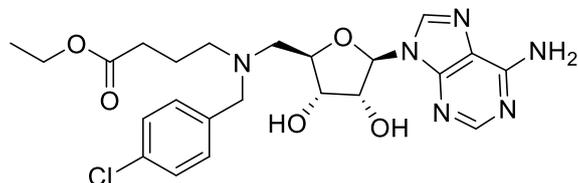
cromatografía en columna (DCM: MeOH 15%) obteniendo **32c** como un aceite incoloro (45.7 mg, 64%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32c** es de 82% (220 nm) y de 95% (250 nm) con un tiempo de retención de 5.134 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.19 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.49 – 7.32 (m, 2H), 7.29 – 7.16 (m, 2H), 5.98 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 4.74 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 1H), 4.29 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 4.23 (dt,  $J$  = 7.3, 4.7 Hz, 1H), 4.04 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.74 – 3.61 (m, 2H), 2.95 (dd,  $J$  = 14.0, 4.1 Hz, 1H), 2.86 (dd,  $J$  = 14.0, 7.3 Hz, 1H), 2.57 (dt,  $J$  = 8.4, 4.1 Hz, 2H), 2.30 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.79 (p,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.20 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  173.94, 155.93, 152.44, 149.13, 140.24, 138.2(Asignado por HMBC-RMN), 130.87, 130.68, 120.37, 119.32, 89.37, 82.57, 73.06, 72.14, 60.04, 58.11, 55.55, 52.97, 31.03, 21.85, 13.10. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 549.1456, observada 549.1461. **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>**: -12.6990.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)metil)(4-clorobencil)amino)butanoato de terbutilo (30d)**

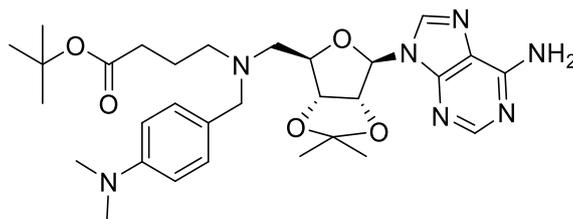
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 7** (200.0 mg, 0.45 mmol), **4-clorobenzaldehído** (189.0 mg, 1.33 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.66 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (162.0 mg, 0.77 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30d** como un aceite incoloro (170.8 mg, 65% calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.24 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.21 – 7.11 (m, 4H), 6.02 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.41 (dd,  $J$  = 6.4, 2.1 Hz, 1H), 4.91 (dd,  $J$  = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 4.34 (td,  $J$  = 6.7, 3.3 Hz, 1H), 3.58 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H), 3.47 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H), 2.74 (dd,  $J$  = 13.6, 6.6 Hz, 1H), 2.64 (dd,  $J$  = 13.5, 6.9 Hz, 1H), 2.53 – 2.39 (m, 2H), 2.28 – 2.11 (m, 2H), 1.71 (p,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.88, 155.44, 153.04, 149.18,

140.03, 137.73, 132.59, 130.07, 128.22, 120.32, 114.25, 90.90, 85.71, 83.82, 83.48, 80.17, 58.28, 55.76, 53.42, 33.01, 28.09, 27.14, 25.39, 22.37.



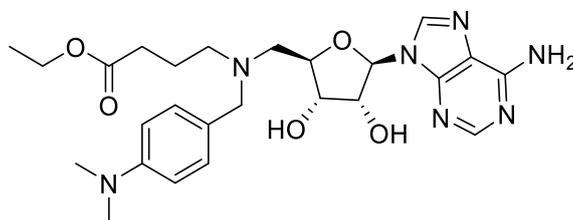
**Etil 4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)(4-clorobencil)amino)butanoato (32d)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C**. **30d** (170.8 mg, 0.29 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31d** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D**. SOCl<sub>2</sub> (0.13 mL) en 3 mL de EtOH absoluto. Se purificó dos veces consecutivas por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32d** como un aceite incoloro (66.0 mg, 45%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32d** es de 88% (220 nm) y de 95% (250 nm) con un tiempo de retención de 5.070 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.19 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 5.98 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.73 – 3.61 (m, 2H), 2.94 (dd, *J* = 14.1, 4.1 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J* = 14.0, 7.3 Hz, 1H), 2.56 (td, *J* = 6.9, 2.3 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.78 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 173.96, 155.92, 152.43, 149.14, 140.22, 137.80, 132.34, 130.29, 127.83, 119.31, 89.34, 82.64, 73.07, 72.15, 60.03, 58.07, 55.56, 52.97, 31.06, 21.91, 13.09. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 505,1961, observada 505.1946. **[α]<sub>D</sub>**: -12.1038.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetil-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)(4(dimetilamino)bencil)amino)butanoato de terbutilo (30e)**

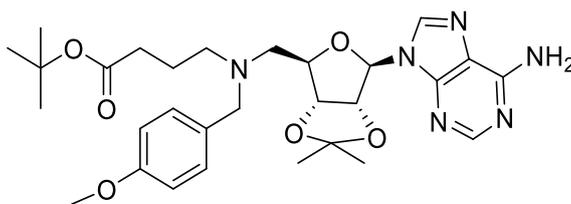
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 7** (400.0 mg, 0.89 mmol), **4-dimetilaminobenzaldehído** (399.0 mg, 2.8 mmol), AcOH (0.07 mL, 1.3 mmol) en THF (10 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (320.0 mg, 1.5 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) y se extrajo con DCM (50 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 5%) obteniendo **30e** como un aceite incoloro (113 mg, 21%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.03 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.66 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.33 (dd, *J* = 6.4, 2.3 Hz, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.36 (s, 1H), 3.60 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.40 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.92 (s, 6H), 2.77 – 2.53 (m, 2H), 2.47 (s, 2H), 2.31 – 2.09 (m, 2H), 1.78 – 1.66 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.37 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.04, 155.40, 153.14, 149.85, 149.38, 139.81, 129.99, 126.61, 120.32, 114.13, 112.42, 91.08, 85.47, 83.79, 83.43, 80.08 (por HMBC-RMN) 58.19, 55.26, 53.33, 40.73, 33.18, 28.12, 27.14, 25.39, 22.41.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il)metil)(4-(dimetilamino)bencil)amino)butanoato de etilo (32e)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 30e** (113.0 mg, 0.19 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31e** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones

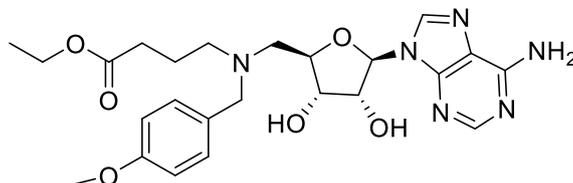
descriptas en **D**. SOCl<sub>2</sub> (0.1 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32e** como un aceite incoloro (29.3 mg, 30%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32e** es de 73% (220 nm) y de 91% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.853 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.20 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.75 – 6.58 (m, 2H), 6.01 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.43 – 4.24 (m, 2H), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.92 – 3.70 (m, 2H), 3.21 – 3.00 (m, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.83 – 2.57 (m, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.91 - 1.81 (m, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 173.79, 155.95, 152.47, 150.40, 149.09, 140.27, 130.21, 129.15, 119.37, 112.44, 89.52, 81.93, 73.17, 72.28, 60.12, 58.11, 54.99, 52.66, 39.62, 31.08, 21.27, 13.10. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 514.2773, observada 514.2777. [ $\alpha_D$ ]: -11.5974.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)(4-metoxibencil)amino)butanoato de terbutilo (30f)**

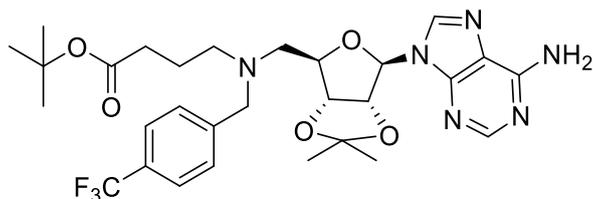
Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 7** (213 mg, 0.47 mmol), **4-metoxybenzaldehído** (0.17 mL, 1.42 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.71 mmol), en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (171 mg, 0.80 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) y se extrajo con DCM (50 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30f** como un aceite incoloro (100.0 mg, 37%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.27 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.84 – 6.74 (m, 2H), 6.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.37 (dd, *J* = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 4.87 (dd, *J* = 6.5, 3.1 Hz, 1H), 4.39 – 4.31 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.60 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.44 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 2.81 – 2.66 (m, 1H), 2.61 (dd, *J* = 13.1, 6.3 Hz, 1H), 2.54 – 2.36 (m, 2H), 2.29 – 2.11 (m, 2H), 1.73 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.97, 158.64, 155.46, 153.09, 149.28, 139.88, 130.94,

130.10, 120.30, 114.18, 113.51, 90.99, 85.54, 83.79, 83.44, 80.11, 58.22, 55.45, 55.24, 53.34, 33.12, 28.11, 27.14, 25.39, 22.36.



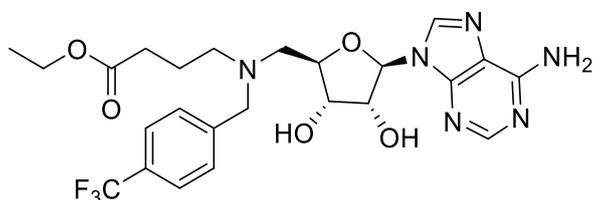
**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxitetrahydrofuran-2-yl)methyl)(4-metoxibencil)amino)butanoato de etilo (32f)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 30f** (100.0 mg, 0,18 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31f** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D. SOCl<sub>2</sub>** (0.05 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 15%) obteniendo **32f** como un aceite incoloro (70.5 mg, 82%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32f** es de 83% (220 nm) y de 95% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.738 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.19 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.34 – 7.12 (m, 2H), 6.96 – 6.71 (m, 2H), 5.98 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.31 – 4.16 (m, 2H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.63 (q, *J* = 13.3 Hz, 2H), 2.92 (dd, *J* = 14.0, 4.2 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 14.0, 7.1 Hz, 1H), 2.61 – 2.48 (m, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.79 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 174.02, 158.90, 155.92, 152.44, 149.16, 140.16, 130.05, 119.30, 113.14, 89.26, 82.67, 73.16, 72.22, 60.02, 58.11, 55.39, 54.24, 52.85, 31.19, 21.88, 13.10. **HRMS** *m/z* calculada ((*M*+*H*)<sup>+</sup>) 501.2457, observada 501.2456. **[α<sub>D</sub>]**: -13.7075.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)(4-(trifluorometil)encil)amino)butanoato de terbutilo (30g)**

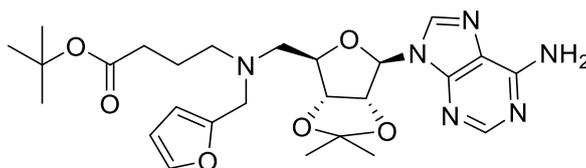
Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 7** (250.0 mg, 0.56 mmol), **4-(trifluorometil)benzaldehído** (0.23 mL, 1.68 mmol), AcOH (0.05 mL, 0.84 mmol), en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (202.0 mg, 0.95 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) y se extrajo con DCM (50 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30g** como un aceite incoloro (254.7 mg, 73%, calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H), 5.41 (dd, *J* = 6.5, 2.1 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 1H), 4.39 (s ancho, 1H), 3.72 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.94 – 2.68 (m, 2H), 2.56 – 2.41 (m, 2H), 2.28 – 2.08 (m, 2H), 1.73 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.72, 155.37, 152.89, 149.15, 144.81 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 1.2 Hz), 140.09, 129.03 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 5.6, 4.6 Hz), 125.46 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 3.7 Hz), 120.28, 114.42, 90.84, 85.55, 83.80, 83.44, 80.27, 58.54, 55.76, 53.46, 32.89, 28.07, 27.14, 25.39, 22.16.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihdroxitetrahidrofuran-2-yl)methyl)(4-(trifluorometil)encil)amino) butanoato de etilo (32g)**

Se utilizaron las condiciones descriptas en **C. 30g** (254.7 mg, 0.41 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31g** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones

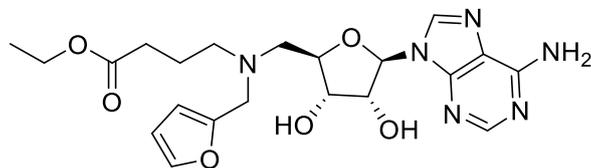
descriptas en **D**. SOCl<sub>2</sub> (0.22 mL) en 3 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32g** como un sólido blanco (159.0 mg, 76%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32g** es de 75% (220 nm) y de 94% (250 nm) con un tiempo de retención de 5.391 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOH) δ 8.29 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.68 (s, 4H), 6.09 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.76 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.59 – 4.42 (m, 4H), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.78 – 3.63 (m, 1H), 3.57 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.39 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.19 – 1.90 (m, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 172.75, 155.67, 151.86, 148.72, 140.91, 134.75 131.51, 127.94, 125.52, 122.55, 119.66, 90.65, 78.84, 72.99, 72.27, 60.47, 56.85, 54.58, 52.77, 30.23, 19.00, 13.06. **<sup>19</sup>F-RMN** (376 MHz, MeOD) δ -63.54. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 539.2225, observada 539.2227. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: 4.0720.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)(furan-2-ilmetil)amino)butanoato de terbutilo (30h)**

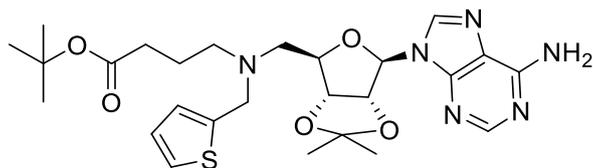
Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 7** (243.0 mg, 0.54 mmol), **furfural** (0.13 mL, 1.6 mmol), AcOH (0.05 mL, 0.81 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (195.0 mg, 0.92 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30h** como un aceite marrón (217.8 mg, 74% calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.31 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.44 (dd, *J* = 6.4, 2.3 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 6.4, 3.2 Hz, 1H), 4.36 (td, *J* = 6.7, 3.2 Hz, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 2H), 2.76 (dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.6, 7.1 Hz, 1H), 2.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.22 (td, *J* = 7.4, 3.8 Hz, 2H), 1.81 – 1.68 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.90, 155.46, 153.12, 151.95, 149.36, 141.99, 139.99, 120.31, 114.32, 110.01, 108.78, 90.95,

85.56, 83.88, 83.19, 80.14, 55.42, 53.49, 50.21, 33.12, 28.12, 27.16, 25.40, 22.60.



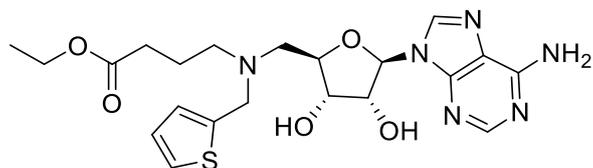
**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)methyl)(furan-2-ilmethyl)amino)butanoato de etilo (32h)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C**. **32h** (217.8 mg, 0.40 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31h** como un sólido marrón. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D**. SOCl<sub>2</sub> (0.16 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 15%) obteniendo **32h** como un aceite marrón (118.4 mg, 64%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32h** es de 92% (220 nm) y de 97% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.316 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.28 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.44 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 6.34 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 3.1, 0.8 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 4.08 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 2.96 (dd, *J* = 14.1, 4.1 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J* = 14.1, 7.1 Hz, 1H), 2.57 (t, *J* = 7.3, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 175.34, 157.33, 153.88, 153.21, 150.57, 143.36, 141.56, 120.65, 111.12, 110.19, 90.55, 84.24, 74.70, 73.43, 61.45, 56.83, 54.59, 51.43, 32.61, 23.43, 14.51. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 461.2144, observada 461.2139. **[α]<sub>D</sub>**: -12.8933.



**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)(tiofen-2-ylmethyl)amino)butanoato de terbutilo (30i)**

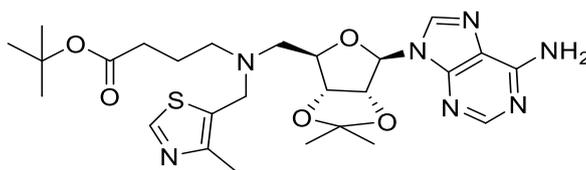
Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 7** (400.0 mg, 0.89 mmol), **Tiofeno-2-carboxaldehído** (0.25 mL, 2.8 mmol), AcOH (0.07 mL, 1.3 mmol) en THF (10 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (320 mg, 1.5 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) y se extrajo con DCM (50 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30i** como un aceite amarillo (173.1 mg, 35%, calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.28 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.17 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 5.1, 3.4 Hz, 1H), 6.83 – 6.77 (m, 1H), 6.04 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.70 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.43 (dd, *J* = 6.5, 2.3 Hz, 1H), 4.99 (dd, *J* = 6.5, 3.2 Hz, 1H), 4.49 – 4.31 (m, 1H), 3.87 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 2.80 (dd, *J* = 13.6, 6.6 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 2.61 – 2.45 (m, 2H), 2.34 – 2.11 (m, 2H), 1.75 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.91, 155.43, 153.09, 149.31, 141.67, 139.94, 126.42, 126.05, 124.87, 120.26, 114.30, 90.93, 85.56, 83.78, 83.22, 80.16, 55.07, 53.09, 53.05, 33.04, 28.12, 27.15, 25.40, 22.46.



**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)methyl)(tiofen-2-ylmethyl)amino)butanoato de etilo (32i)**

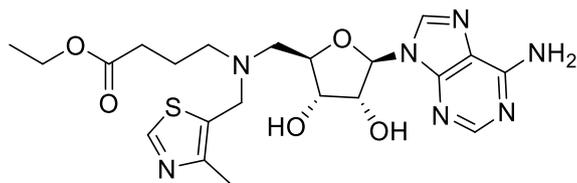
Se utilizaron las condiciones descriptas en **C. 32i** (173.1 mg, 0.31 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31i** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descriptas en **D. SOCl<sub>2</sub>** (0.12 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32i** como un aceite

amarillo (72.3 mg, 49%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32i** es de 81% (220 nm) y de 90% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.511 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.21 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.33 – 7.21 (m, 1H), 6.98 – 6.88 (m, 2H), 5.99 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 4.74 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 4.31 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 4.23 (dt,  $J$  = 7.0, 4.5 Hz, 1H), 4.07 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.93 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 2H), 2.98 (dd,  $J$  = 14.1, 4.2 Hz, 1H), 2.86 (dd,  $J$  = 14.1, 7.1 Hz, 1H), 2.59 (t,  $J$  = 6.9, 4.8 Hz, 2H), 2.34 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 2H), 1.22 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  174.04, 155.93, 152.46, 149.19, 141.56, 140.16, 126.08, 125.99, 124.56, 119.25, 89.18, 82.99, 73.18, 72.04, 60.03, 55.16, 52.86, 52.76, 31.16, 22.10, 13.11. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 477.1915, observada 477.1905. **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>**: -15.7110.



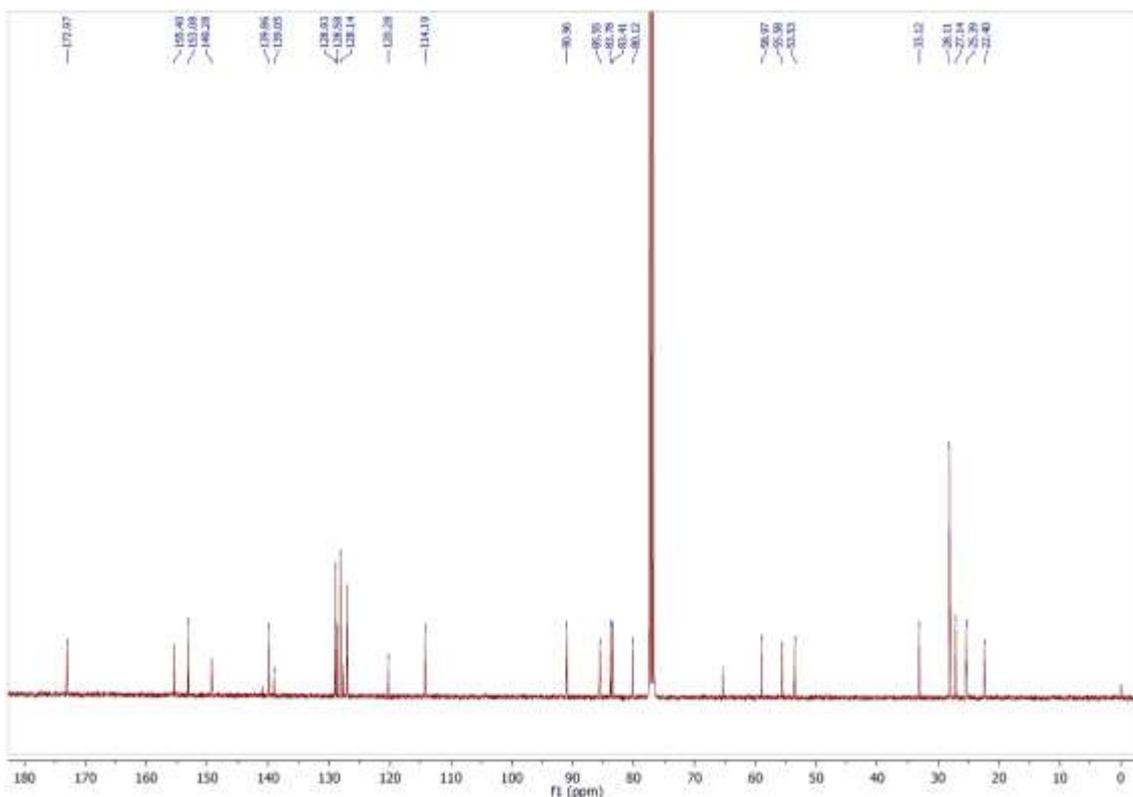
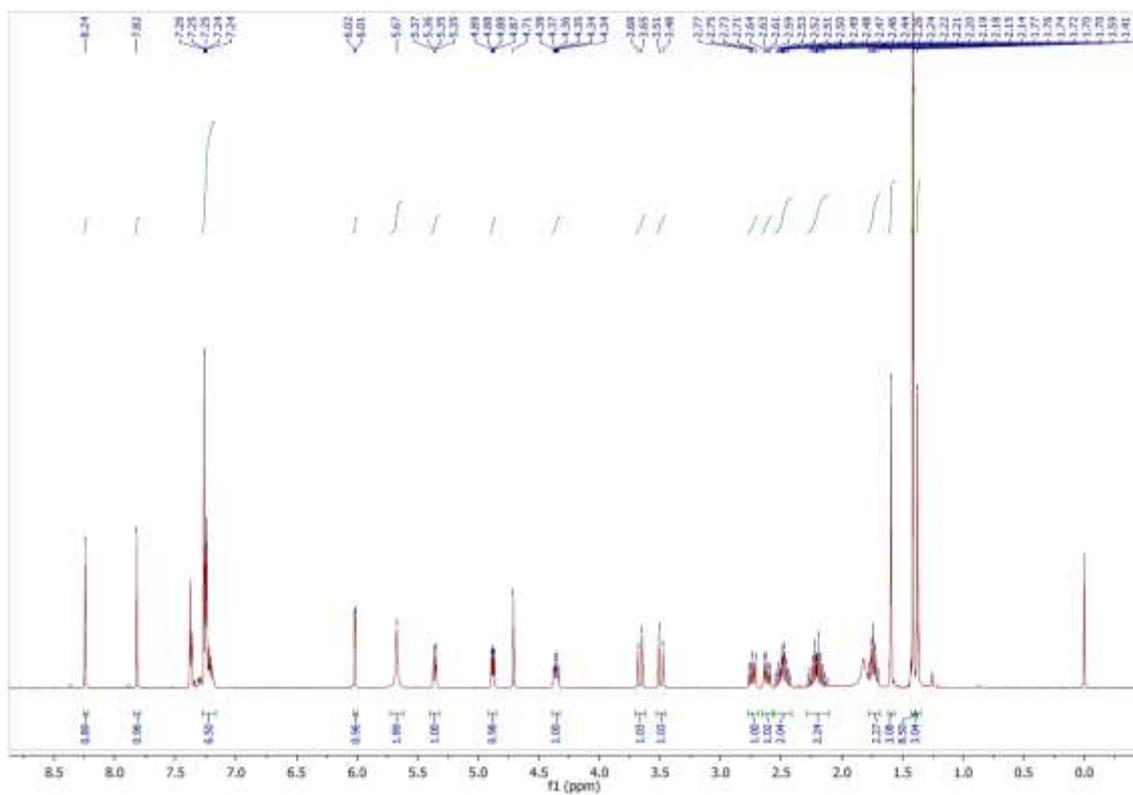
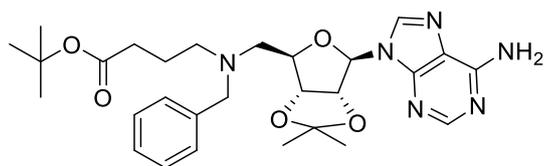
**4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)((4-metiltiazol-5-il)metil)amino)butanoato de terbutilo (30j)**

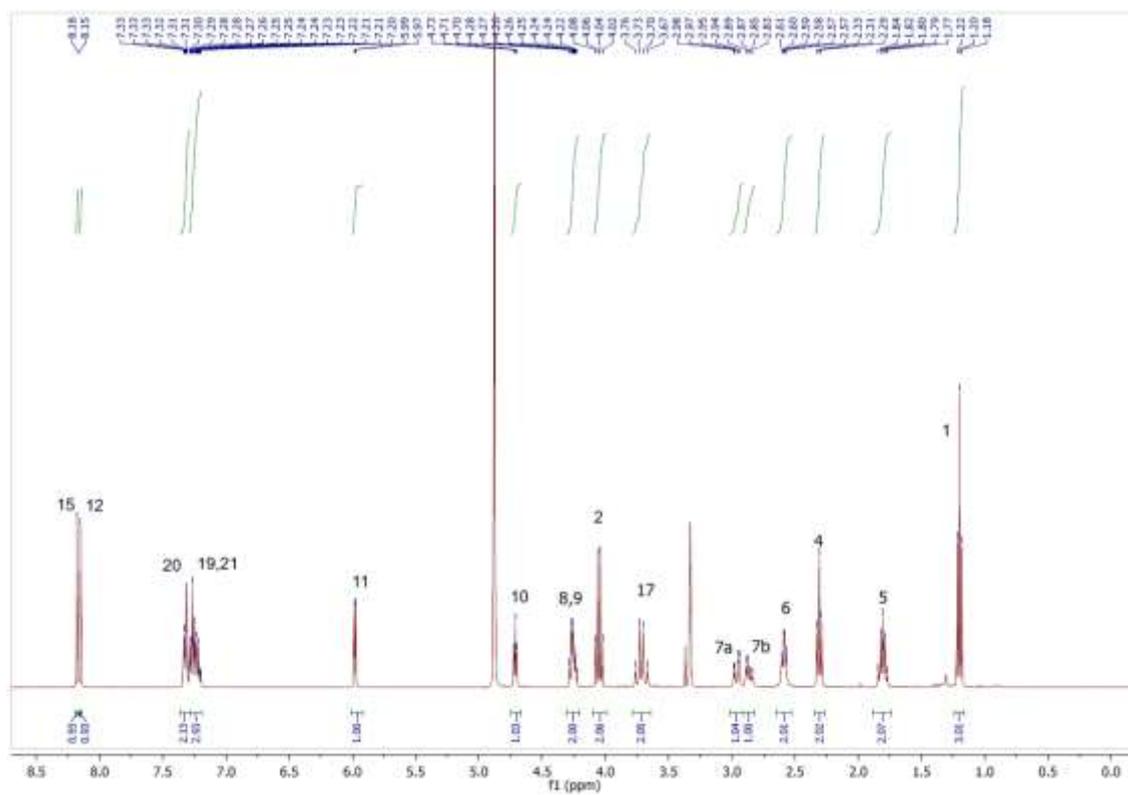
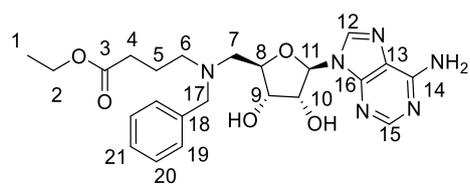
Se utilizaron las condiciones descritas en **A. 7** (220.0 mg, 0.49 mmol), **Metil-S-tiazolcarboxaldehído** (187.0 mg, 1.47 mmol), AcOH (0.04 mL, 0.74 mmol) en THF (5 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (176.0 mg, 0.83 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **30j** como un aceite amarillo (96.8 mg, 34%, calculado a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 6.44 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 6.03 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 5.42 (dd,  $J$  = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J$  = 6.5, 3.4 Hz, 1H), 4.41 – 4.30 (m, 1H), 3.93 – 3.52 (m, 2H), 2.90 – 2.76 (m, 1H), 2.71 (dd,  $J$  = 13.4, 7.1 Hz, 1H), 2.52 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.28 – 2.12 (m, 2H), 1.73 (p,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.74, 155.56, 152.46, 151.22, 149.79, 148.94, 140.00, 129.74, 119.80, 114.49, 90.93, 85.54, 83.72, 83.25, 80.30, 55.34, 53.19, 50.19, 32.88, 28.10, 27.13, 25.36, 22.27, 15.11.

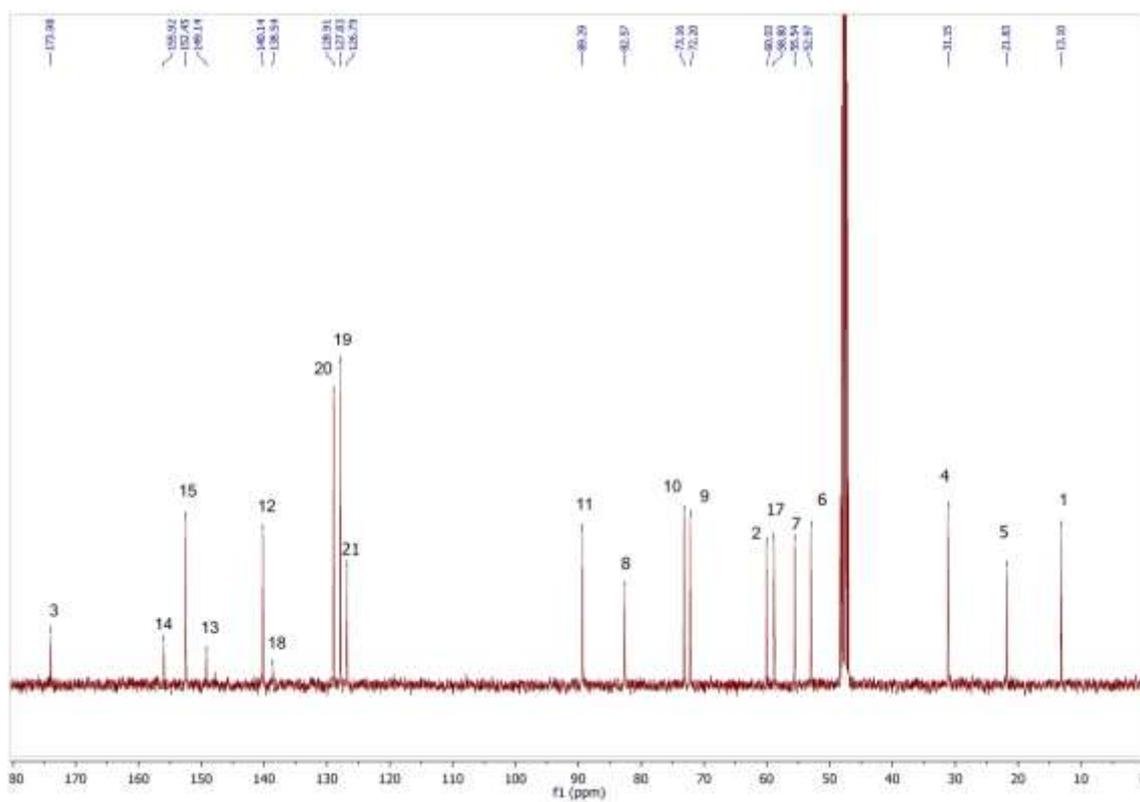


**4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxitetrahidrofuran-2-yl)methyl)((4-methylthiazol-5-yl)methyl)amino)butanoato de etilo (32j)**

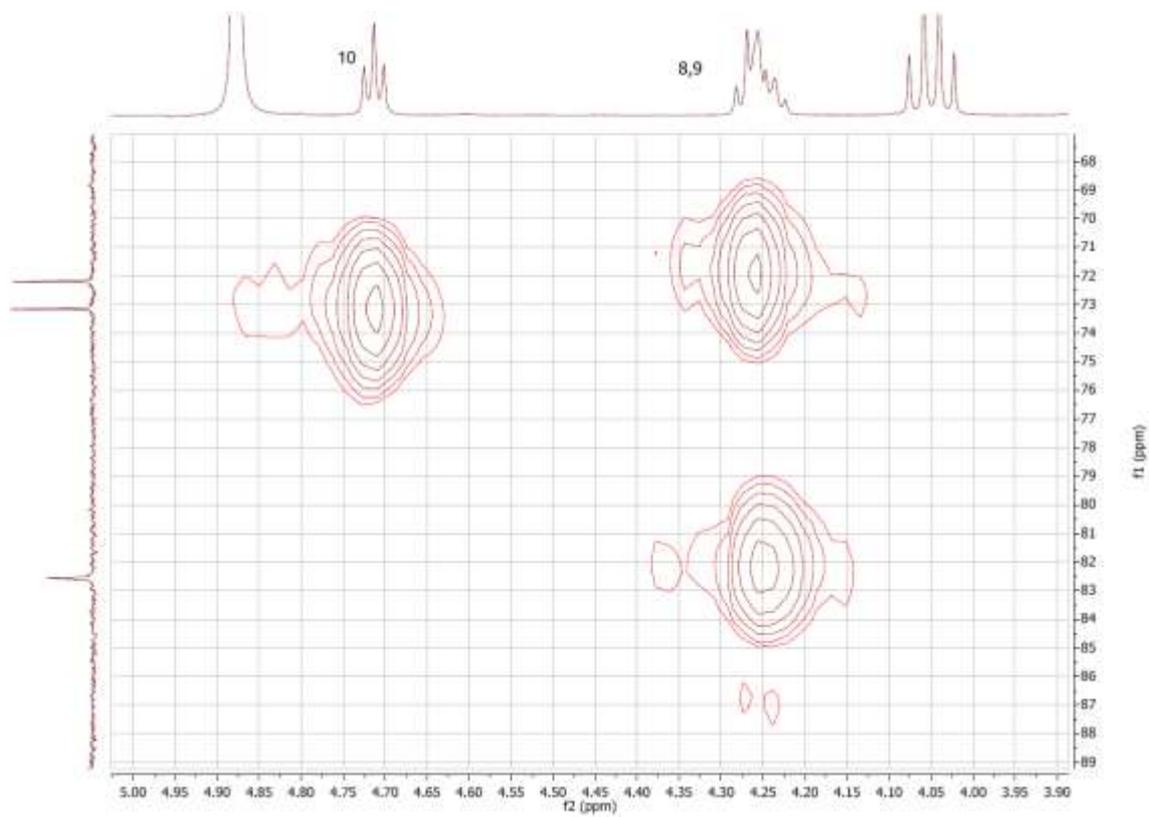
Se utilizaron las condiciones descritas en **C**. **30j** (96.8 mg, 0.17 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se lleva a sequedad la reacción y se obtuvo **31j** como un sólido blanco. Posteriormente, se utilizaron las condiciones descritas en **D**. SOCl<sub>2</sub> (0.07 mL) en 5 mL de EtOH absoluto. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50%) obteniendo **32j** como un aceite incoloro (41.8 mg, 56%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **32j** es de 92% (220 nm) y de 96% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.187 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.84 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 6.00 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.75 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.29 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.81 (s, 2H), 2.34 (d, *J* = 2.3 Hz, 7H), 1.86 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 174.92, 157.17, 154.57, 153.52, 150.39, 151.10 (asignado por HMBC-RMN), 141.95, 120.88, 91.22, 82.81, 74.40, 73.51, 61.60, 56.46, 54.27, 51.03, 32.16, 22.52, 15.08, 14.50. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 492.2024, observada 492.2016. **[α]<sub>D</sub>**: -3.6604.





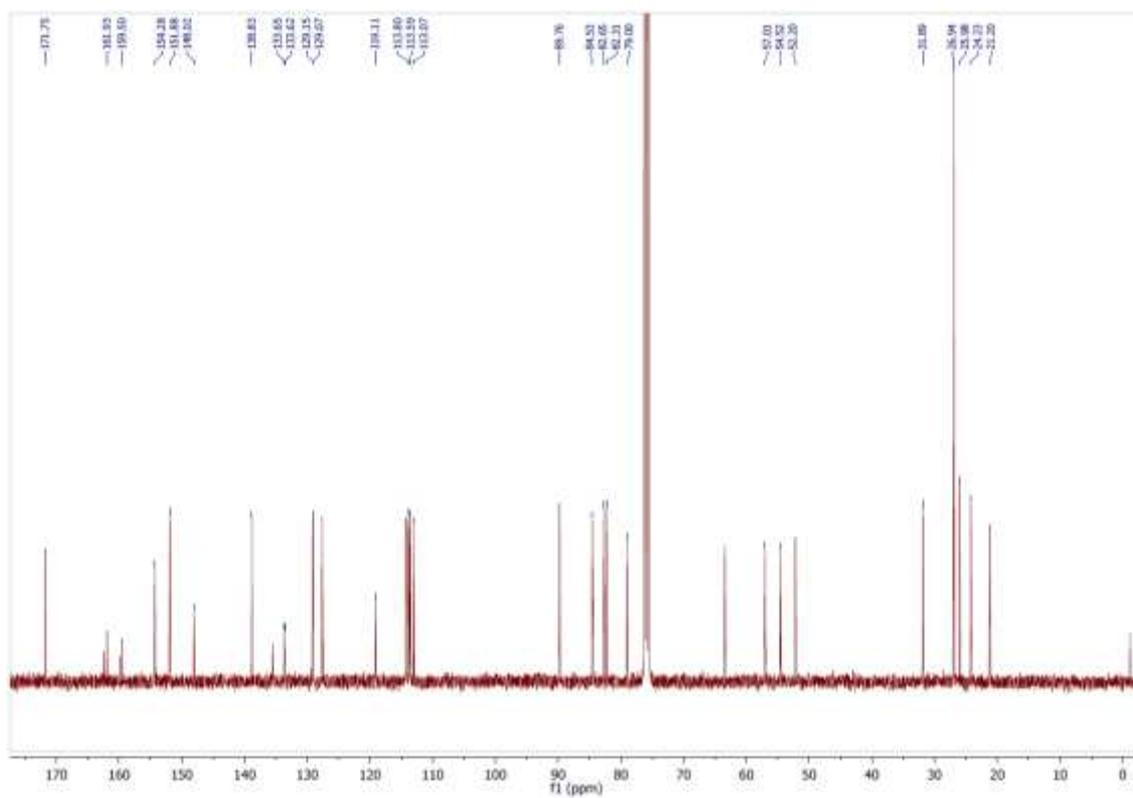


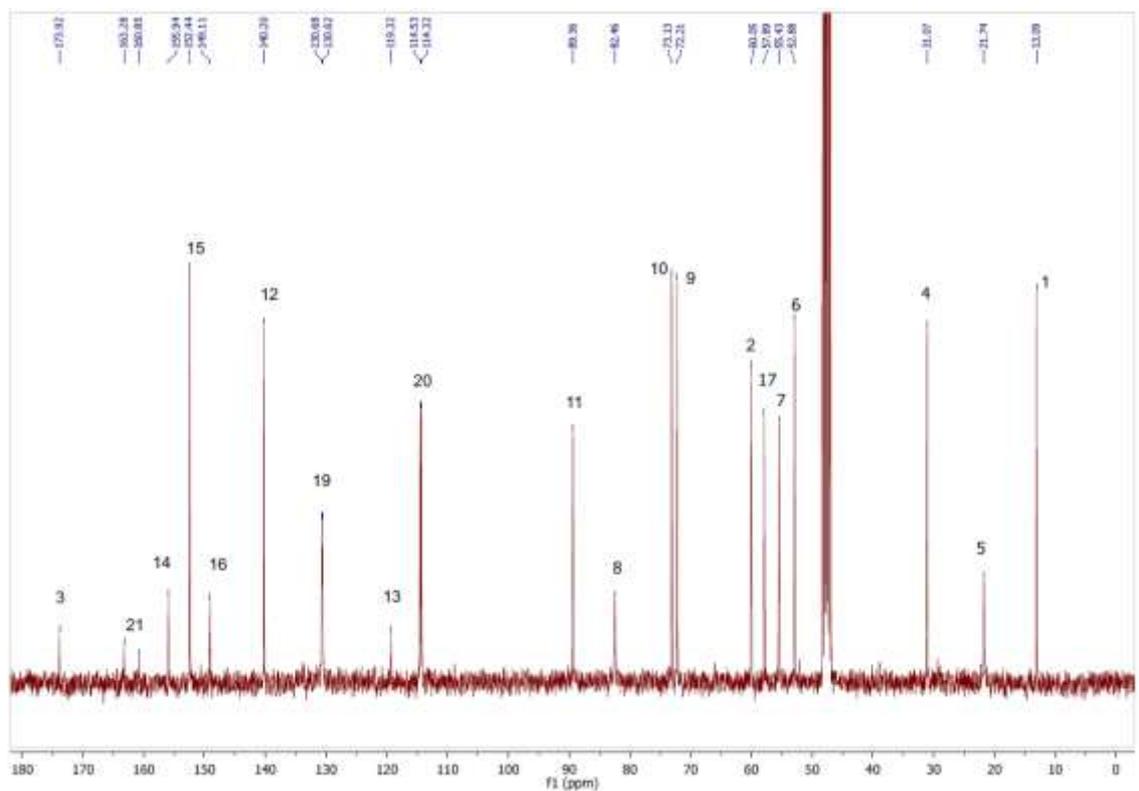
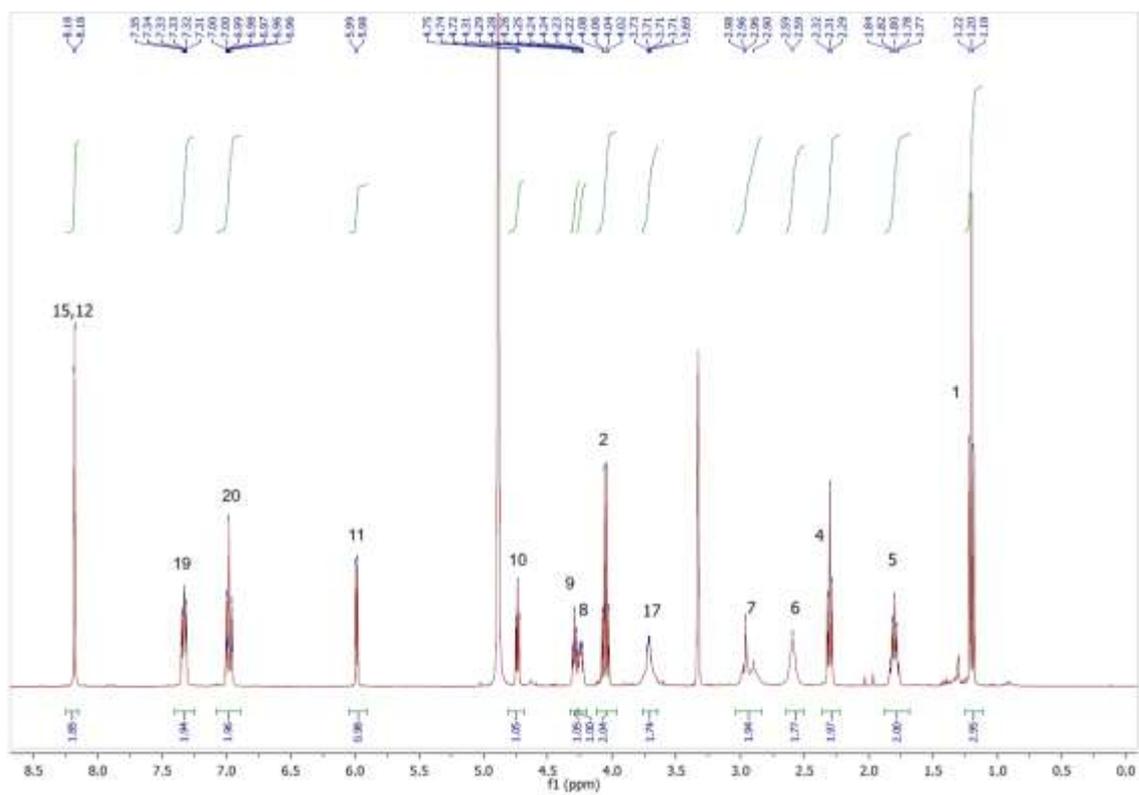
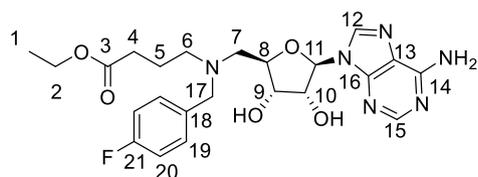
HSQC-RMN



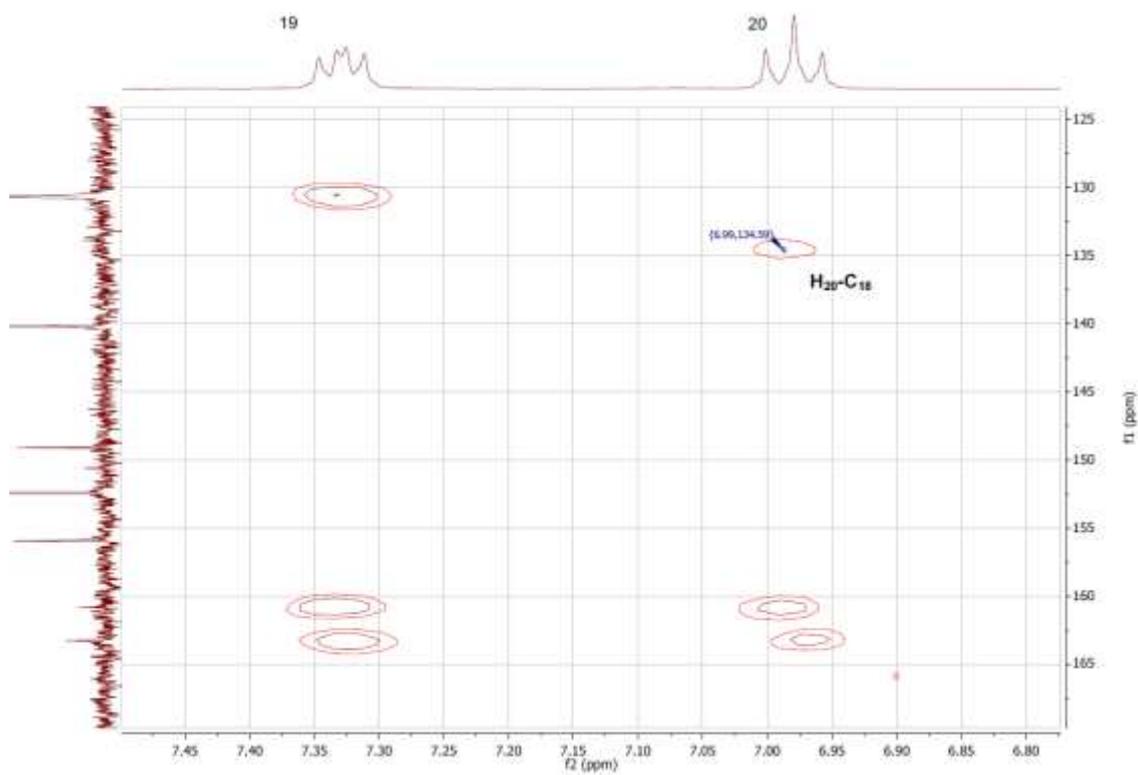
HMBC-RMN



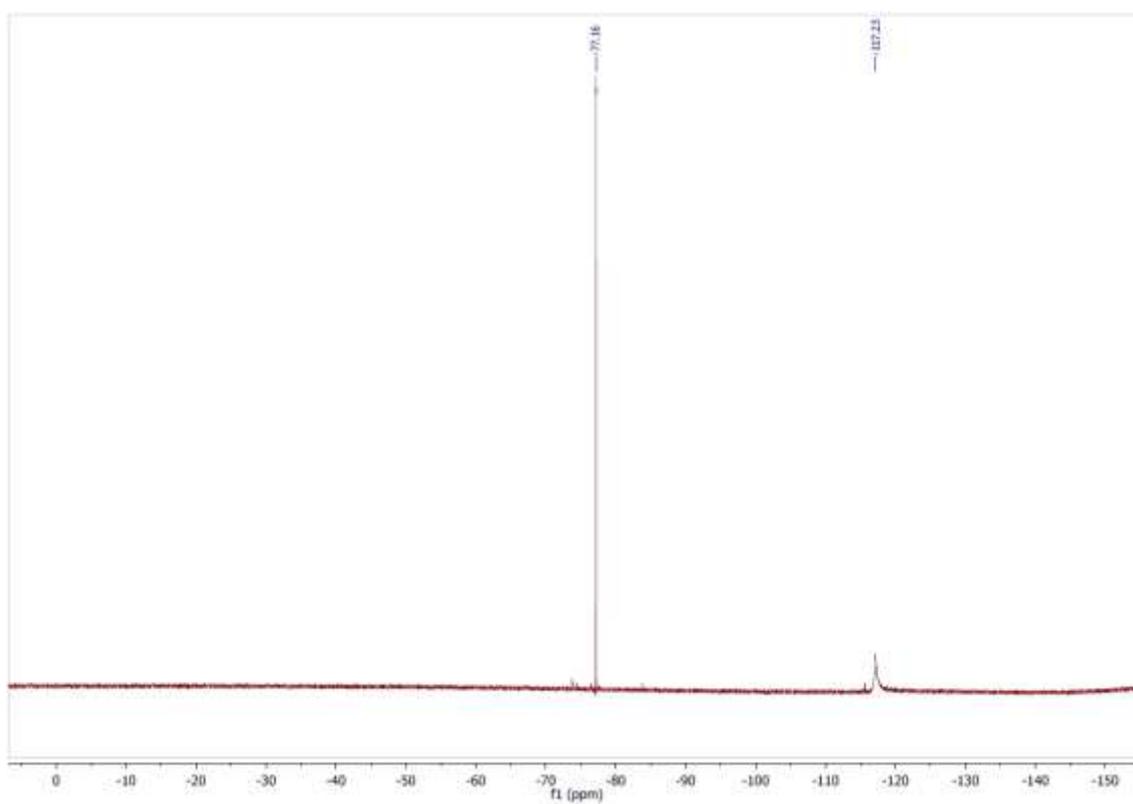


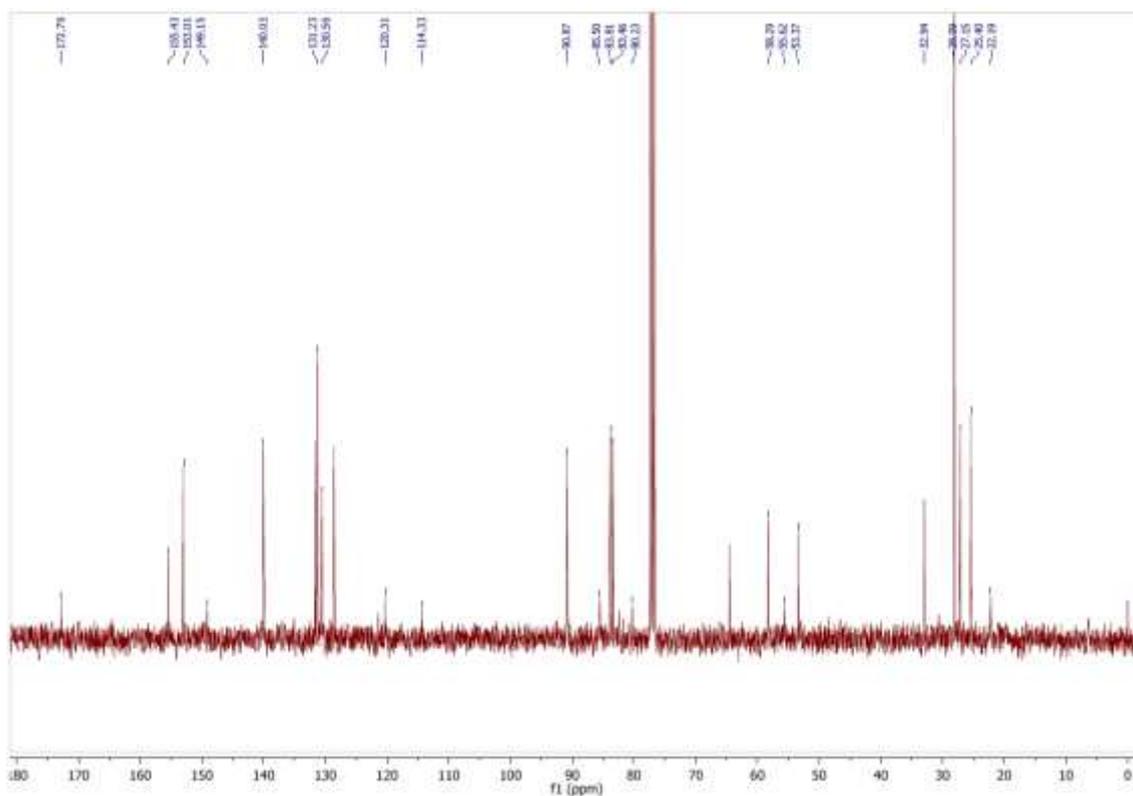
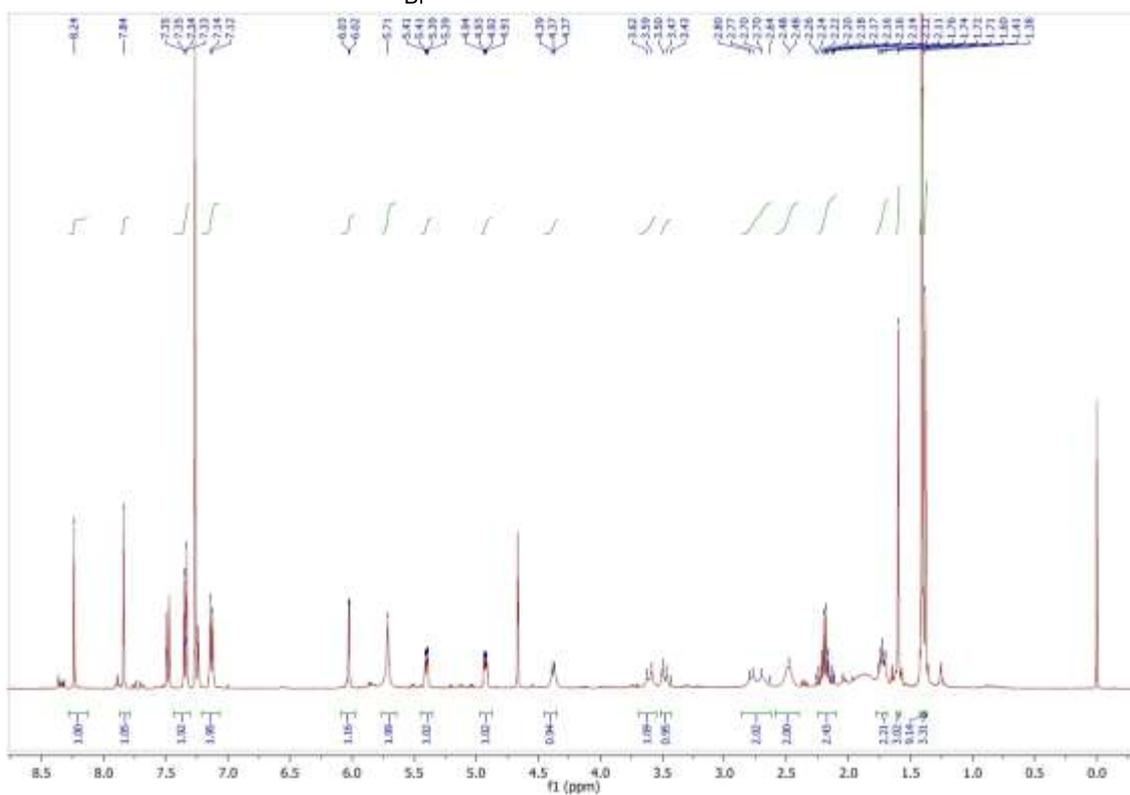
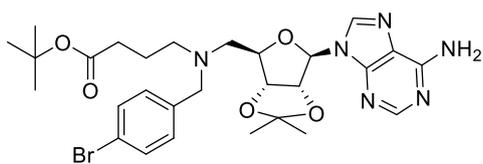


### HMBC-RMN

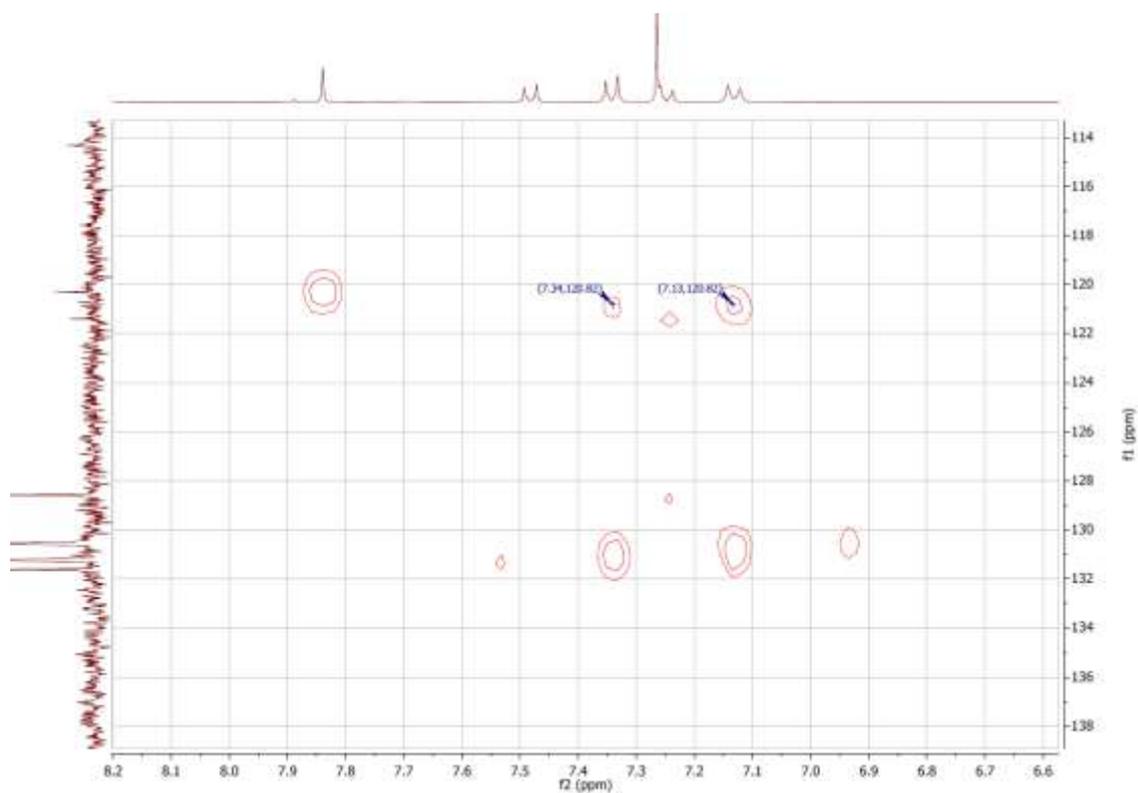


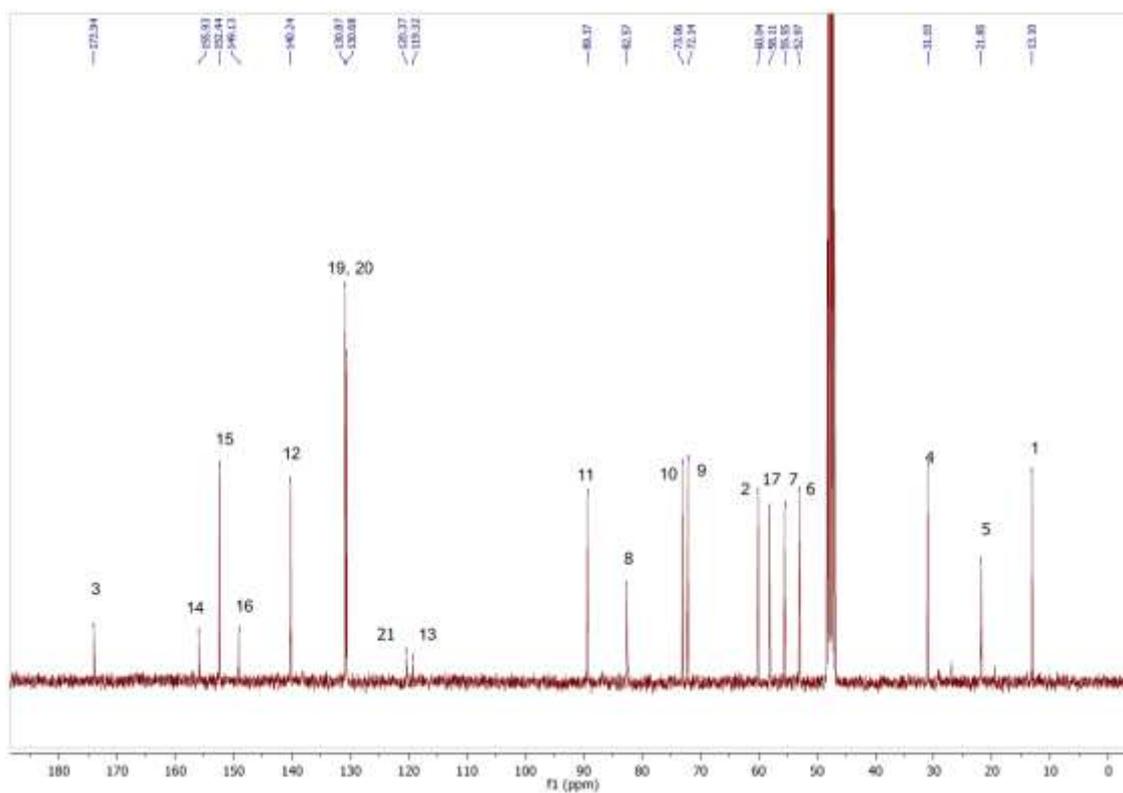
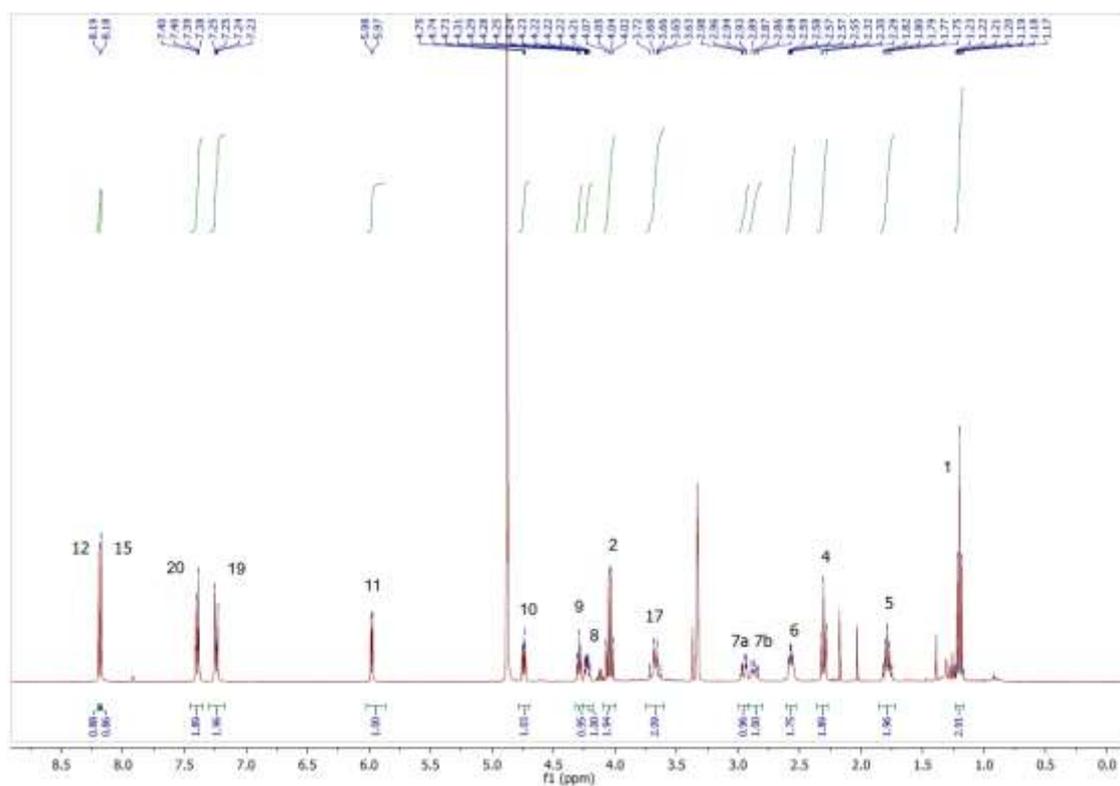
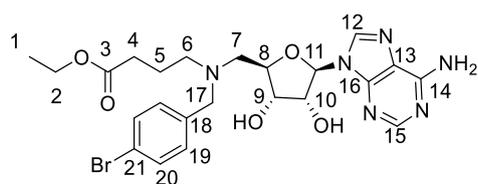
### <sup>19</sup>F-RMN



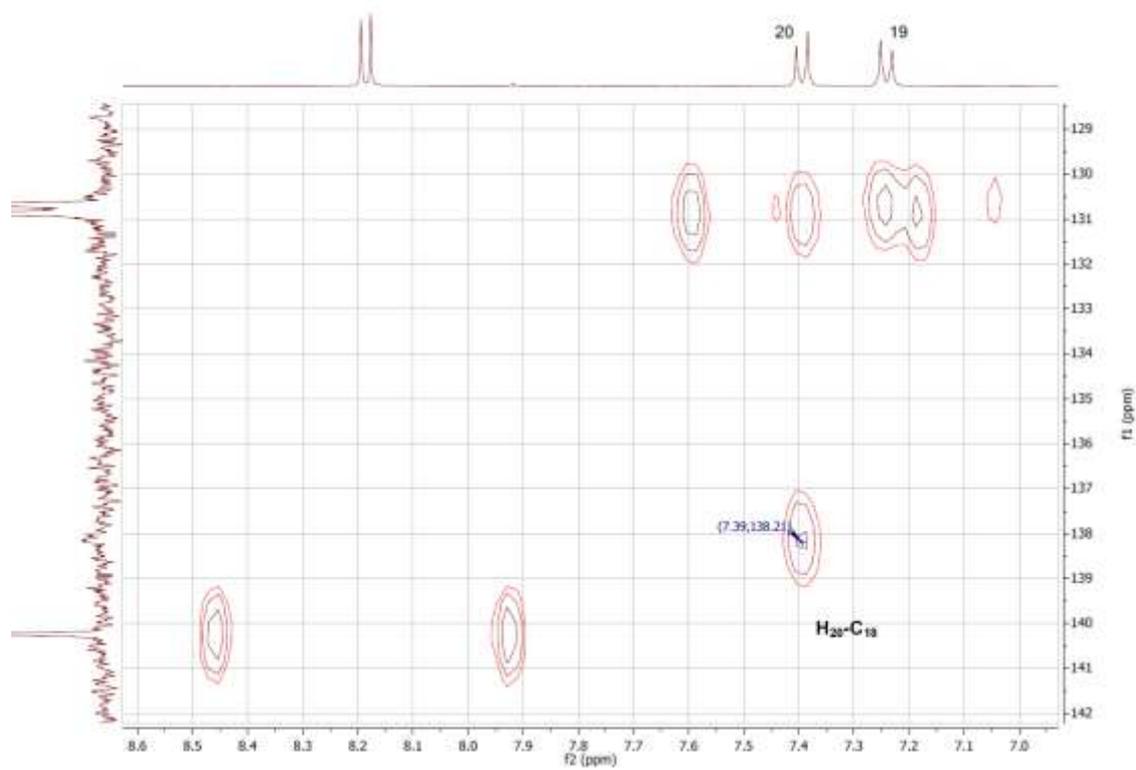


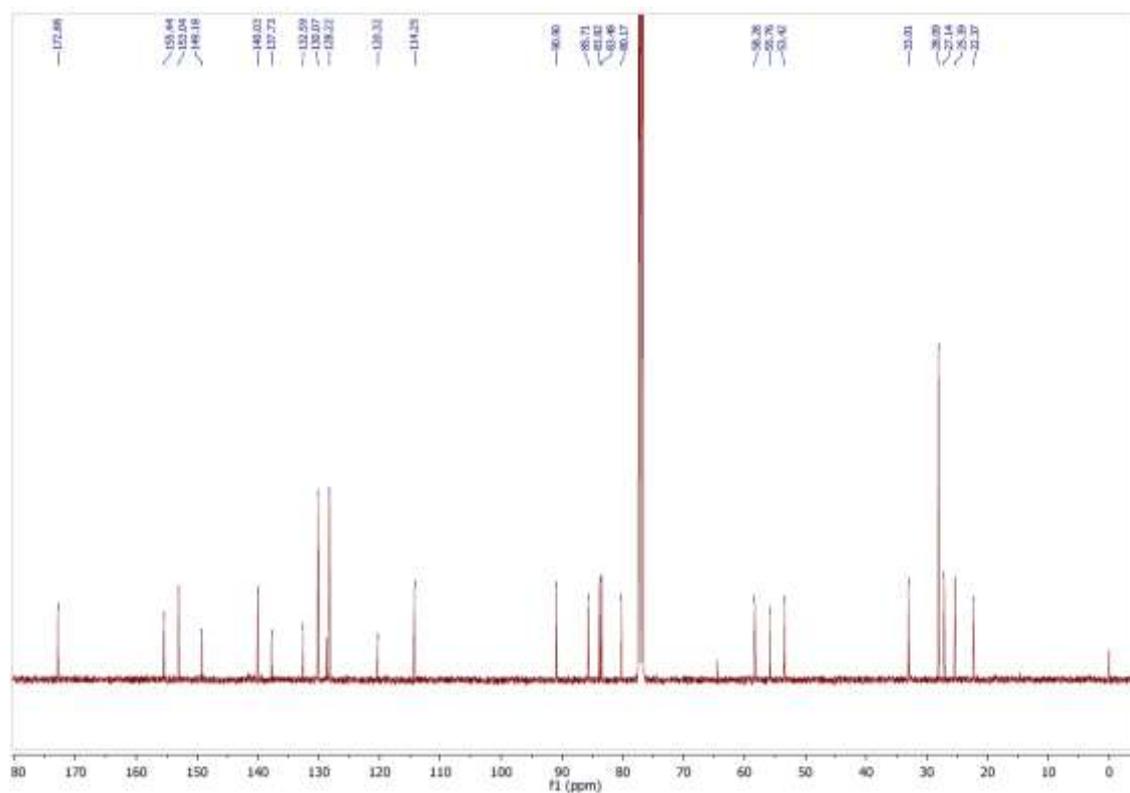
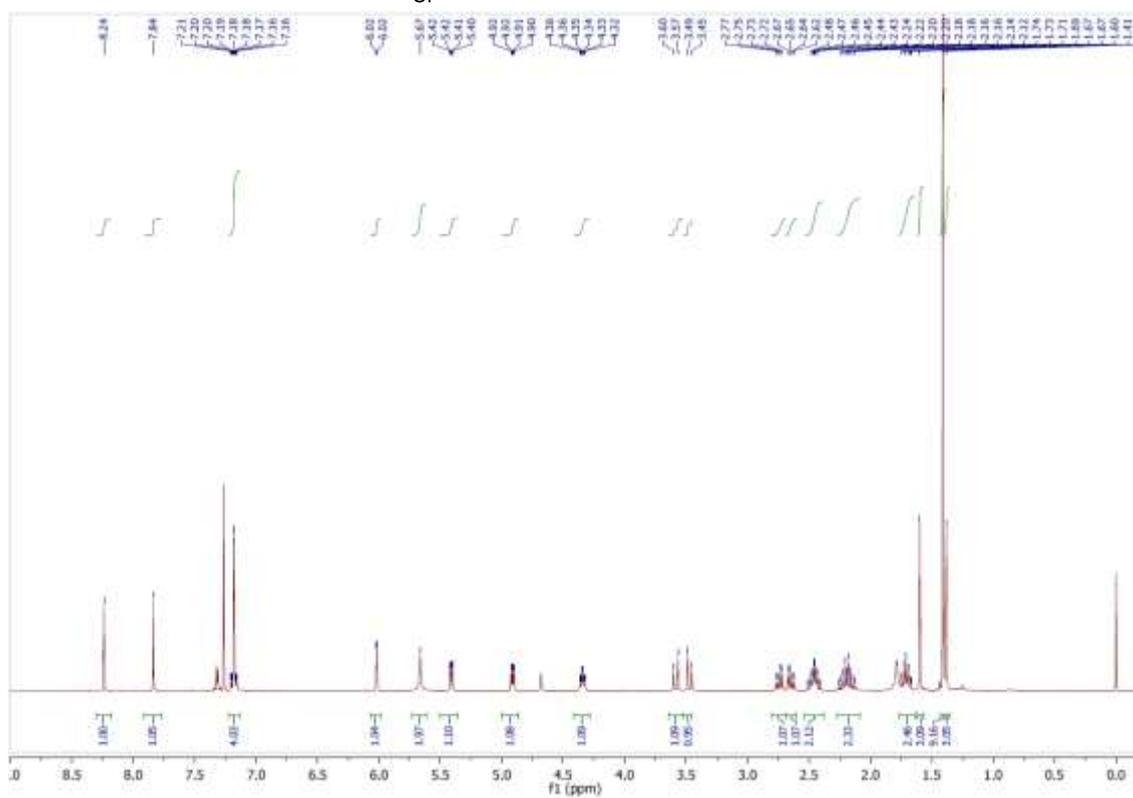
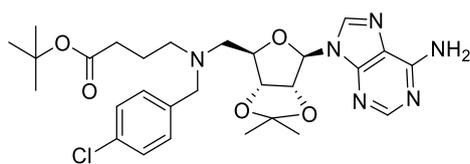
### HMBC-RMN

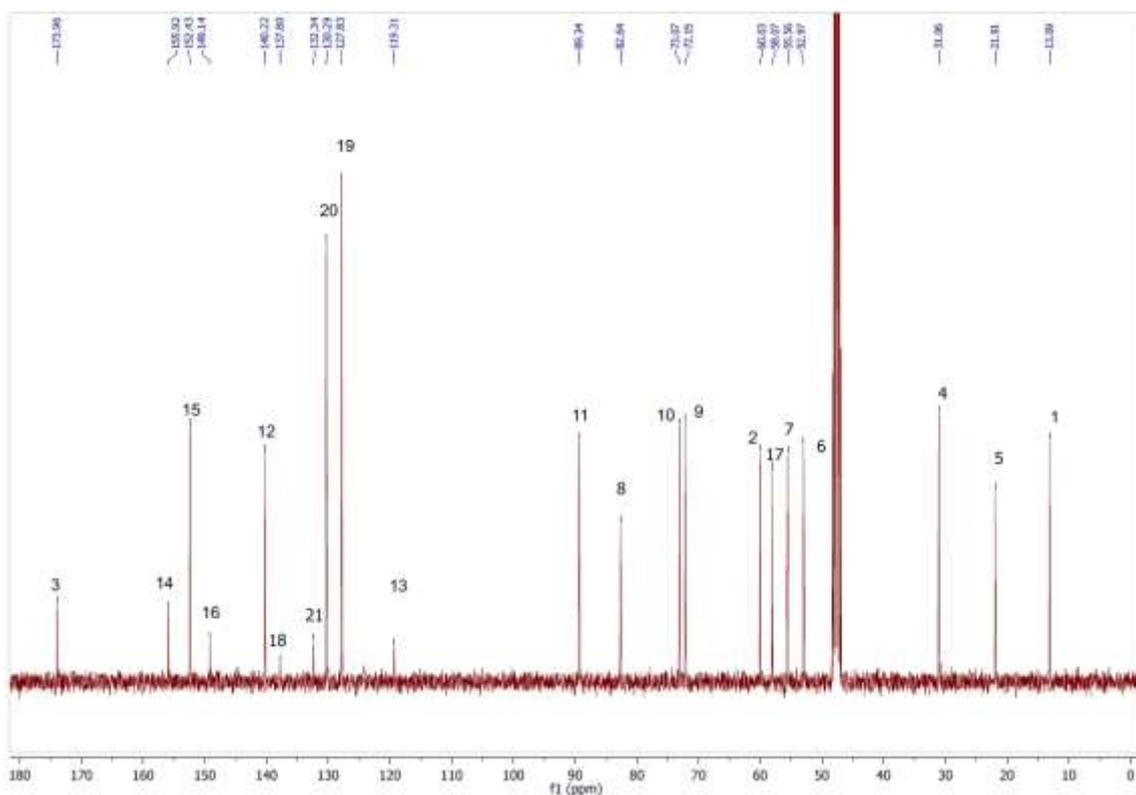
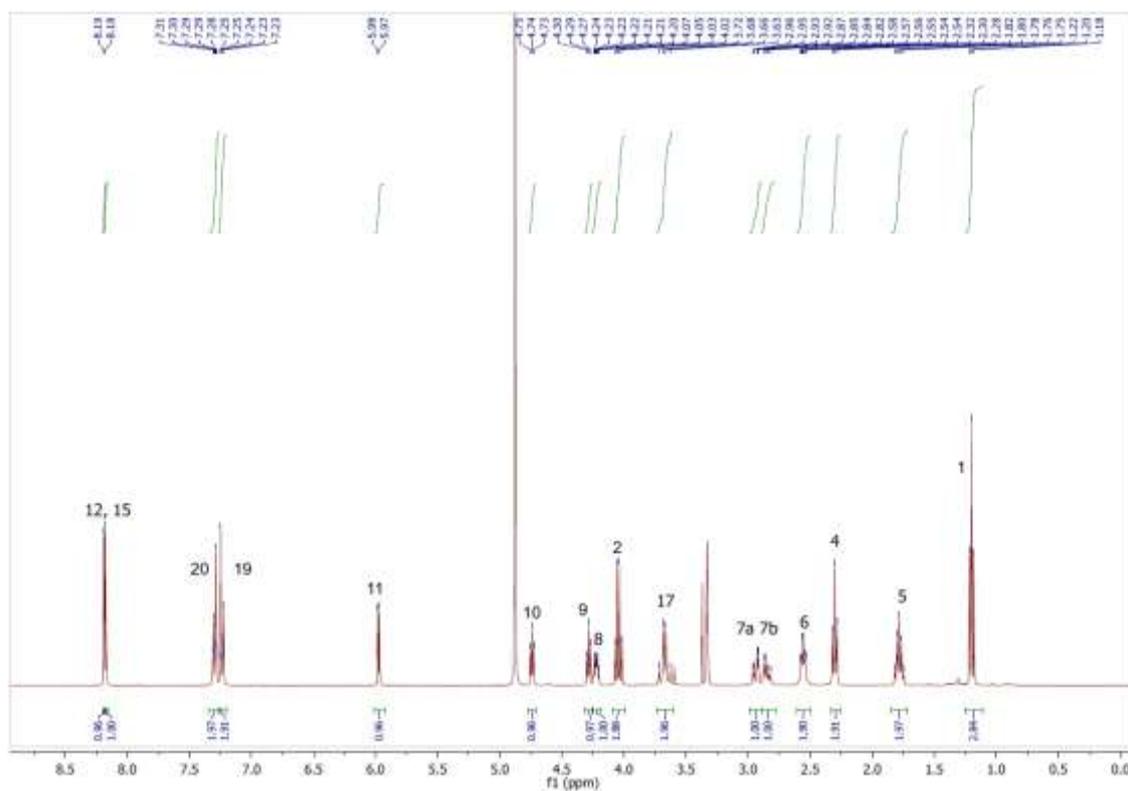
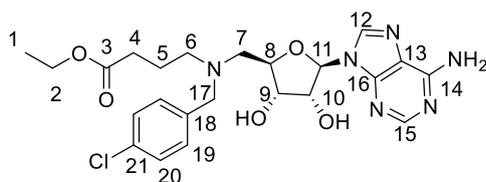


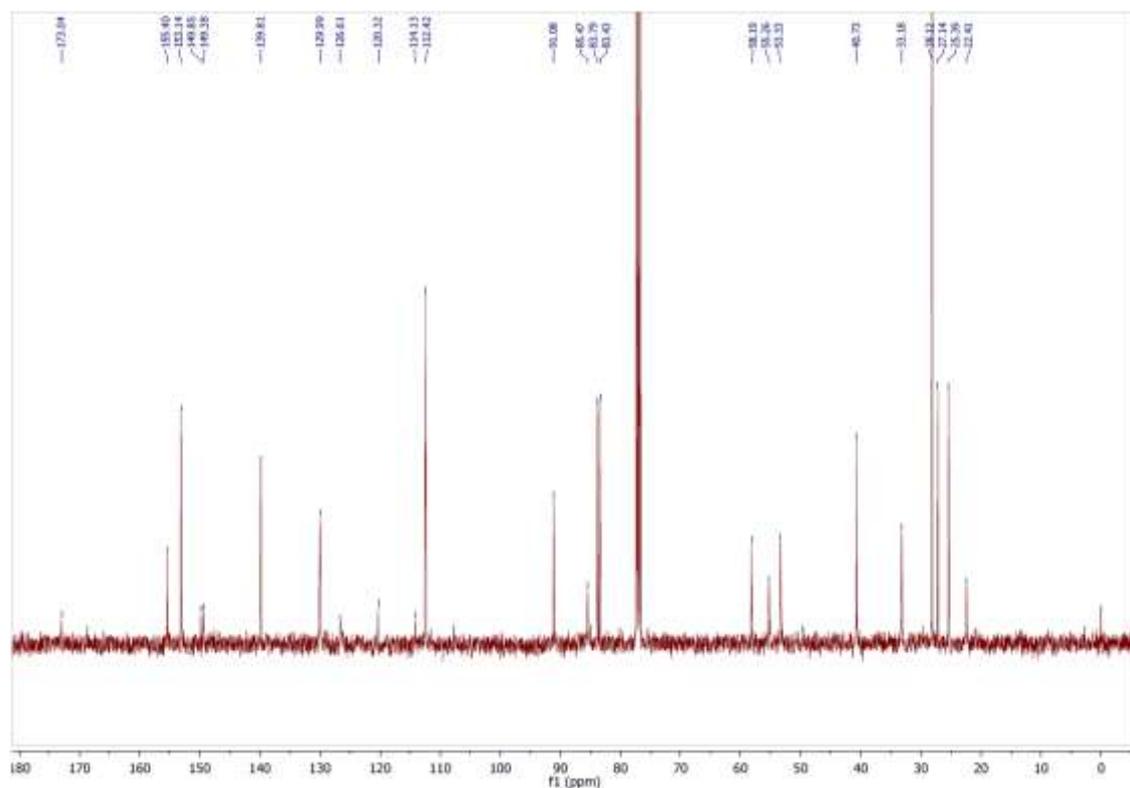
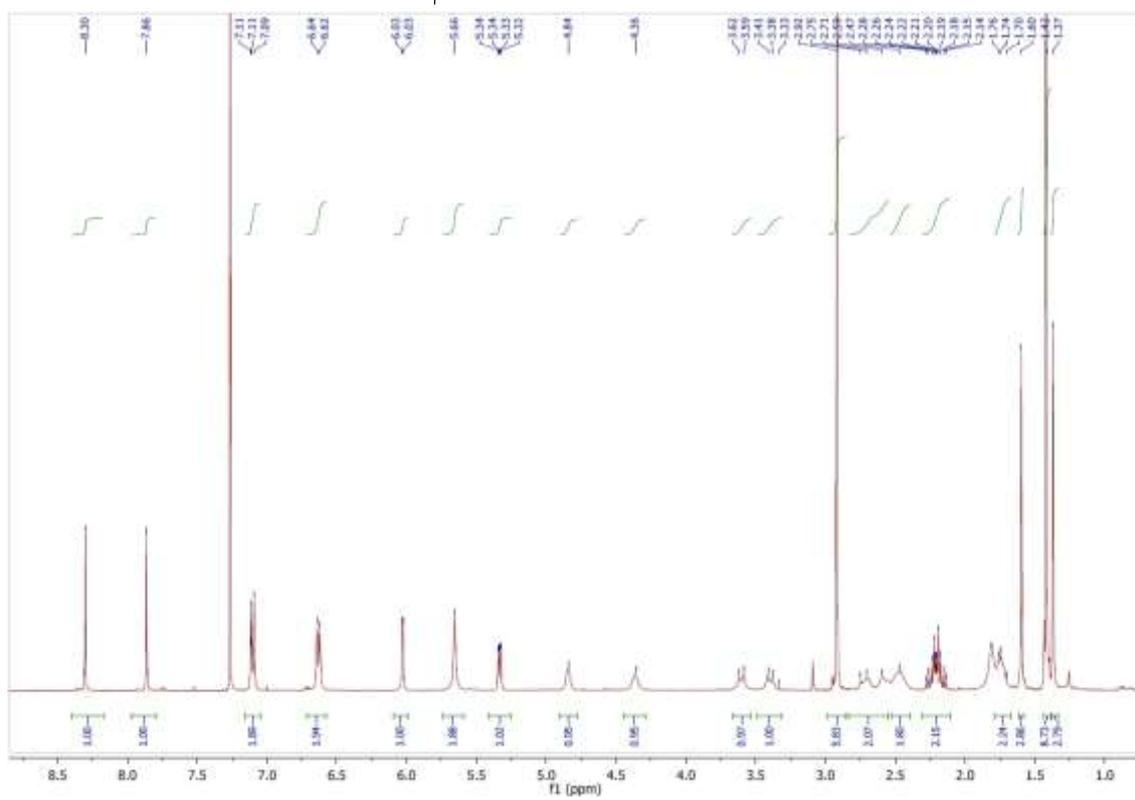
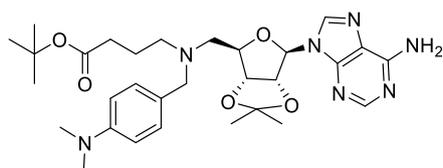


### HMBC-RMN

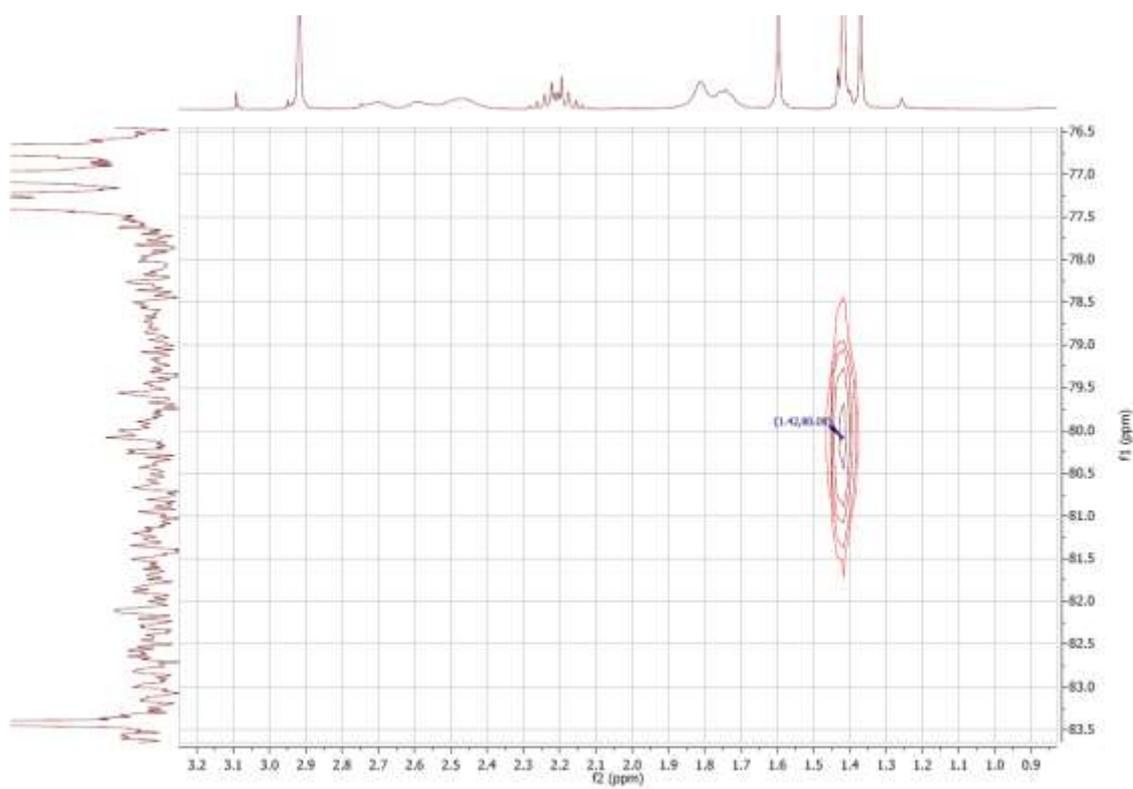


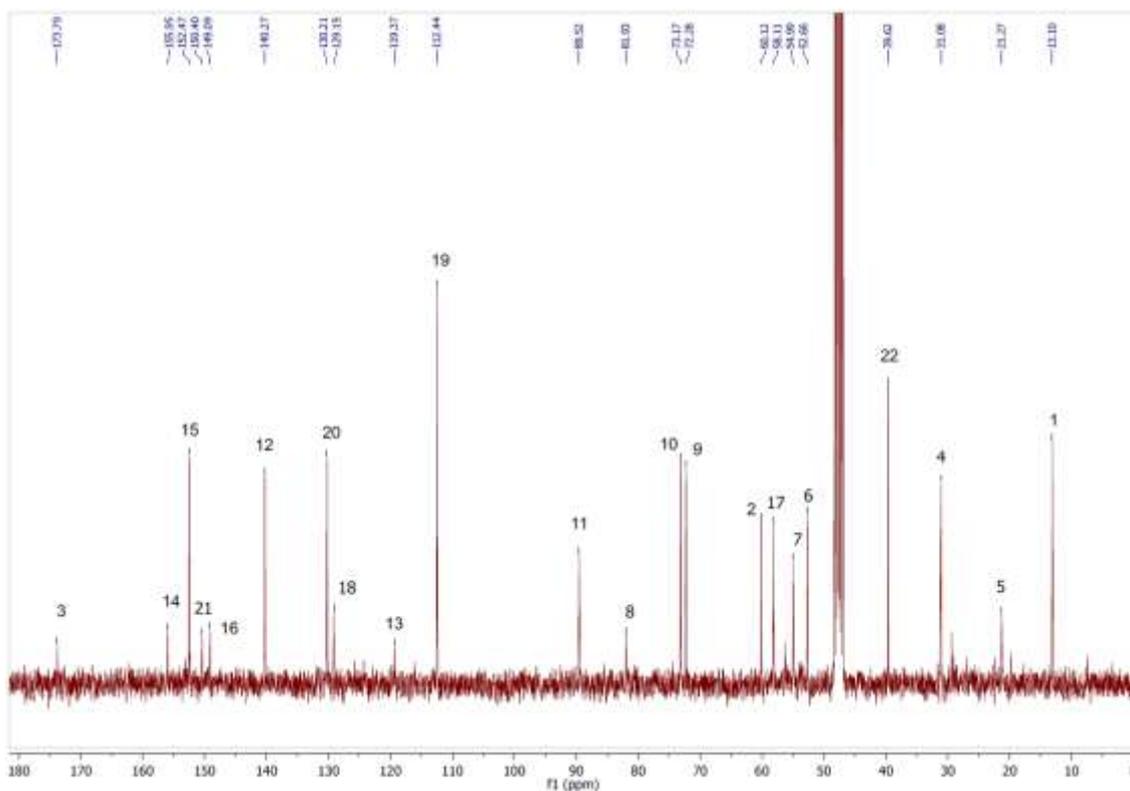
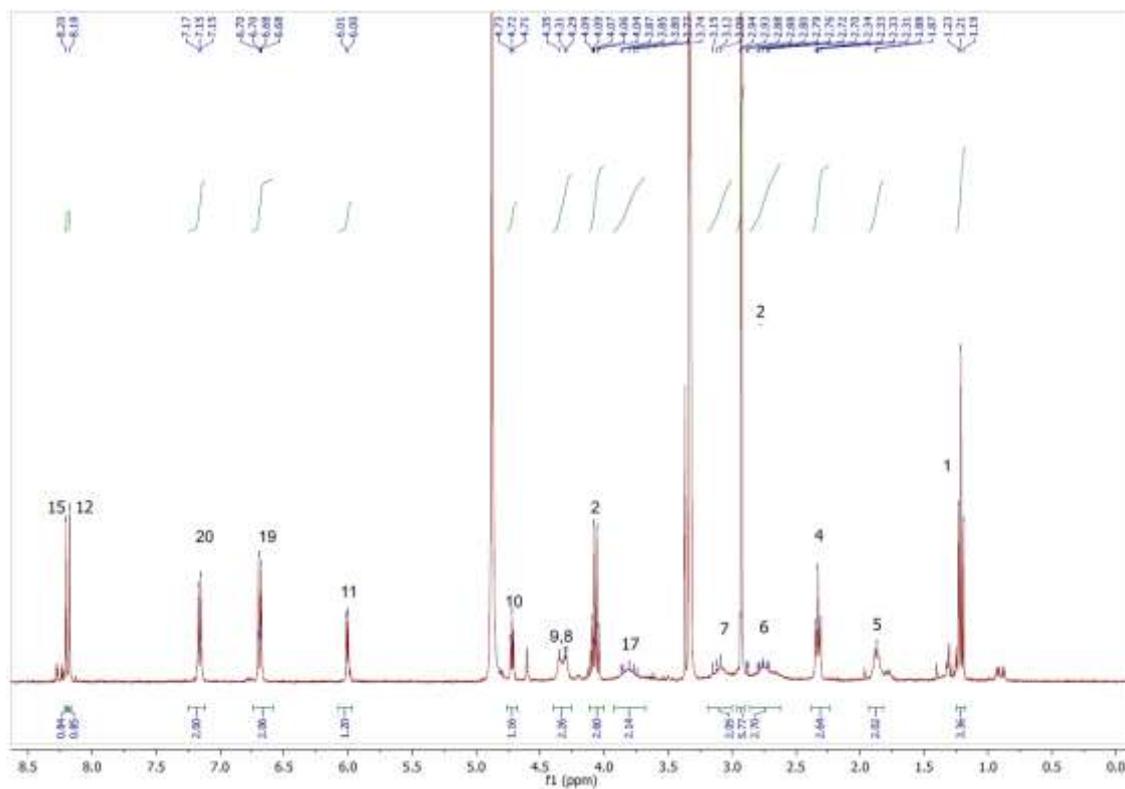
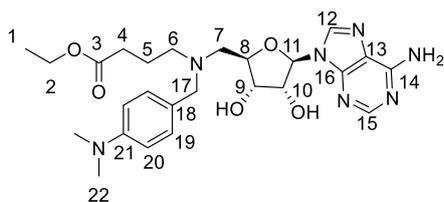


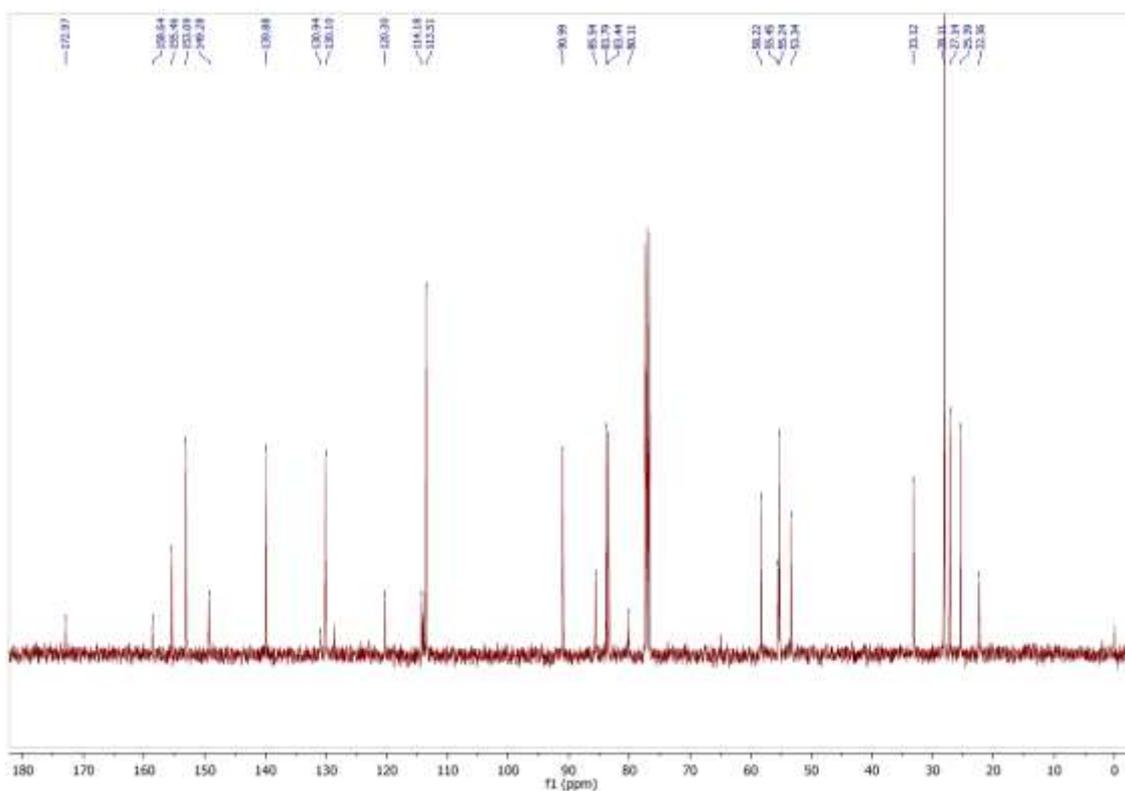
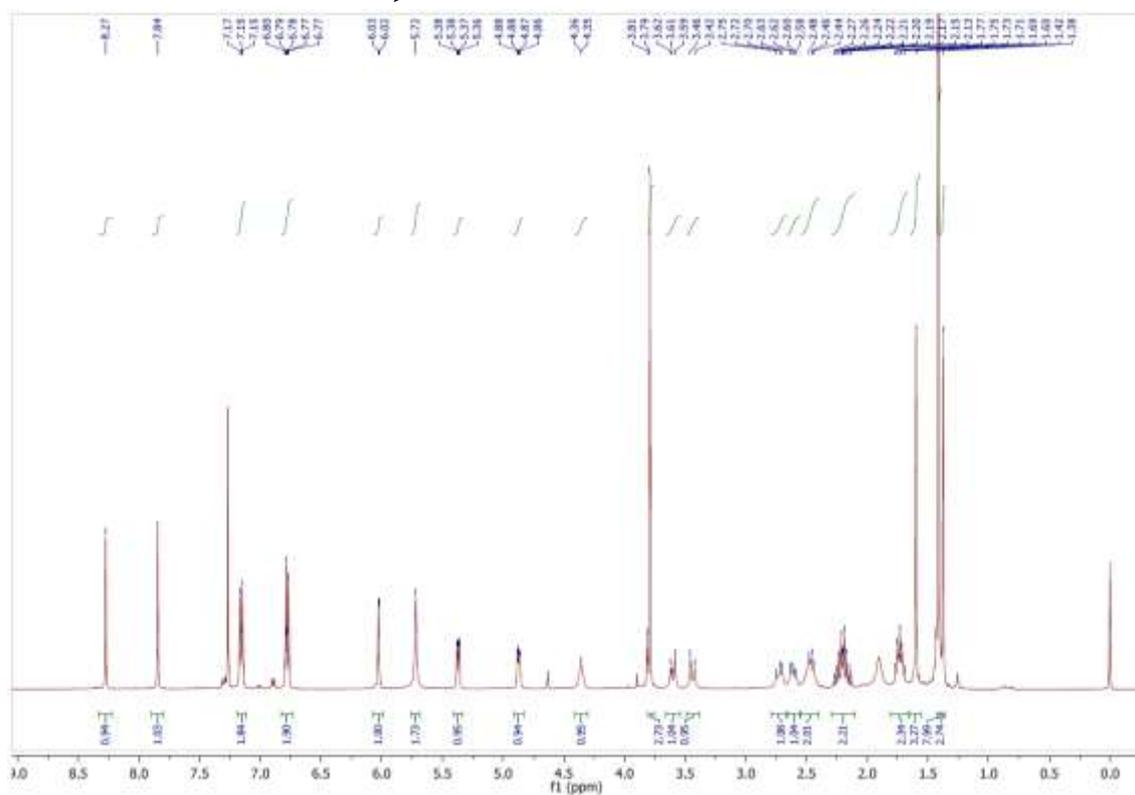
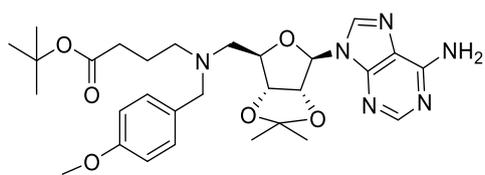


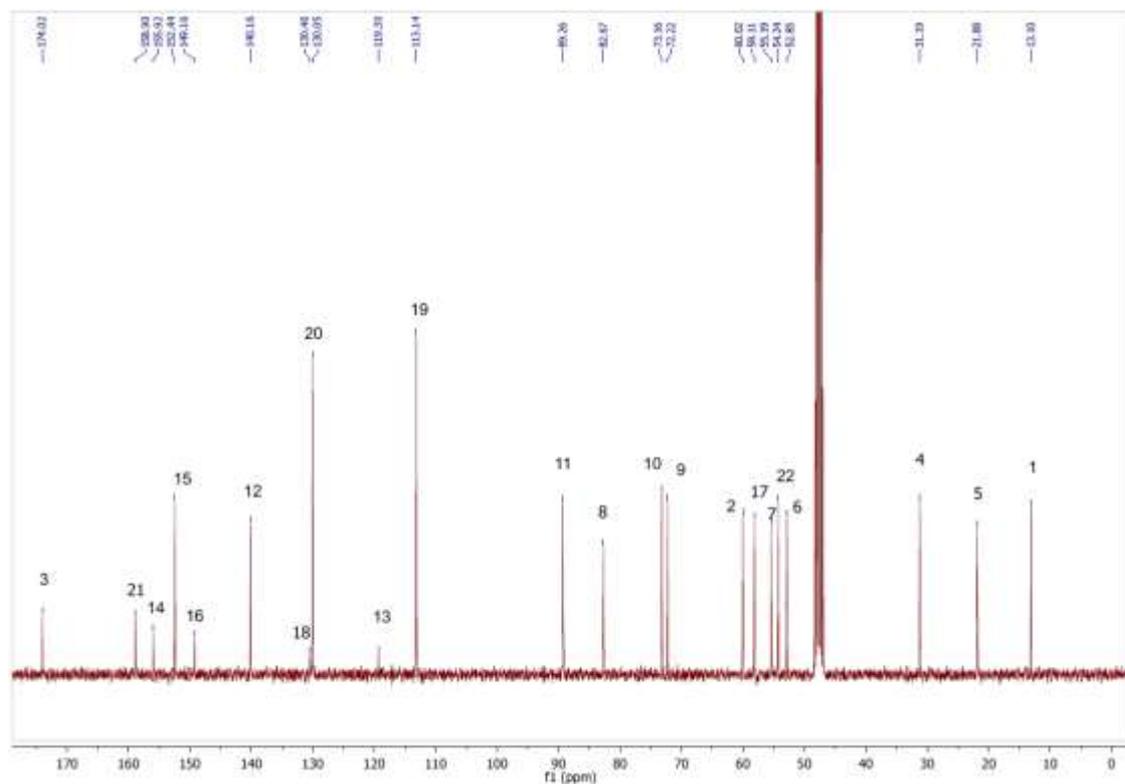
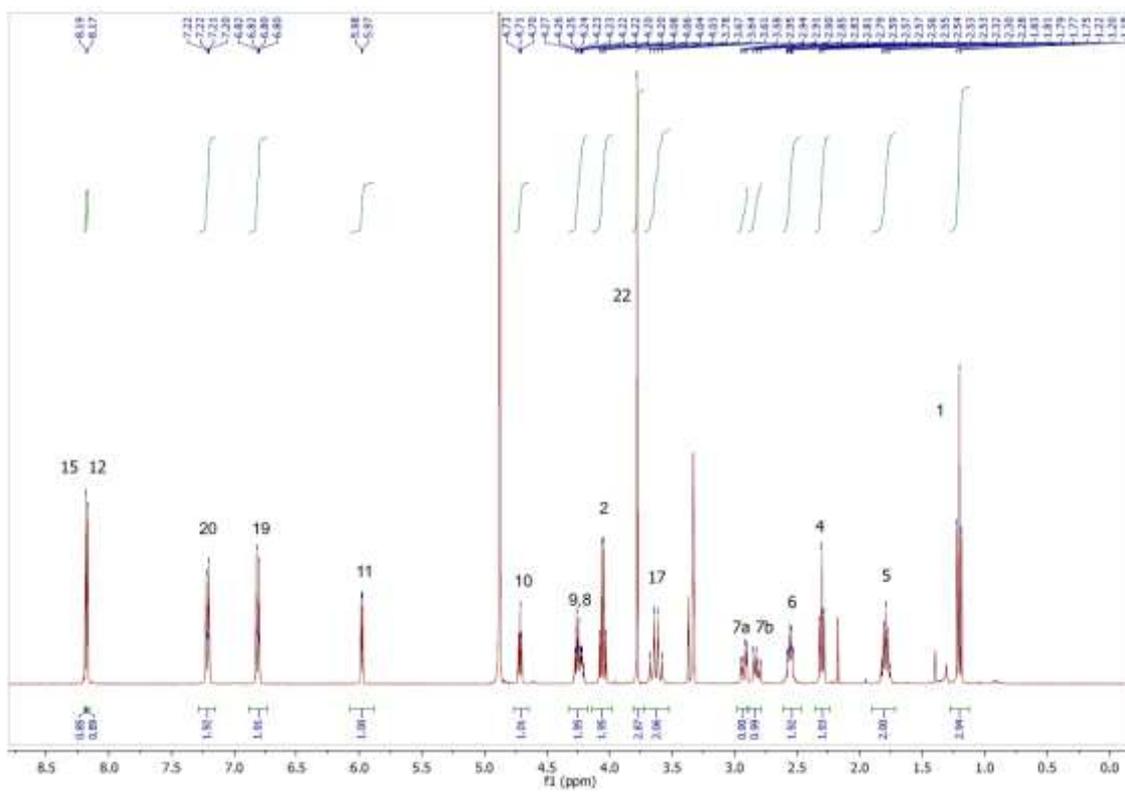
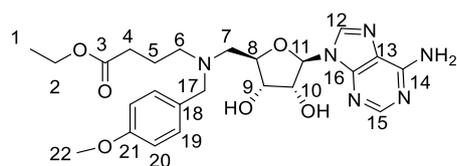


### HMBC-RMN



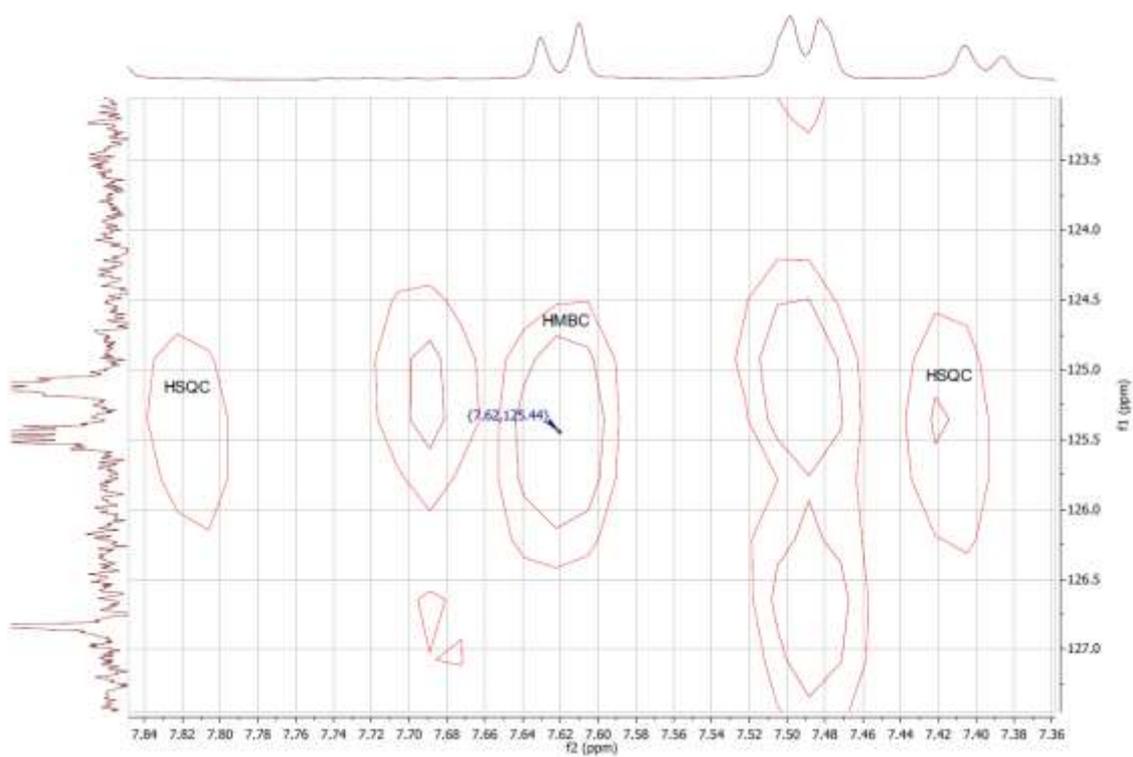


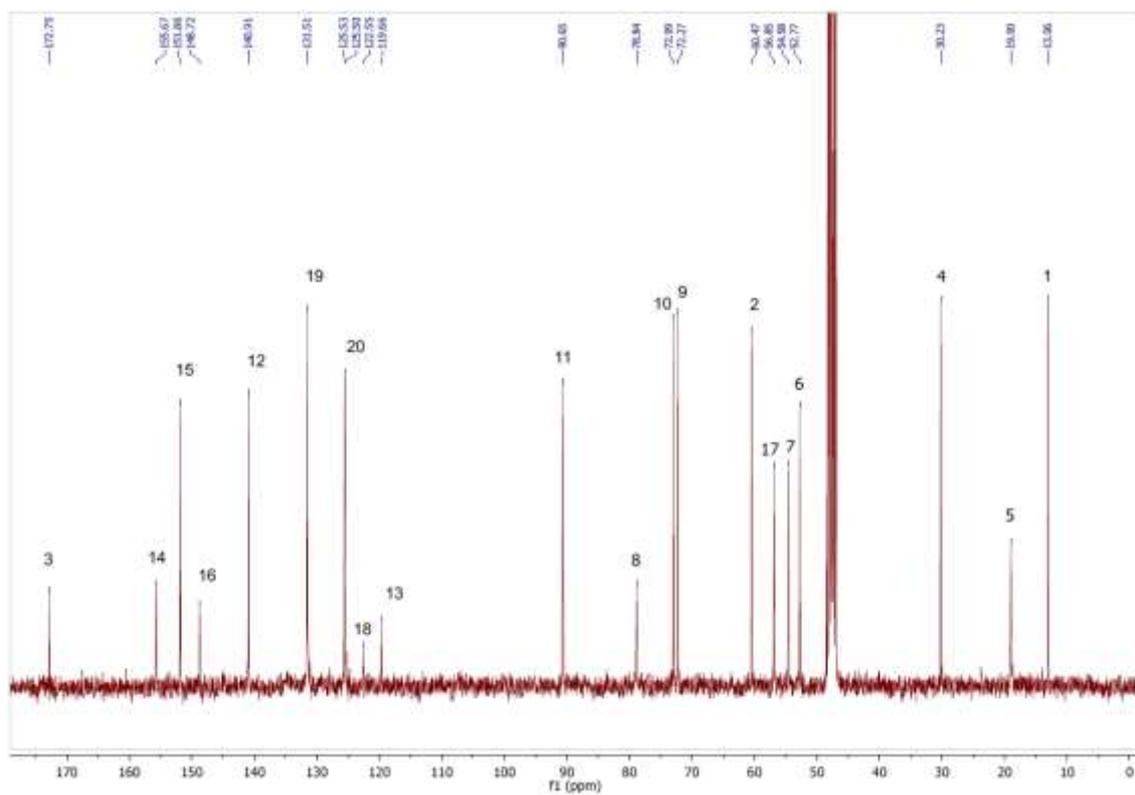
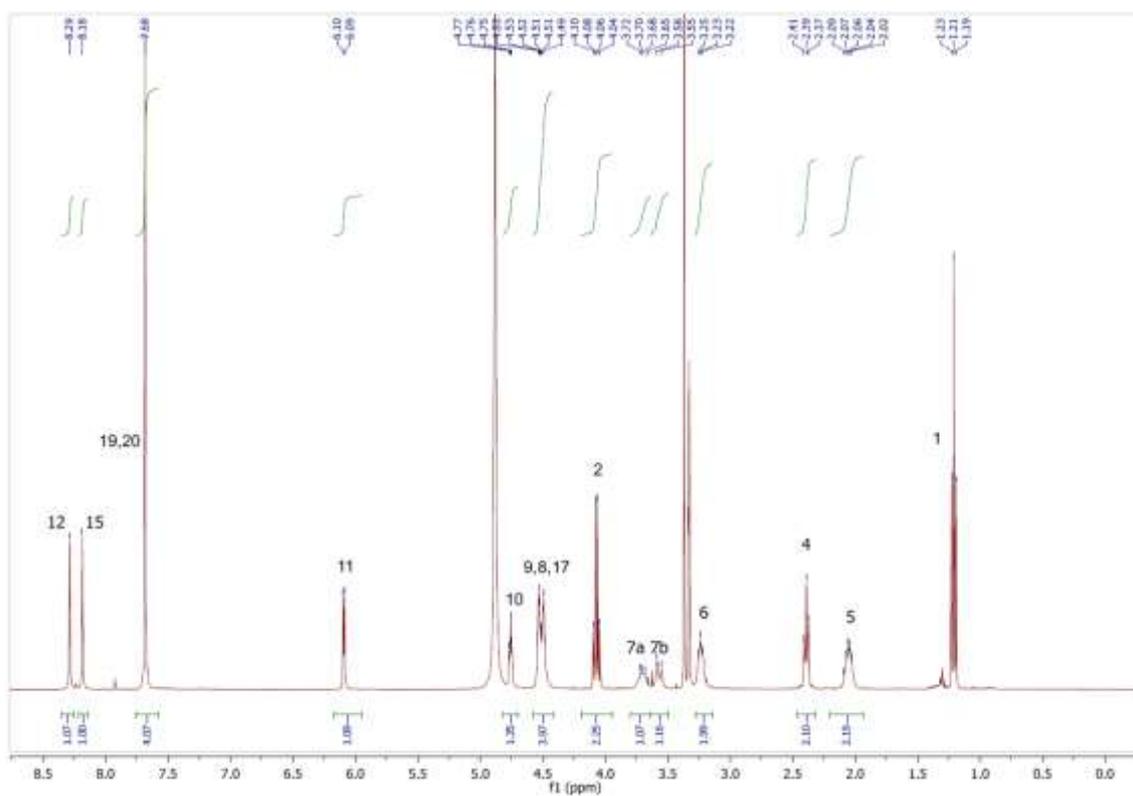
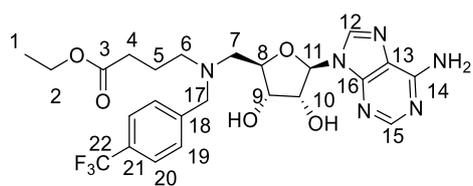




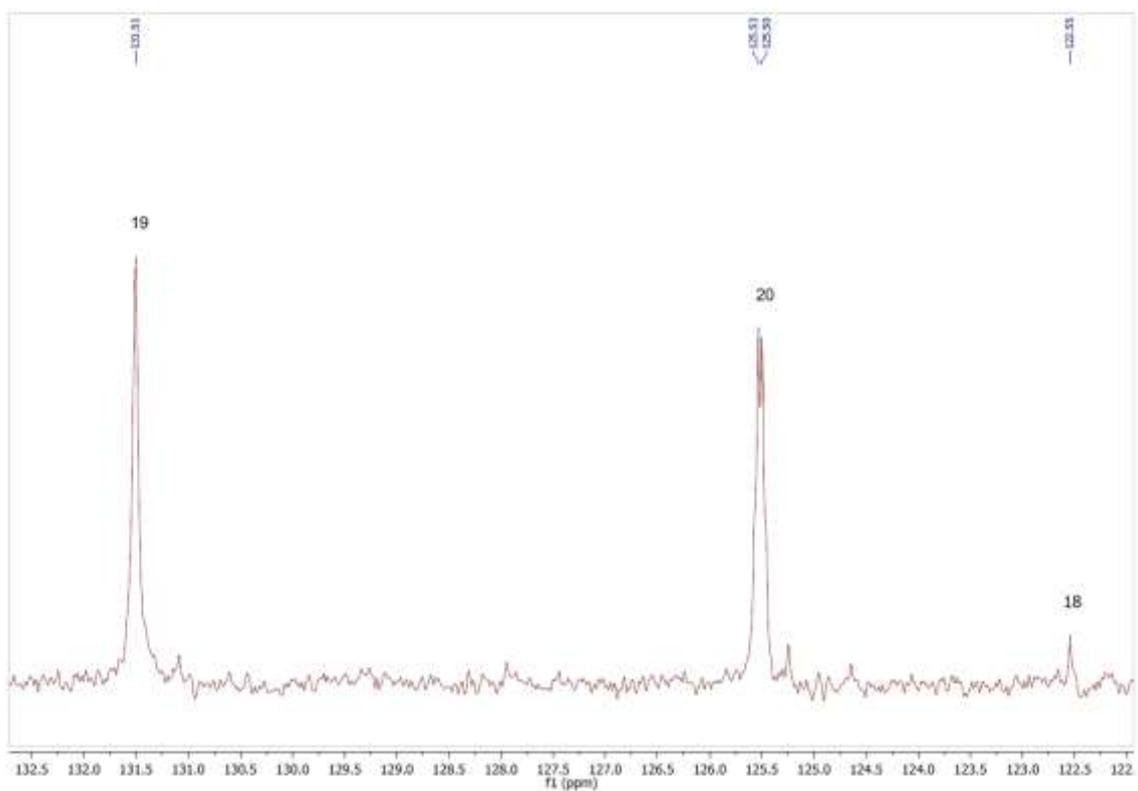


## HMBC-RMN

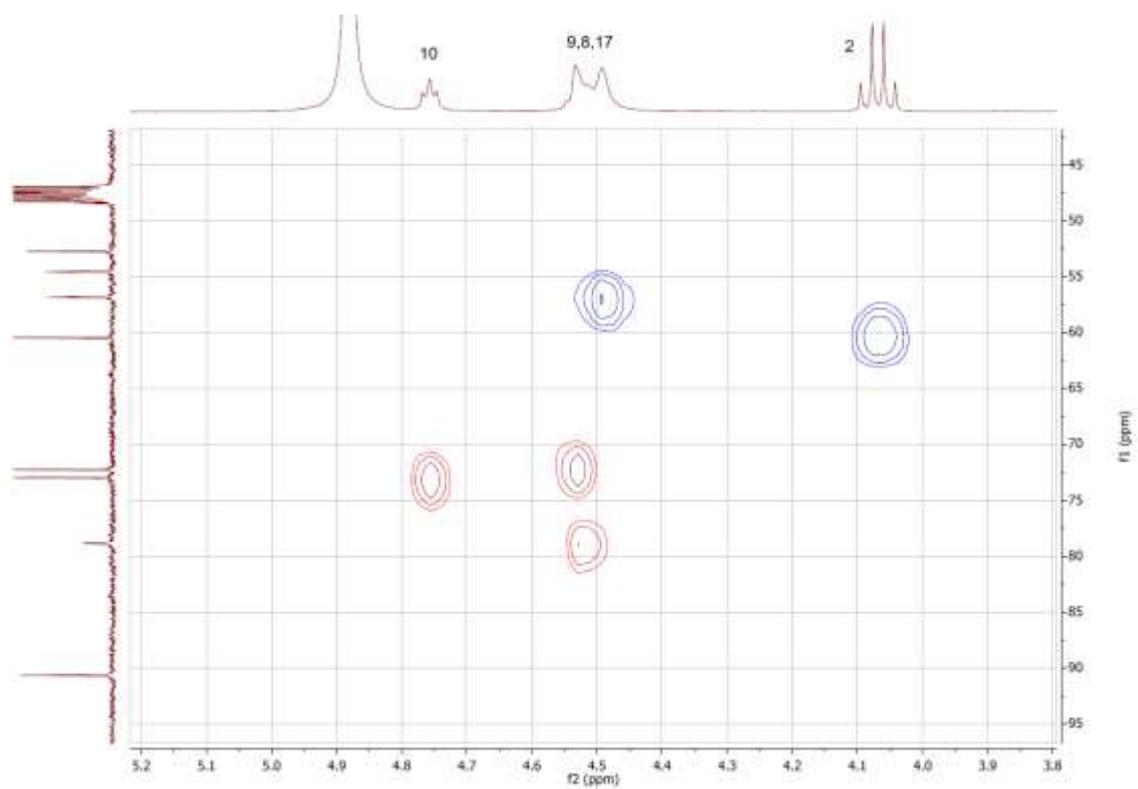




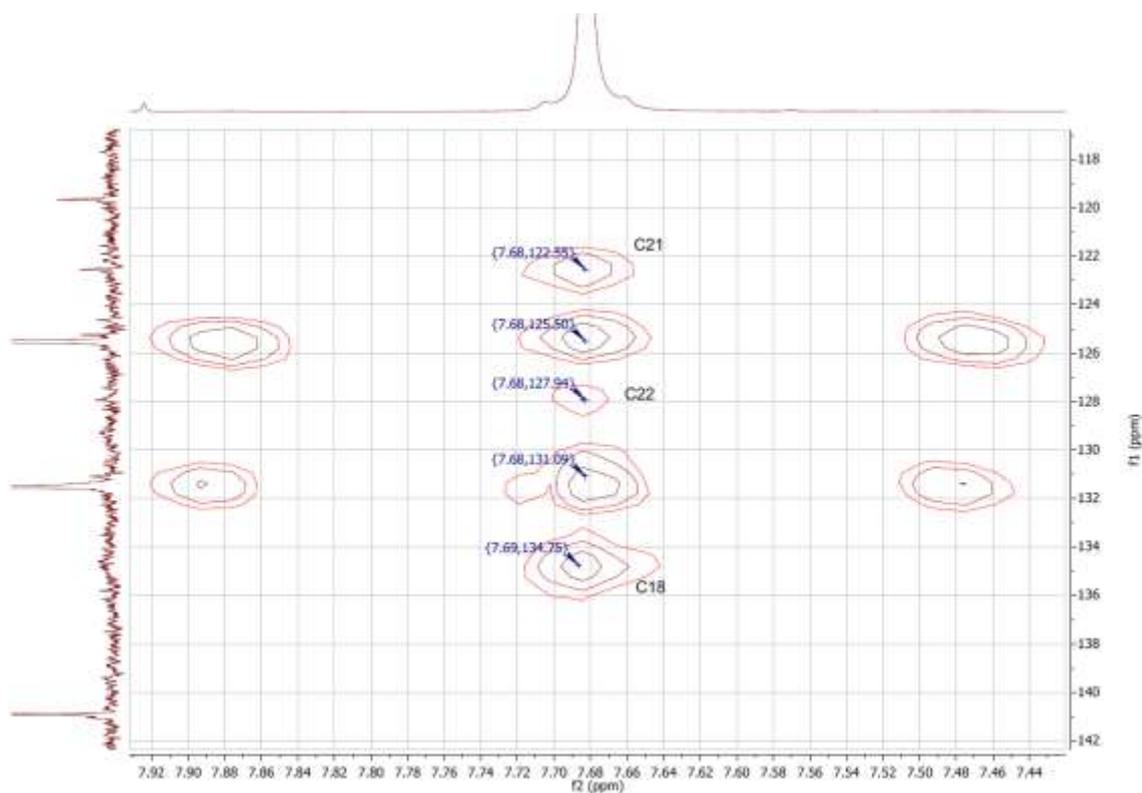
### Ampliación $^{13}\text{C}$ -RMN



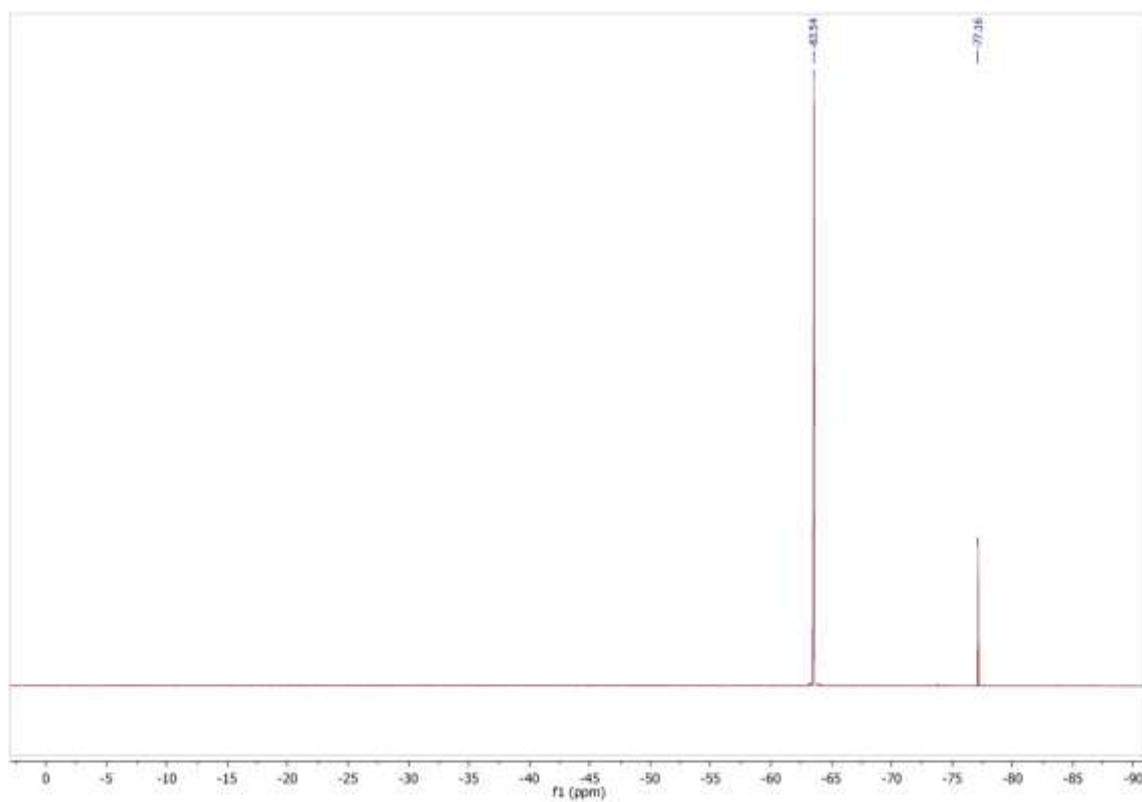
### HSQC-RMN



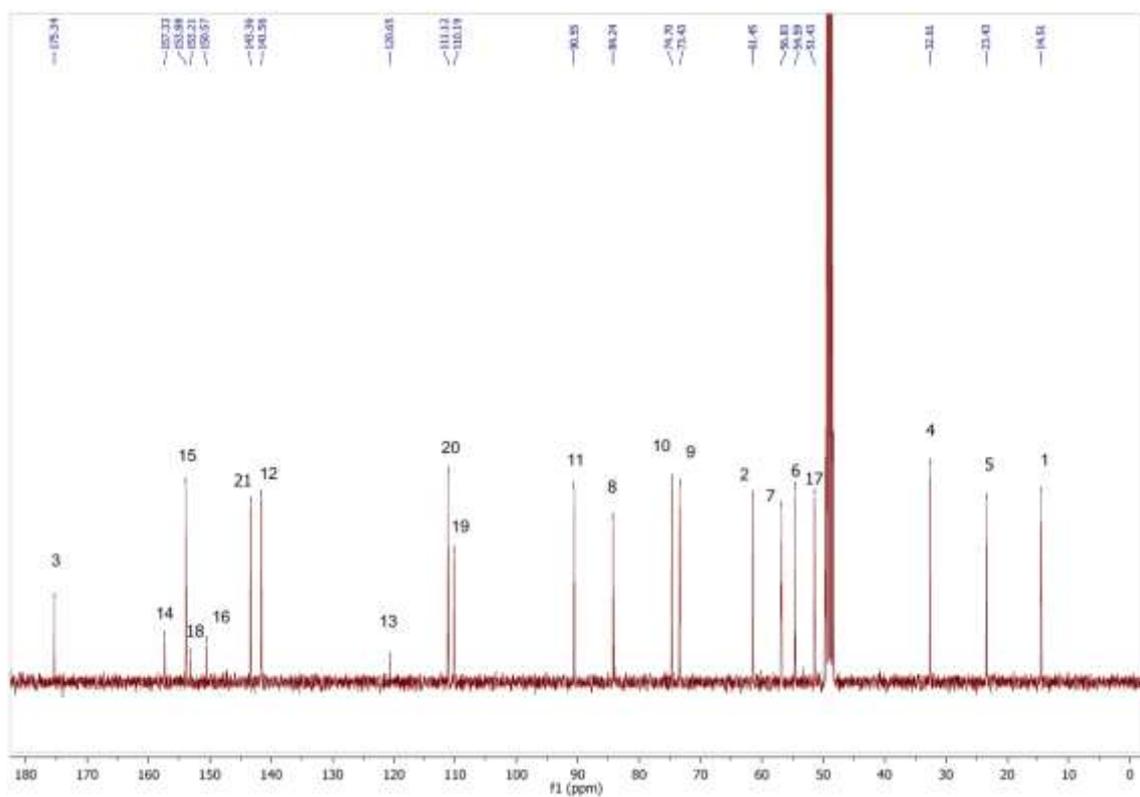
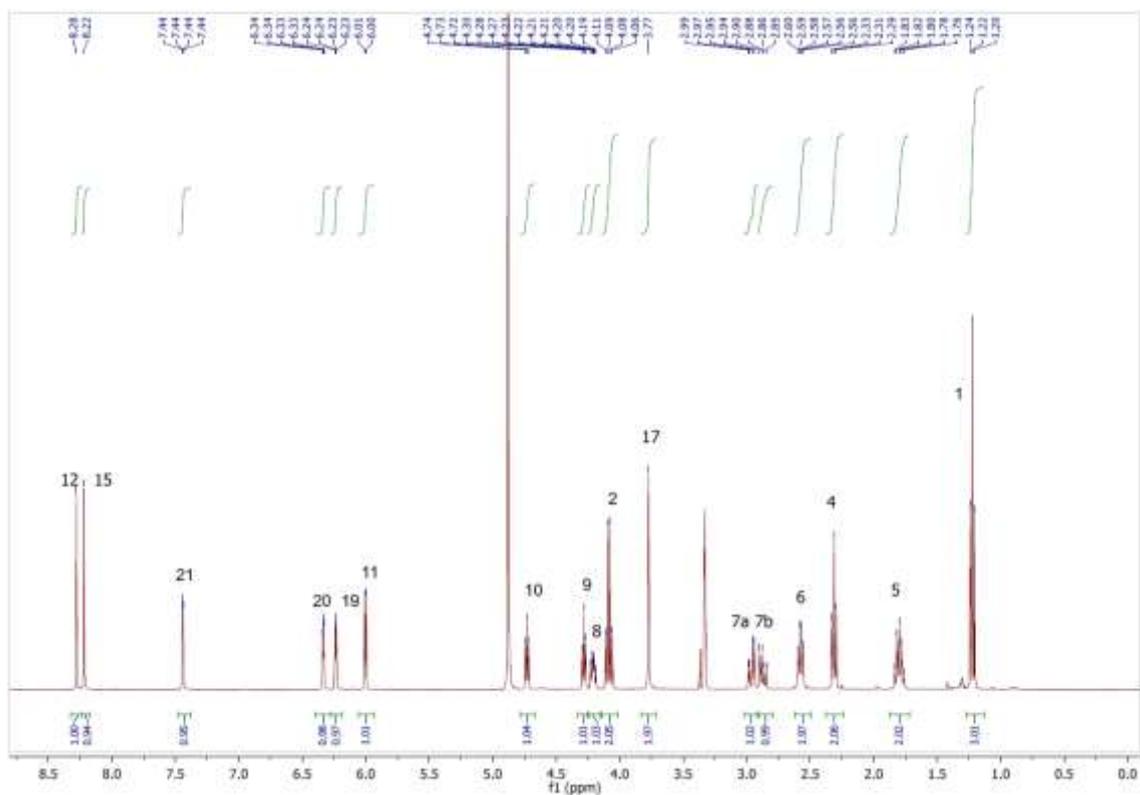
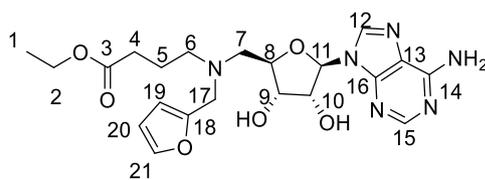
### HMBC-RMN



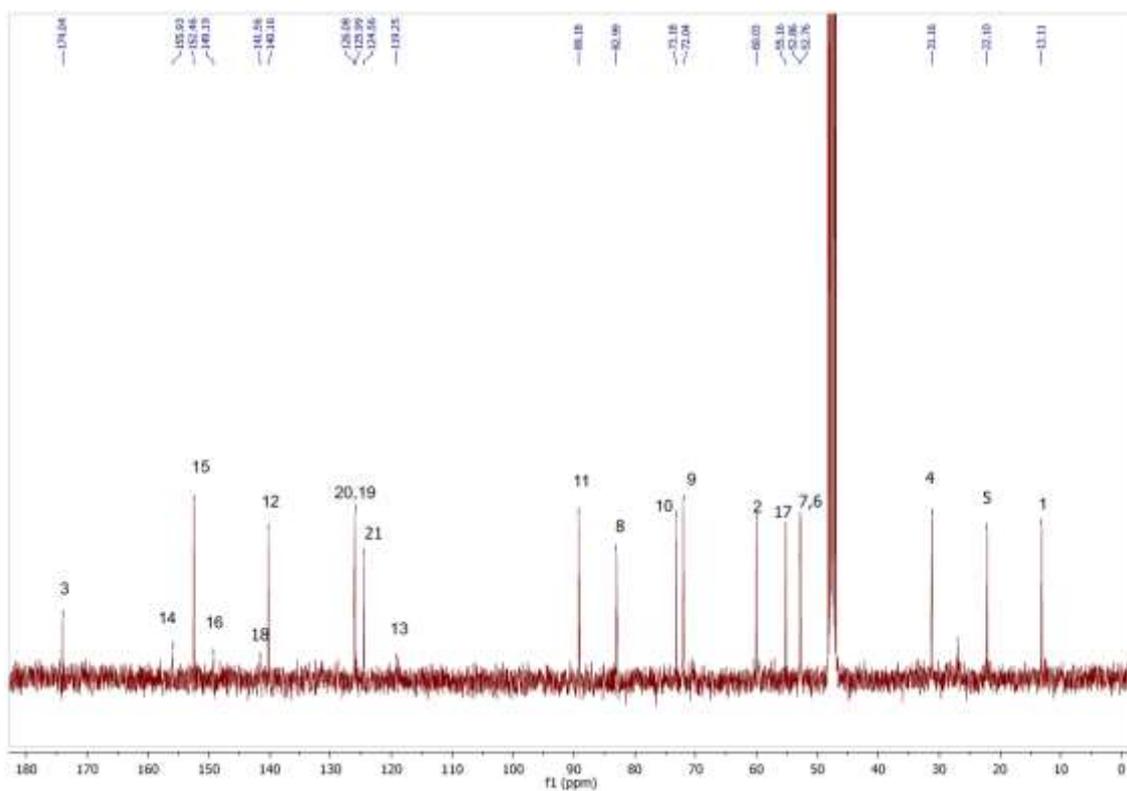
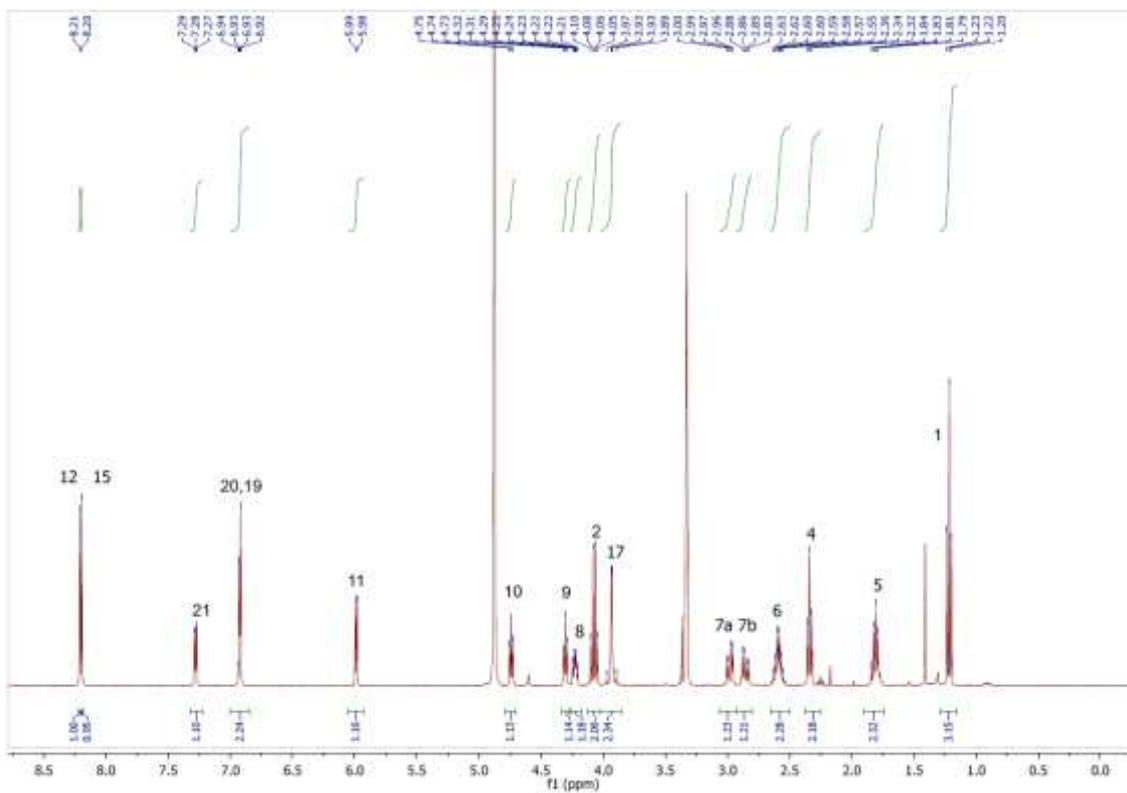
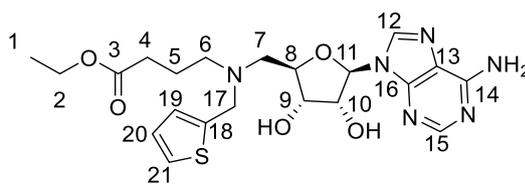
### <sup>19</sup>F-RMN



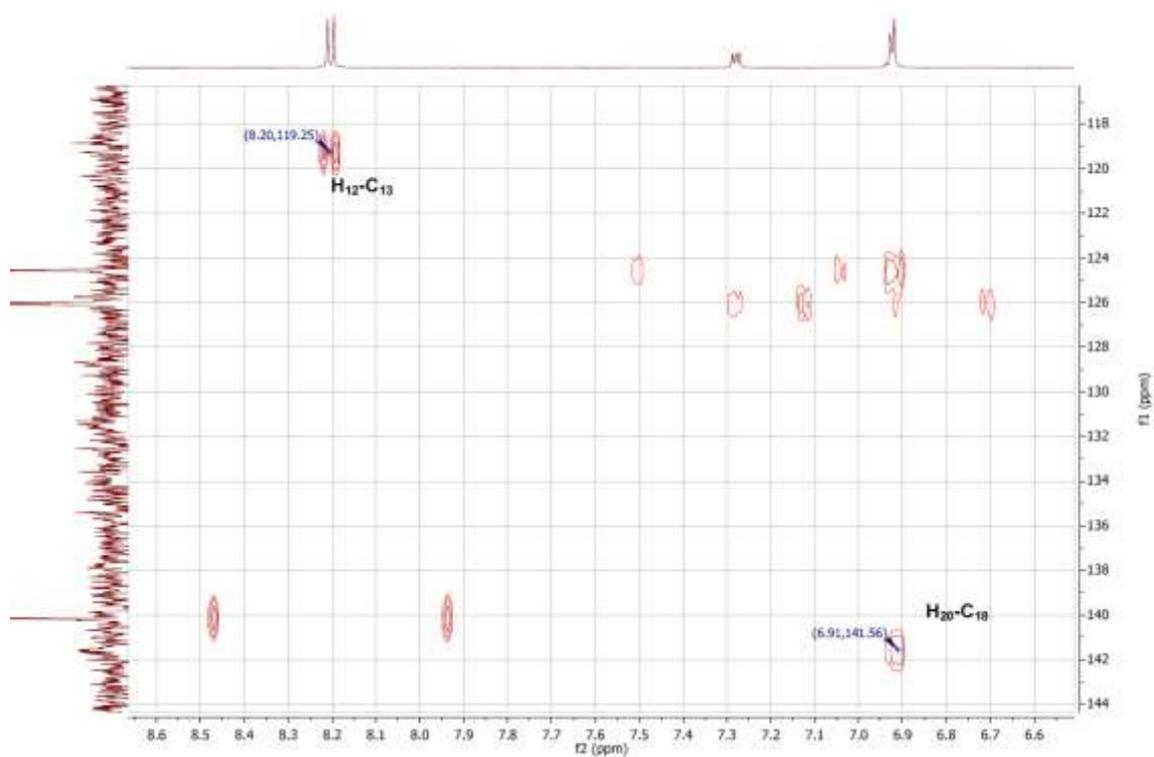


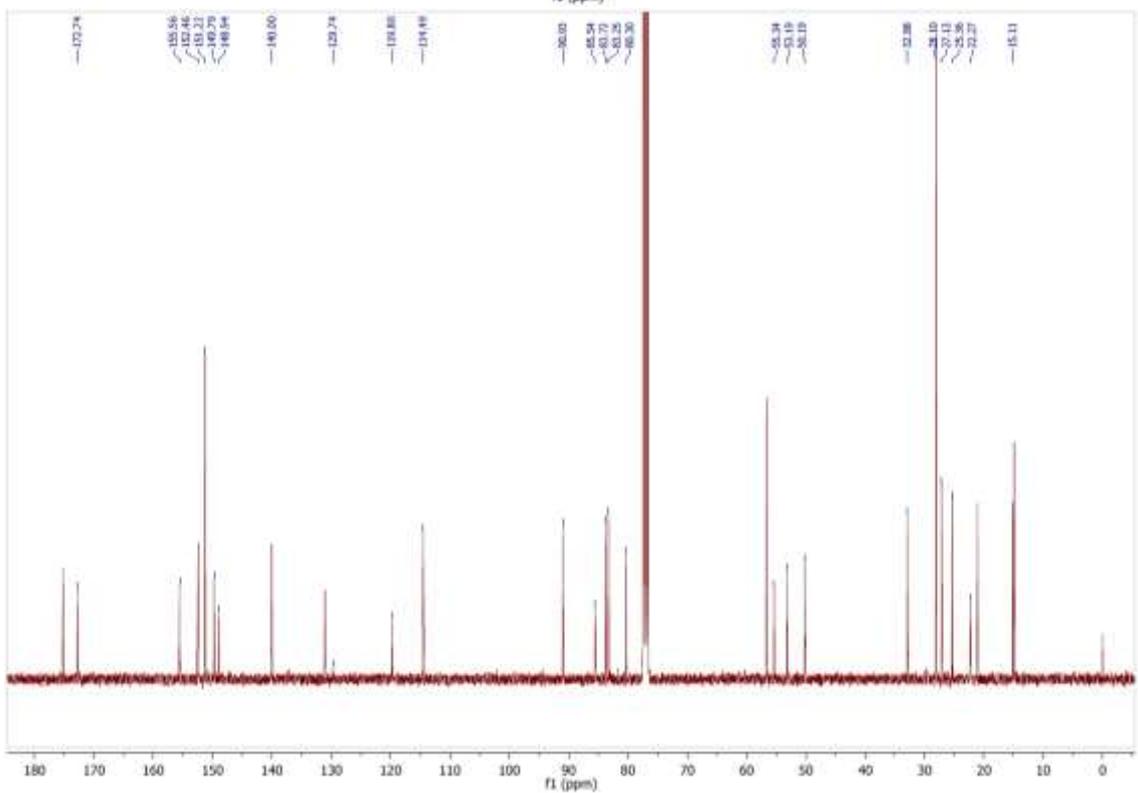
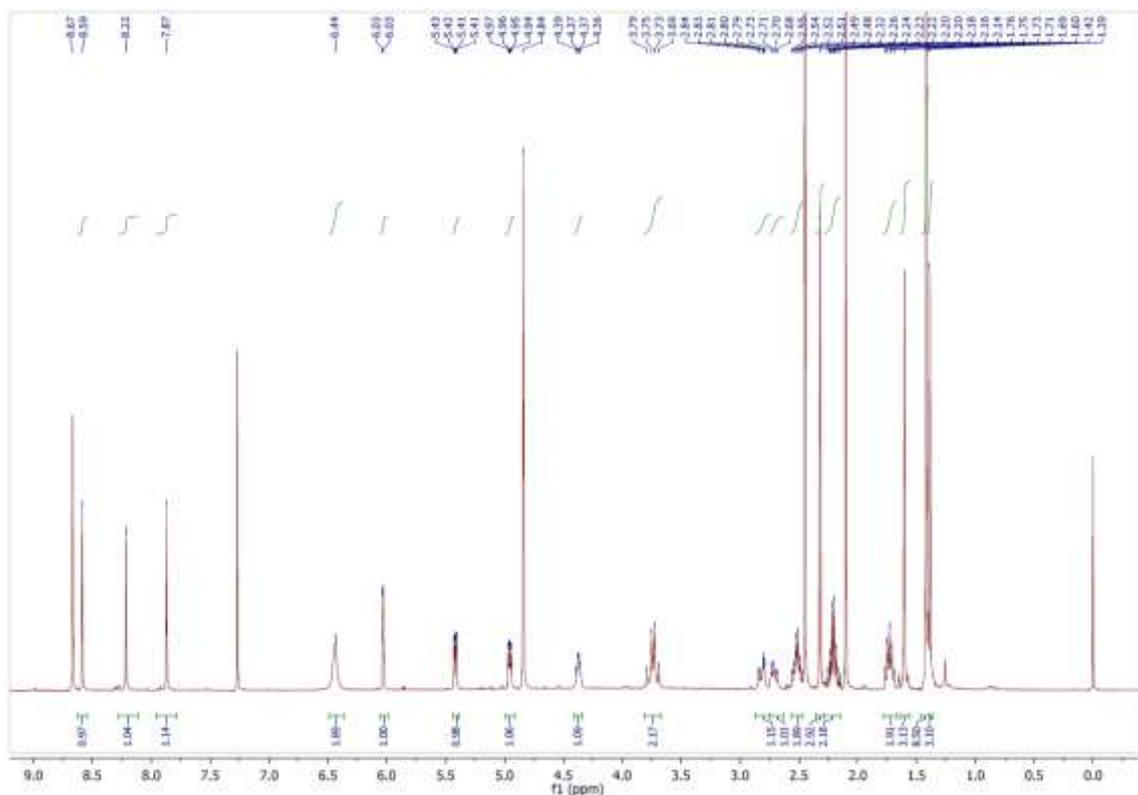
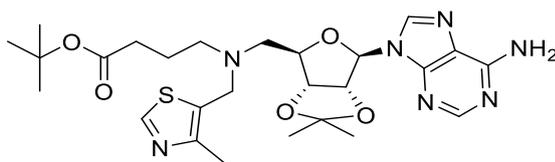


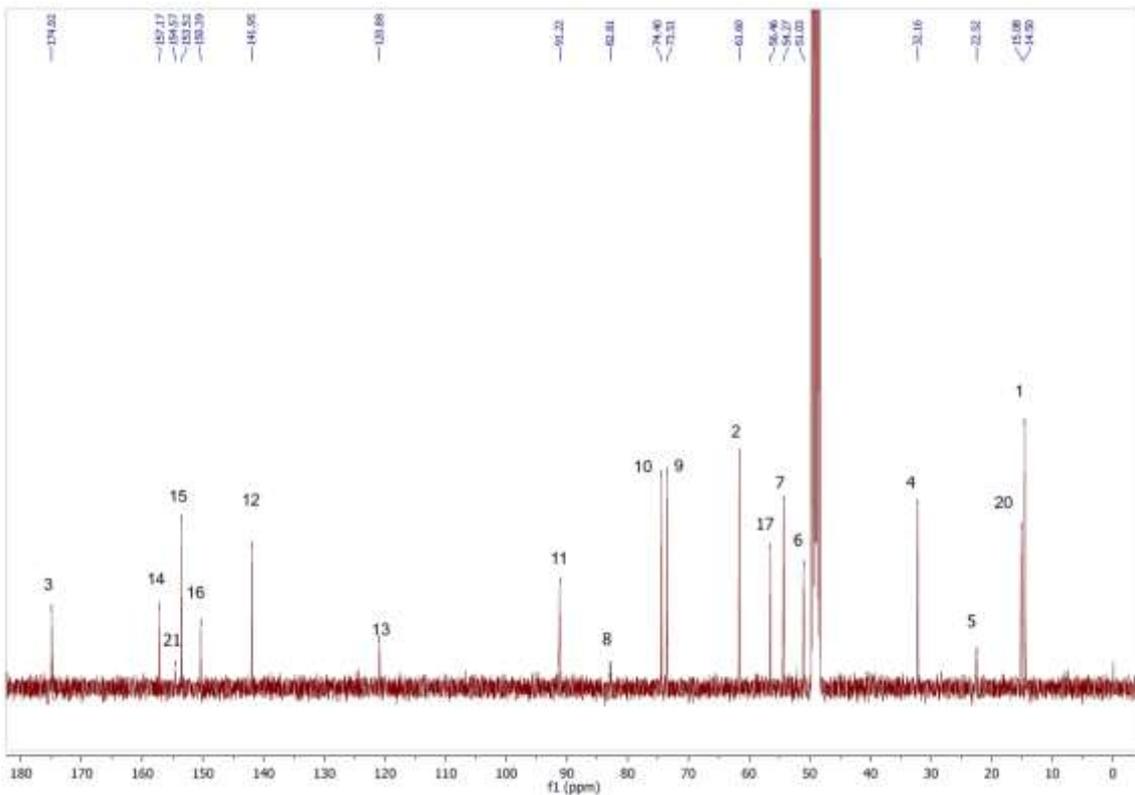
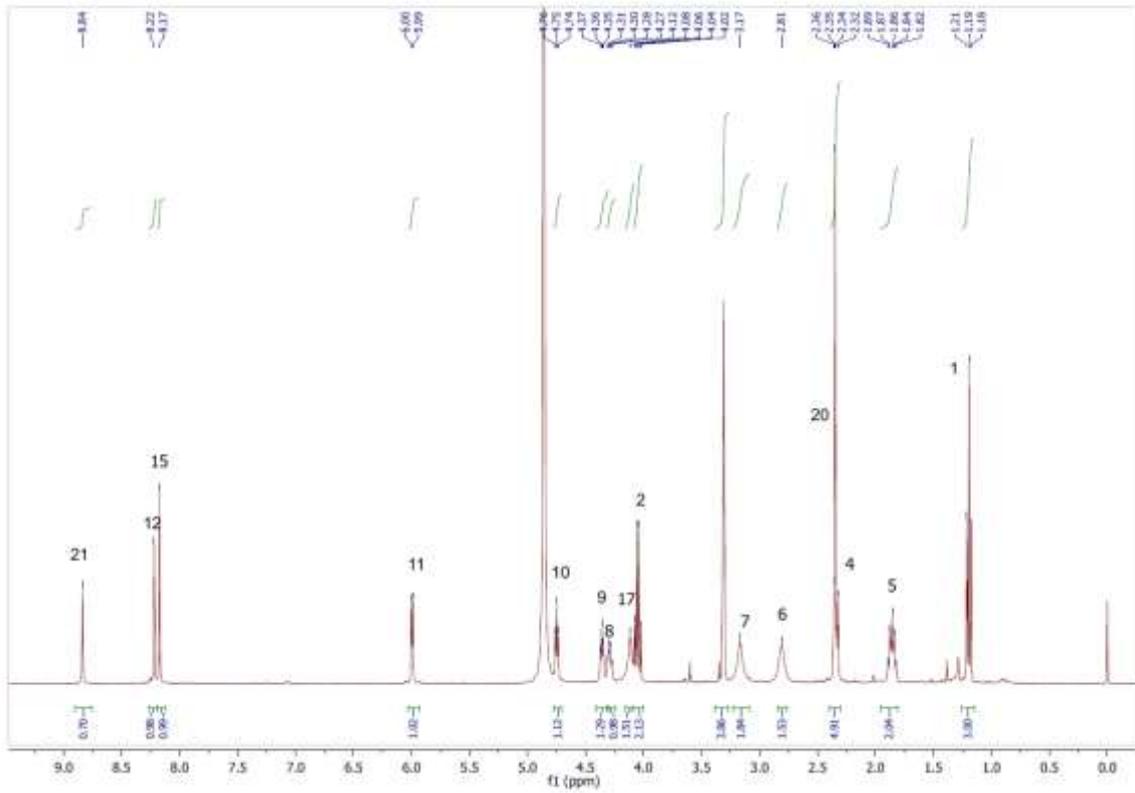
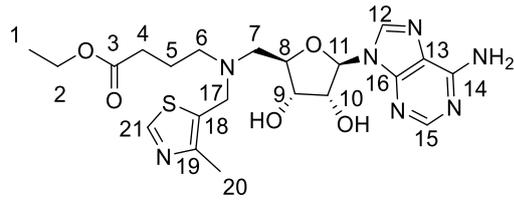


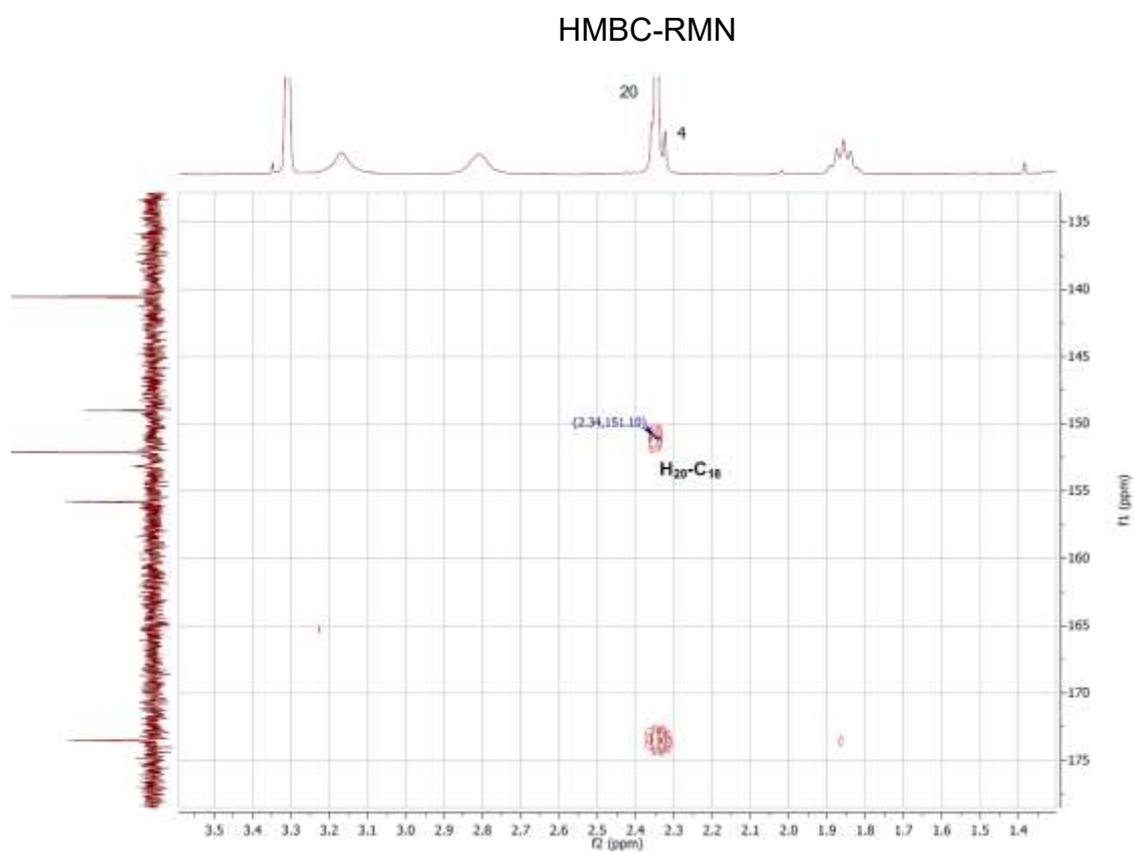
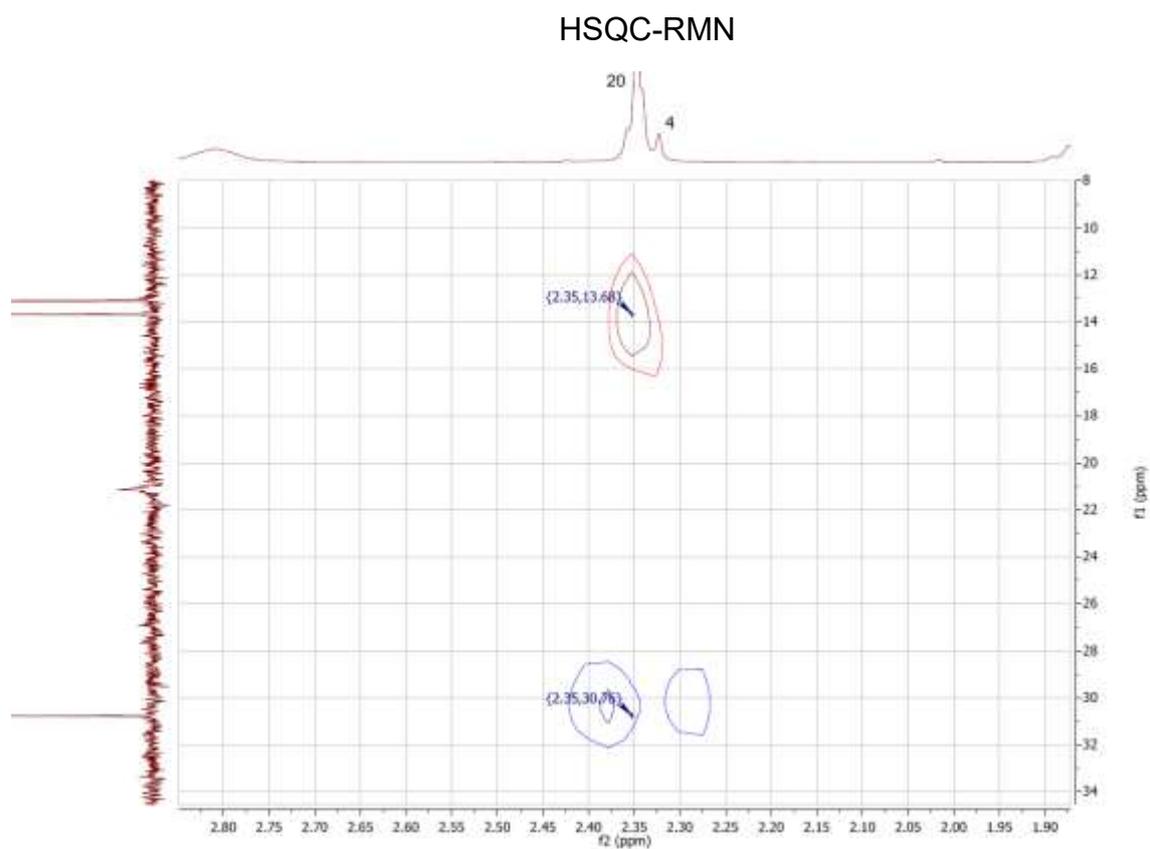


### HSQC-RMN











## **Capítulo 5:**

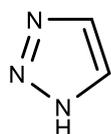
# **Síntesis de los compuestos de la Serie C**



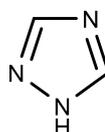
### Antecedentes:

El grupo triazol, también conocido como pirrodiazol, es un compuesto heterocíclico de cinco miembros, con tres átomos de nitrógeno en su estructura. Los derivados de triazol presentan una amplia gama de actividades farmacológicas como antivirales, anticancerígenas, entre otras.<sup>1</sup>

Este grupo presenta 2 isómeros: el 1,2,3-Triazol y el 1,2,4-triazol (Figura 5.1). Si bien ambos isómeros se han utilizado en la síntesis de fármacos,<sup>2</sup> nos enfocaremos en el primero debido a su accesibilidad sintética.



1,2,3-Triazol



1,2,4-Triazol

Figura 5.1: Isómero 1,2,3-Triazol y 1,2,4-Triazol.

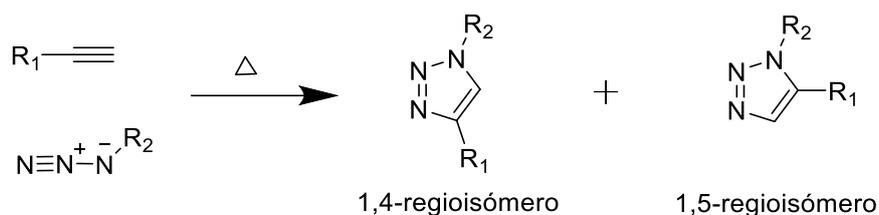
El 1,2,3-Triazol presenta ciertas características estructurales como la rigidez y la capacidad para actuar como donador y aceptor de enlaces de hidrógeno lo que explica su amplio uso como bioisómero de varios grupos funcionales.<sup>3</sup>

Las primeras síntesis de derivados de 1,2,3-Triazol fueron llevadas a cabo mediante la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen produciendo una mezcla de 1,4- y 1,5- triazol disustituído (Esquema 5.1). Debido a que se deben utilizar altas temperaturas se obtienen los dos regioisómeros (al usar alquinos asimétricos) y bajos rendimientos, lo cual ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias sintéticas para mejorar la regioselectividad y rendimiento de la reacción.

1 Kharb, R.; Sharma, P. C.; Yar, M. S. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (1), 1–21.

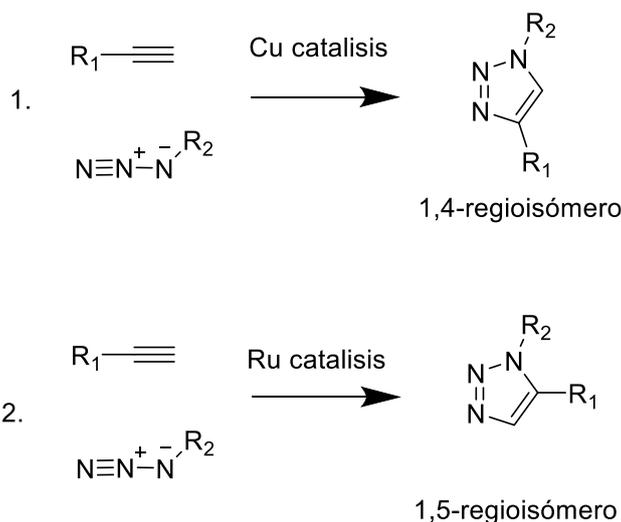
2 Dai, J.; Tian, S.; Yang, X.; Liu, Z. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 891484.

3 Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572–1581.



Esquema 5.1: cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen.

En 2001 Sharpless et al.,<sup>4</sup> introdujeron el concepto de “click chemistry” utilizando cobre como catalizador para la obtención de 1,2,3-triazoles, 1,4-disustituídos a temperatura ambiente en un medio acuoso. Análogamente se reportó la catálisis con rutenio para producir únicamente el 1,2,3-triazol, 1,5-disustituído.<sup>5</sup> (Esquema 5.2)



Esquema 5.2: 1. Cicloadición catalizada por cobre. 2. Cicloadición catalizada por rutenio.

La cicloadición, entre un grupo azida y un alquino para la formación del heterociclo triazol, que utiliza cobre como catalizador recibe el nombre de CuAAC (Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition). Entre los tipos de catalizadores de cobre que se han utilizado en este tipo de reacciones se ha reportado el uso de la sal CuI, donde el cobre ya presenta el estado de oxidación necesario para

4 Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.

5 Shen, Q.; Han, E.; Huang, Y.; Chen, Q.-Y.; Guo, Y. *Synthesis* **2015**, 47 (24), 3936–3946.

la catálisis (estado de oxidación  $\text{Cu}^{+1}$ ). Además, se ha empleado sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) con ascorbato de sodio como agente reductor, para reducir el cobre a  $\text{Cu}^{+1}$  y así formar el catalizador in-situ.<sup>6</sup>

---

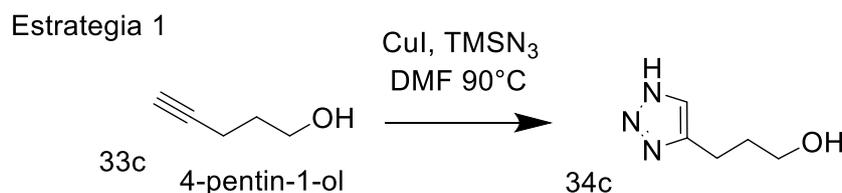
<sup>6</sup> Vala, D. P.; Vala, R. M.; Patel, H. M. *ACS Omega* **2022**, 7 (42), 36945–36987.

## 5.1. Optimización de la ruta sintética para la obtención de la serie C:

### 5.1.1. Estrategias sintéticas para la obtención de derivados del triazol

De los compuestos propuestos en el capítulo 2 describiremos en este capítulo, la síntesis de derivados del heterociclo triazol. La ruta sintética propuesta para la obtención del compuesto de interés se comenzó en la mencionada pasantía en la Universidad de Mainz. Se optó por seguir la misma estrategia utilizada en los capítulos anteriores, introduciendo el triazol de interés a partir de una aminación reductiva con la amina de la adenosina (compuesto **3**) ya sintetizada.

Para esto, se comenzó con la síntesis del triazol de interés a partir del 4-pentin-1-ol:



Esquema 5.3: Síntesis del triazol: Estrategia 1

Utilizamos la estrategia 1 para la síntesis del compuesto 34c de interés (ver esquema 5.3), ensayando varias condiciones de reacción presentadas en la tabla 5.1.<sup>7,8</sup> En los mencionados ensayos, el compuesto de interés aislado no se obtuvo con un rendimiento adecuado para continuar con la ruta sintética.

7 Rajender Reddy, K.; Venkateshwar, M.; Uma Maheswari, C.; Santhosh Kumar, P. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (16), 2170–2173.

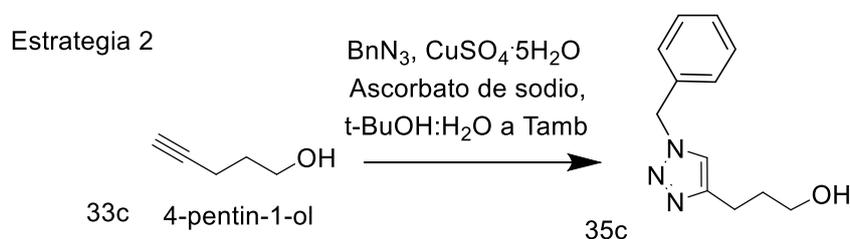
8 Jafarzadeh, M. T *Synlett* **2007**, 2007 (13), 2144–2145.

Condiciones	Resultados	Observaciones
TMSN <sub>3</sub> (1,5 eq), CuI(0,05 eq), DMF:MeOH, 90°C, 12hs	ND	-
TMSN <sub>3</sub> (1,5 eq), CuI(0,05 eq), DMF, 95°C, 24 hs	Muy bajo rendimiento	Se observó un pico a 8 ppm por <sup>1</sup> H-RMN.

Tabla 5.1: condiciones ensayadas en la estrategia 1 para la síntesis del triazol.

Se llevó a cabo la primera aproximación a la síntesis del triazol de interés utilizando las primeras condiciones descritas en la tabla 5.1. Esta reacción se siguió por TLC, donde no se observó formación de productos ni la desaparición de reactivos. Se volvió a realizar esta reacción con las segundas condiciones descritas en la tabla 5.1, donde un aumento en la temperatura y en el tiempo de reacción permitió el avance de la reacción. Por TLC se observaron varios productos formados, por lo que se decidió realizar un espectro de <sup>1</sup>H-RMN observando un pico en 8,0 ppm que es un desplazamiento característico para el protón del triazol. Sin embargo, se observaron muchos productos secundarios y señales de reactivo remanente.

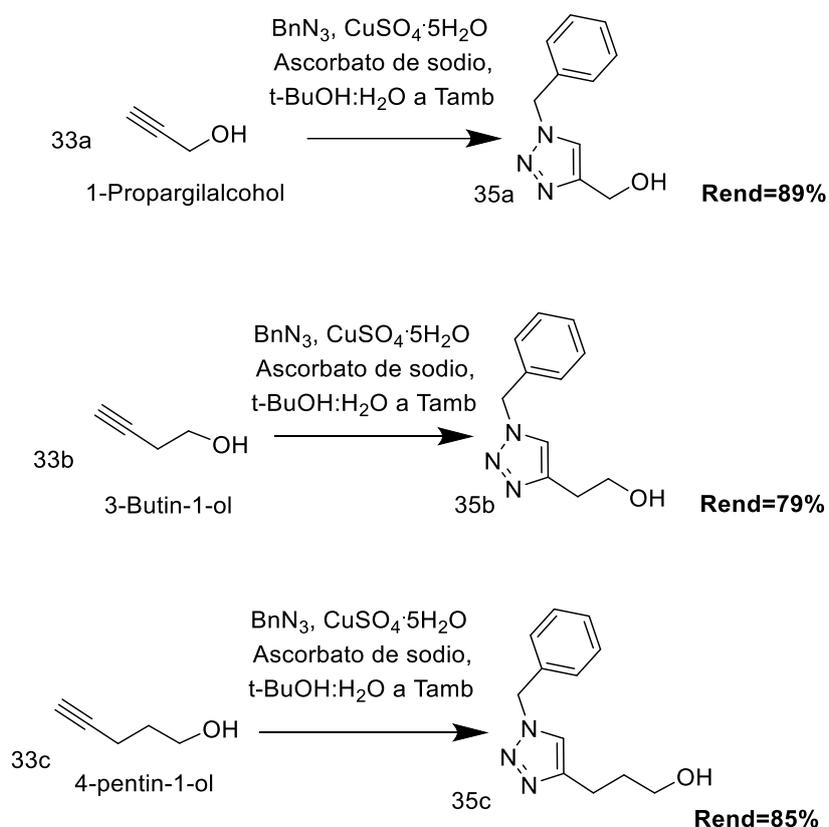
A partir de estos resultados, se decidió cambiar la estrategia sintética y utilizar azida de bencilo, ascorbato de sodio y sulfato de cobre en agua y tertbutanol<sup>9</sup> (estrategia 2, Esquema 5.4).



Esquema 5.4: Síntesis del triazol: Estrategia 2

9 Ghalavand, N.; Heravi, M. M.; Nabid, M. R.; Sedghi, R. *J. Alloys Compd.* **2019**, 799, 279–287.

Con estas nuevas condiciones se pudo obtener el triazol **35c** con 85% de rendimiento. A partir de estos resultados, se decidió sintetizar los compuestos **35a** y **35b** con el fin de evaluar la influencia del largo de cadena entre la adenosina y el grupo triazol. Los compuestos **35a** y **35b** se sintetizaron con buenos rendimientos partiendo de 1-Propargilalcohol (**33a**) y 3-Butin-1-ol (**33b**), respectivamente. En el esquema 5.5 se muestran las reacciones realizadas con sus respectivos rendimientos.

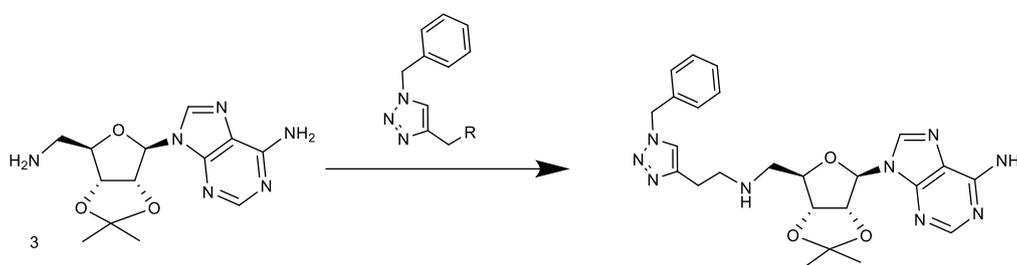


Esquema 5.5: Síntesis de triazol: obtención de los compuestos **35a-c**.

### 5.1.2. Estrategias sintéticas para el acople del heterociclo triazol al compuesto **3**.

Una vez obtenidos los triazoles de interés, se continuó con la optimización del acople entre los triazoles sintetizados y el compuesto **3** (previamente sintetizado en el capítulo 3). Para realizar estas optimizaciones se utilizó el compuesto **35b**.

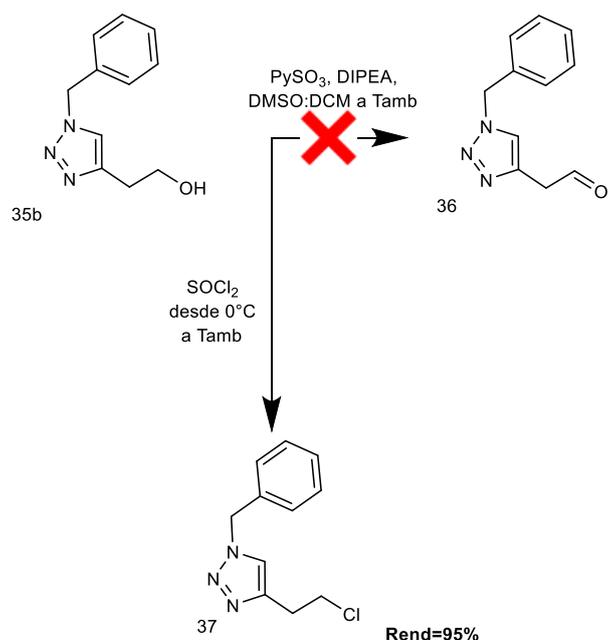
Se ensayaron varias estrategias para la formación del enlace C-N entre el triazol y la amina de la adenosina **3** (Esquema 5.6):



Esquema 5.6: Estrategias para el acople entre el bloque 1 (compuesto **3**) y el bloque 2.

La primera estrategia seguida fue la síntesis del aldehído **36**, con el fin de realizar una aminación reductiva entre éste y el compuesto **3** (Esquema 5.7). Para esto se utilizó  $\text{PySO}_3$  (6 eq), DIPEA (10 eq) en DCM:DMSO (4:1) a temperatura ambiente (Oxidación de Parikh-Doering<sup>10</sup>) para obtener el compuesto **36**. Esta reacción fue seguida por TLC, donde se observó la formación de un producto con un  $R_f$  mayor al del reactivo sumado a la desaparición del reactivo en el medio de reacción. Sin embargo, no fue posible aislar el compuesto de interés, aunque se ensayaron varias formas de terminar la reacción (Work-up).

10 Parikh, J. R.; Doering, W. V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (21), 5505–5507.

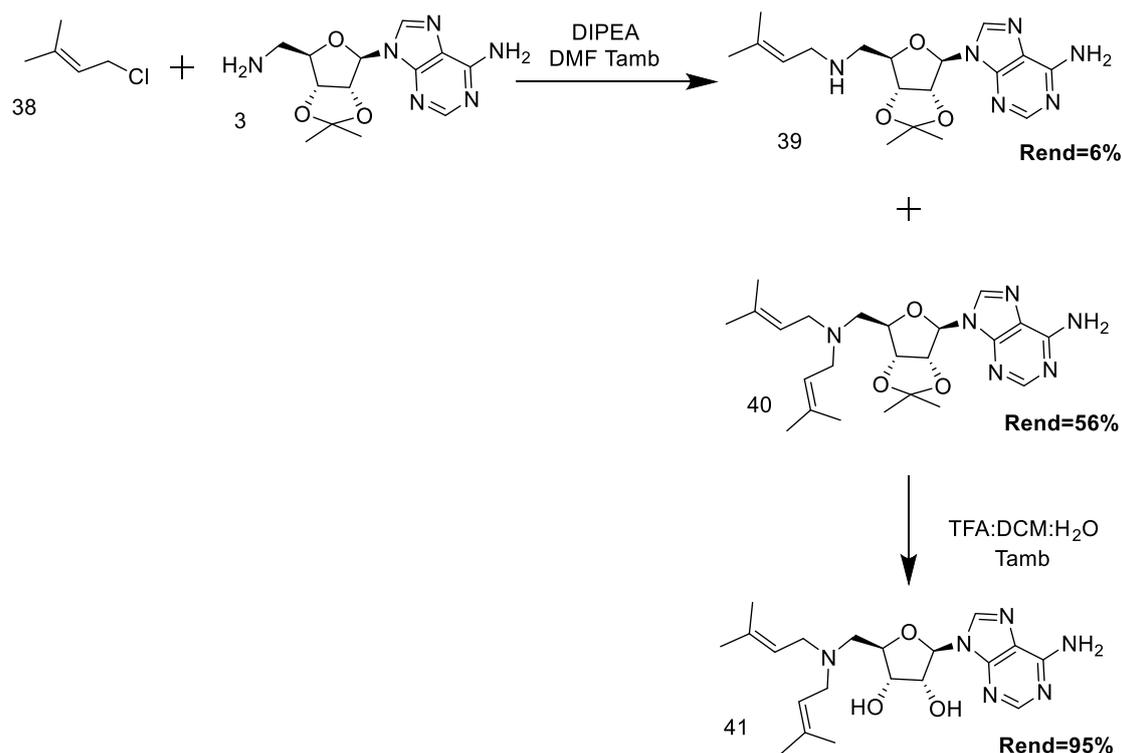


Esquema 5.7: Síntesis del compuesto **36** y **37** a partir del compuesto **35b**.

Ya que no fue posible aislar el compuesto de interés, se continuó con una segunda estrategia, donde el grupo alcohol se reemplazó por un átomo de Cl, dando lugar al compuesto **37** con un rendimiento del 95%. (Esquema 5.7)

Propusimos realizar una reacción de sustitución entre el compuesto **37** y el compuesto **3**. Se utilizaron varias estrategias para la obtención del compuesto deseado a partir del compuesto **37**. En todas las estrategias se llevó a cabo una reacción de sustitución ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ):

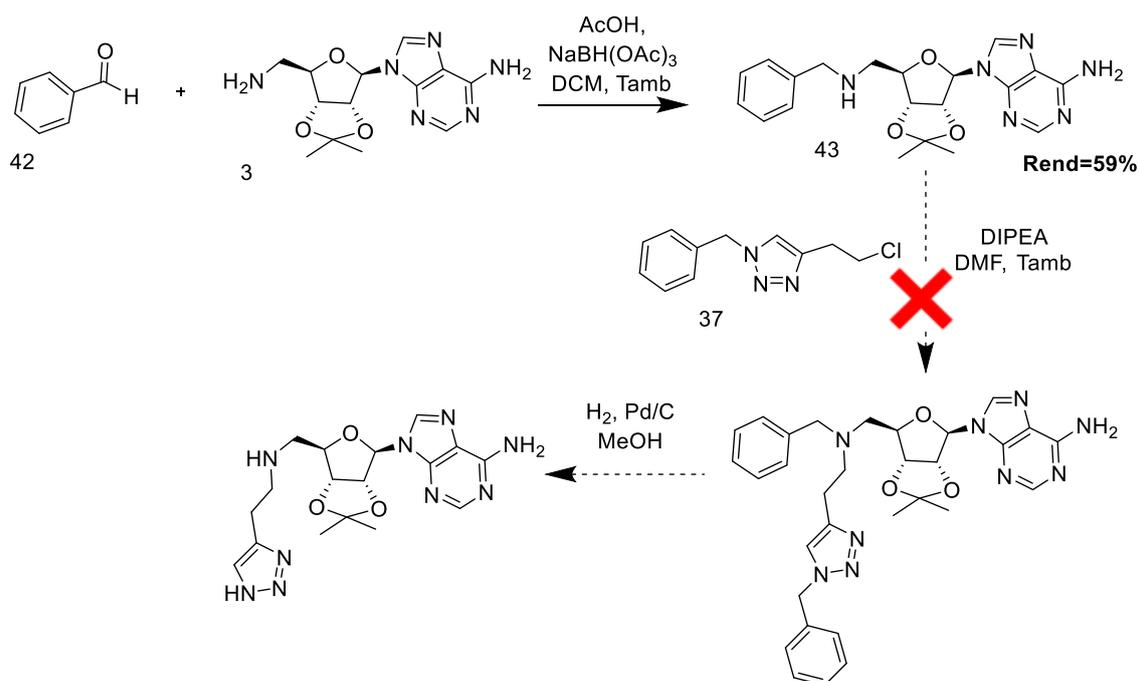
- I) Para la primera estrategia se eligió el **cloro-3-metil-2-buteno (38)** para optimizar la reacción de sustitución. La reacción se llevó a cabo con 1 eq de **38** con el fin de determinar si es posible obtener un porcentaje del compuesto monosustituído. La sustitución resultó en un 56% del compuesto di-sustituído **39** y un 6% del compuesto monosustituído **40**. Aunque el compuesto di-sustituído no era el deseado se procedió a su desprotección para generar el compuesto final **41**, el cual será utilizado para ensayos de actividad biológica y fue incluido como parte de la serie A. (Esquema 5.8)



Esquema 5.8: Síntesis del compuesto **41**.

- II) Con el fin de lograr un mejor control de la reacción de sustitución y evitar la di-sustitución de la amina **3**, se probó la estrategia sintética publicada en la patente WO 2012/082436 A2.<sup>11</sup> En ésta, se realiza la sustitución de una amina secundaria con un sustituyente bencílico el cual es luego eliminado por hidrogenación. Surgió así la estrategia 2, donde se sintetizó el compuesto **43** a partir de una aminación reductiva entre el compuesto **3** y benzaldehído **42**. Posteriormente, se utilizó el compuesto **37** para realizar la alquilación de la amina **43** utilizando 3 equivalentes de este reactivo. (Esquema 5.9)

11 Chesworth R. (2012). Modulators of histone methyltransferase, and methods of use thereof (Patente No. WO 2012/082436 A2). Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.



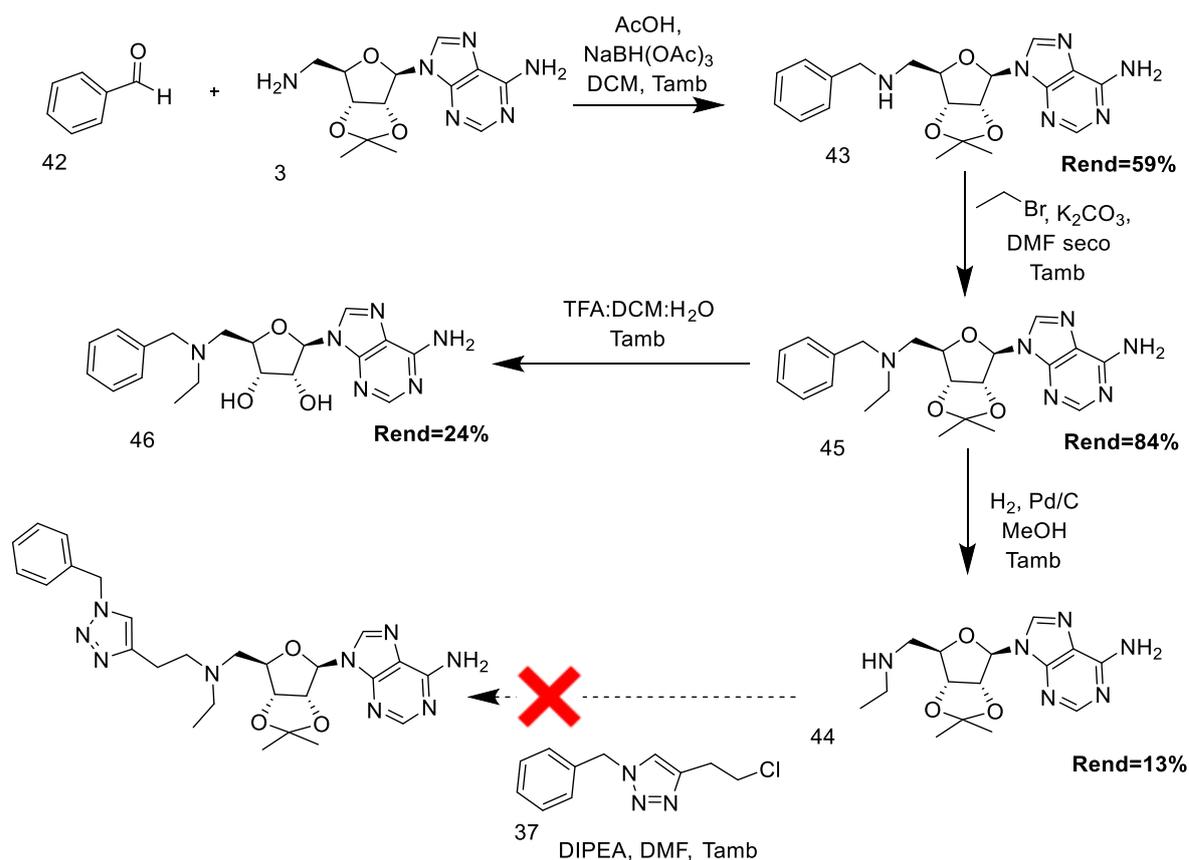
Esquema 5.9: Estrategia 2

El seguimiento de esta reacción se realizó por TLC, donde no se observaron cambios luego de 24 horas, recuperándose ambos reactivos **43** y **37**.

Este resultado fue inesperado ya que como vimos en la estrategia 1, la amina secundaria en la reacción de sustitución con **38** conduce al compuesto disustituido. Una posible explicación a que la sustitución no haya ocurrido es el impedimento estérico que puede generar el grupo bencilo que forma la amina secundaria al querer introducir otro grupo voluminoso como el compuesto **37**.

- III) A partir de los resultados obtenidos, se continuó con la estrategia 3 (esquema 5.10), donde se decidió sintetizar la amina secundaria **44**. Con esto se esperaba disminuir la voluminosidad del sustituyente de la amina secundaria para continuar con la sustitución con el compuesto **37**. Para esto, se decidió realizar una aminación reductiva del compuesto **3** con acetaldehído en las condiciones de aminación reductiva ya optimizadas con anterioridad. El compuesto de interés **44**, se obtuvo con un rendimiento del 20%.




 Esquema 5.11: Estrategia 3: Síntesis del compuesto **46**

Buscando una explicación a estos resultados, se encontró en la bibliografía que la eliminación del grupo bencilo unido a aminas, puede presentar algunas complicaciones, no siendo favorable dicha eliminación en algunos casos con las condiciones tratadas de hidrogenación.<sup>12</sup>

Posteriormente, se decidió preparar el compuesto **46** a partir del compuesto **45**, realizando la hidrólisis del acetónido con las condiciones descritas en capítulos anteriores. Se decidió incluir este compuesto en la serie A. (Esquema 5.11).

Si bien utilizando estas estrategias no se obtuvieron los compuestos de interés, se sintetizaron los compuestos finales **41** y **46**, que fueron incluidos como parte de la serie A. (Figura 5.2)

<sup>12</sup> *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 1st ed.; Wuts, P. G. M., Ed.; Wiley, **2014**.

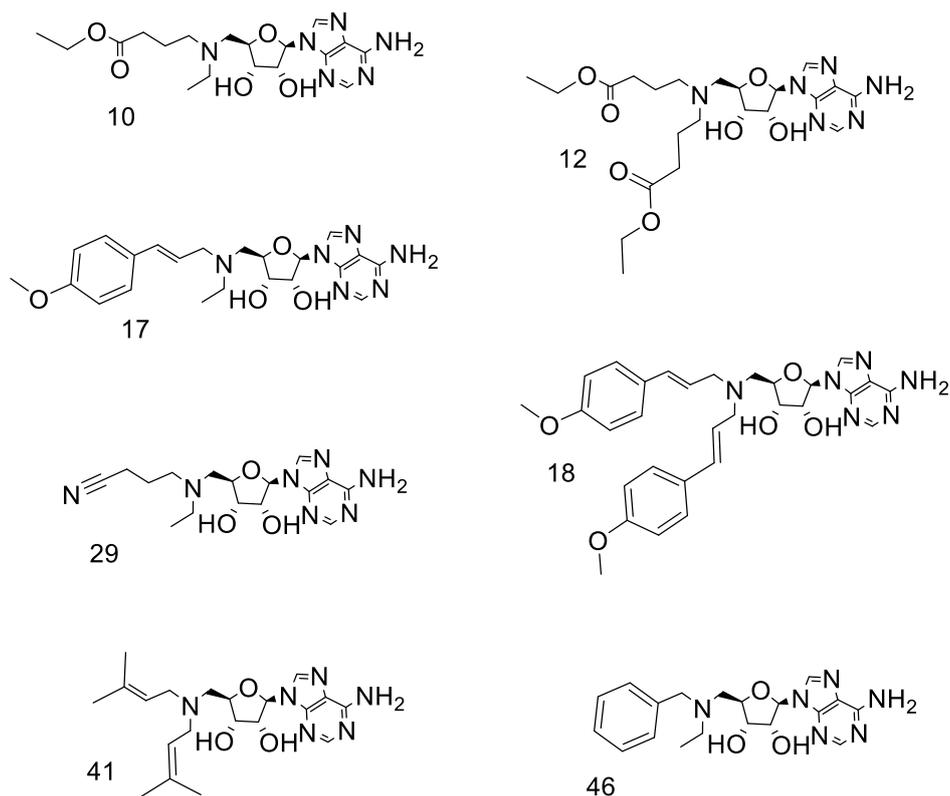
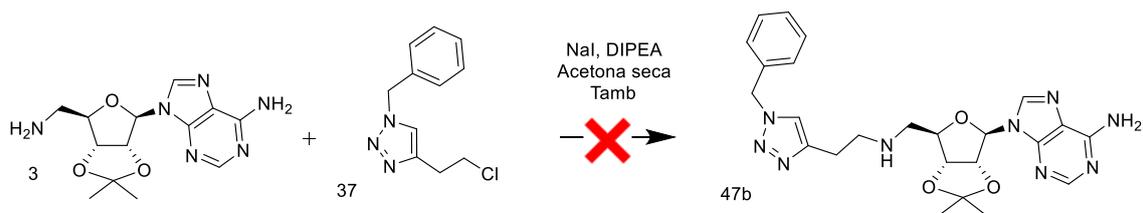


Figura 5.2: Compuestos de la Serie A completa.

- IV) A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, se realizó una nueva búsqueda bibliográfica con el fin de obtener condiciones de reacción para la introducción del compuesto **37** lo que nos llevó a plantear la estrategia 4. En la estrategia 4, se decidió realizar una reacción de sustitución directamente sobre el compuesto **3** a partir del compuesto **37** (Ver esquema 5.12). Las condiciones de reacción fueron similares a las anteriores, donde se utilizó DIPEA y se añadió el uso de NaI en acetona seca. La reacción trascurrió bajo atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 50°C.<sup>13</sup> De todas formas, utilizando estas condiciones, no fue posible obtener el compuesto deseado. (Esquema 5.12)

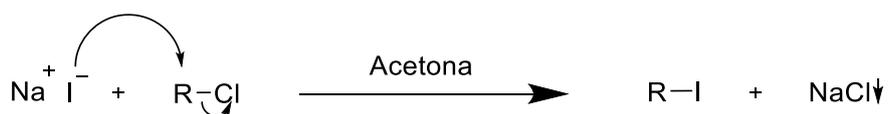
13 Schwickert, M.; Fischer, T. R.; Zimmermann, R. A.; Hoba, S. N.; Meidner, J. L.; Weber, M.; Weber, M.; Stark, M. M.; Koch, J.; Jung, N.; Kersten, C.; Windbergs, M.; Lyko, F.; Helm, M.; Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (14), 9750–9788.



Esquema 5.12: Reacciones de sustitución para la obtención del compuesto **47b**.

- V) En la reacción anterior se utilizó NaI, para lograr una sustitución in-situ del átomo de cloro del compuesto **37** por uno de iodo y luego llevar a cabo la sustitución con el compuesto **3**. A partir de esto, se decide cambiar el átomo de Cl por un átomo de I en **37** mejorando así el grupo saliente en la reacción de sustitución, dando lugar a la estrategia 5:

Se realizó primero la reacción de Finkelstein,<sup>14</sup> sobre el compuesto **37**, donde el átomo de cloro es sustituido por un átomo de iodo a partir de una reacción de sustitución S<sub>N</sub>2 (Esquema 5.13). A partir de esta reacción se logró la obtención del compuesto **48b**, con un rendimiento del 29%, utilizando las condiciones reportadas en Castedo et al.<sup>15</sup> (Esquema 5.15-i).



Esquema 5.13: Reacción de Finkelstein

A continuación, se decidió realizar una reacción de Appel modificada<sup>16,17</sup> sobre el compuesto **35b** para obtener el compuesto **48b**. La reacción de Appel es utilizada en la conversión de alcoholes en el cloruro de alquilo correspondiente,

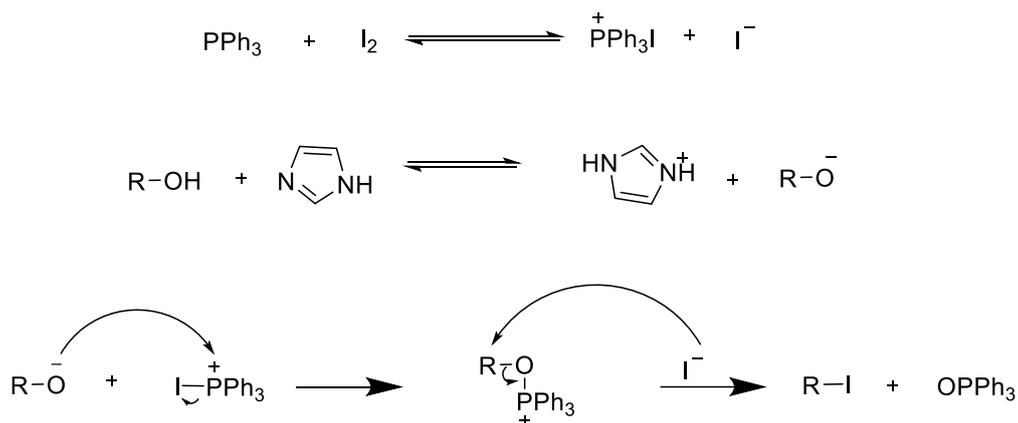
14 Bohlmann, R. Schering AG, "Comprehensive Organic Synthesis". Pergamon, **1991**, 203-223.

15 Castedo, L.; Borges, J. E.; Marcos, C. F.; Tojo, G. *Synth. Commun.* **1995**, 25 (11), 1717-1727

16 Igarashi, J.; Katsukawa, M.; Wang, Y.-G.; Acharya, H. P.; Kobayashi, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (19), 3783-3786.

17 Wells, J. A. L.; Orthaber, A. "Organophosphorus and Related Group 15 Polymers. In *Comprehensive Organometallic Chemistry IV*"; Elsevier, **2022**; pp 166-232.

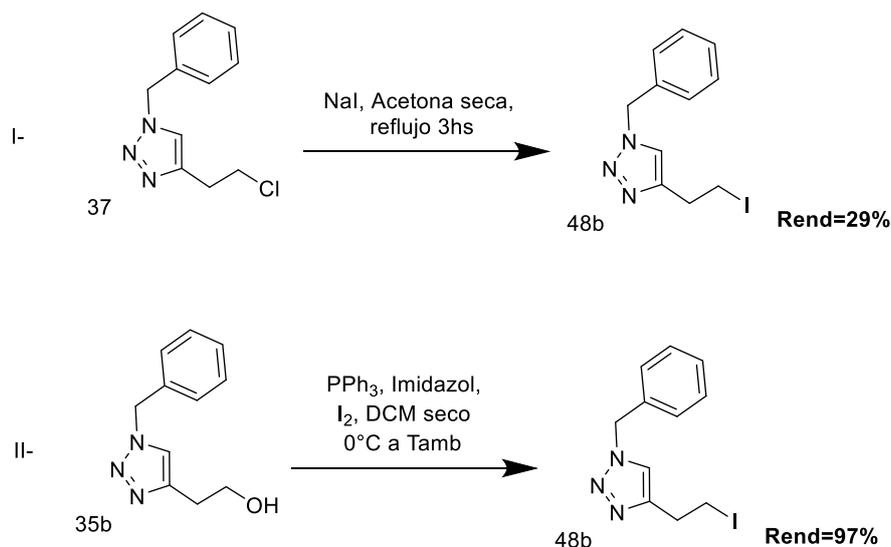
utilizando  $\text{PPh}_3$  y  $\text{CCl}_4$ . Una de las variantes reportadas es la utilización de  $\text{PPh}_3$ , Imidazol e  $\text{I}_2$  en la conversión del alcohol de interés en el ioduro de alquilo correspondiente (Esquema 5.14). El empleo de las condiciones reportadas por Zhao, F et al.<sup>18</sup> permitió obtener el compuesto **48b** con un mejor rendimiento con respecto a la reacción anterior y eliminando un paso de reacción. (Esquema 5.15-ii).



Esquema 5.14 Reacción modificada de Appel: mecanismo supuesto.

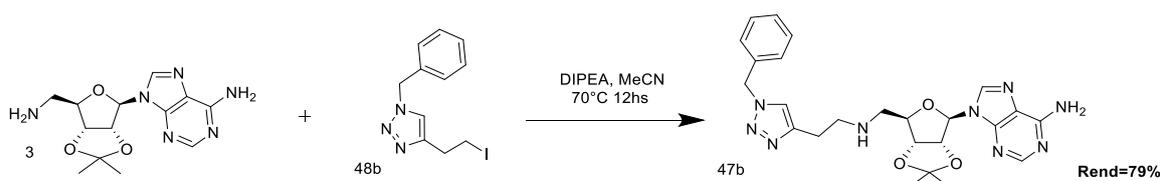
El aumento en el rendimiento de la formación del compuesto **48b** utilizando la reacción de Appel frente a la reacción de Finkelstein podría explicarse mediante el mecanismo de ambas reacciones. Si bien ambas reacciones transcurren mediante un mecanismo de sustitución  $\text{S}_{\text{N}}2$ , donde el yoduro ataca al carbono electrófilo de la molécula, la reacción de Appel presenta un mejor grupo saliente (óxido de trifenilfosfina  $\text{OPPh}_3$ ) que en el caso de la reacción Finkelstein ( $\text{Cl}^-$ ). (Esquemas 5.13 y 5.14).

18 Zhao, F.; Jiang, F.; Wang, X. *Sci. China Chem.* **2022**, 65 (11), 2231–2237.



Esquema 5.15: i- Reacción de Finkelstein para compuesto **37**, ii-Reacción de Appel para el compuesto **35b**

Una vez obtenido el compuesto **48b**, se continuó con la sustitución entre éste y el compuesto **3**. Esta reacción se llevó a cabo con las condiciones reportadas en la patente WO 2023/004438 A2,<sup>19</sup> por lo que se utilizó DIPEA como base y la reacción transcurrió en MeCN, bajo atmósfera de nitrógeno a una temperatura constante de 70°C durante toda una noche. Como resultado se obtuvo el compuesto **47b** con un rendimiento del 79%. (Esquema 5.16)



Esquema 5.16. Reacción de sustitución entre el compuesto **3** y el **48b**.

19 Mazitschekh, R. (2023). Fret-based assays. (Patente No. WO 2023/004438 A2). Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.

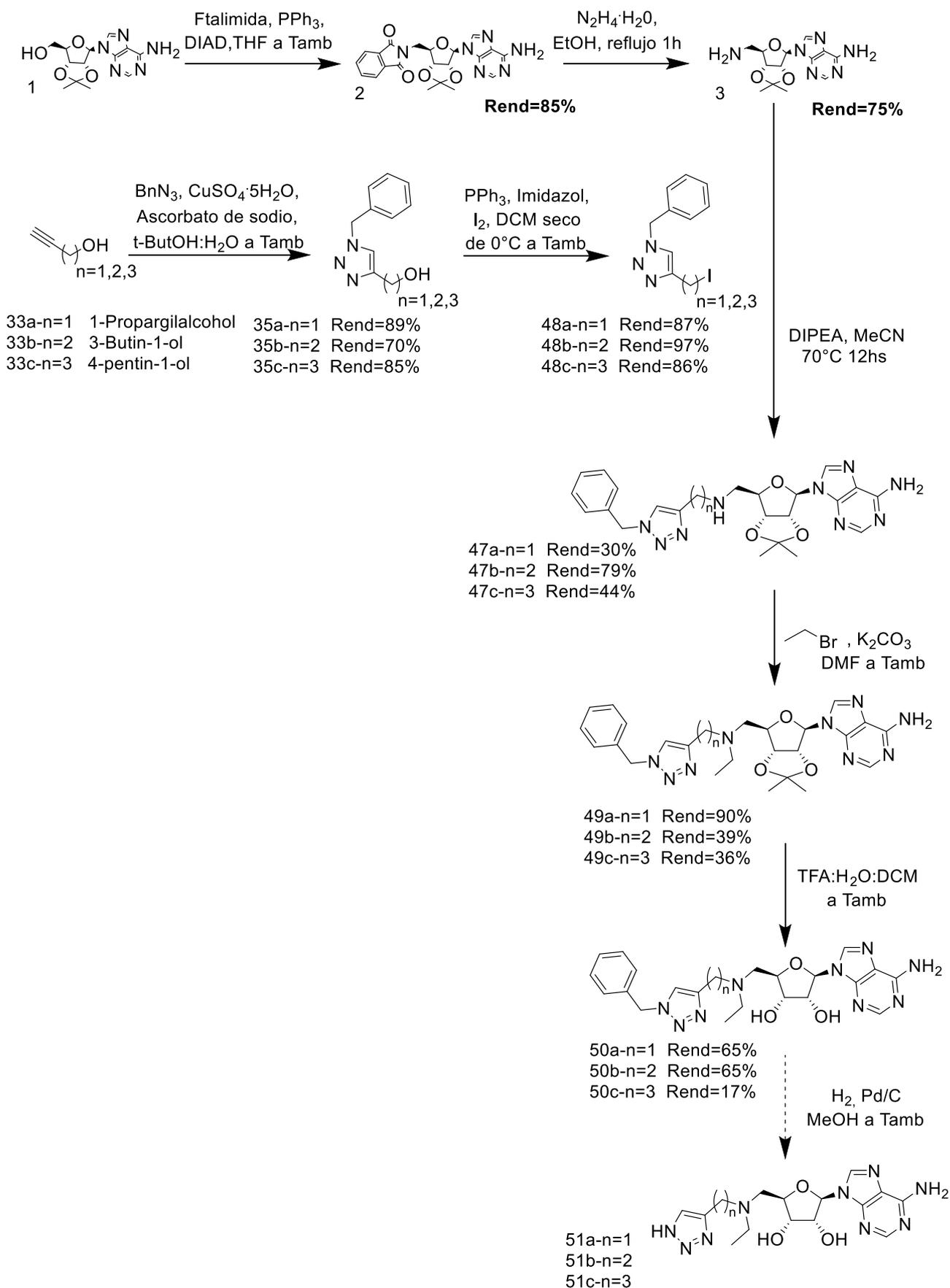
## 5.2. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie C.

Con las condiciones optimizadas anteriormente en la formación del triazol y el acople del mismo a partir de una reacción de sustitución con el compuesto **3**, se continuó con la síntesis de los compuestos de interés.

Se realizó la síntesis de los compuestos **47a** y **47c** con rendimientos aceptables, a partir de la sustitución entre el compuesto **3** y los compuestos **48a** y **48c**, respectivamente.

Una vez obtenidos estos compuestos, se continuó con la síntesis de los compuestos finales. Los compuestos **47 a-c** fueron etilados para formar la amina terciaria dando lugar a los compuestos **49a-c** con rendimientos de buenos a aceptables. Las condiciones empleadas fueron las optimizadas en el capítulo 3.

Como penúltimo paso de reacción, se sintetizaron los compuestos **50a-c** con las condiciones de hidrólisis del acetónido utilizadas con anterioridad. (Esquema 5.17).

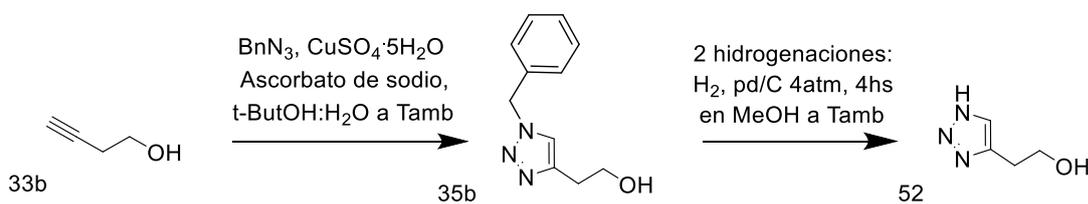


Esquema 5.17: Ruta sintética para la síntesis de la serie C

Con respecto a la síntesis de los compuestos **50 a-c**, podemos observar que el compuesto **50c** presentó bajos rendimientos al momento de realizar la desprotección del diol, obteniendo pocos mg de este compuesto. Se decidió no continuar la síntesis para la obtención del compuesto **51c** y ensayar el compuesto **50c**. Este rendimiento bajo puede deberse a problemas en la purificación por columna de este compuesto, por lo cual se podría realizar una purificación por HPLC-preparativo o la optimización de las condiciones de reacción para este compuesto en particular. Por otro lado, los compuestos **50a** y **50b** se obtuvieron con buenos rendimientos.

Para la obtención de los compuestos finales, se decidió realizar una reacción de hidrogenación. Como primera aproximación se decidió ensayar el compuesto **50b**. Con las condiciones ensayadas no ocurrió la eliminación del grupo bencilo para dar lugar al compuesto final **51b** (se realizaron 2 hidrogenaciones consecutivas 4atm, 24hs con catalizador Pd/C 10%).

La elección de esta aproximación para la eliminación del grupo bencilo fue realizada en base a que previamente habíamos ensayado la eliminación de este grupo bencilo en el compuesto **35b**. A modo de prueba se sometió el compuesto **35b** a dos hidrogenaciones a 4atm por 4hs cada una utilizando como catalizador Pd/C 10%, obteniendo el compuesto **52**. Esto nos permite suponer que la eliminación del grupo bencilo depende de la estructura del compuesto. (Esquema 5.18 y Figura 5.19)



Esquema 5.18: Eliminación del grupo bencilo para la obtención del compuesto **52**.

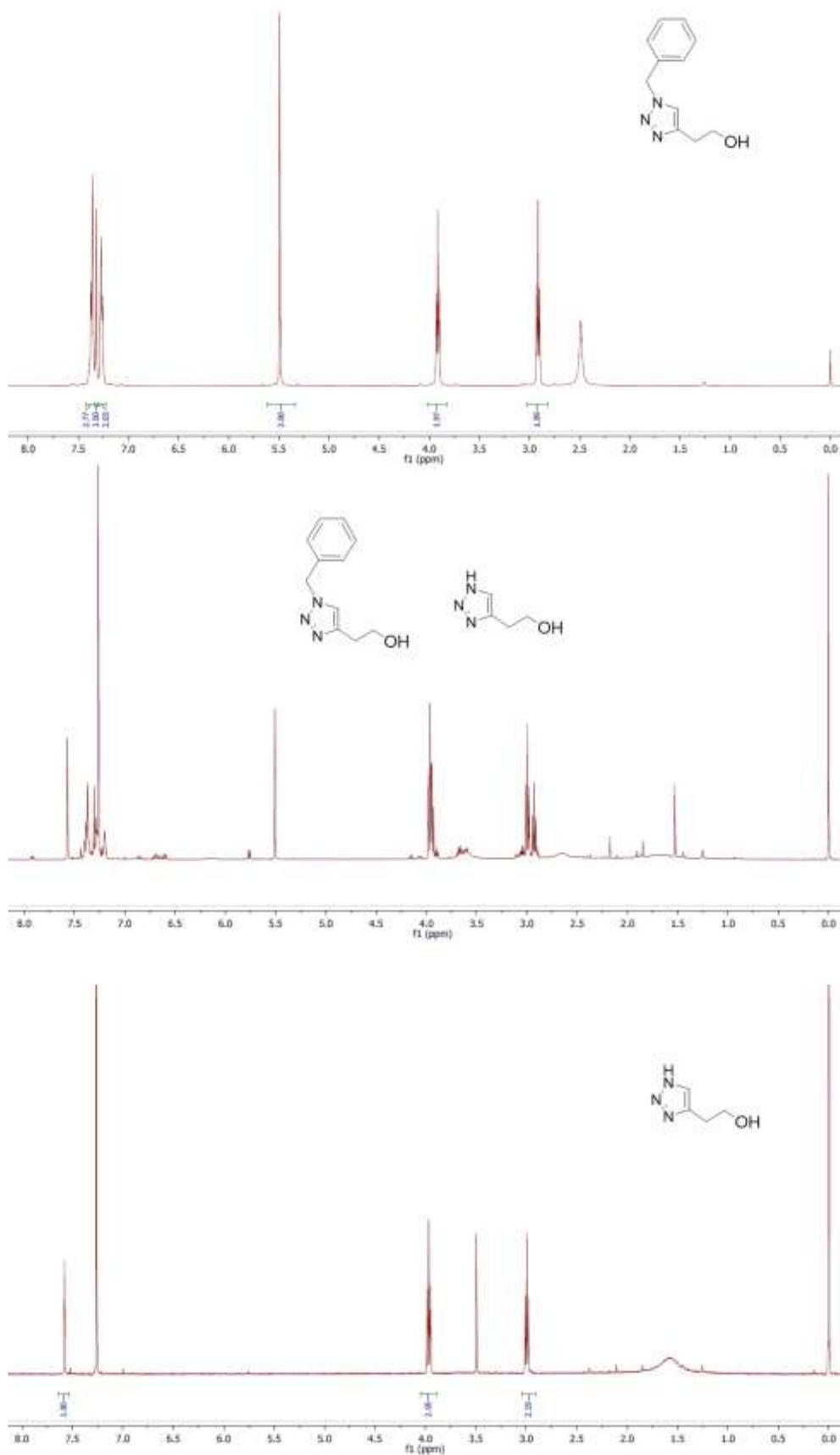
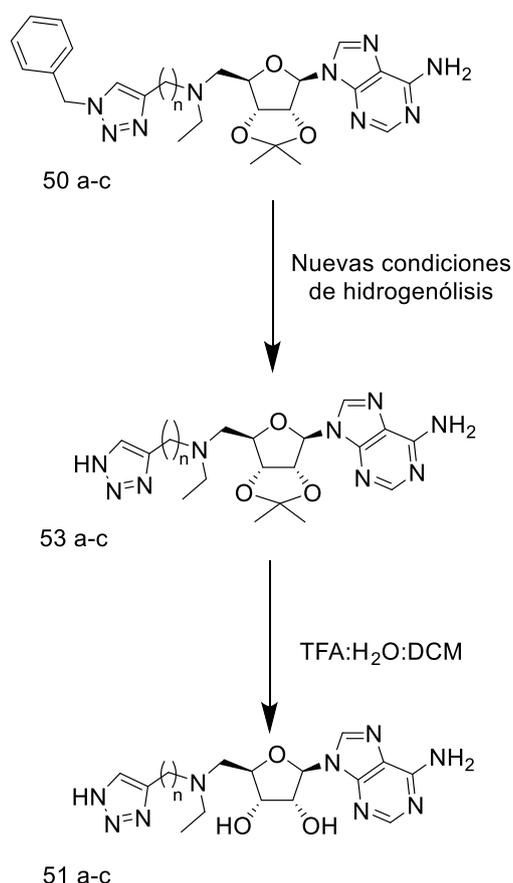


Figura 5.19: 1-  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto **35b**. 2-  $^1\text{H-NMR}$  después de la primera hidrogenación: Compuesto **35b** y **52**. 3-  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto **52**.

Como trabajo a futuro resta la optimización en la obtención del compuesto **49c** así como la modificación en la ruta sintética para la obtención de los compuestos **51a-c**.

En el esquema 5.19 se presenta una ruta alternativa a partir de los compuestos **50a-c** para la obtención de los compuestos **51a-c**, donde se realiza la eliminación del grupo bencilo antes de la desprotección del diol. Esto se planteó con el fin de utilizar otras condiciones de reacción en la hidrogenólisis pero utilizando un compuesto menos polar, el cual permite un seguimiento de reacción más sencillo por TLC. Luego, debería evaluarse si es posible obtener los compuestos **51a-c** a partir de los compuestos **53a-c**.



Esquema 5.19: Ruta sintética propuesta para la obtención de los compuestos **51a-c**

# Capítulo 5:



## Parte Experimental



Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando solventes recientemente destilados. Las reacciones en condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno empleando solventes secos según literatura.<sup>19</sup>

Todos los rendimientos informados se refieren a productos espectroscópicamente puros (determinado mediante <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN). Para los compuestos que presentan impurezas conocidas, el rendimiento de la reacción se calculó en base al espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Advance NEO-400. Los desplazamientos químicos reportados son referenciados al TMS utilizado como referencia interna.

Las purificaciones por cromatografía en columna fueron realizadas con Silica gel 60M 0.04-0.063 mm.

Los seguimientos de reacción y de separaciones cromatográficas se realizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> sobre plástico.

La pureza de los productos finales se determinó utilizando un equipo HPLC analítico Shimadzu LC-2050C equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5µm). Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>O-0.1% de Ácido Fórmico y CH<sub>3</sub>CN. Las muestras se disolvieron en MeOH calidad HPLC. Las corridas se efectuaron en 16min con el siguiente programa de gradiente de: 0-10 min (CH<sub>3</sub>CN 5% a 95%) de 10-13 min (CH<sub>3</sub>CN 95%) y de 13-16 min (CH<sub>3</sub>CN de 95% a 5%). Se reportaron los valores de pureza a 220 nm y 250 nm.

Los espectros de masas de alta resolución de estos compuestos se determinaron en el Instituto Pasteur de Montevideo en un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific, USA) por inyección directa (10 µL/min) usando 100% Metanol calidad HPLC como solvente y una fuente Ion Max API con una sonda HESI-II. Los espectros de masa fueron obtenidos en

---

19 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. ed., reprinted.; Pergamon Press: Oxford, 1993.

modo positivo con voltaje de espray de ion a 4.0 kV y una temperatura capilar de 250°C.

Por último, se determinó la desviación de luz polarizada en los compuestos finales utilizando un polarímetro Jasco P-2000 con lámpara de sodio a 589 nm. Se tomaron 3 medidas de 5 ciclos cada una y se reportó el promedio de estas. La temperatura varió de los 23.5°C a los 24.5°C a lo largo de las mediciones.

### **Metodologías generales:**

#### **A. Metodología general de aminación reductiva:**

A una suspensión de la amina **3** en THF o DCM se agregó 1 eq del aldehído de interés y AcOH (1eq). Transcurrida una hora (o 30min), se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.5 eq). Luego de 19hs se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con DCM. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida.

#### **B. Metodología general de etilación:**

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió el compuesto a etilar en DMF seco. Se agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (2 eq) con agitación y posteriormente bromuro de etilo (2 eq) gota a gota. Transcurridos al menos 3 días, se corroboró la formación del producto de interés por TLC. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt, se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida.

#### **C. Metodología general de hidrolisis del éster y/o del acetónido:**

El compuesto de interés se disolvió en DCM, se agregó H<sub>2</sub>O y TFA. Se dejó la reacción con agitación toda una noche y la reacción se lleva a sequedad a presión reducida con posteriores lavados con CHCl<sub>3</sub> y AcOEt para eliminar el TFA.

#### **E. Metodología general síntesis de triazol: Reacción Click**

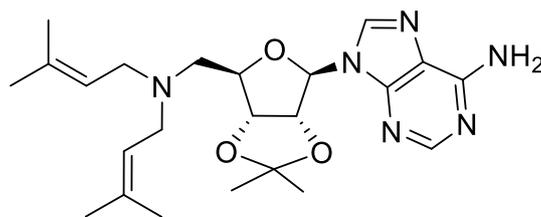
A una solución del alquino correspondiente y BnN<sub>3</sub> (1.1 eq) en tert-butanol:Agua (1:1) se agregó una solución de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.01 eq) y ascorbato de sodio (0.1 eq) en agua. Luego de 3 días se extrajo la reacción con DCM. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida.

#### **F. Metodología general iodación del alcohol del triazol:**

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió  $\text{PPh}_3$  (1.6 eq) e imidazol (1.5 eq) en DCM seco. Se agregó  $\text{I}_2$  (1.5 eq) a  $0^\circ\text{C}$ . Posteriormente se agregó el alcohol de interés disuelto en 5 mL de DCM. Se dejó con agitación toda una noche y se extrajo con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y DCM. Se juntaron las fases orgánicas, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida.

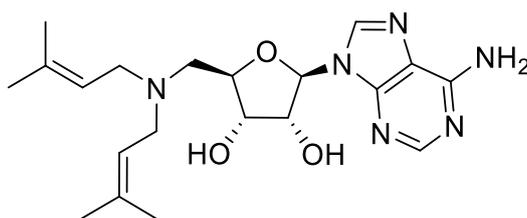
#### **G. Metodología general sustitución de (3) con el triazol- $(\text{CH}_2)_n\text{-I}$**

Bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió la amina (**3**) y el triazol- $(\text{CH}_2)_n\text{-I}$  de interés (3 eq) en MeCN seco. Se agregó DIPEA (5 eq) y se llevó a  $70^\circ\text{C}$  y se dejó con agitación toda una noche. Se eliminó el solvente a presión reducida y se realizaron lavados con ciclohexano.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-((bis(3-metilbut-2-en-1-il)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (40)**

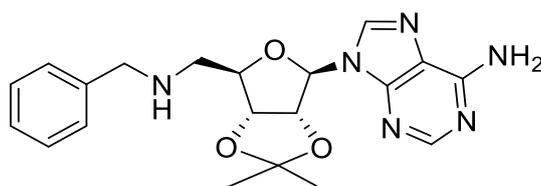
Se disolvió el compuesto **3** (200.0 mg, 0.65 mmol) en DMF, se agregó el **cloro-3-metil-2-buteno (38)** (0.07 mL, 0.65 mmol, 1 eq) y DIPEA (0.4 mL, 0.65 mmol, 1 eq). Se dejó con agitación toda una noche. Se agregaron 25 mL de agua y se extrajo con AcOEt (20 mL x 3). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el solvente. Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **21** como un aceite incoloro (161.6mg, 56%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 6.07 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.83 (s ancho, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.43 (dd, *J* = 6.4, 2.2 Hz, 1H), 5.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.96 (dd, *J* = 6.5, 3.4 Hz, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 1H), 3.28 – 2.97 (m, 4H), 2.76 – 2.60 (m, 2H), 1.67 (s, 6H), 1.61 (s, 3H), 1.56 (s, 6H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.23, 151.80, 148.09, 138.65, 119.74 (por HSQC-RMN), 119.03, 113.07, 89.58, 84.12, 82.73, 82.05, 53.98, 50.63, 25.90, 24.59, 24.17, 16.67.



**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-((bis(3-metilbut-2-en-1-il)amino)metil)tetrahidrofuran-3,4-diol (41)**

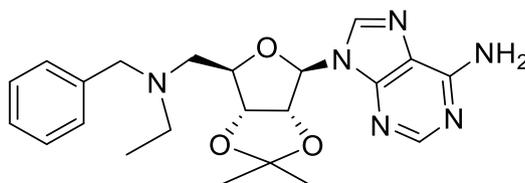
Se utilizaron las condiciones descriptas en **C. 40** (315.0 mg, 0.71 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (1.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH (50: 50)) obteniendo **41** como un aceite marrón (271.3 mg, 95%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **41** fue de 84% (220 nm) y de 99% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.768 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ

8.36 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 6.12 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 5.40 – 5.24 (m, 2H), 4.74 (dd,  $J = 5.3, 3.7$  Hz, 1H), 4.51 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 4.49 – 4.40 (m, 1H), 3.83 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H), 3.67 (dd,  $J = 13.8, 9.8$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J = 13.8, 2.4$  Hz, 1H), 1.91 – 1.78 (m, 6H), 1.72 (d,  $J = 1.4$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, MeOD)  $\delta$  154.11, 149.31, 148.56, 144.66, 141.65, 119.69, 112.00, 90.84, 78.63, 73.23, 72.22, 53.95, 51.51, 50.48, 24.74, 17.01. **HRMS**  $m/z$  calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 403.2453, observada 403.2446.  $[\alpha]_D$ : 4.8285.



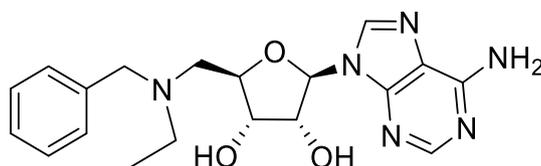
**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-((bencilamino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (43)**

Se utilizaron las condiciones descriptas en **A. 3** (500.0 mg, 1.6 mmol), **benzaldehído (42)** (0.16 mL, 1.6 mmol), AcOH (0.09 mL, 1.6 mmol) en DCM: MeCN (60: 30) (30 mL). Se agregó NaBH(OAc)<sub>3</sub> (508.0 mg, 2.4 mmol). Se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **43** como un aceite incoloro (372 mg, 59%).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.11 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.41 – 7.10 (m, 5H), 5.98 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 5.94 – 5.70 (m, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 5.47 (dd,  $J = 6.4, 3.3$  Hz, 1H), 5.08 (dd,  $J = 6.4, 3.1$  Hz, 1H), 4.41 (dt,  $J = 6.0, 3.7$  Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.08 – 2.75 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  155.59, 153.10, 149.39, 139.98, 139.88, 128.41, 128.08, 127.05, 120.44, 114.53, 91.15, 85.52, 83.30, 82.31, 53.84, 50.68, 27.35, 25.44.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-((bencil(etil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (45)**

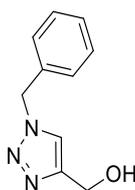
Se utilizaron las condiciones descritas en **B. 44** (100.0 mg, 0.25 mmol),  $K_2CO_3$  (69.0 mg, 0.50 mmol), bromuro de etilo (0.04 mL, 0.50 mmol) en DMF seco (2 mL). Se lavó con  $H_2O$  (20 mL) y se extrajo con AcOEt (20 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **45** como un aceite incoloro (89 mg, 84%).  **$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.25 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.29 – 7.09 (m, 5H), 6.03 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 5.82 – 5.65 (m, 2H-NH<sub>2</sub>-HSQC-RMN), 5.37 (dd,  $J = 6.4, 2.2$  Hz, 1H), 4.89 (dd,  $J = 6.4, 3.1$  Hz, 1H), 4.47 – 4.33 (m, 1H), 3.65 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H), 3.54 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1H), 2.79 – 2.40 (m, 4H), 1.60 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.02 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  **$^{13}C$ -RMN** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155.45, 153.06, 149.30, 139.86, 139.10, 129.00, 128.14, 126.99, 120.29, 114.19, 91.01, 85.56, 83.81, 83.36, 58.45, 54.88, 48.04, 27.15, 25.40, 11.48.



**((bencil(etil)amino)metil)tetrahidrofuran-3,4-diol (43)**

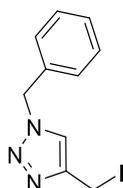
Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 42** (100.0 mg, 0.23 mmol) en DCM:  $H_2O$ : TFA (1.0 mL: 1.0 mL: 1.0 mL). Se purificó por cromatografía en columna 2 veces ( $CHCl_3$ : MeOH (50: 50)) obteniendo **43** como un aceite incoloro (23 mg, 24%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **43** es de 73% (220 nm) y de 89% (250 nm) con un tiempo de retención de 3.936 s.  **$^1H$ -RMN** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.18 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.40 – 7.32 (m, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 3H), 6.02 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 4.69 (dd,  $J = 5.2, 4.2$  Hz, 1H), 4.39 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.34 (q,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.19(2H-por HSQC-RMN), 3.00 – 2.83 (m, 4H).  **$^{13}C$ -RMN** (101 MHz, MeOD)  $\delta$  156.01, 152.46, 148.95, 140.28, 129.73, 128.22,

127.95, 119.42, 89.89, 80.78, 73.23, 72.28, 57.65, 54.30, 47.28, 9.33. Se presume que la impureza presente es Et<sub>3</sub>N. **HRMS** m/z calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 385.1983, observada 385.1983. [ $\alpha_D$ ]: 8.7689.



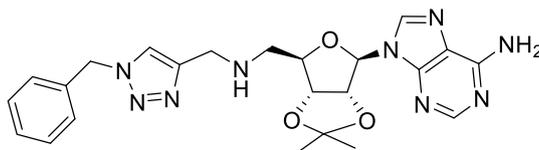
**(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (35a)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **E. 1-Propargilalcohol (32)** (0.52 mL, 8.9mmol), BnN<sub>3</sub> (1304.2 mg, 9.8 mol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (22.0 mg, 0.089 mmol) y ascorbato de sodio (176.0 mg, 0.89 mmol), en tert-butanol:Agua (50:50) (20 mL). Se extrajo con H<sub>2</sub>O (20 mL) y AcOEt (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt MeOH 10%) obteniendo **35a** como un sólido blanco (1.498 mg, 89%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45 (s, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 3H), 7.30 – 7.13 (m, 2H), 5.50 (s, 2H), 4.75 (s, 2H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.17, 134.50, 129.15, 128.82, 128.14, 121.70, 56.34, 54.21.



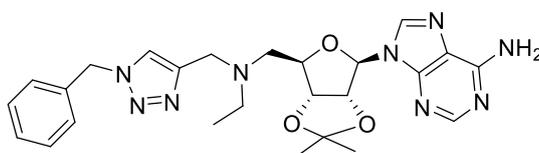
**1-bencil-4-(iodometil)-1H-1,2,3-triazol (48a)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **F. 35a** (200.0 mg, 1.06 mmol), PPh<sub>3</sub> (444.2 mg, 1.69 mmol), imidazol (108.1 mg, 1.59 mmol), iodo (404.0 mg, 1.59 mmol) en DCM seco (8 mL). Se lavó con una solución saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (60 mL) y se extrajo con DCM 30 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:EP 50:50) obteniendo **48a** como un sólido blanco (276.1 mg, 87%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45 (s, 1H), 7.42 – 7.33 (m, 3H), 7.30 – 7.23 (m, 2H), 5.49 (s, 2H), 4.44 (s, 2H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.15, 134.40, 129.34, 129.05, 128.28, 122.10, 54.44, -8.72.



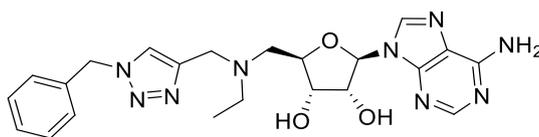
**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (47a)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **G. 3** (281.0 mg, 0.9 mmol), **48a** (275.0 mg, 0.9 mmol, 1 eq), DIPEA (0.13 mL, 0.9 mmol, 1 eq) en MeCN seco (5 mL). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt MeOH 10%) obteniendo **47a** como un aceite amarillo (130.9 mg, 30%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.41 – 7.32 (m, 4H), 7.28 – 7.21 (m, 2H), 5.99 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.78 (s, 2H), 5.49 (s, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.47 – 5.35 (m, 1H), 5.03 (dd, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H), 4.43 – 4.34 (m, 1H), 3.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 3.09 – 2.84 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.37 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.55, 153.11, 149.34, 146.50, 139.98, 134.63, 129.11, 128.74, 128.10, 121.72, 120.42, 114.67, 90.95, 85.39, 83.51, 82.28, 54.15, 50.79, 44.68, 27.29, 25.43.



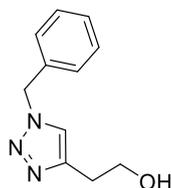
**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)(etil)amino)methyl)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (49a)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **B. 47a** (270.0 mg, 0.56 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (156.1 mg, 1.13 mmol), bromuro de etilo (0.08 mL, 1.13 mmol) en DMF seco (5 mL). Se extrajo con H<sub>2</sub>O (70 mL) y AcOEt (30 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **49a** como un aceite amarillo (256.1 mg, 90%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.47 – 7.31 (m, 4H), 7.24 – 7.17 (m, 2H), 6.04 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.74 (s ancho, 2H-NH por HSQC-RMN), 5.56 – 5.33 (m, 3H), 5.02 – 4.70 (m, 1H), 4.38 (s ancho, 1H), 3.81 (s, 2H), 2.82 – 2.67 (m, 2H), 2.56 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.46, 151.12, 147.28, 142.83, 138.02, 132.75, 127.04, 126.63, 125.92, 120.86, 118.27, 112.47, 88.67, 83.15, 81.86, 81.09, 52.76, 52.03, 46.53, 46.05, 25.14, 23.40, 9.50.



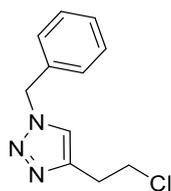
**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)etil)amino)methyl)tetrahidrofuran-3,4-diol (50a)**

Se utilizaron las condiciones descriptas en **C. 49a** (245.0 mg, 0.48 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50:50) obteniendo **50a** como un aceite amarillo (146.1 mg, 65%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **50a** es de 85% (220 nm) y de 99% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.342 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.23 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 3H), 7.28 (dd, *J* = 7.5, 2.1 Hz, 2H), 6.04 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 4.75 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.57 – 4.48 (m, 4H), 4.49 – 4.42 (m, 2H), 3.75 (dd, *J* = 13.8, 9.8 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 13.8, 2.5 Hz, 1H), 3.26 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 156.10, 152.48, 148.74, 140.74, 136.61, 134.96, 128.70, 128.34, 127.81, 126.50, 119.70, 90.68, 78.68, 73.04, 72.21, 54.19, 53.70, 48.72, 46.41, 8.12. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 466.2310, observada 466.2307. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: 6.7469.



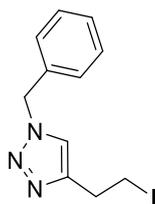
**2-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-yl)etan-1-ol (35b)**

Se utilizaron condiciones descriptas en **E. 3-Butin-1-ol (33b)** (0.38 mL, 5.0 mmol), BnN<sub>3</sub> (665.0 mg, 5.0 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (12.0 mg, 0.05 mmol) y ascorbato de sodio (99.0 mg, 0.5 mmol), en tert-butanol: Agua (14 mL). Se extrajo con H<sub>2</sub>O (15 mL) y AcOEt (20 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:MeOH 10%) obteniendo **35a** como un sólido blanco (762.0 mg, 75%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41 – 7.34 (m, 3H), 7.32 (s, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 2H), 5.49 (s, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.91 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.98, 134.68, 129.12, 128.75, 128.10, 121.53, 61.54, 54.12, 28.72.



**1-benzyl-4-(2-chloroethyl)-1H-1,2,3-triazole (37)**

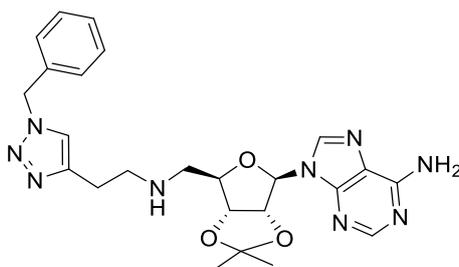
**35b** (100.0 mg, 0.49 mmol), se disolvió en  $\text{SOCl}_2$  (0.5 mL) sin agitación. Luego de 24hs se eliminó el solvente a presión reducido. Se agregó tolueno y  $\text{CHCl}_3$  y se eliminó el solvente a presión reducida. Se lavó con 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  con 1 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (10 mL x 3). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt), obteniendo **42** como un sólido blanco (103.5 mg, 95%).  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.44 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.18 (m, 2H), 5.52 (s, 2H), 3.78 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.17 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  144.69, 134.71, 129.13, 128.75, 128.02, 121.80, 54.13, 43.46, 29.38.



**1-bencil-4-(2-iodoetil)-1H-1,2,3-triazol (48b)**

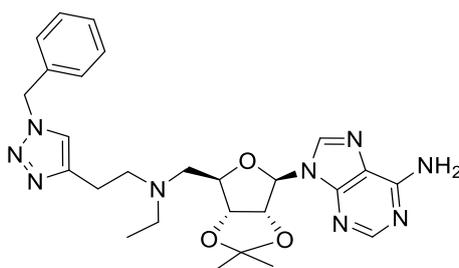
**Método 1:** Se disolvió **37** (100.0 mg, 0.45 mmol) en acetona y se agregó NaI (339.0 mg, 2.3 mmol, 5 eq) y se llevó a reflujo de un día para el otro. Se lavó con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) se extrajo con DCM (30 mL x 3). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida. Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:EP 50:50). Se obtiene **48b** como un sólido blanco (41.0 mg, 29%)

**Método 2:** Se utilizaron condiciones descritas en F. **35b** (500.0 mg, 2.5 mmol),  $\text{PPh}_3$  (1032.0 mg, 3.9 mmol), imidazol (251.0 mg, 3.7 mmol), iodo (937.0 mg, 3.7 mmol) en DCM seco (13 mL). Se extrajo con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (40 mL) y DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:EP 40:60) obteniendo **48b** como un aceite amarillo (759.1 mg, 97%).  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.41-7.43 (m, 3H), 7.34 (s, 1H), 7.31 – 7.19 (m, 2H), 5.52 (s, 2H), 3.42 (td,  $J = 7.1, 0.9$  Hz, 2H), 3.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  146.67, 134.74, 129.13, 128.74, 127.97, 121.22, 54.13, 30.25, 4.03.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((2-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (47b)**

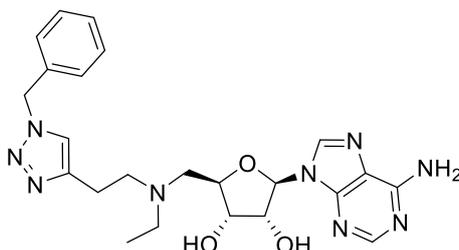
Se utilizaron las condiciones descritas en **G**. con **3** (248.0 mg, 0.8 mmol), **48b** (759.1 mg, 2.4 mmol), DIPEA (0.7 mL, 4.0 mmol) en MeCN seco (10 mL). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: MeOH 15%) obteniendo **47b** como un aceite amarillo (282.3 mg, 79%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.22 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 3H), 7.24 – 7.12 (m, 2H), 6.29 (s ancho, 2H-NH<sub>2</sub> por HSQC-RMN), 6.10 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.33 (dd, *J* = 6.3, 2.9 Hz, 1H), 5.22 (dd, *J* = 6.4, 3.2 Hz, 1H), 4.72 – 4.64 (m, 1H), 3.84 – 3.68 (m, 1H), 3.86 – 3.65 (m, 2H), 3.26 (dd, *J* = 12.8, 3.7 Hz, 1H), 3.18 – 3.08 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.32, 152.96, 148.45, 143.82, 140.17, 134.37, 129.09, 128.77, 128.11, 122.01, 119.68, 115.11, 91.15, 83.94, 82.51, 82.11, 54.13, 49.64, 47.77, 27.17, 25.39, 23.27.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((2-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil)etil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (49b)**

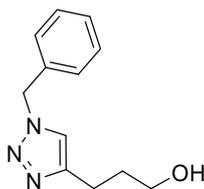
Se utilizaron las condiciones descritas en **B**. **47b** (249.0 mg, 0.5 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (140.0 mg, 1.0 mmol), bromuro de etilo (0.07 mL, 1.0 mmol) en DMF seco (5 mL). Se lavó con H<sub>2</sub>O (70 mL) y se extrajo con AcOEt (30 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **49b** como un aceite

amarillo (101.0 mg, 39%). **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.37 – 7.32 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 7.25 – 7.22 (m, 2H), 6.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.75 (s ancho, 2H), 5.49 – 5.41 (m, 3H), 4.97 (dd, *J* = 6.6, 3.4 Hz, 1H), 4.41 (s ancho, 1H), 2.87 – 2.78 (m, 6H), 2.67 (s ancho, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 0.97 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.51, 153.14, 149.22, 145.88, 140.17, 134.92, 129.06, 128.63, 127.97, 121.37, 120.33, 114.41, 90.98, 85.28, 83.86, 83.28, 55.10, 54.00, 53.11, 48.01, 27.13, 25.40, 23.16, 10.96.



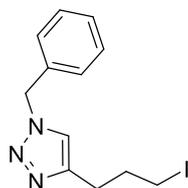
**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(((2-(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-yl)etil)(etil)amino)metil)tetrahidrofuran-3,4-diol (50b)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 49b** (245.0 mg, 0.47 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 2.0 mL: 2.0 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50:50) obteniendo **50b** como un sólido blanco (146.0 mg, 65%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **50b** es de 70% (220 nm) y de 94% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.389 s. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, MeOD) δ 8.20 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.39 – 7.30 (m, 3H), 7.32 – 7.23 (m, 2H), 6.01 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 4.86 (1H debajo de la señal del agua), 4.54 – 4.41 (m, 2H), 4.40 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.76 (t, *J* = 12.1 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 3.54 – 3.41 (m, 2H), 3.42 – 3.32 (m, 2H), 3.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C-RMN** (101 MHz, MeOD) δ 157.57, 153.98, 150.21, 144.37, 142.30, 136.64, 130.08, 129.69, 129.22, 123.97, 121.26, 91.92, 80.28, 74.15, 73.75, 55.73, 55.02, 53.62 (por HSQC-RMN), 48.94 (por HSQC-RMN), 21.22, 8.92. **HRMS** *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 480.2467, observada 480.2465. [**α**<sub>D</sub>]: 8.8614.



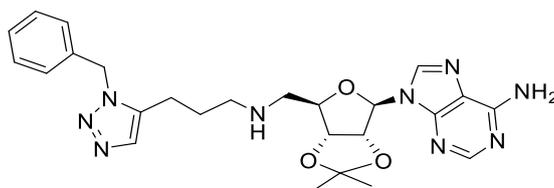
**3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)propan-1-ol (35c)**

Se utilizaron las condiciones descritas en **E. 4-pentin-1-ol (33c)** (0.5 mL, 5.0 mmol),  $\text{BnN}_3$  (665.0 mg, 5.0 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (12.0 mg, 0.05 mmol) y ascorbato de sodio (100.0 mg, 0.5 mmol), en tert-butanol:Agua (50: 50) (16 mL). Se extrajo con  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL) y AcOEt (20 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:MeOH 10%) obteniendo **35c** como un sólido blanco (923.0 mg, 85%).  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 – 7.30 (m, 3H), 7.30 – 7.17 (m, 3H), 5.49 (s, 2H), 3.69 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.80 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.91 (tt,  $J = 7.4, 6.1$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.97, 134.82, 129.11, 128.70, 128.02, 120.84, 61.89, 54.08, 31.90, 22.17.



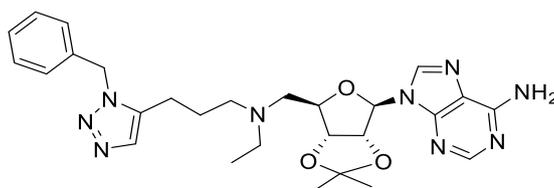
**1-bencil-4-(3-iodopropil)-1H-1,2,3-triazol (48c)**

Se utilizaron condiciones descritas en **F.** con **35c** (400.0 mg, 1.84 mmol),  $\text{PPh}_3$  (773.0 mg, 2.9 mmol), imidazol (188.0 mg, 2.7 mmol), iodo (701.0 mg, 2.7 mmol) en DCM seco (15 mL). Se lavó con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (40 mL) y se extrajo con DCM (25 mL x 4). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:EP 40:60) obteniendo **48c** como un sólido blanco (581.9 mg, 86%).  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.43 – 7.31 (m, 3H), 7.30 – 7.20 (m, 3H), 5.50 (s, 2H), 3.20 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.81 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.18 (p,  $J = 6.9$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  146.55, 134.79, 129.13, 128.73, 128.02, 121.06, 54.10, 32.58, 26.31, 6.17.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-amina (47c)**

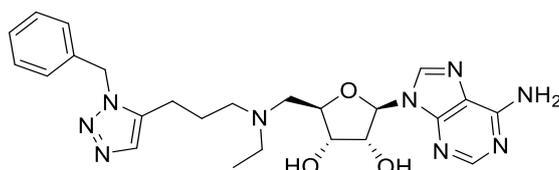
Se utilizaron las condiciones descritas en **G**. con **3** (324.0 mg, 1.06 mmol), **48c** (519.0 mg, 1.58 mmol, 1.5 eq), DIPEA (0.9 mL, 5.28 mmol) en MeCN seco (10 mL). Se purificó por cromatografía en columna (AcOEt MeOH 15%) obteniendo **47c** como un aceite amarillo (235.9 mg, 44%, calculado a partir del espectro de  $^1\text{H-RMN}$ ).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.27 (s, 1H), 8.17 (s ancho, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 7.26 – 7.20 (m, 2H), 6.12 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.30 (dd,  $J = 6.3, 3.1$  Hz, 1H), 5.25 (dd,  $J = 5.4, 2.5$  Hz, 1H), 4.97 – 4.87 (m, 1H), 4.76-4.72 (m, 2H), 3.39-3.32 (m, 2H), 2.78 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.38 – 2.17 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.37 (s, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.07, 152.90, 148.29 (por HMBC-RMN), 145.79, 140.32, 134.55, 129.57, 129.10, 128.71, 128.18, 121.83, 115.33, 91.04, 83.93, 82.14, 81.03, 54.20, 50.75, 48.09, 27.17, 25.41, 24.83, 23.13.



**9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(((3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propil)(etil)amino)metil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-amina (49c)**

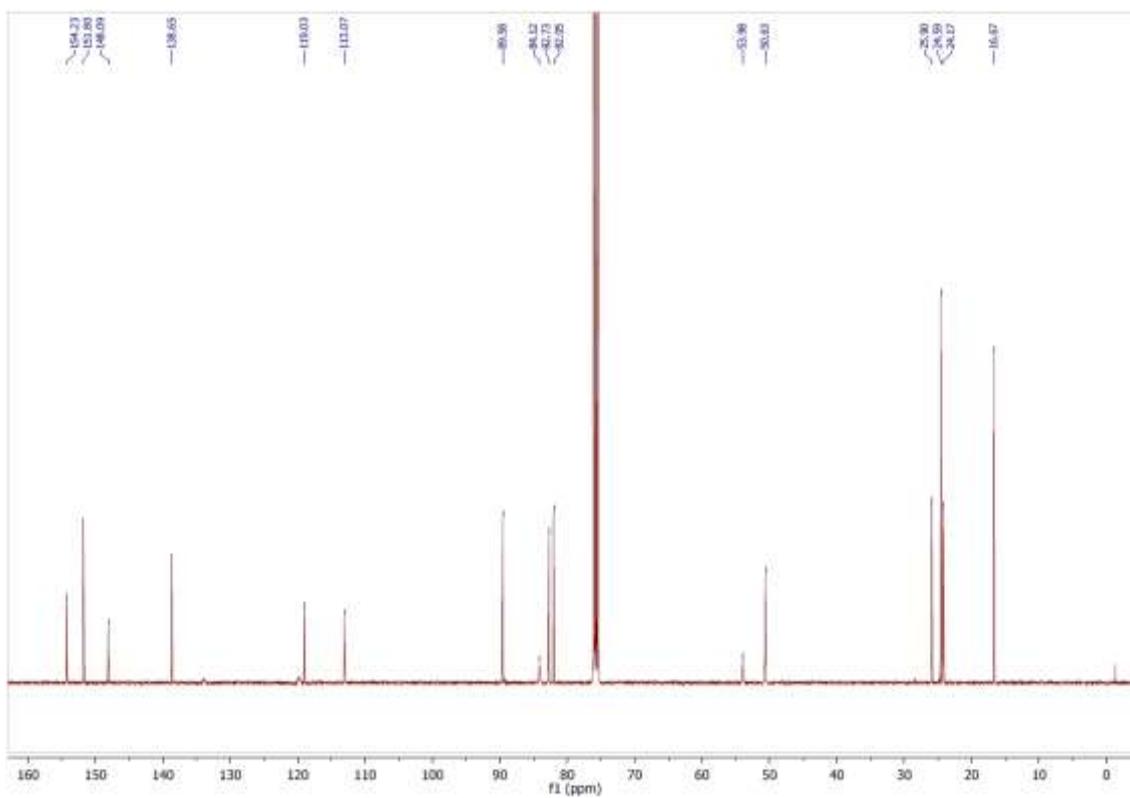
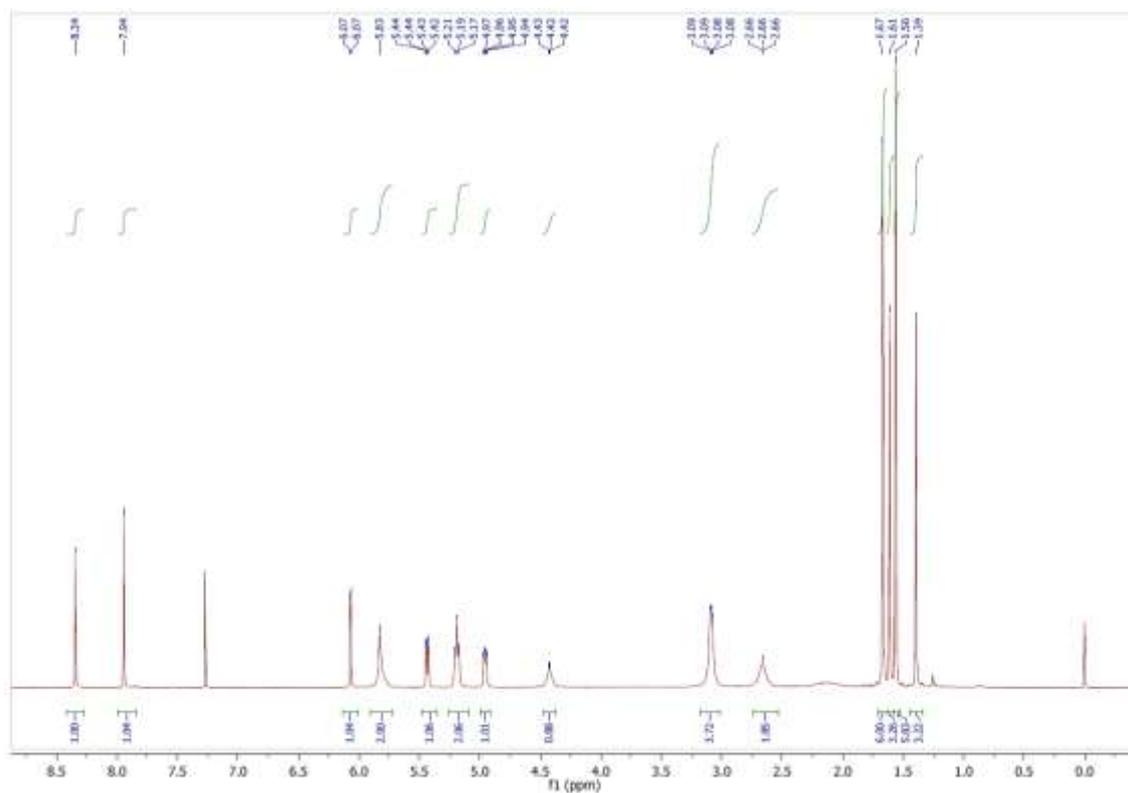
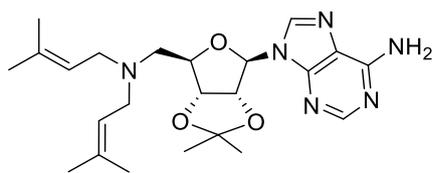
Se utilizaron las condiciones descritas en **B**. **47c** (236.0 mg, 0.47 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (129.0 mg, 0.93 mmol), bromuro de etilo (0.07 mL, 0.93 mmol) en DMF seco (5 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 10%) obteniendo **49c** como un aceite amarillo (90 mg, 36%). Se extrajo con  $\text{H}_2\text{O}$  (70 mL) y AcOEt (30 mL x 4).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.33 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.46 – 7.31 (m, 3H), 7.28 – 7.15 (m, 3H), 6.05 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 5.73 (s, 2H-NH por HSQC-

RMN), 5.49 (s, 2H), 5.44 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.56 – 4.27 (m, 1H), 3.02 – 2.35 (m, 8H), 1.88 – 1.69 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 0.97 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.48, 152.04, 148.00, 146.34, 139.07, 133.77, 127.96, 127.54, 126.91, 119.83, 119.20, 113.50, 89.84, 83.29, 82.69, 82.21, 53.59, 52.92, 51.74, 46.95, 26.02, 24.27, 23.76, 21.95, 9.27.

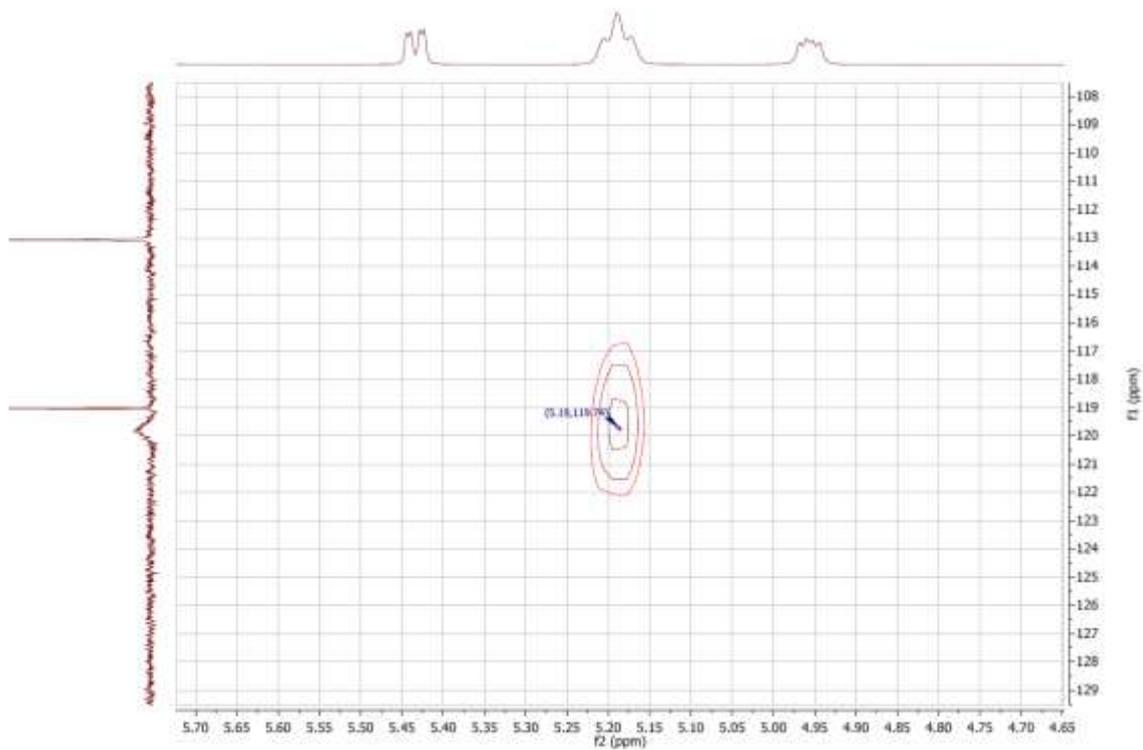


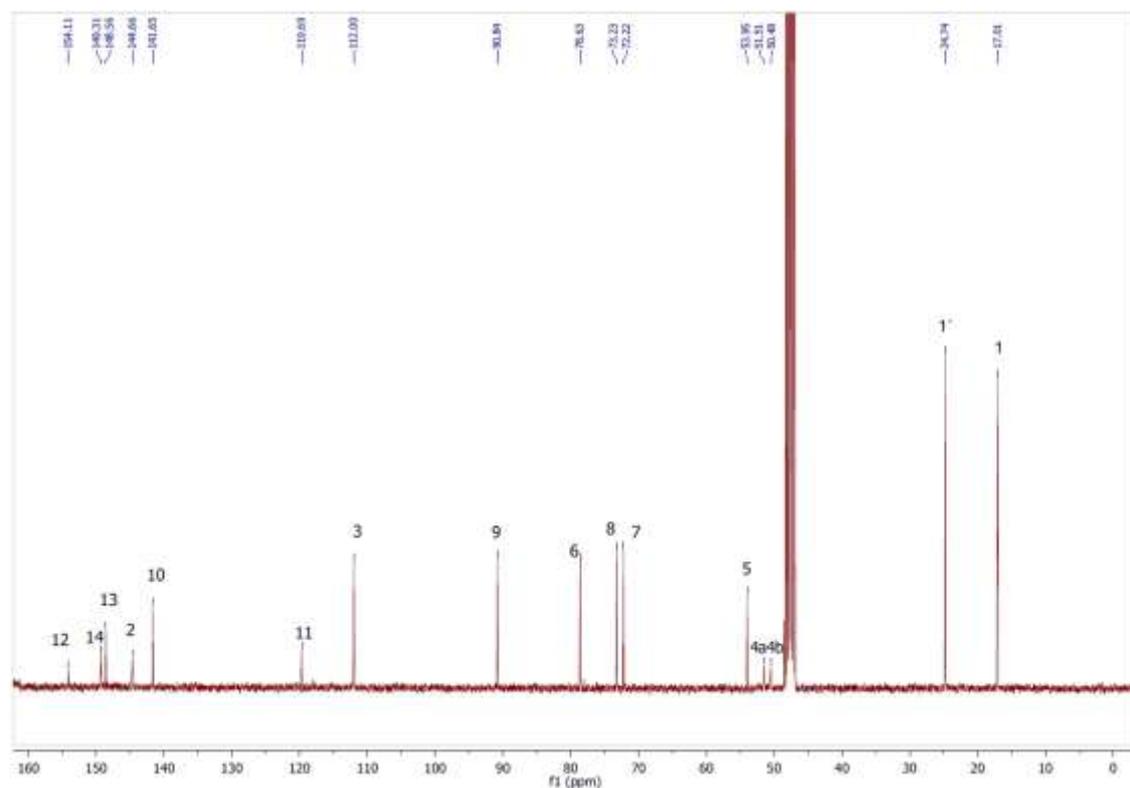
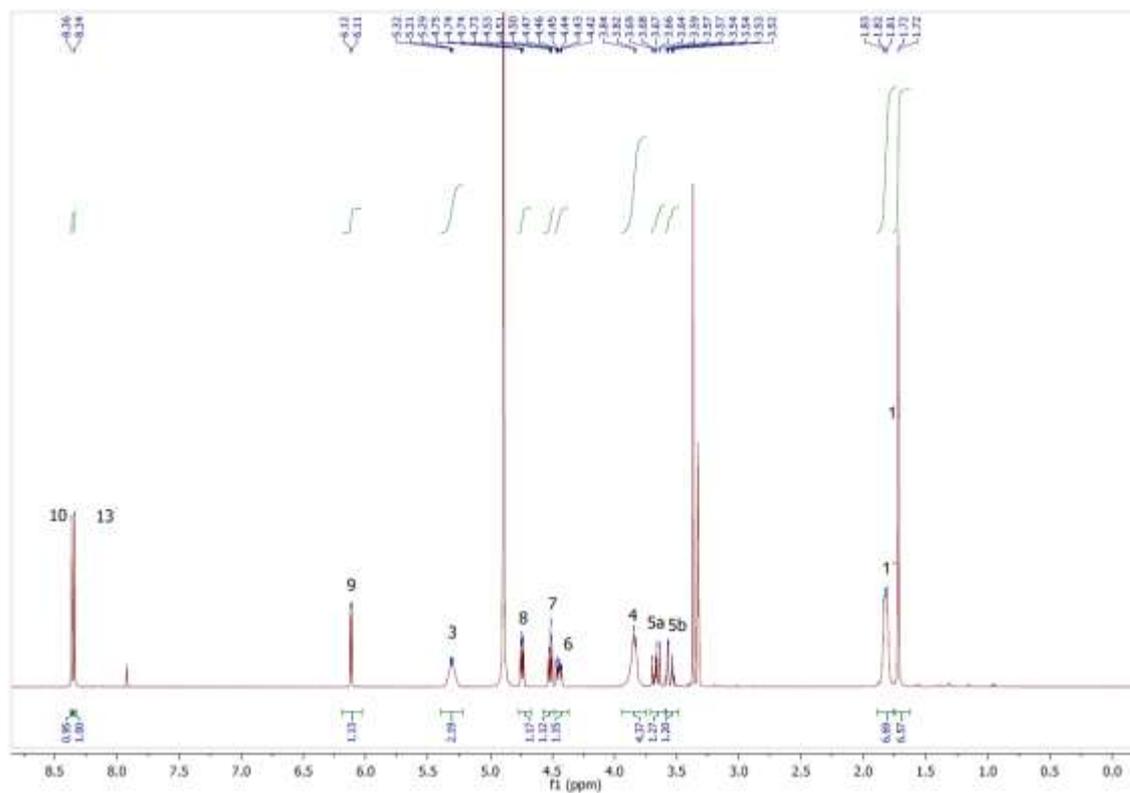
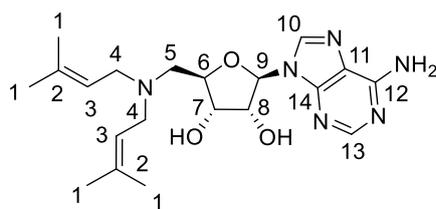
**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(((3-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propil)(etil)amino)metil)tetrahidrofuran-3,4-diol (50c)**

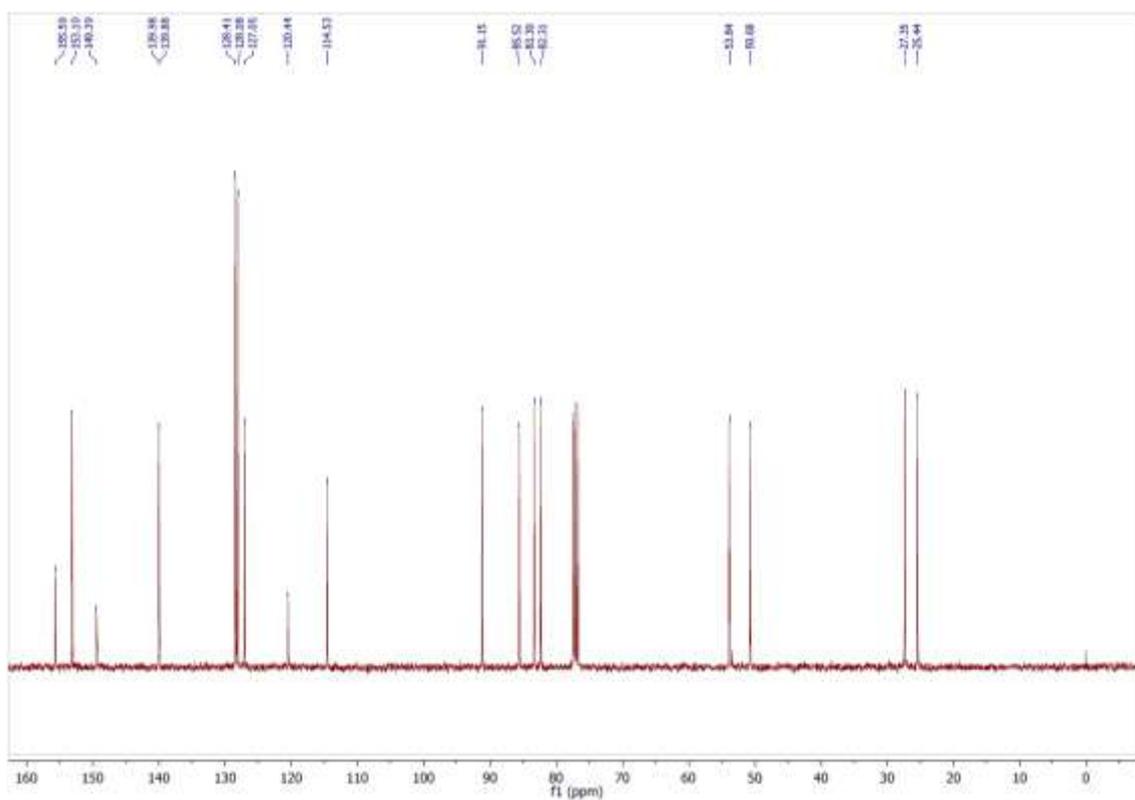
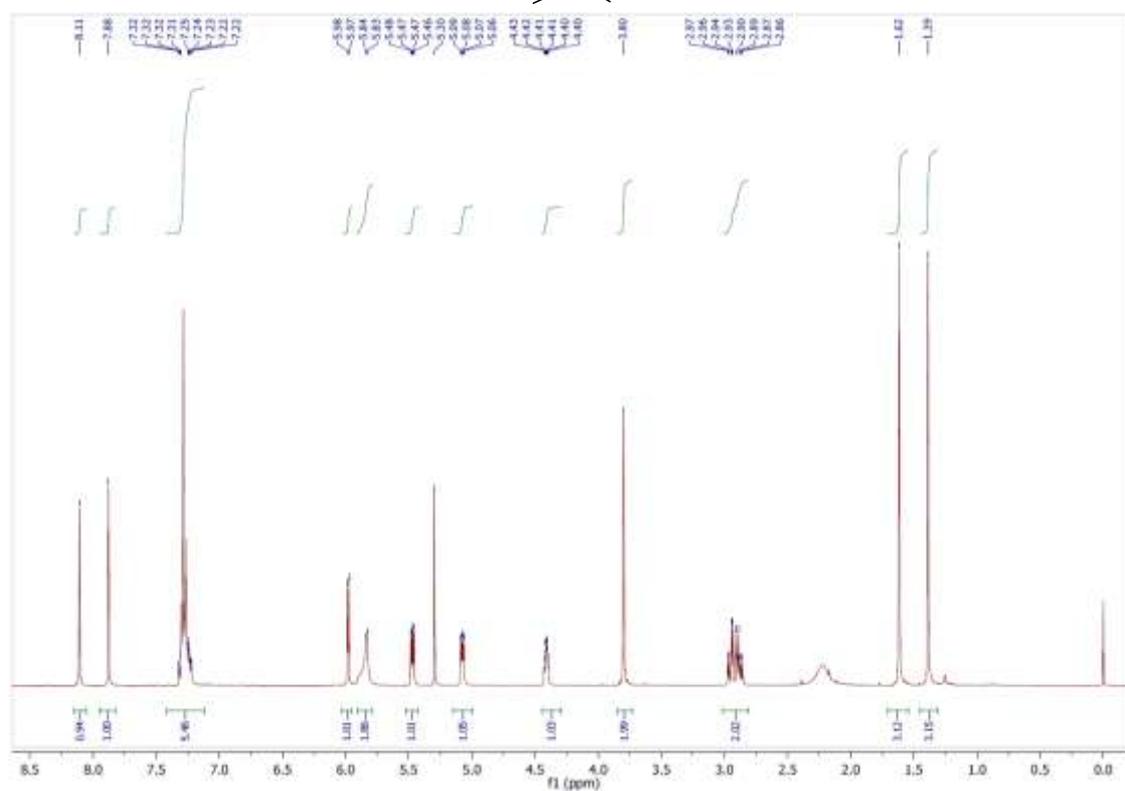
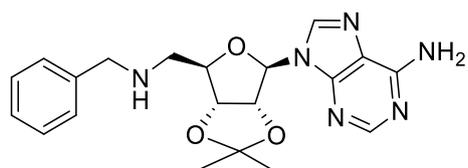
Se utilizaron las condiciones descritas en **C. 49c** (90.0 mg, 0.17 mmol) en DCM: H<sub>2</sub>O: TFA (2.0 mL: 0.5 mL: 1.0 mL). Se purificó por cromatografía en columna (DCM: MeOH 50:50) obteniendo **50c** como un aceite incoloro (14.5 mg, 17%). El valor de pureza por HPLC del compuesto **50c** es de 96% (220 nm) y de 97% (250 nm) con un tiempo de retención de 4.535 s. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, MeOD) δ 8.25 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.39 – 7.22 (m, 5H), 5.97 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 4.72 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.27 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.17 (dt, *J* = 6.7, 4.6 Hz, 1H), 2.95 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.74 – 2.55 (m, 6H), 1.88 – 1.73 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, MeOD) δ 155.95, 152.49, 149.12, 147.59, 140.26, 135.52, 128.59, 128.11, 127.61, 121.86, 119.31, 89.41, 81.91, 73.19, 72.22, 55.31, 53.45, 52.76, 47.52, 25.48, 22.56, 9.95. HRMS *m/z* calculada ((M+H)<sup>+</sup>) 494.2623, observada 494.2616. [α]<sub>D</sub>: 0.7812.

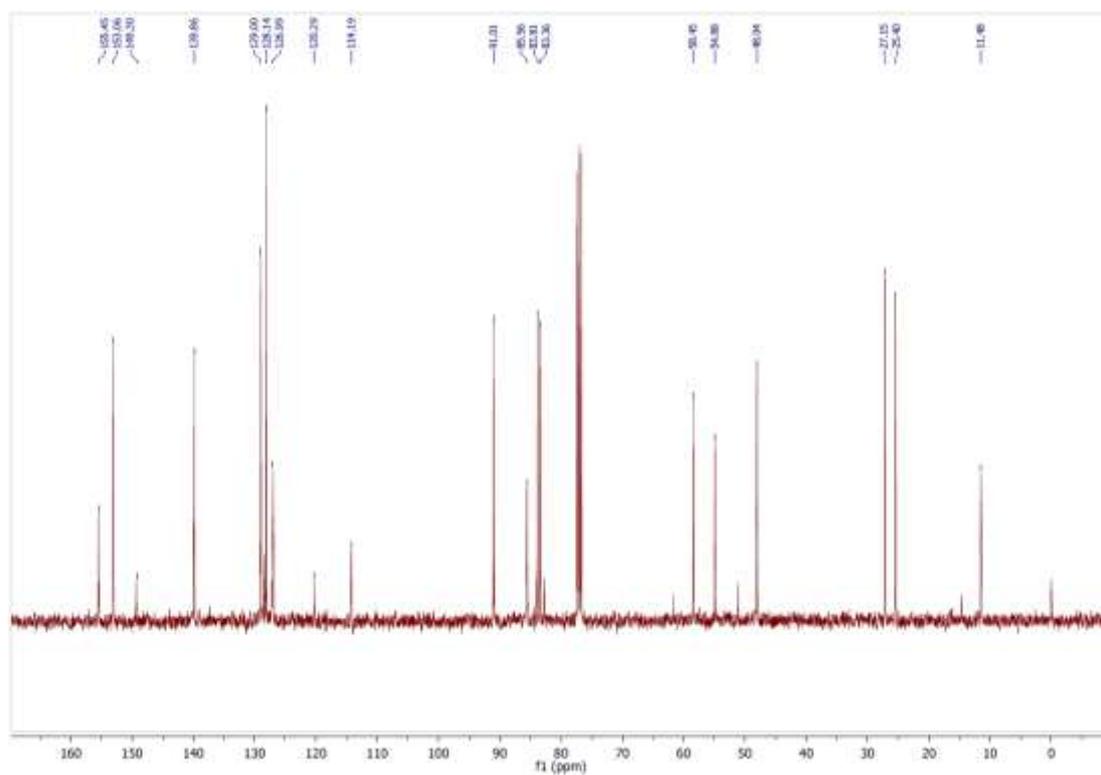
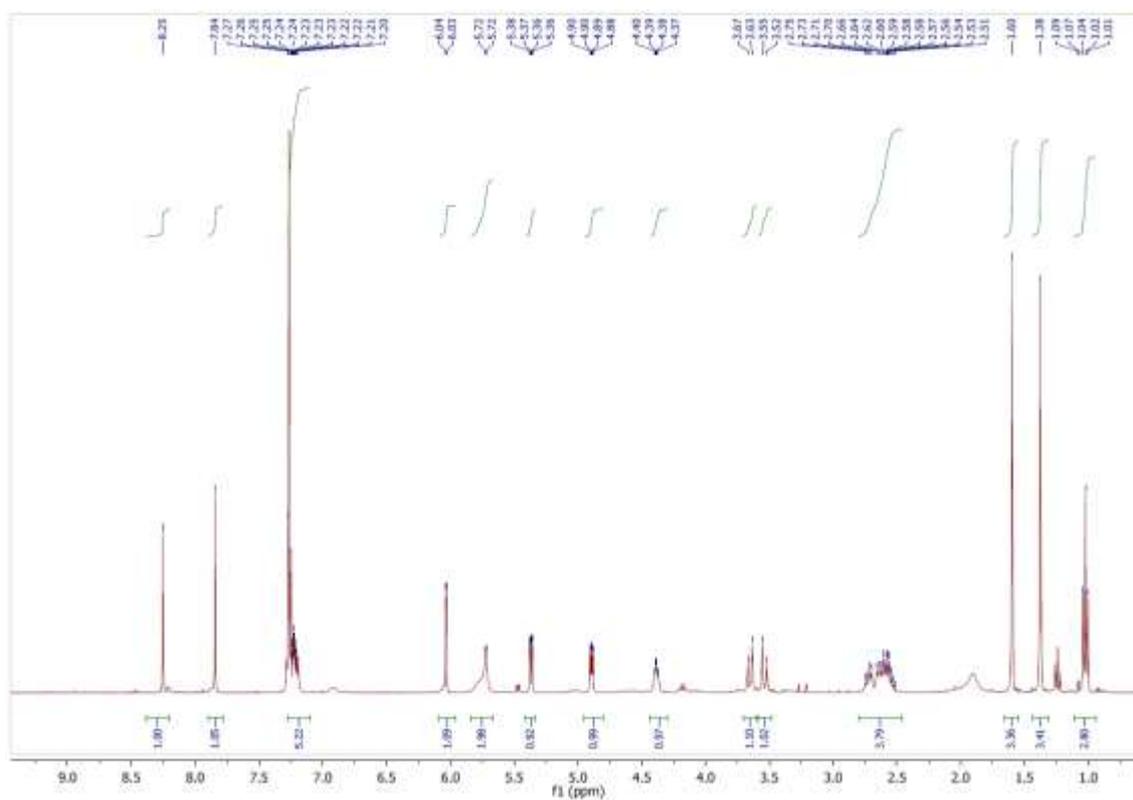
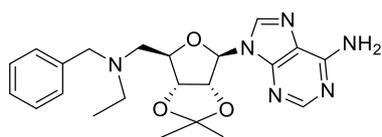


## HSQC-RMN

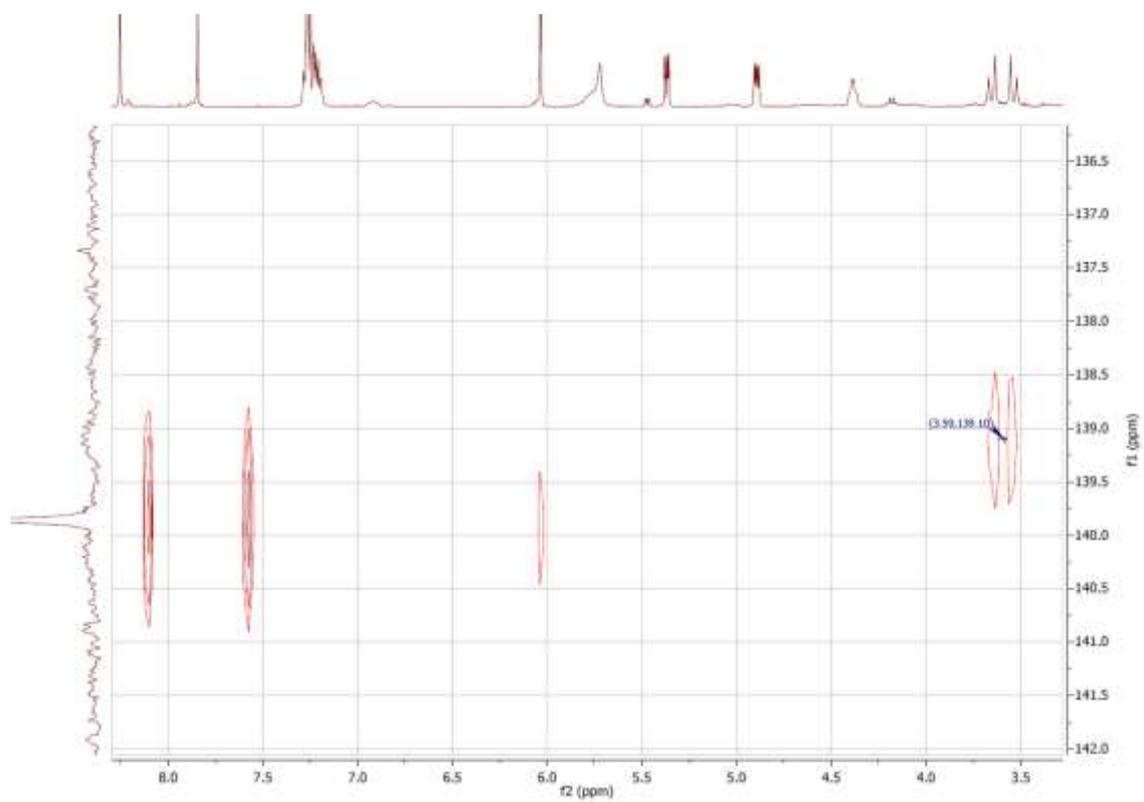


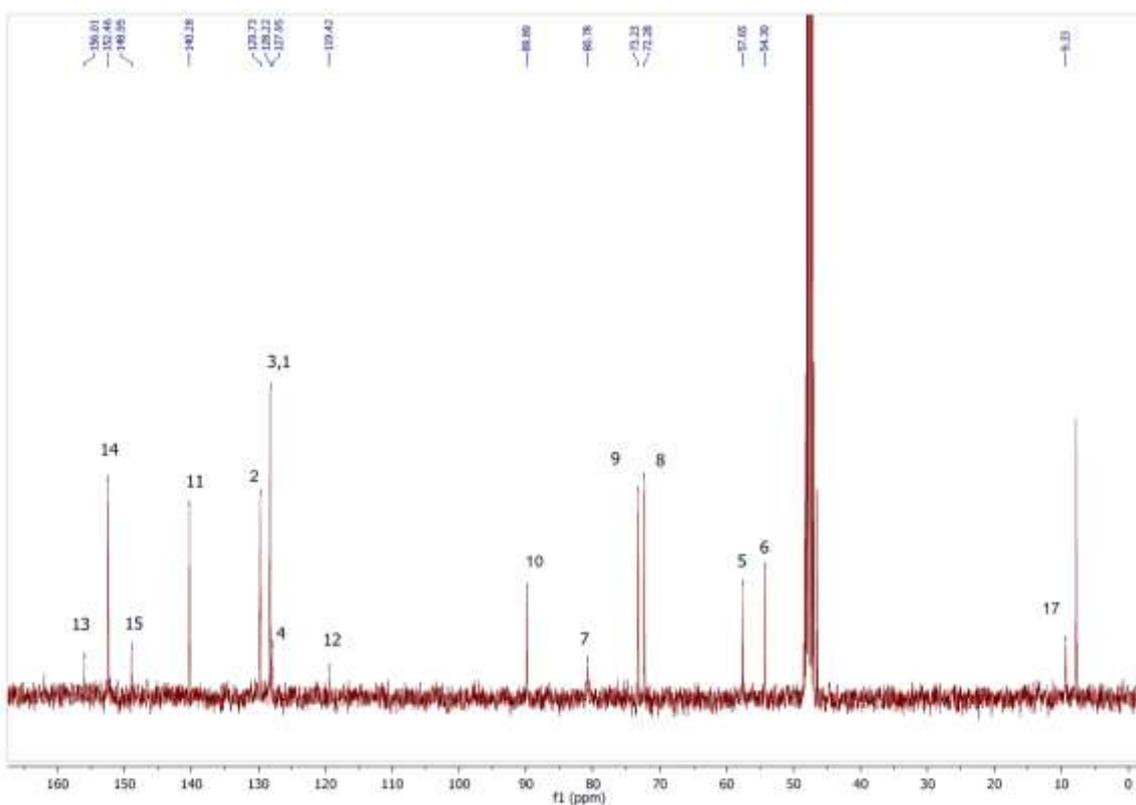
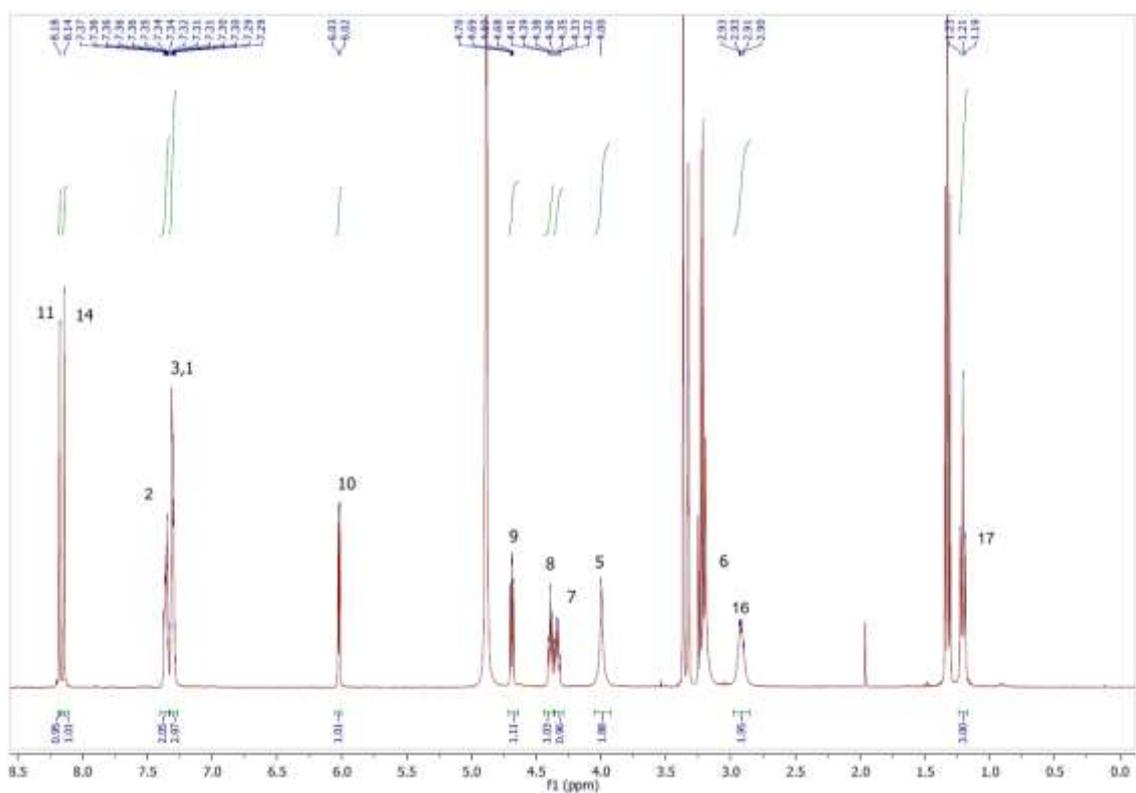
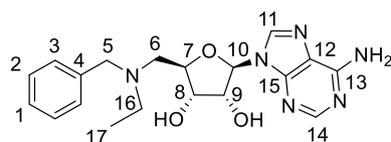




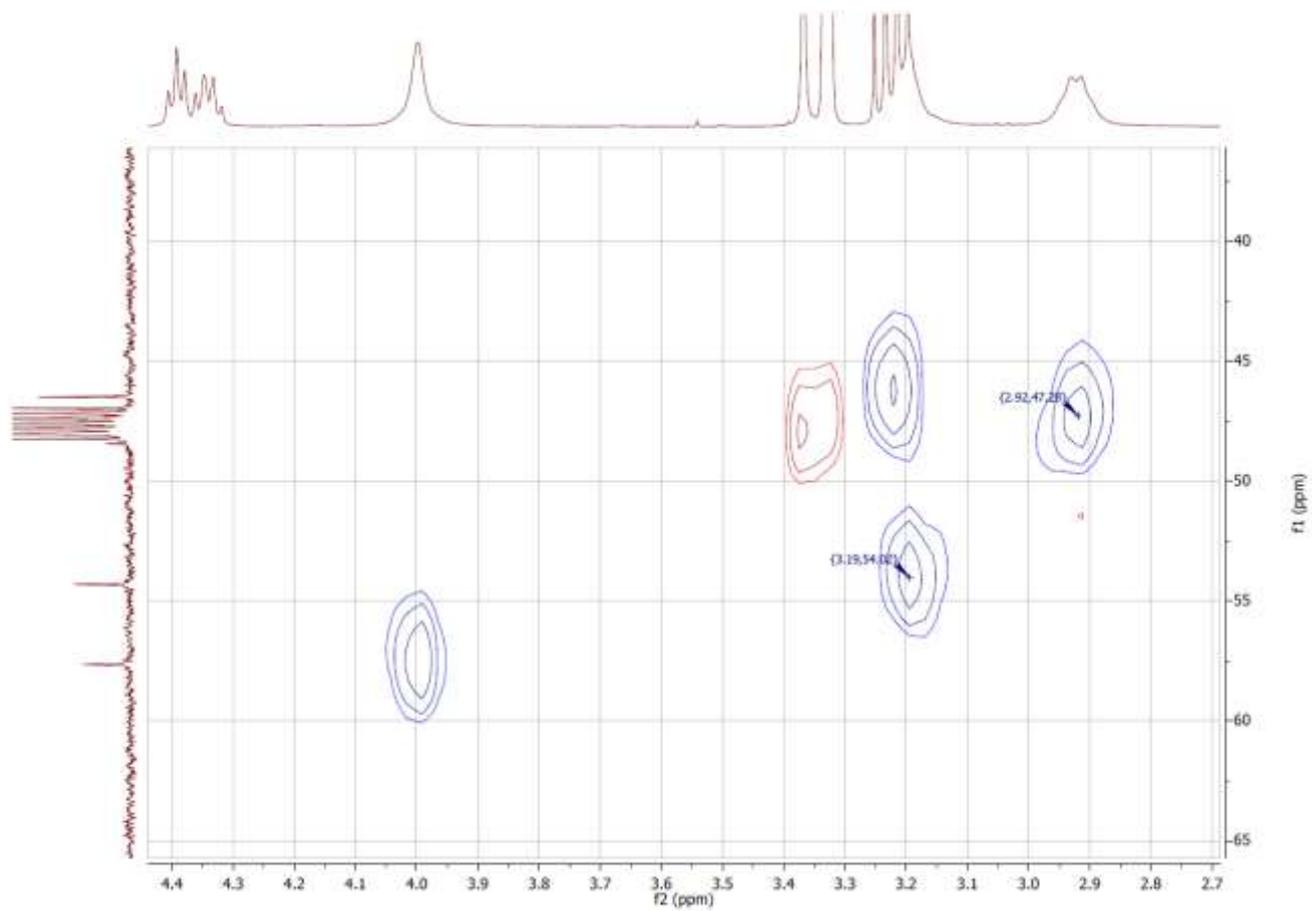


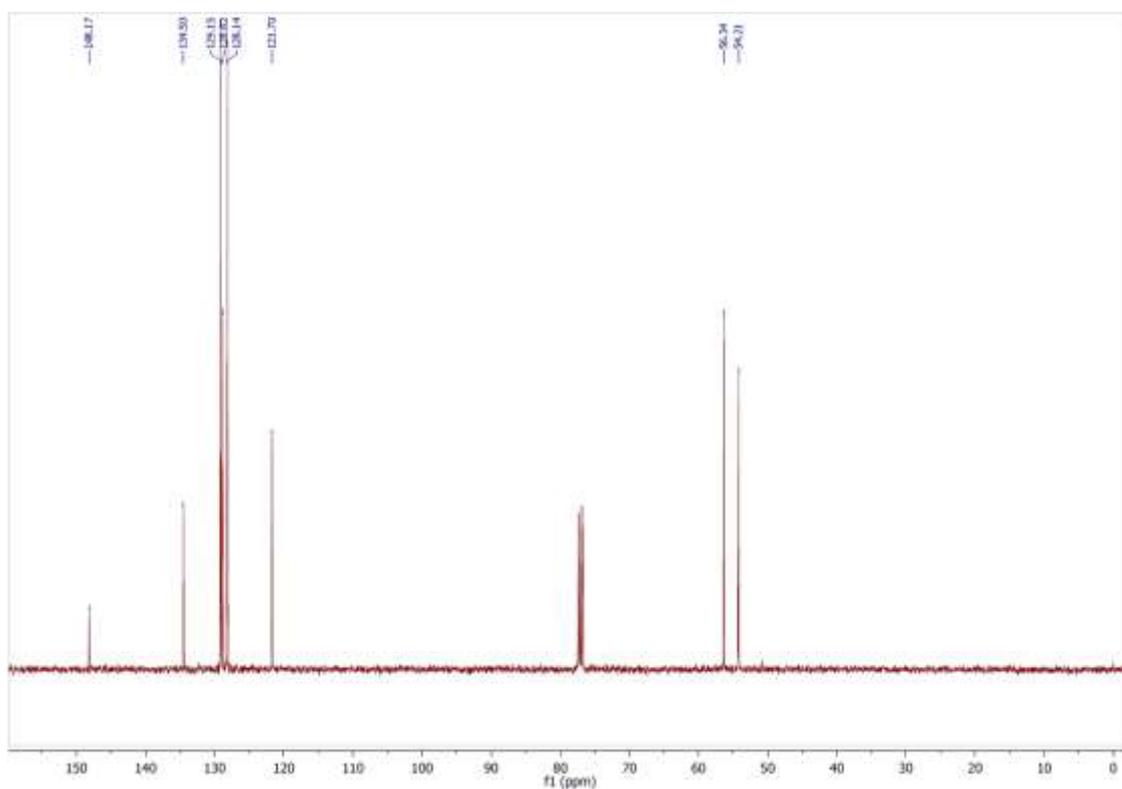
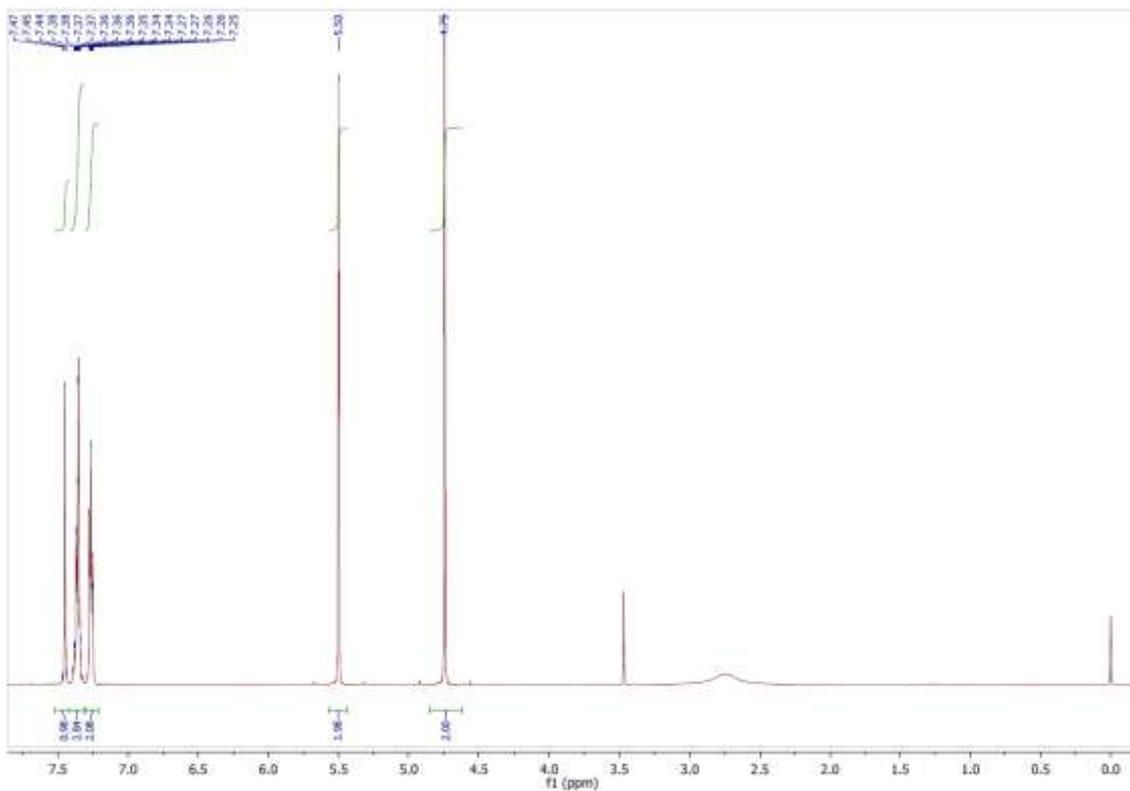
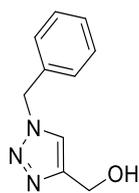
### HMBC-RMN

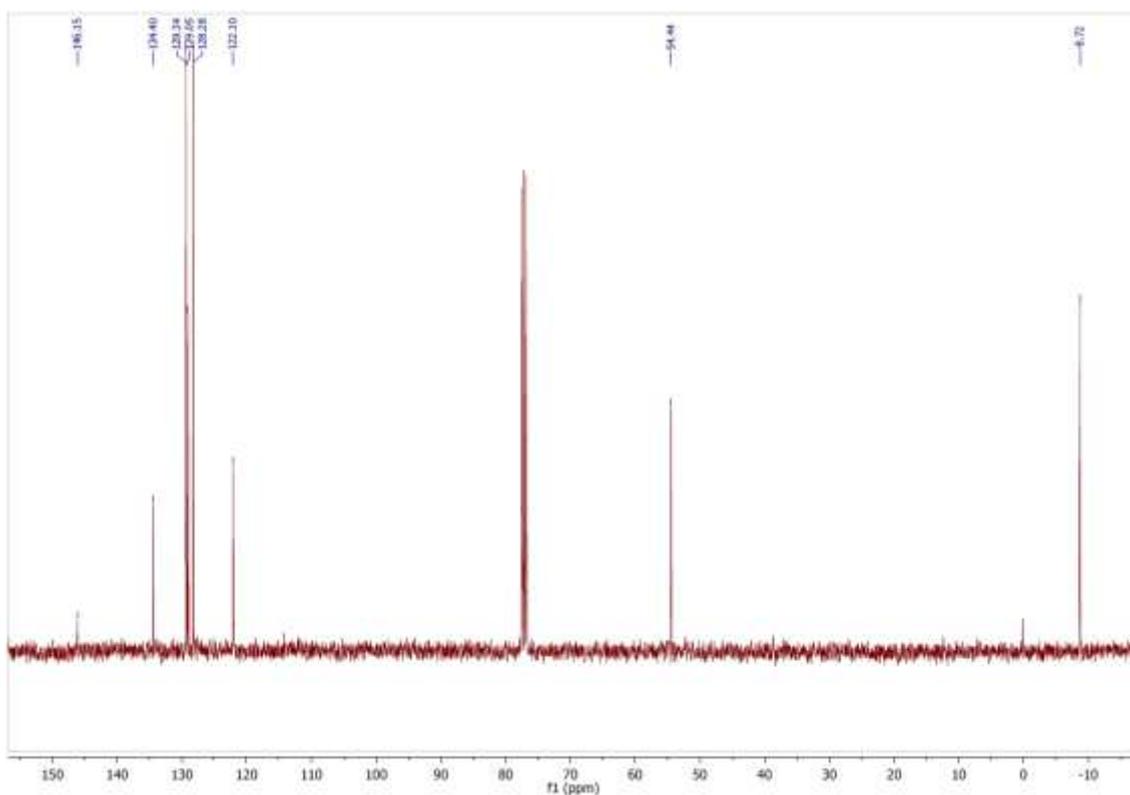
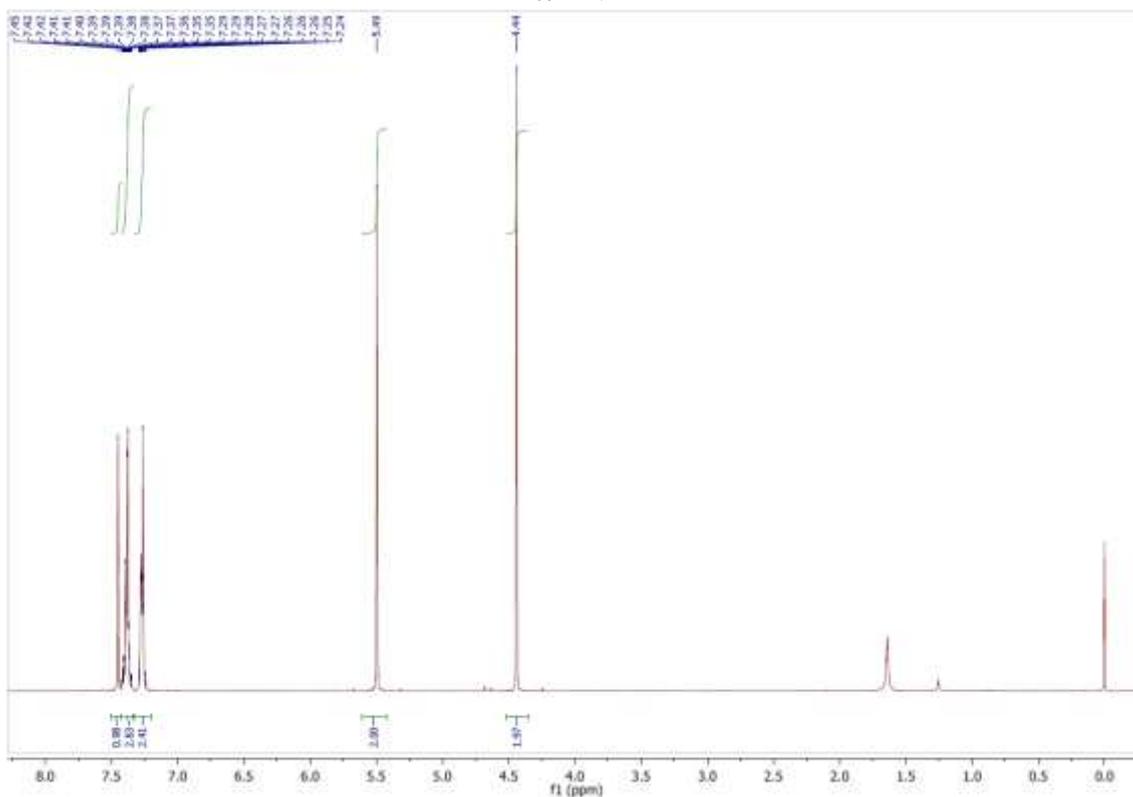
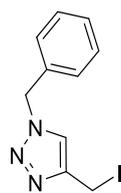


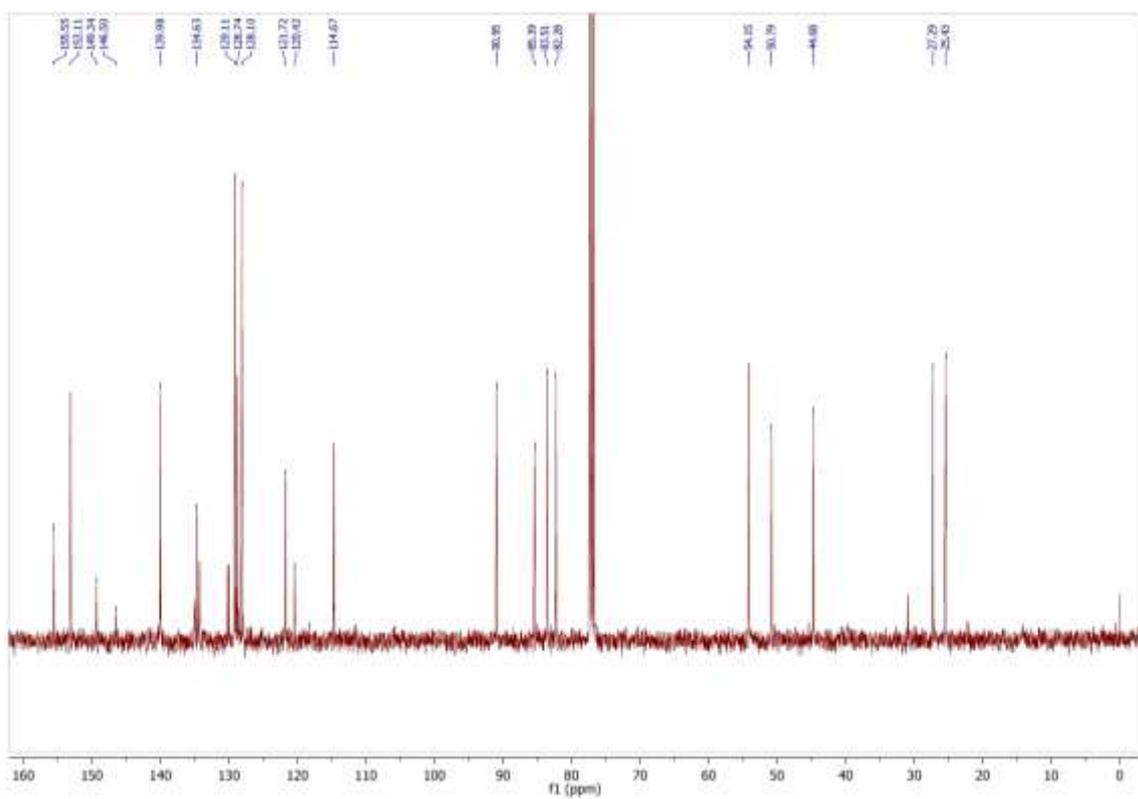
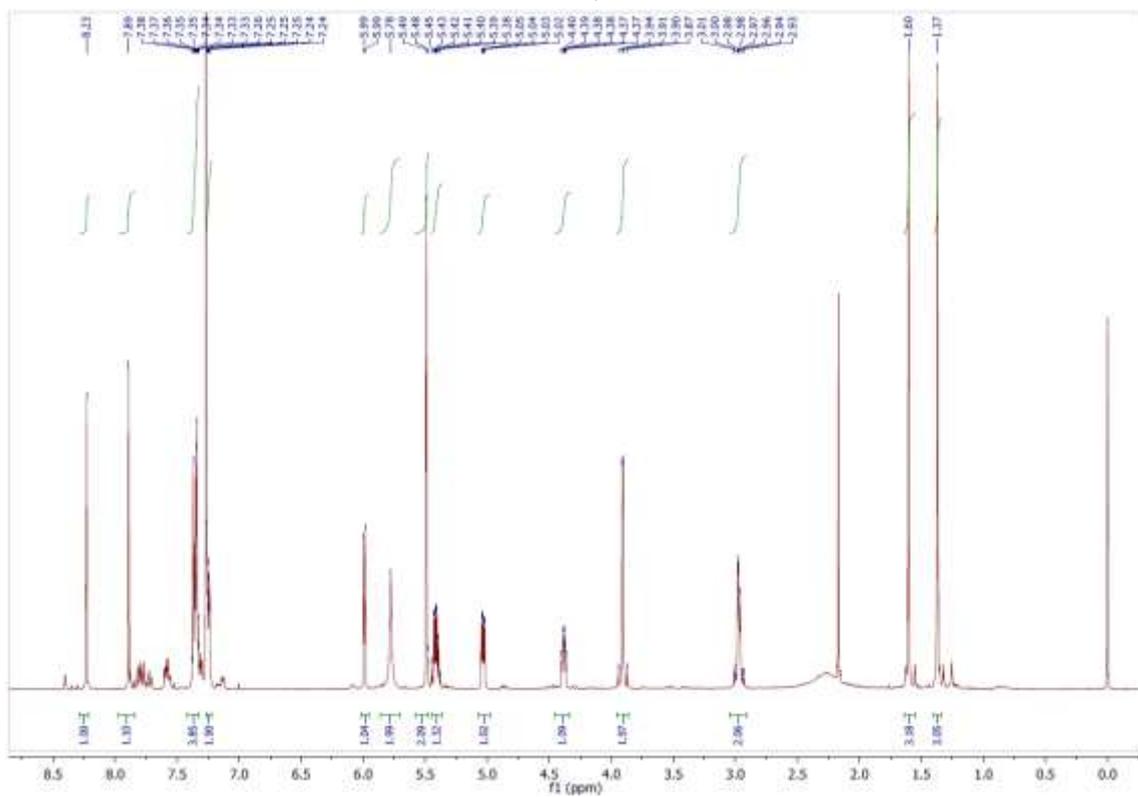
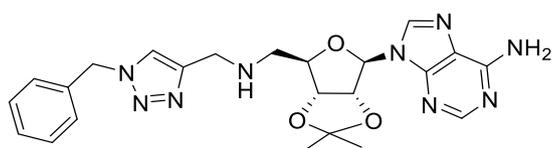


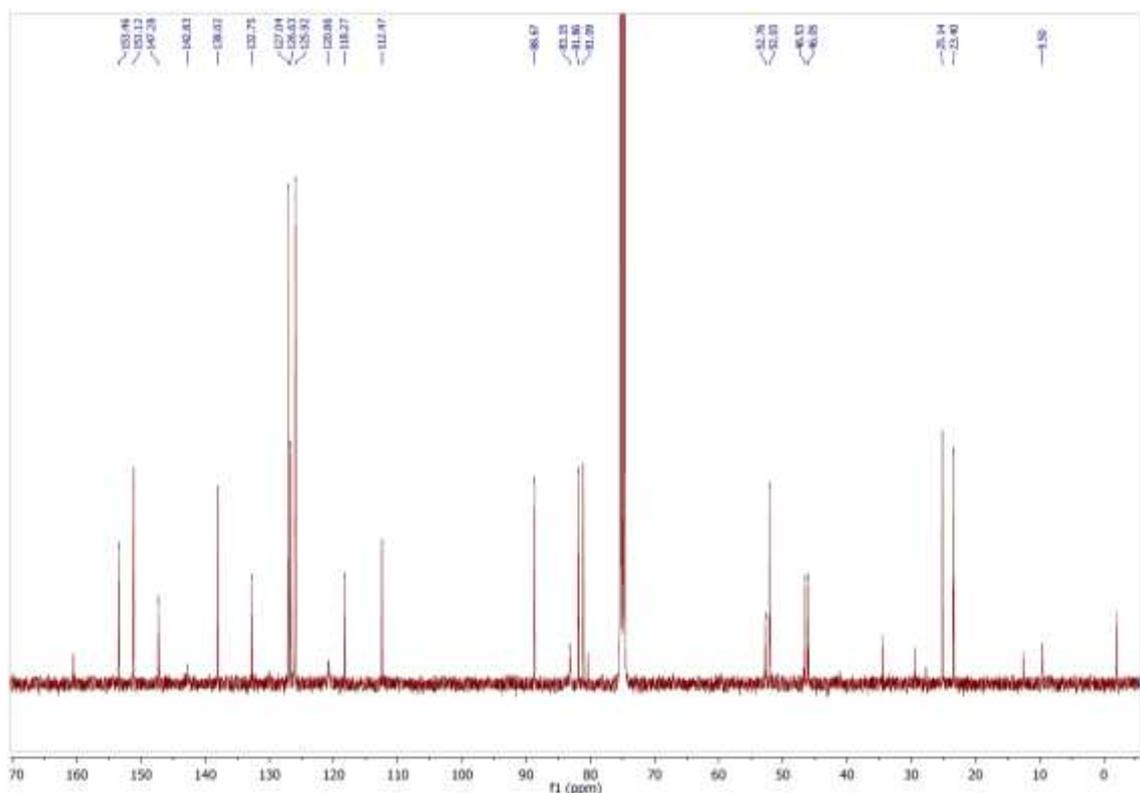
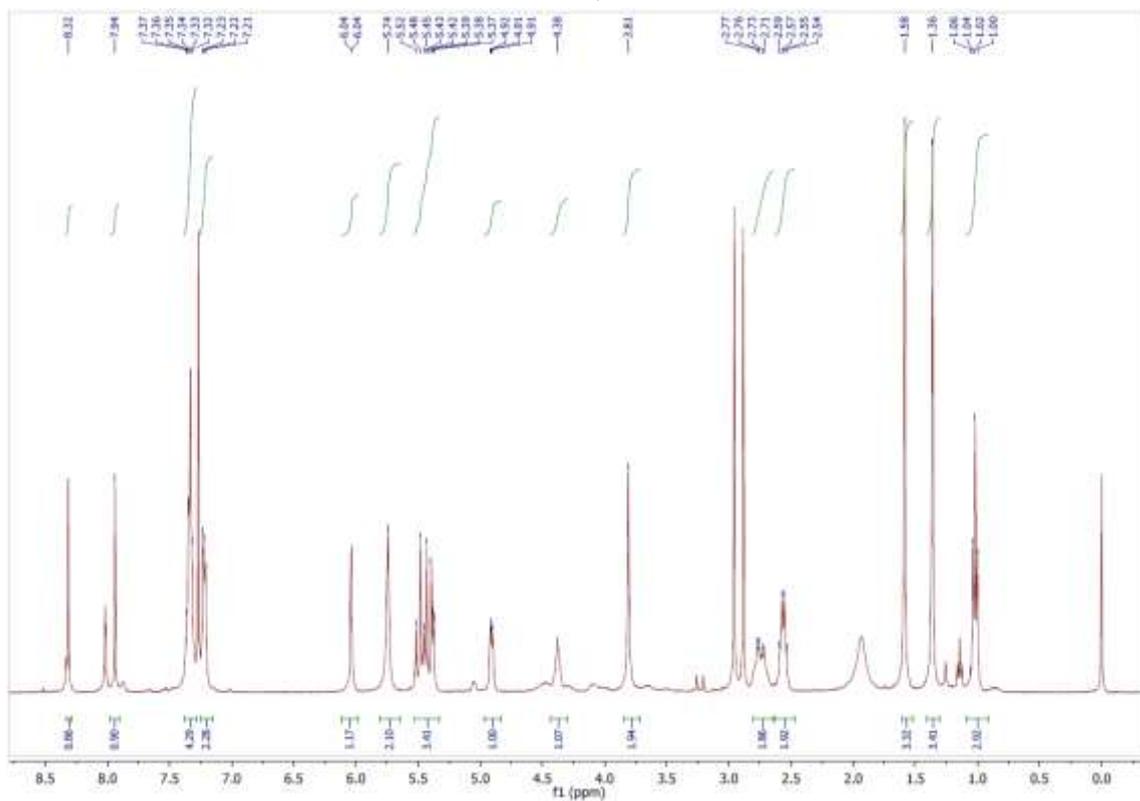
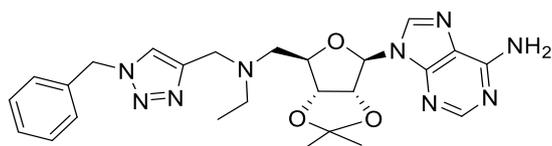
## HSQC-RMN



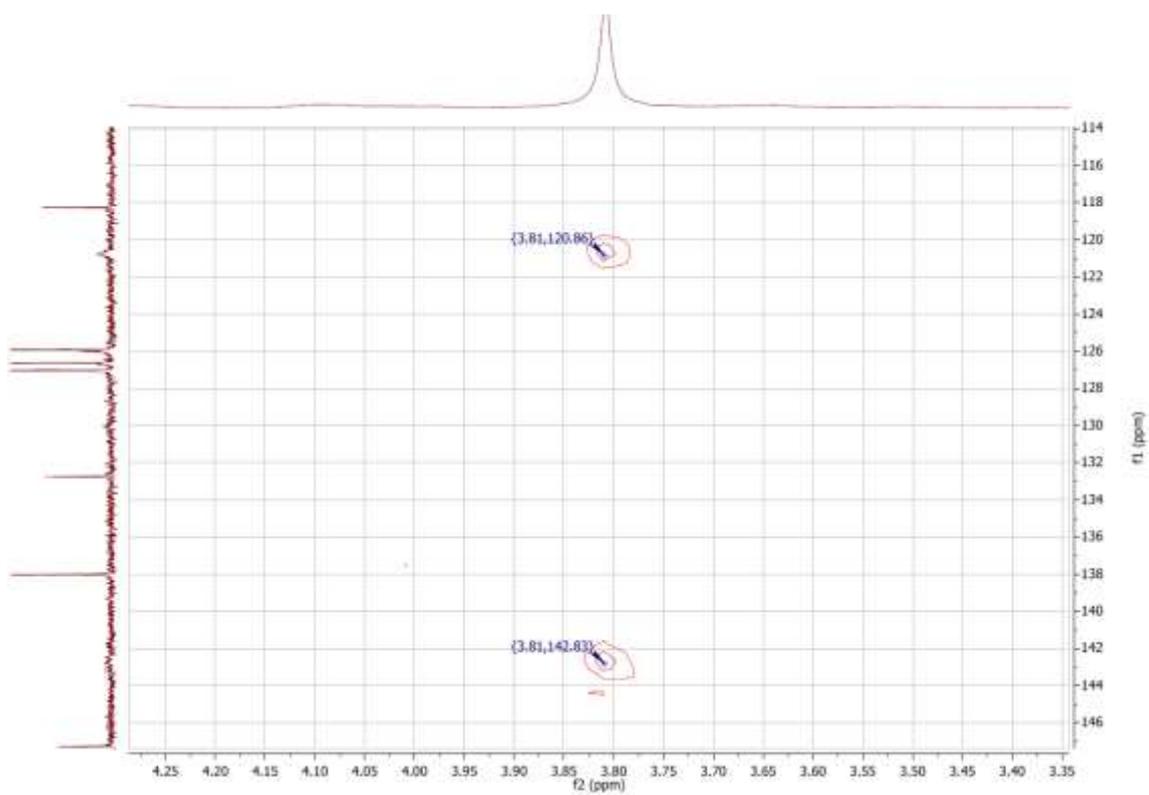


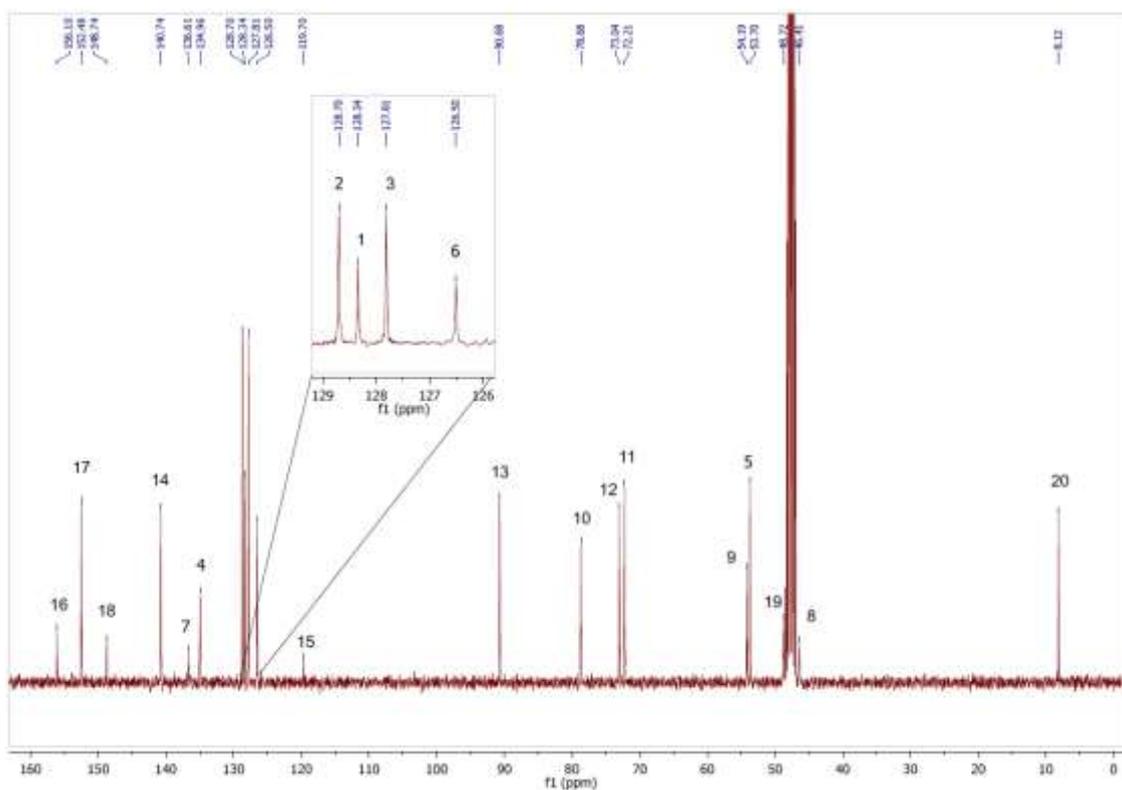
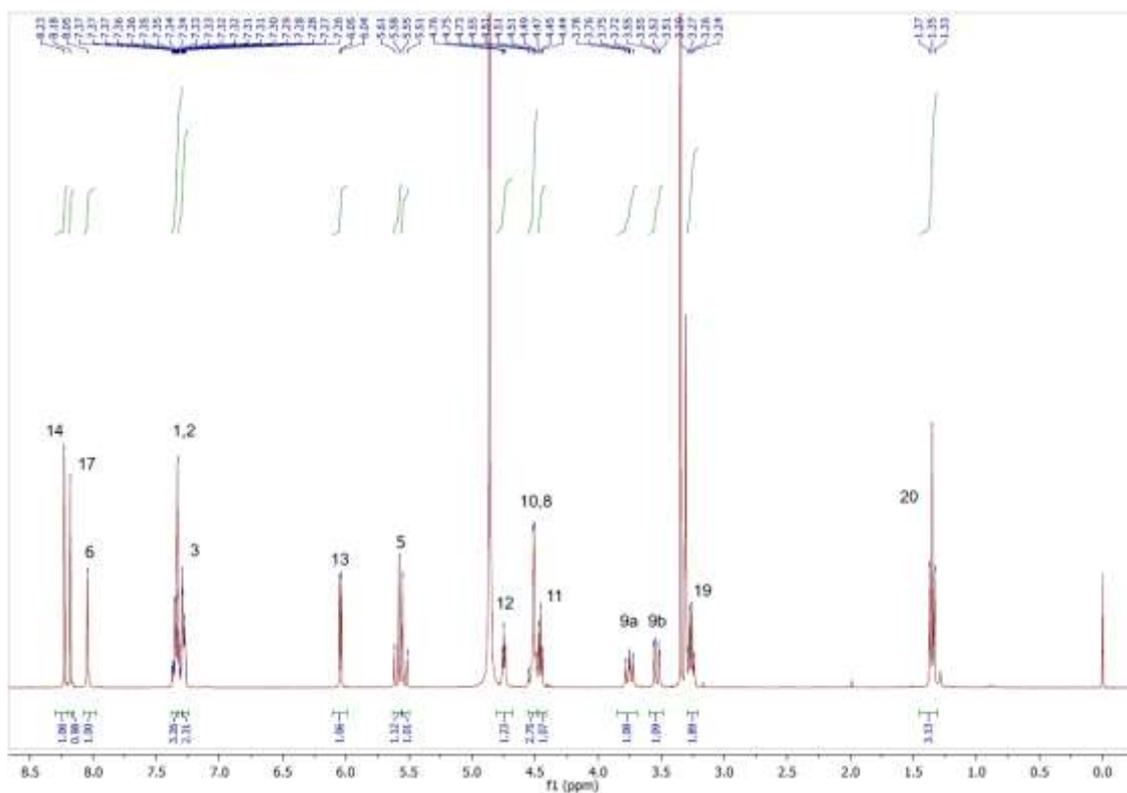
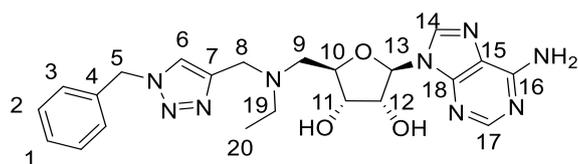




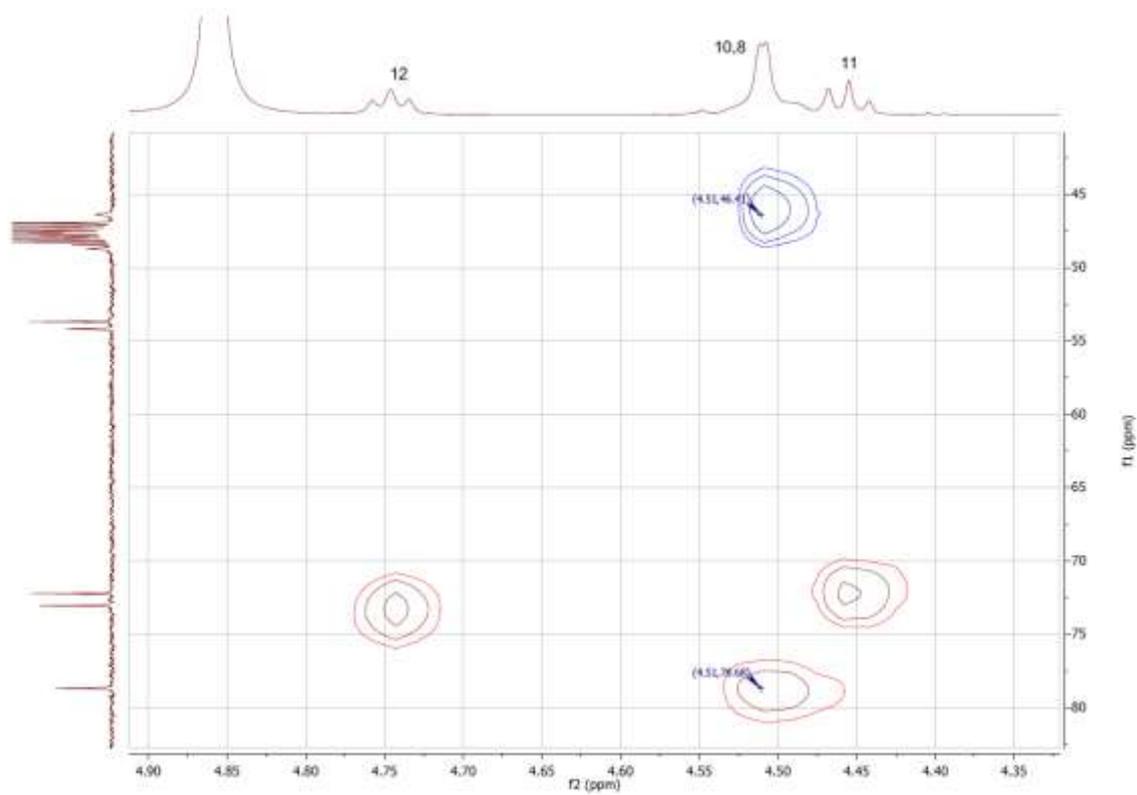


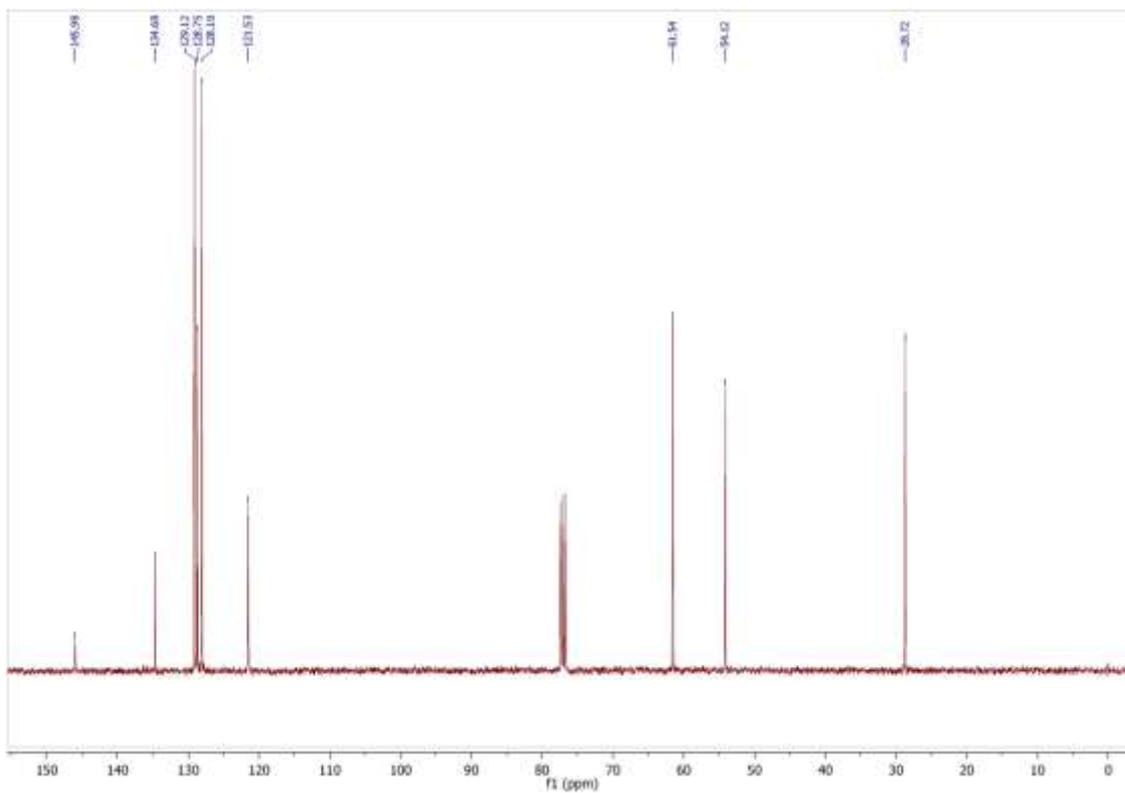
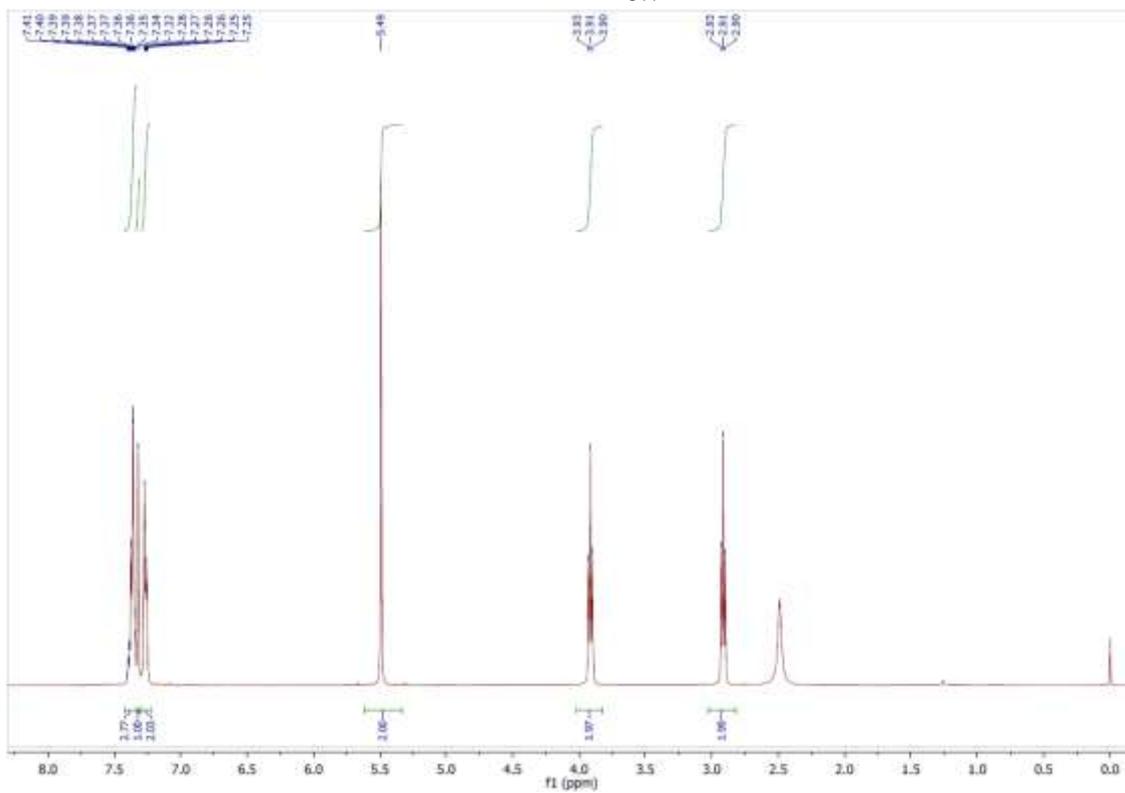
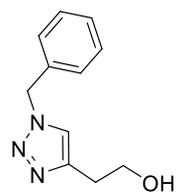
### HMBC-RMN

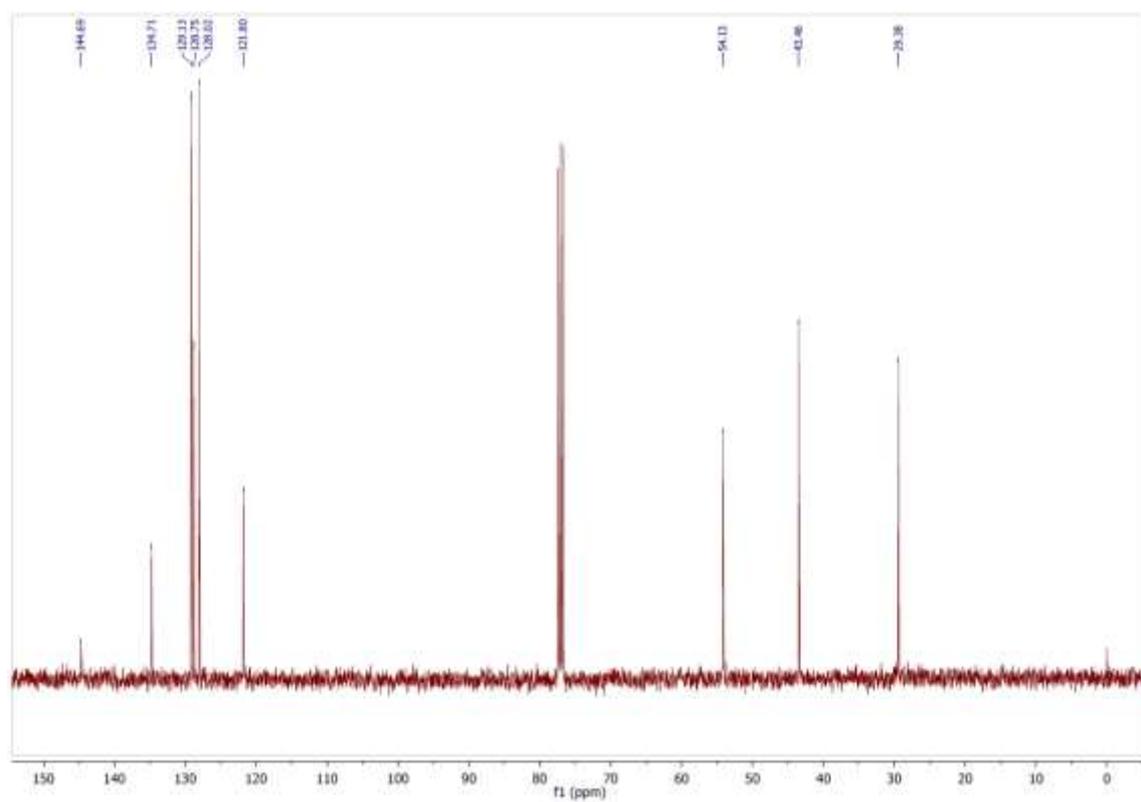
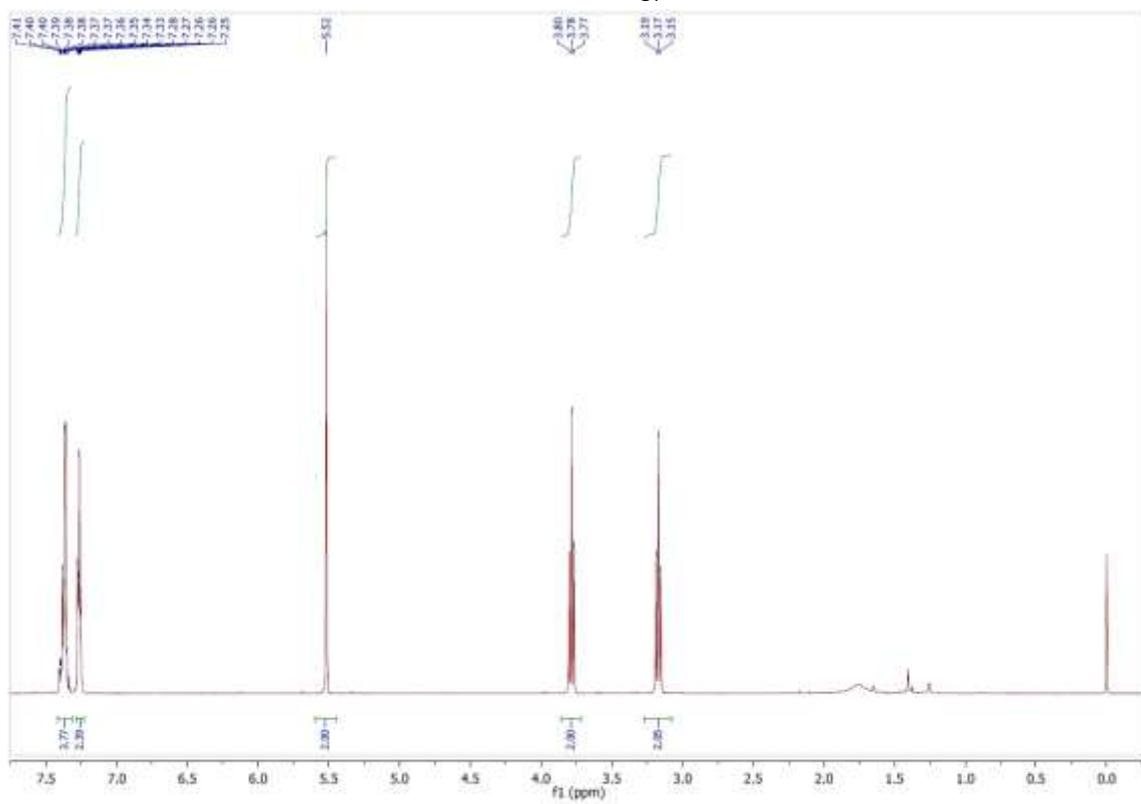
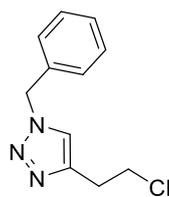




### HSQC-RMN

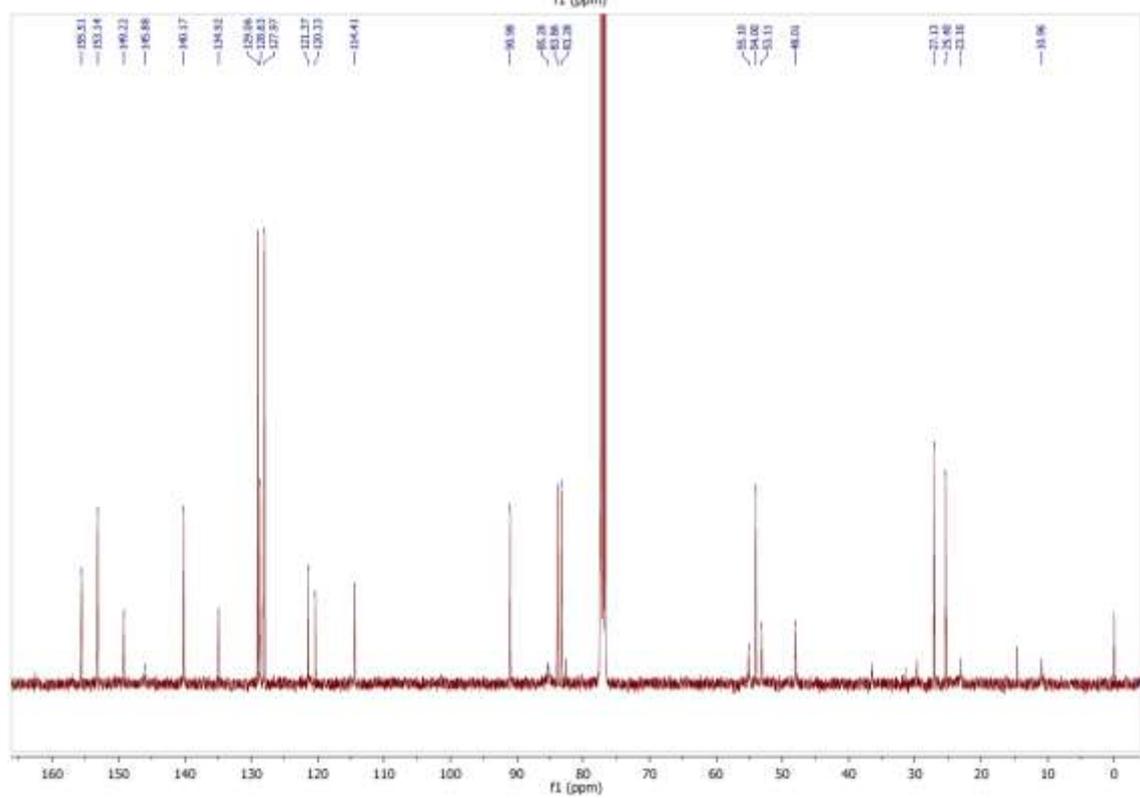
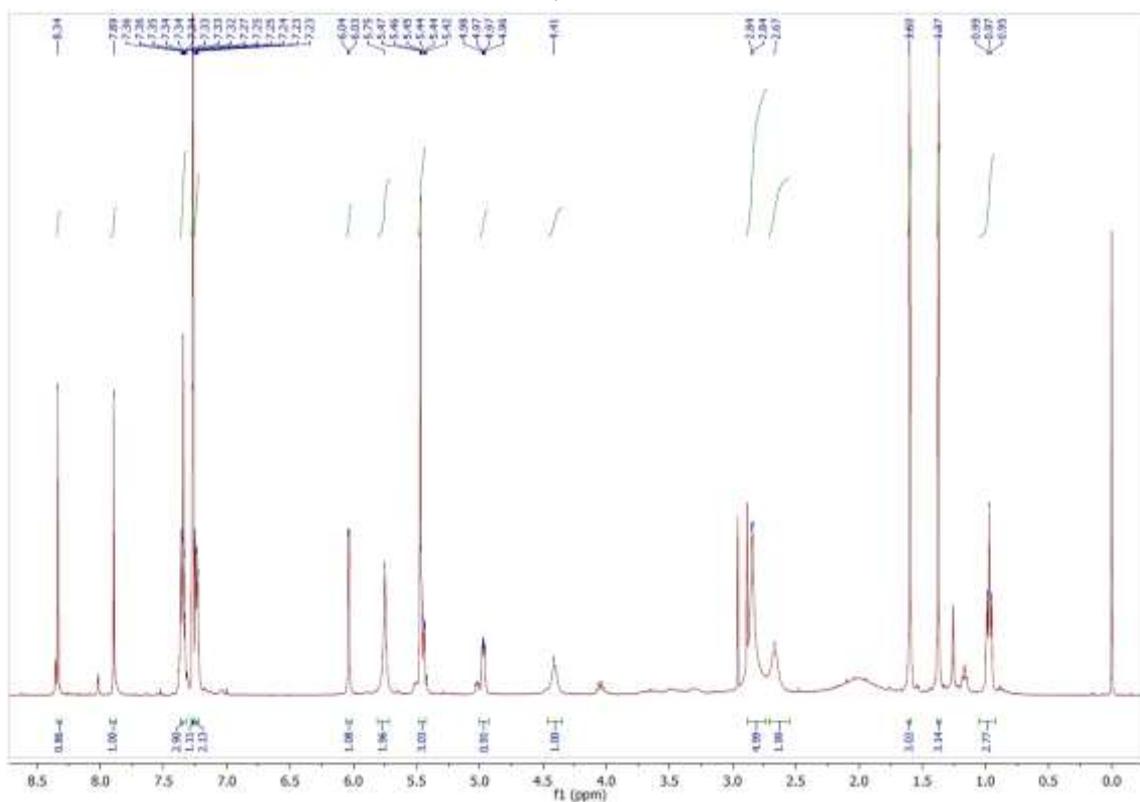
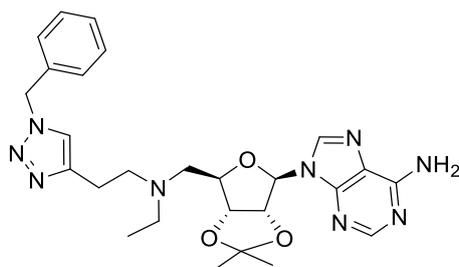




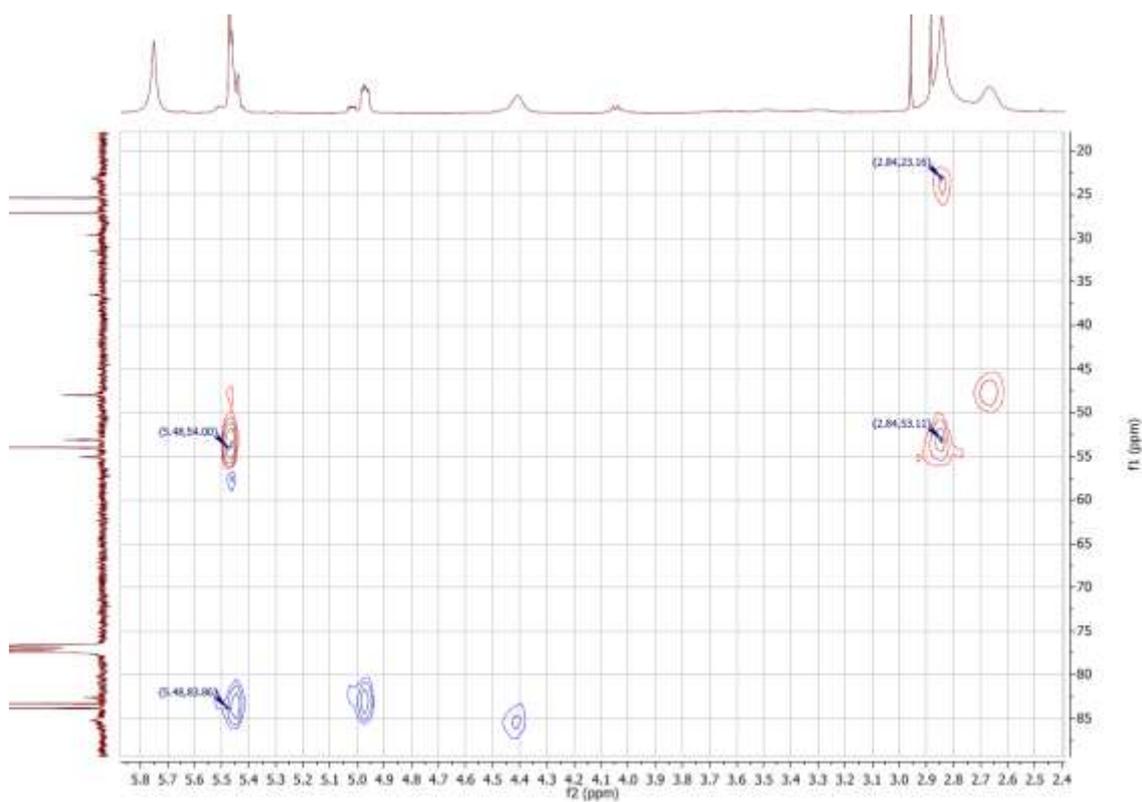


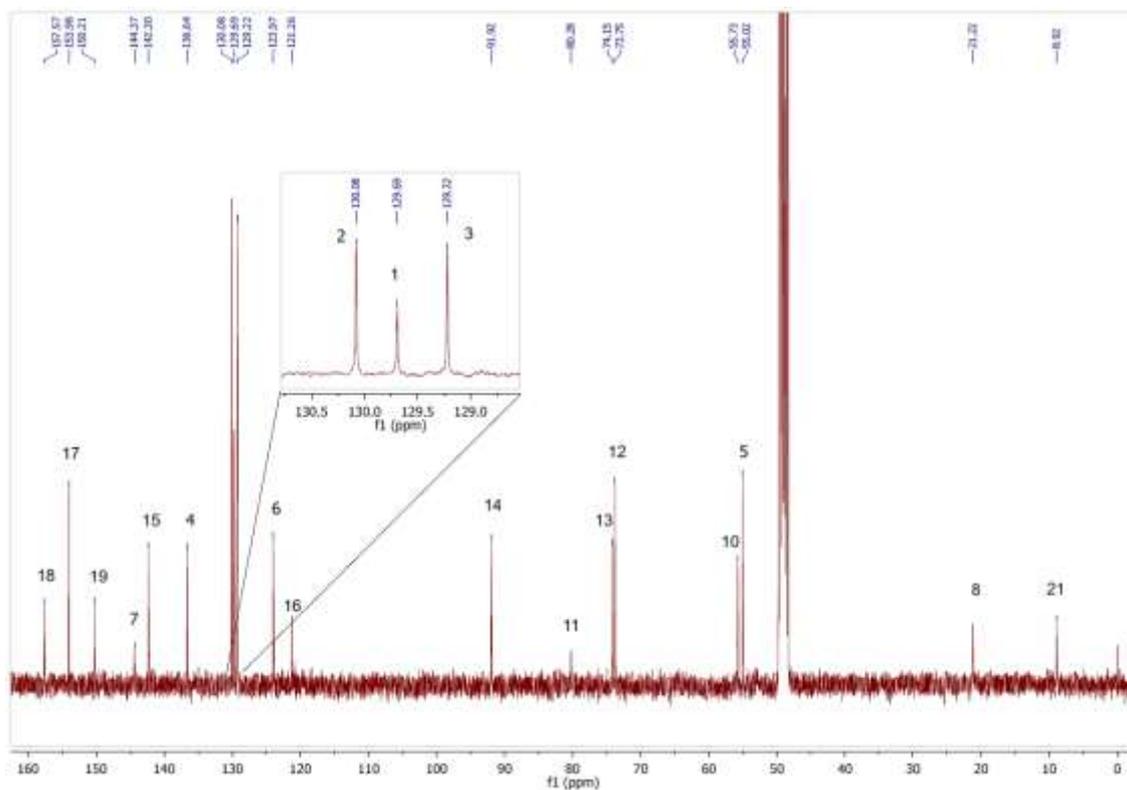
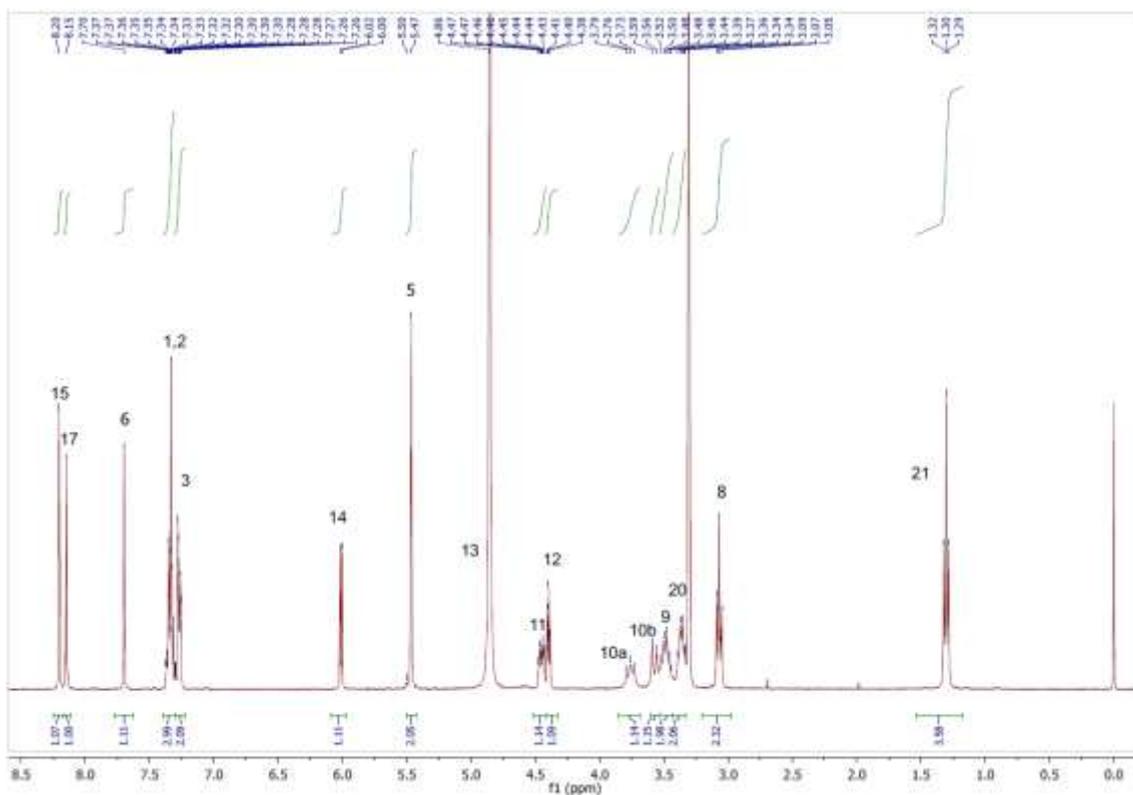
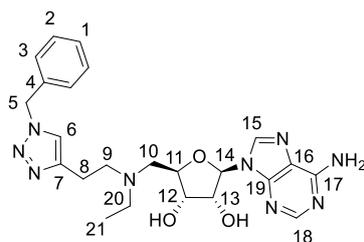




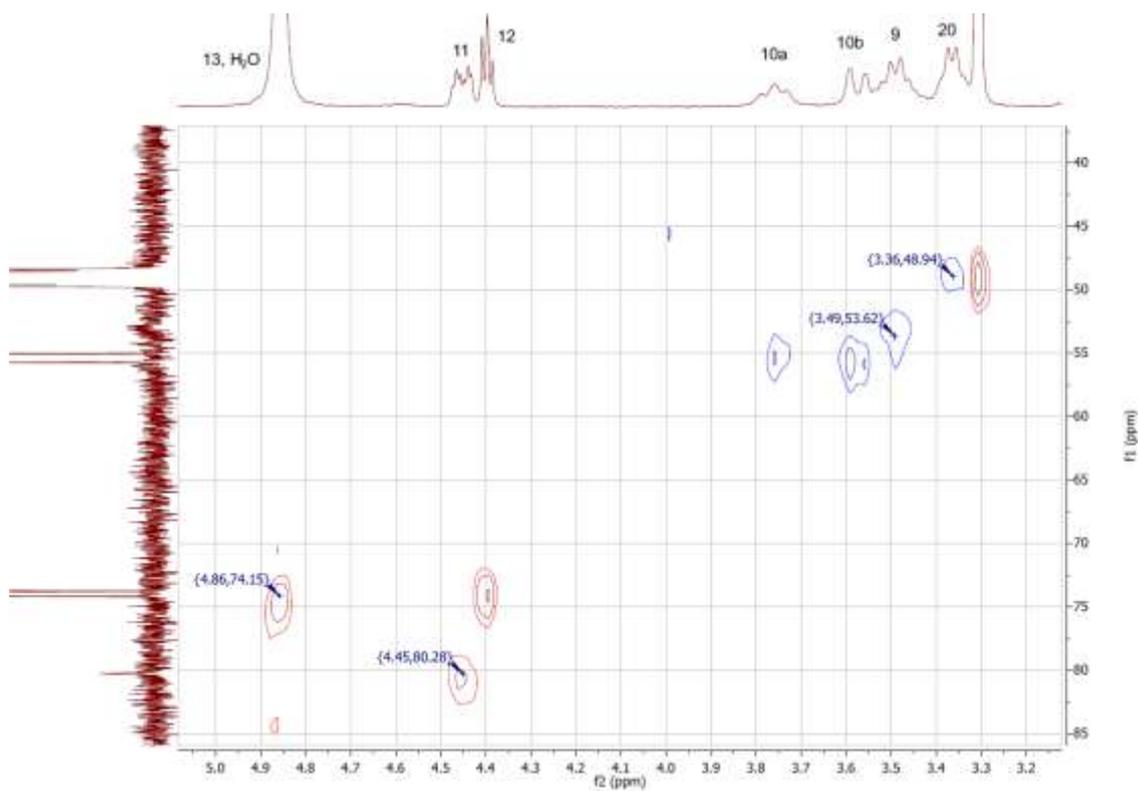


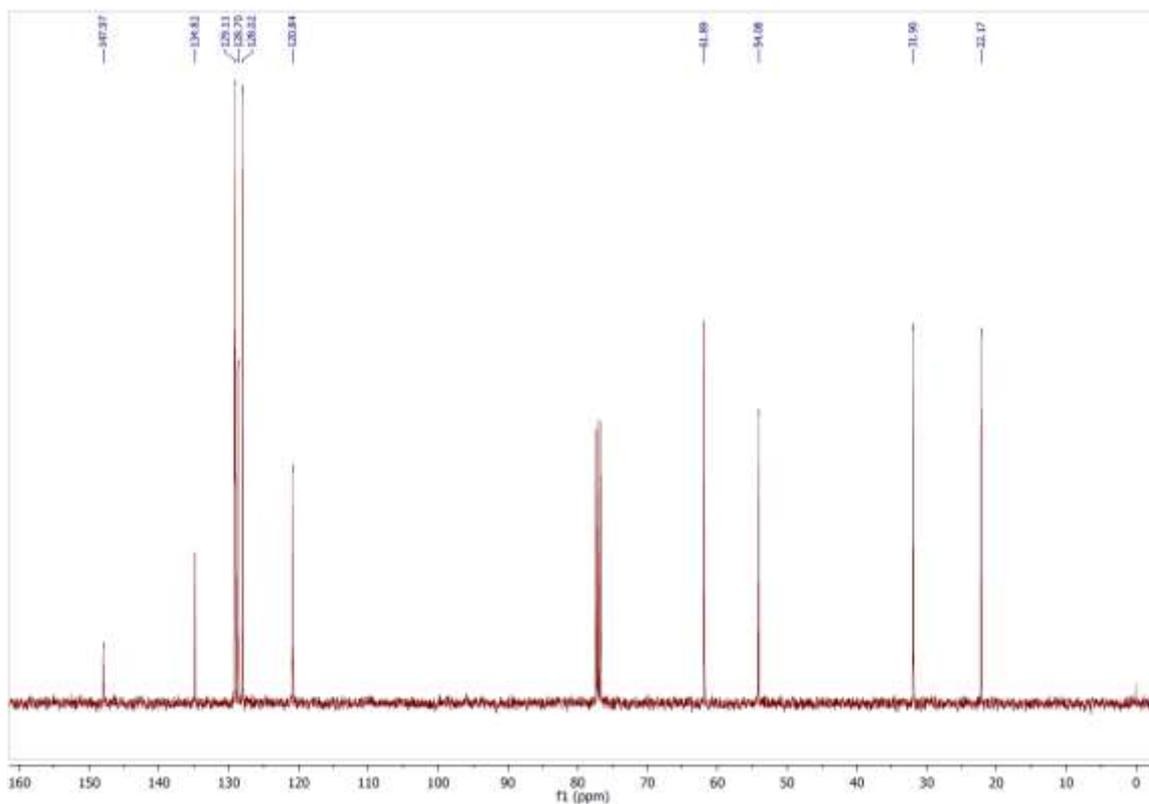
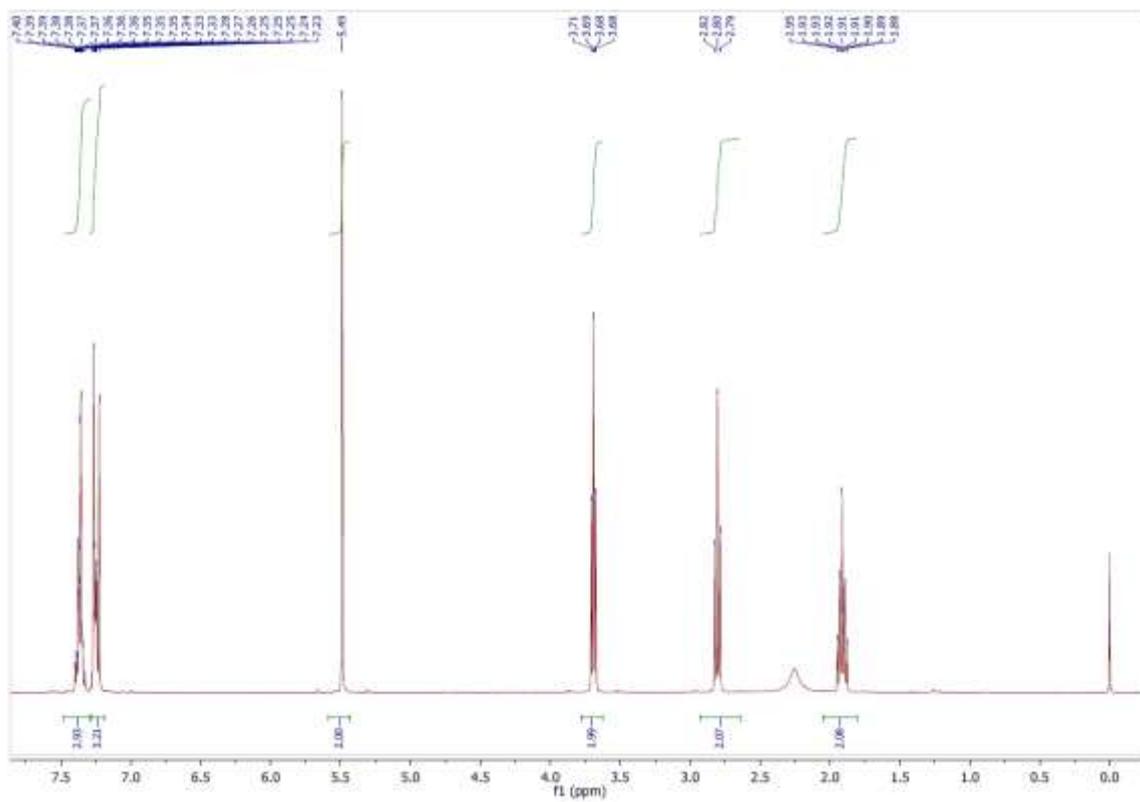
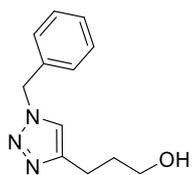
### HSQC-RMN

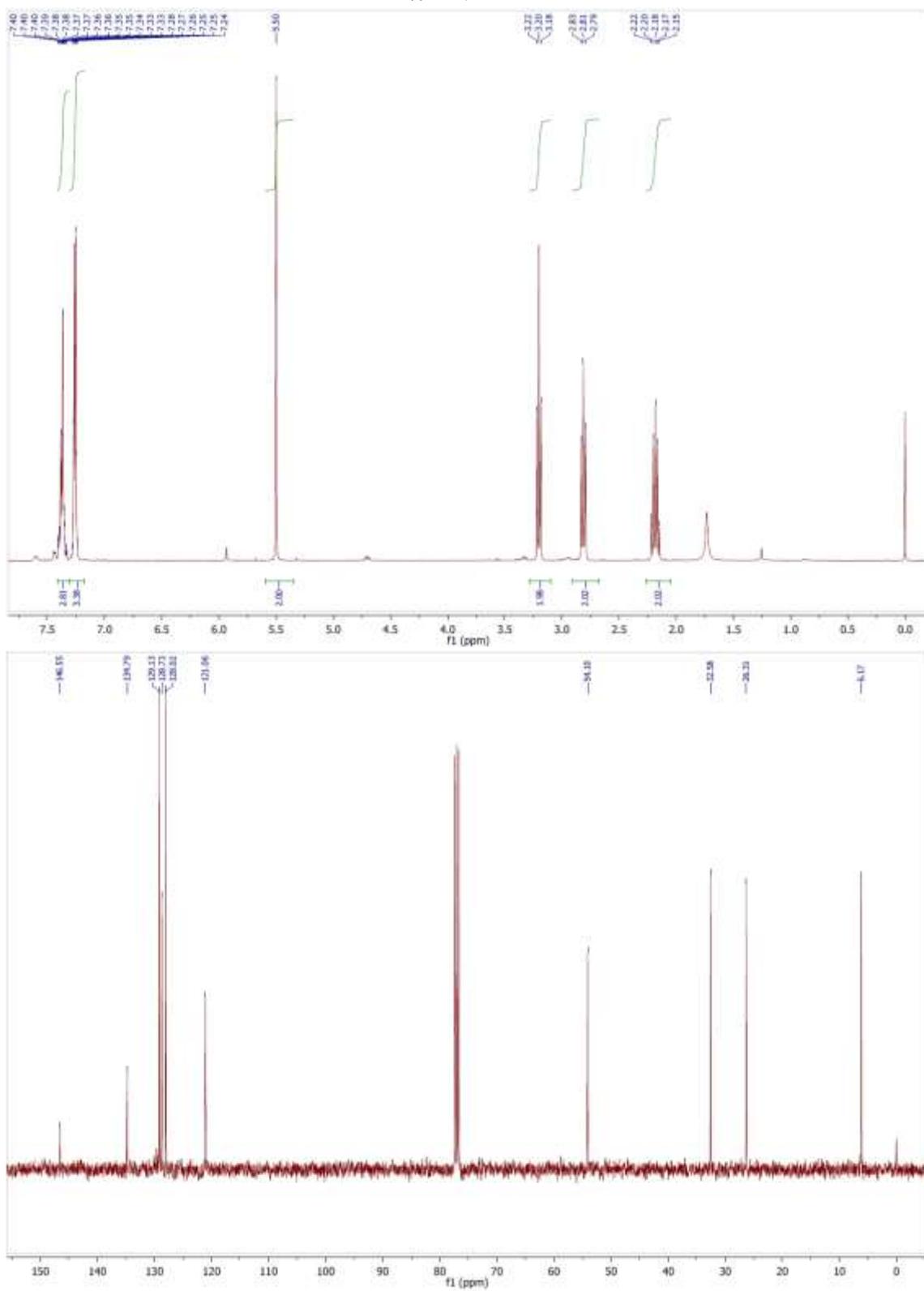
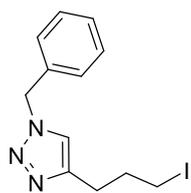


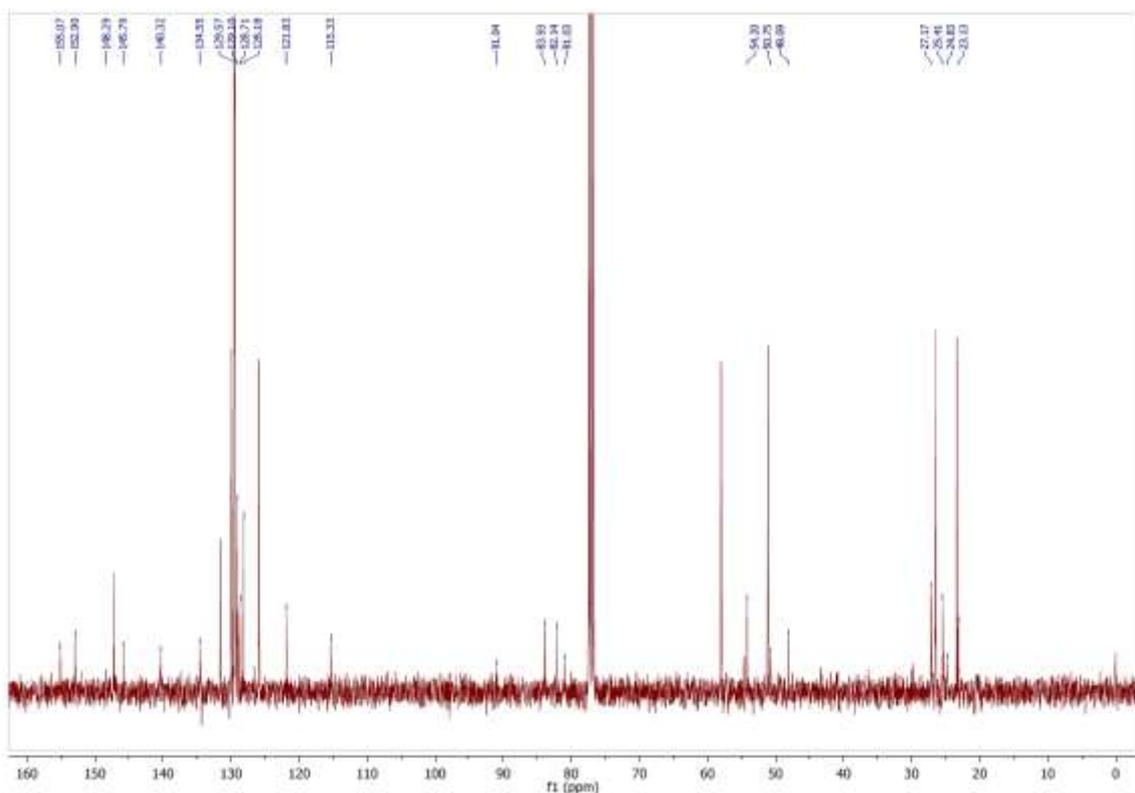
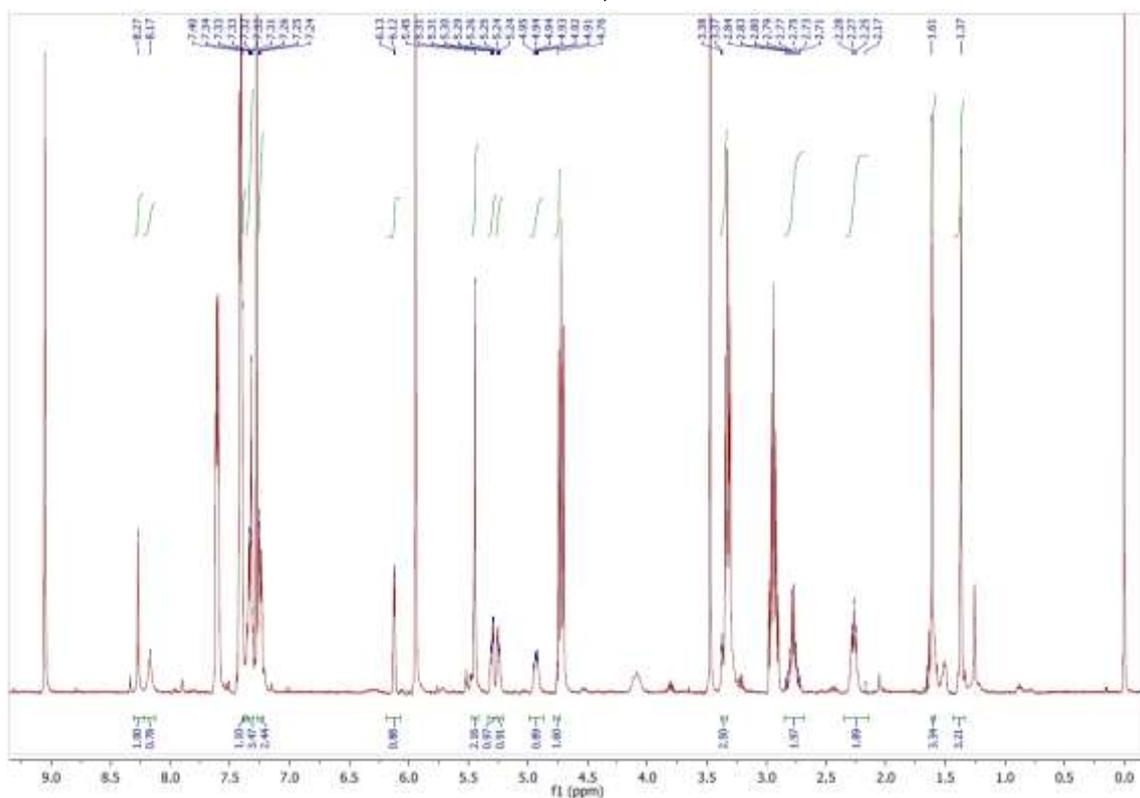
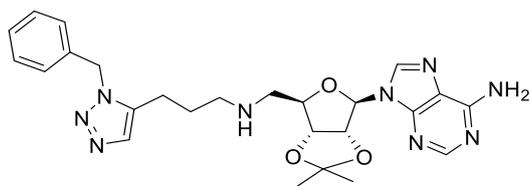


### HSQC-RMN

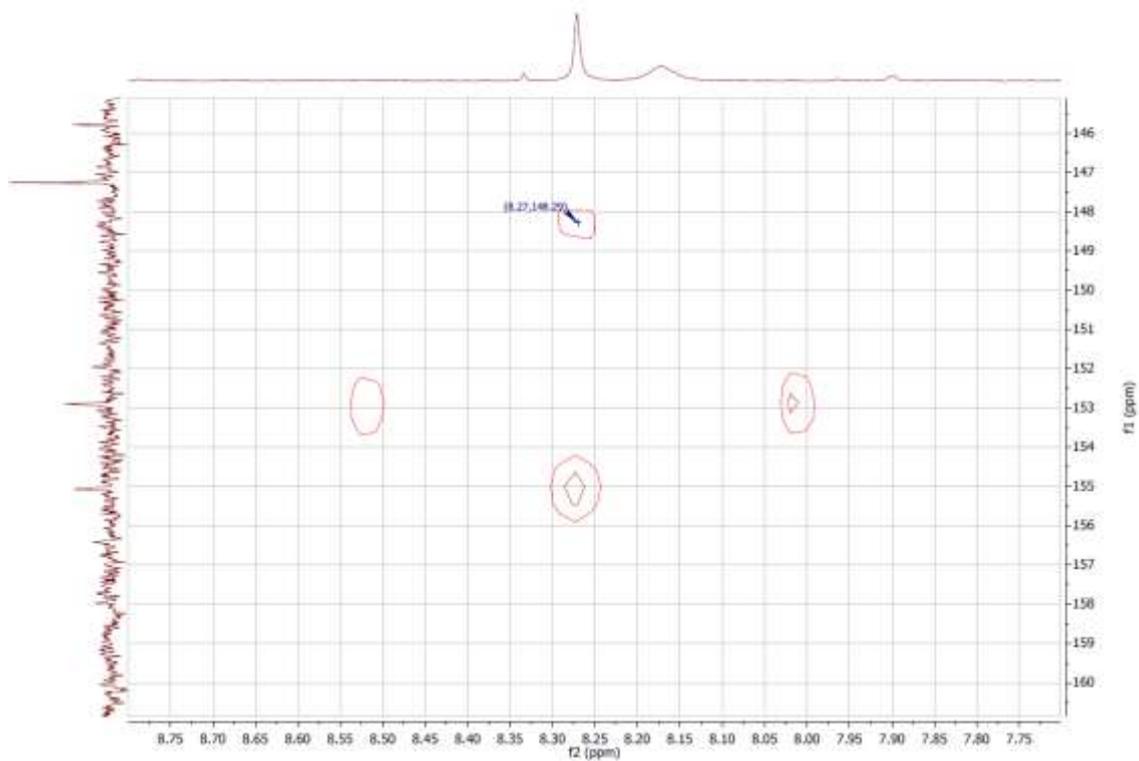


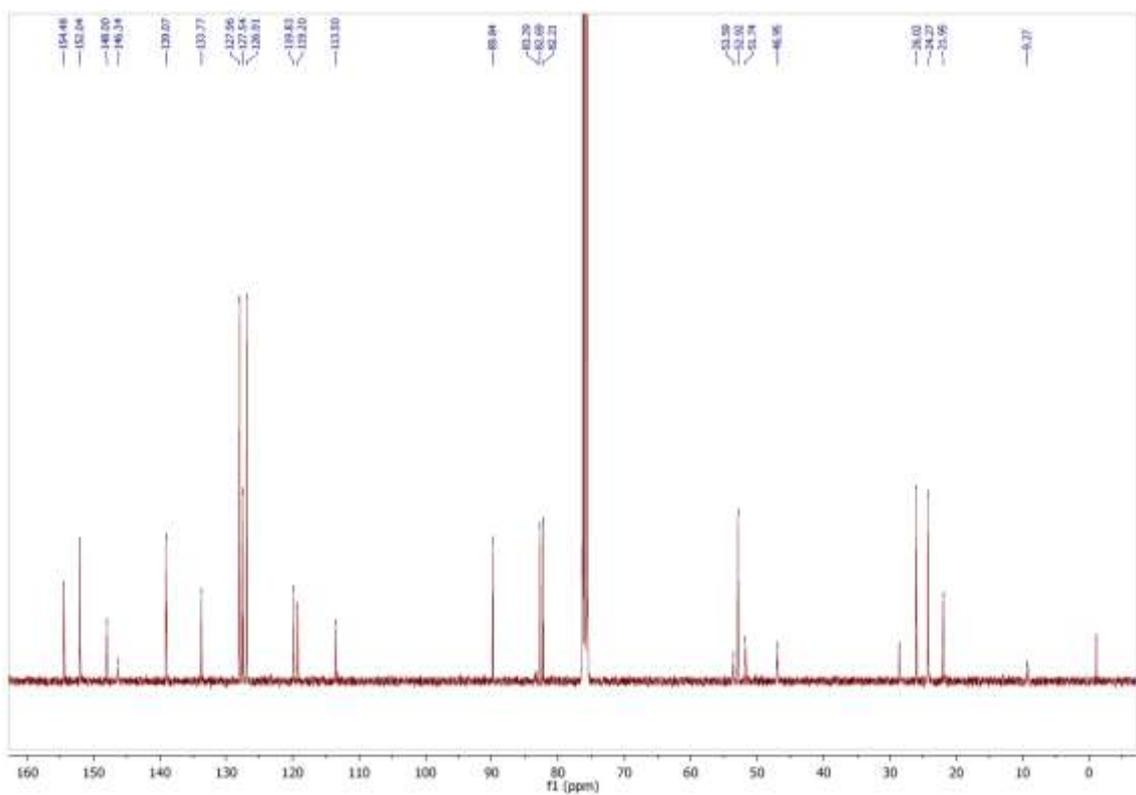
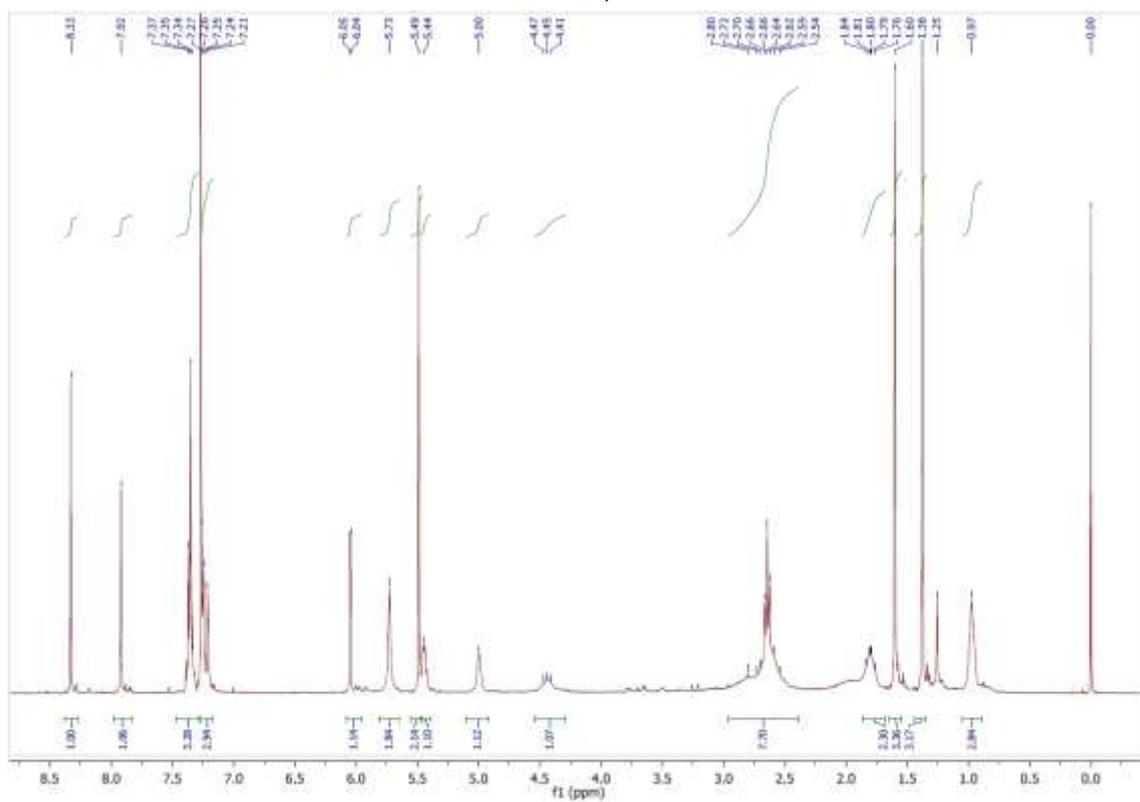
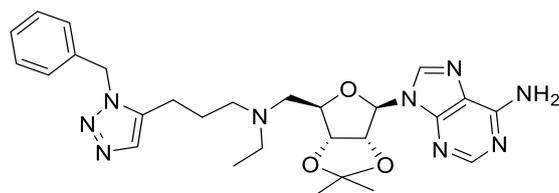




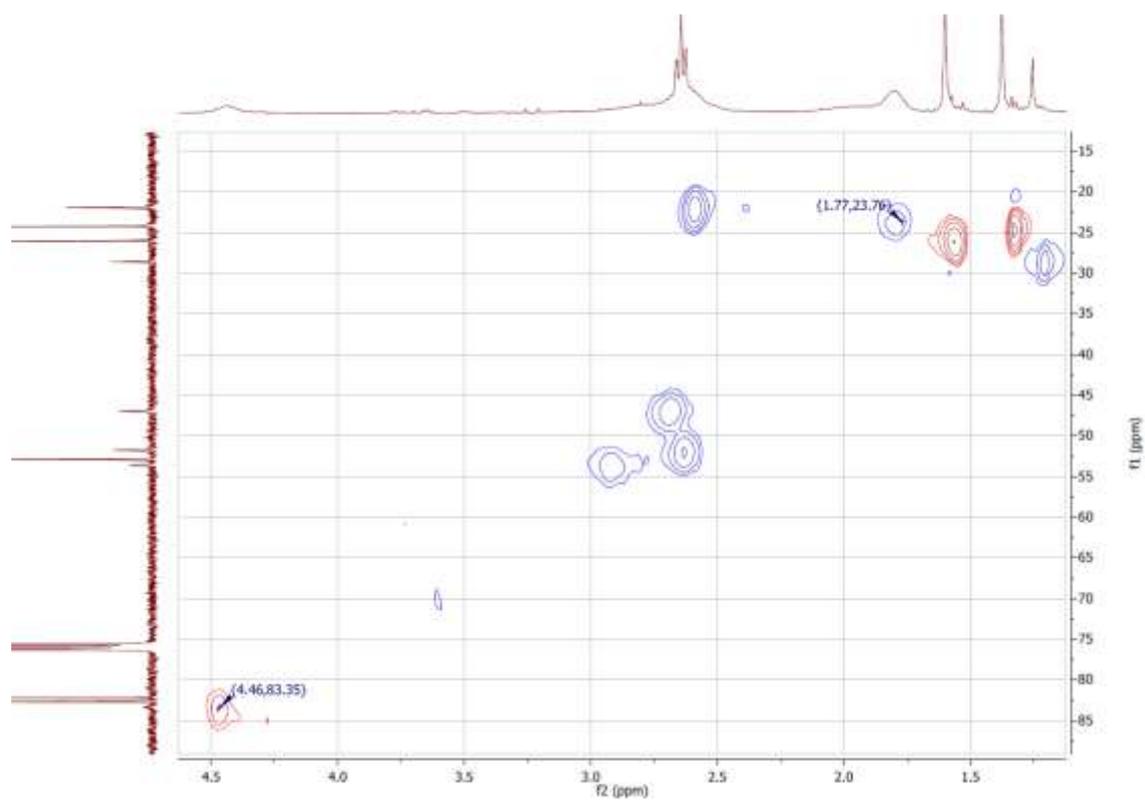


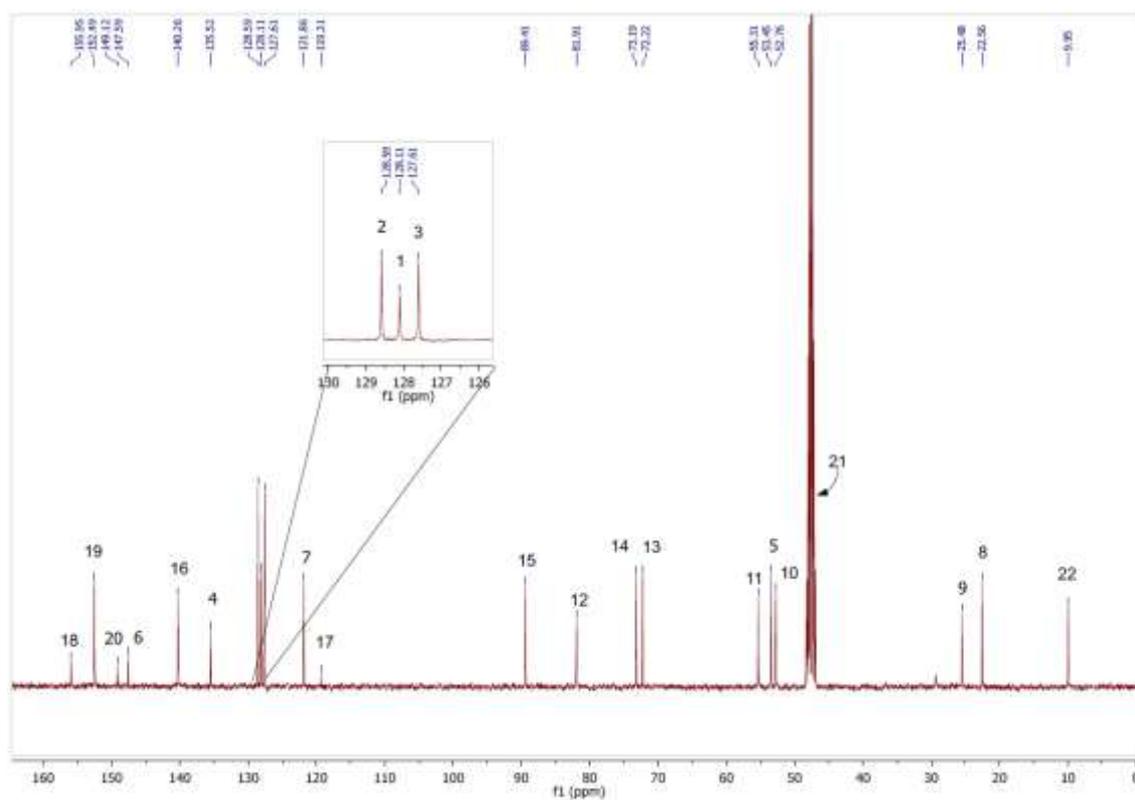
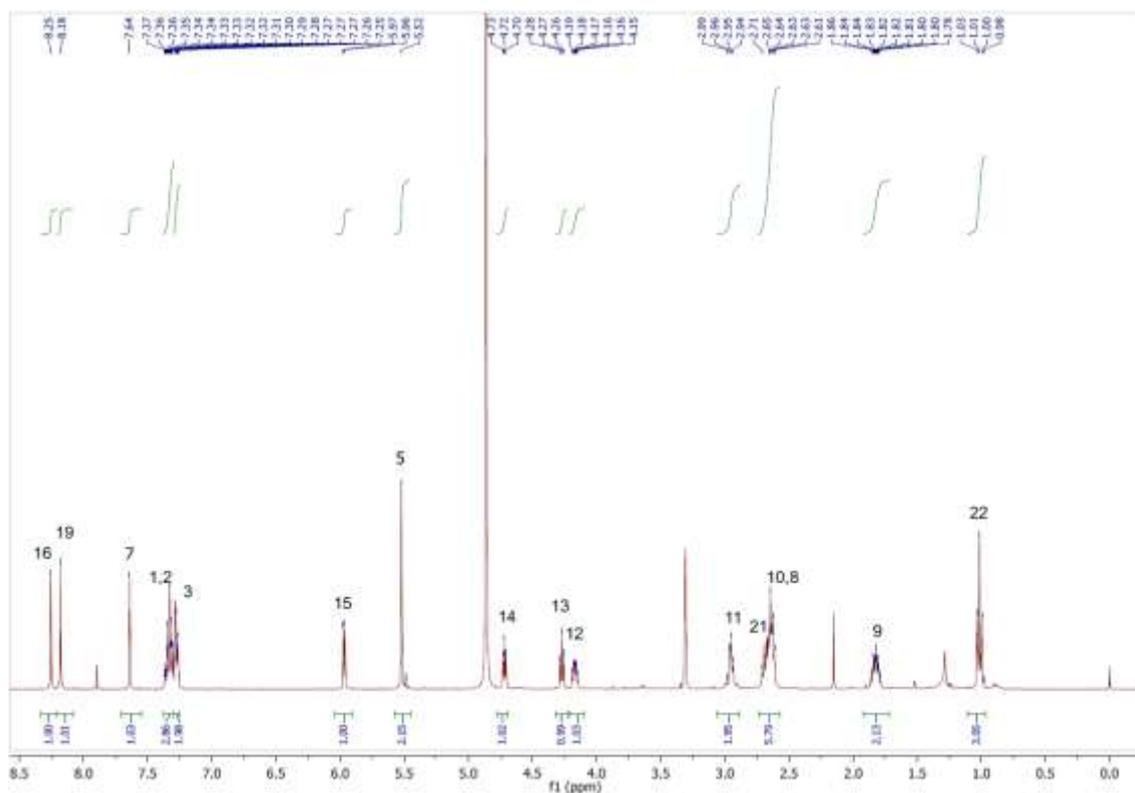
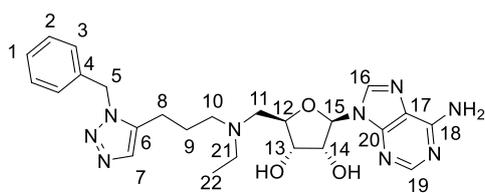
### HMBC-RMN



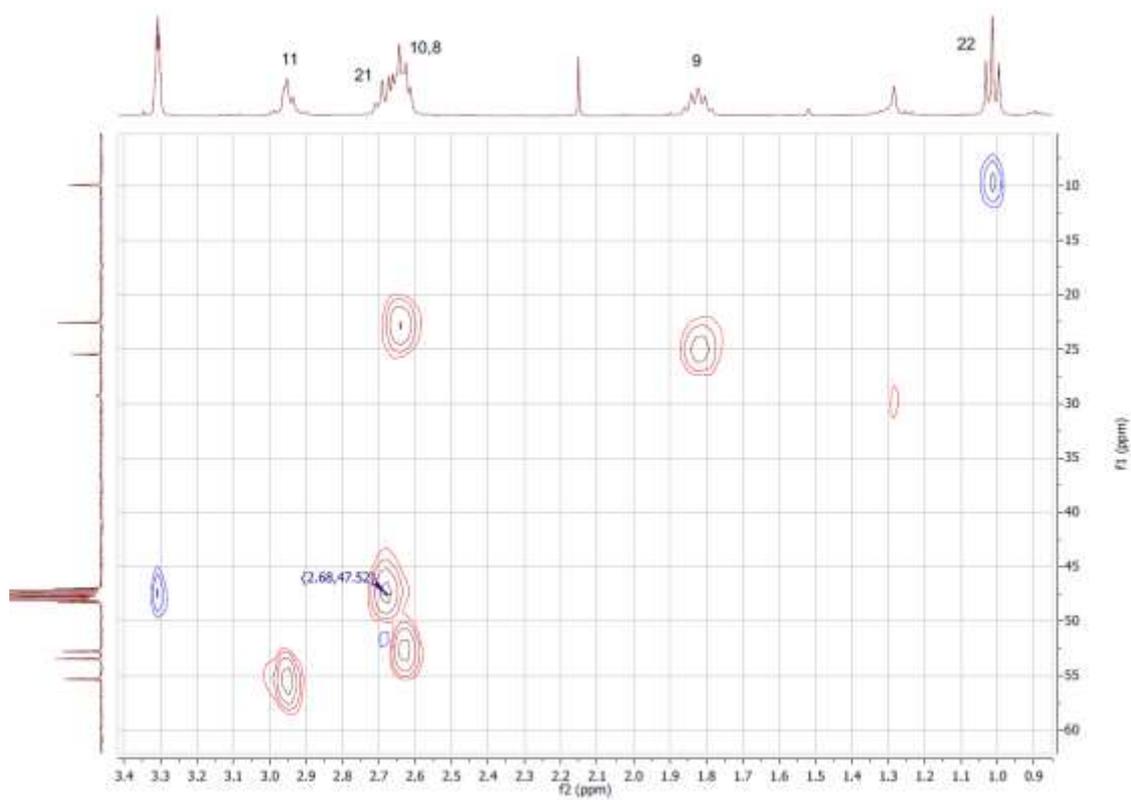


### HSQC-RMN





### HSQC-RMN

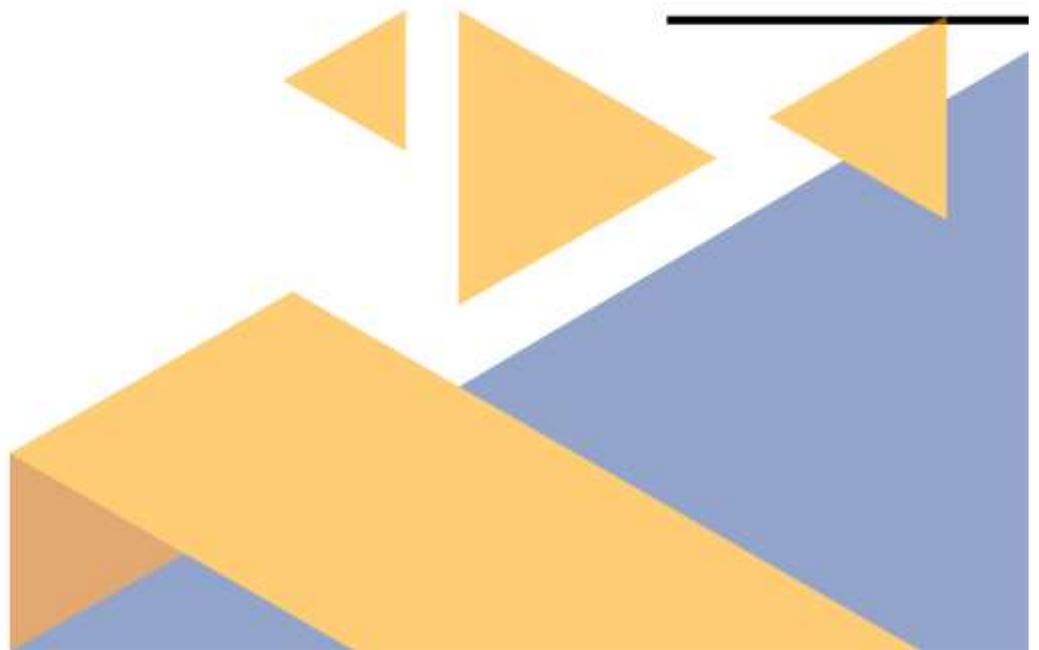






## **Capítulo 6:**

# **Estudios computacionales de los compuestos de interés frente a NS5-Mtasa-Den2**



## Antecedentes

En los últimos años el desarrollo y aplicación de herramientas computacionales en el diseño de fármacos se han incrementado. Estas herramientas, entre otras aplicaciones, permiten predecir propiedades del sistema proteína-ligando que facilitan la propuesta de nuevos inhibidores.

Se pueden seguir varios enfoques al momento de utilizar dichas herramientas, los cuales tienen en común el determinar una relación entre estructura y actividad. Como ventaja principal al utilizar herramientas computacionales se destaca la rapidez en evaluar una gran cantidad de compuestos, acelerando, por ejemplo, la detección de compuestos líderes prometedores. Un claro ejemplo de lo mencionado son los estudios realizados por cribado de alto rendimiento (HTS) y por cribado basado en fragmentos. Estos implican la evaluación de una biblioteca de compuestos o fragmentos (moléculas de menor tamaño), con el fin de determinar las posibles interacciones frente al blanco enzimático de interés. Gracias a la automatización del proceso, se pueden evaluar una gran cantidad de compuestos a gran velocidad.<sup>1</sup>

Para el estudio de estas interacciones proteína-ligando, así como también para la evaluación de los compuestos seleccionados, se han desarrollado varias técnicas computacionales con algoritmos sofisticados.<sup>2,3</sup> Algunas de estas son:

1- Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR): Es una técnica que busca relacionar las características estructurales y las cualidades físicas y químicas de los compuestos con la actividad experimental que estos presentan frente al blanco de interés. Esto se logra utilizando descriptores para la obtención de una ecuación matemática que cumpla dicho propósito.

---

1 Shah, M.; Patel, M.; Shah, M.; Patel, M.; Prajapati, M. *Intell. Pharm.* **2024**, 2 (5), 589–595.

2 Lin, X.; Li, X.; Lin, X. *Molecules* **2020**, 25 (6), 1375.

3 Naithani, U.; Guleria, V. *Front. Drug Discov.* **2024**, 4, 1362456.

- 2- Acoplamiento molecular (docking): Se busca predecir la orientación adecuada del ligando respecto al receptor y las fuerzas que permiten dicha unión. Con el fin de obtener un complejo proteína-ligando para el análisis de las interacciones existentes. Este estudio de docking se puede realizar de varias formas: 1) docking rígido, donde la disposición de la molécula no cambia; 2) docking semiflexible, donde las moléculas varían en cierto rango. En general el receptor se mantiene rígido y la molécula percibe los cambios conformacionales; 3) docking flexible, donde el grado de libertad se aplica a todo el sistema de simulación.
  
- 3- Dinámica molecular (MD): permite realizar un desarrollo dinámico del complejo proteína-ligando para evaluar su estabilidad, donde se simula el movimiento de las moléculas a lo largo del tiempo, con el fin de obtener información sobre la estabilidad, interacción y cambios conformacionales del complejo proteína-ligando.

Al utilizar estas técnicas se crea un modelo computacional que se aplica al sistema proteína-ligando de interés, el cual debe ser optimizado en sus etapas iniciales. Estos modelos, pueden emplear una o varias técnicas que generalmente necesitan de un componente empírico. De esta forma, se logra alcanzar un modelo de predicción de mayor precisión para el problema en estudio.

Cabe destacar que las métricas más utilizadas para la evaluación de los resultados obtenidos al emplear el modelo computacional son la desviación cuadrática media y la fluctuación cuadrática media.<sup>4</sup> El cálculo de los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) se utilizan al medir las diferencias entre conformaciones o estructuras, mientras que los valores de fluctuación cuadrática media (RMSF) se utilizan para medir el desplazamiento de un átomo o grupo de átomos en particular. Como regla general, mayores valores de RMSD representan una diferencia mayor entre las estructuras comparadas, mientras que mayores valores de RMSF representan una mayor flexibilidad del sistema.

---

4      Martínez, L. *PLOS ONE* 2015, 10 (3), e0119264.

## 6.1. Primeras aproximaciones al modelo de docking.

Como primera aproximación al modelo de docking, se comenzó con la búsqueda en el pdb de una estructura cristalina adecuada. Se seleccionó del pdb la estructura cristalina 1L9K, que presenta a la enzima de interés NS5-Mtasa-Den2 co-cristalizada con el SAH en el bolsillo del co-factor. Posteriormente, se comenzaron las primeras pruebas para la puesta a punto del modelo computacional de docking, lo que incluyó la elección del programa de docking así como, la optimización del modelo.

### 6.1.1. Elección del programa:

Se utilizaron varios programas de simulación de docking con el fin de encontrar el más adecuado para nuestro sistema. Esto se llevó a cabo ya que cada uno de éstos presenta diferentes algoritmos de posicionamiento y minimización de las poses generadas.

Lo que se buscó, en una primera aproximación, fue recrear la pose que adopta el ligando al estar co-cristalizado con la proteína. Para esto se trató el archivo del cristal, donde se eliminaron las moléculas de agua y sales presentes para luego aplicar una minimización de energía (Ver parte experimental). A esta estructura se la denominó **1L9K-1**. Por otra parte, se extrajo la estructura del SAH presente en el cristal, sin alterar la conformación del mismo y se la designó como **SAH-1L9K**.

Los programas utilizados fueron: MOE, Autodock,<sup>5</sup> y Autodock-Vina.<sup>6</sup> Al utilizar estos 3 programas con las condiciones estándares que presentan cada uno de ellos, no se pudo recrear la pose del SAH presente en el cristal reportado en el pdb (datos no mostrados). Por este motivo se recurrió a la estrategia de utilizar

---

5 Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30 (16), 2785–2791.

6 Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (2), 455–461.

el programa MOE acoplado los algoritmos del programa GOLD,<sup>7</sup> para realizar las simulaciones de docking. Con estas nuevas condiciones fue posible recrear la pose del SAH co-cristalizado (SAH-1L9K) reportada en el pdb (1L9K). Al calcular el valor de RMSD de la pose de docking obtenida en estas condiciones en relación con la pose reportada en el cristal, se obtuvo un valor de 0.7482 Å, lo cual es un valor aceptable para continuar con las siguientes etapas. (Figura 6.1)

En general, en estudios computacionales se considera que todo valor de RMSD menos a 2 Å es aceptable para determinar que dos estructuras son muy similares.<sup>8</sup>

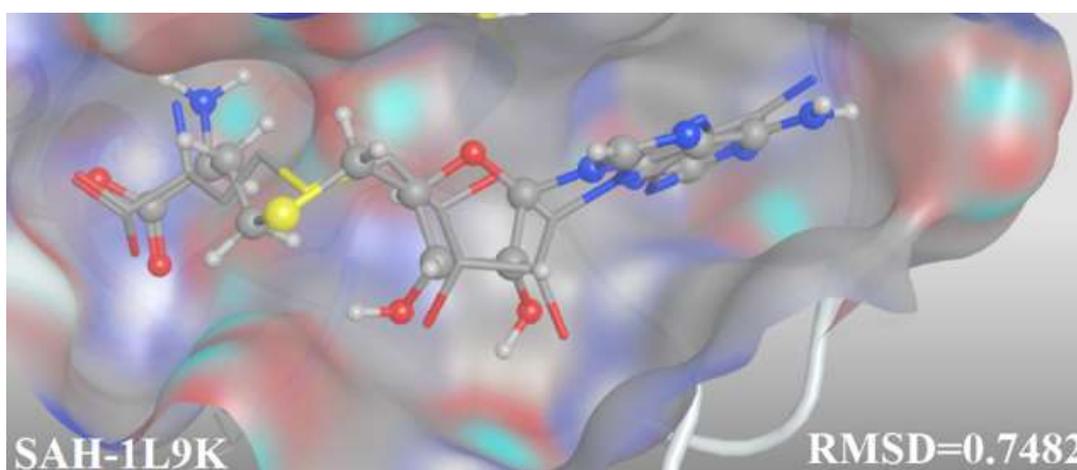


Figura 6.1: Pose de docking lograda con MOE-GOLD superpuesta a la estructura de SAH reportada en el cristal.

En base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar este acople de los programas MOE-GOLD para continuar con la optimización del modelo de docking a utilizar.

7 Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2003**, 52 (4), 609–623.

8 Castro-Alvarez, A.; Costa, A.; Vilarrasa, J. *Molecules* **2017**, 22 (1), 136.

## 6.1.2. Optimización del modelo de docking:

### 6.1.2.1. Conformación de partida:

Una vez seleccionado el programa, se decidió probar distintas posiciones iniciales en la conformación del ligando, ya que al utilizar la misma conformación que presenta el ligando en la estructura cristalográfica se agrega un sesgo en los resultados obtenidos. Se realizaron dos experimentos de docking para determinar la influencia de la conformación de partida, utilizando como sitio de posicionamiento el SAH del cristal.

- 1) El primero se realiza con el ligando extraído del cristal, sometido a una minimización de energía con MOE (SAH-1L9K-Minimizado).
- 2) El segundo es la estructura del SAH dibujada utilizando el programa Chemdraw, también sometido a una minimización de energía con el programa de MOE (SAH-Chemdraw-Minimización).

Las poses resultantes fueron superpuestas a la del cristal y se les calculó el valor de RMSD. A modo de comparación, se agregaron los resultados obtenidos para SAH-1L9K, el primer ensayo realizado (Tabla 6.1 y Figura 6.2).

1L9K-1	
Estructura	RMSD (Å)
SAH-1L9K	0.7482
SAH-1L9K-Minimizado	0.9566
SAH-Chemdraw-Minimizado	1.1516

Tabla 6.1: Valores de RMSD en Å de la mejor posición de docking obtenida al utilizar la enzima 1L9K-1 y diferentes conformaciones de partida del SAH respecto a la posición reportada del SAH en la estructura del pdb (1L9K).

Se puede observar como la mejor pose obtenida de docking se presenta al utilizar el ligando en la conformación reportada en cristal, lo que era de esperar ya que se está partiendo de la posición a la que se quiere llegar. Por otra parte, los resultados de las demás conformaciones son alentadores, ya que no presentaron grandes diferencias a la pose de referencia del SAH reportada en el cristal. Como ya se mencionó, un valor de RMSD de 2 Å se considera aceptable, por lo cual los resultados obtenidos en los tres casos se consideraron aceptables. En particular, la pose de inicio utilizada en SAH-Chemdraw-Minimizado es la que presenta menos sesgo, sumado al hecho de que nuestros compuestos de interés tendrán este mismo tratamiento, se decidió optar por esta conformación de partida al evaluar los compuestos de interés.

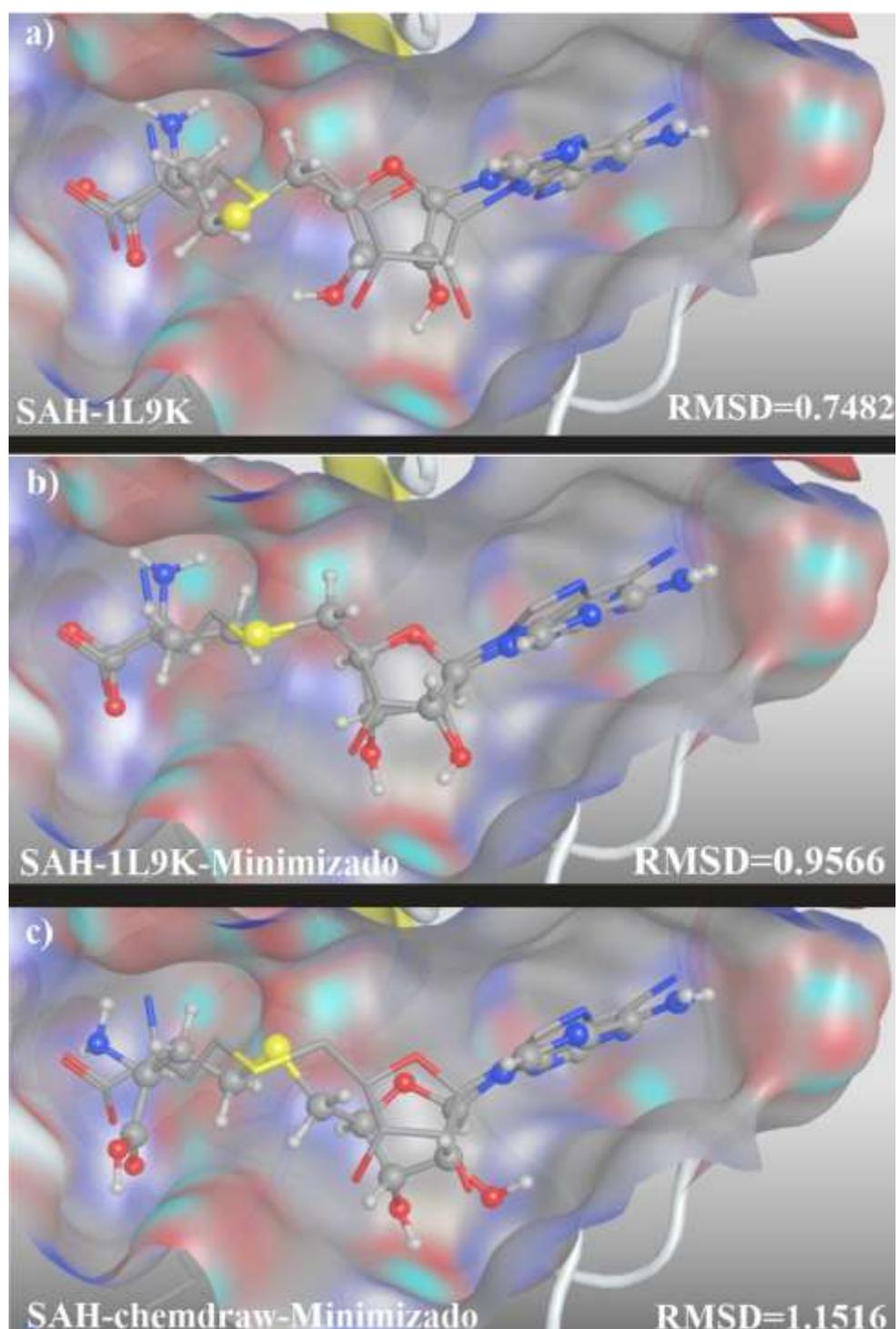


Figura 6.2: Mejor pose de docking obtenida para el SAH en distintas conformaciones de partida superpuestas al SAH del cristal, con su correspondiente valor de RMSD (Å). Este docking se realizó con la enzima 1L9K-1, utilizando como sitio de posicionamiento el SAH del cristal. a) SAH-1L9K: SAH con la conformación proveniente del pdb, b) SAH-1L9K-Minimizado: SAH proveniente del pdb al cual se le realizó una minimización de energía con MOE. c) SAH-Chemdraw-Minimizado: estructura dibujada en el chemdraw y sometida a una minimización de energía con MOE.

### 6.1.2.2. Optimización del bolsillo a utilizar:

A pesar de lo prometedor de los datos anteriores, se decidió mejorar la predicción de las poses de docking, ya que, al tratarse de estructuras cristalizadas, presentan aguas residuales que son propias de este proceso y pueden interferir al momento de encontrar la mejor pose.

En una primera instancia se decidió eliminar todas las moléculas de agua y sales con el fin de simplificar los cálculos computacionales. Sin embargo, pueden existir moléculas que sean propias del bolsillo y que interaccionen con el SAH, por lo cual sería necesario incluirlas en este análisis.

Se compararon distintas estructuras reportadas en el pdb con el fin de determinar cuáles son las moléculas que se conservan. A partir de esto se decidió conservar cuatro moléculas de agua: 910, 940, 955 y 956. Esta nueva estructura se denominó como **1L9K-2**. (Figura 6.3)

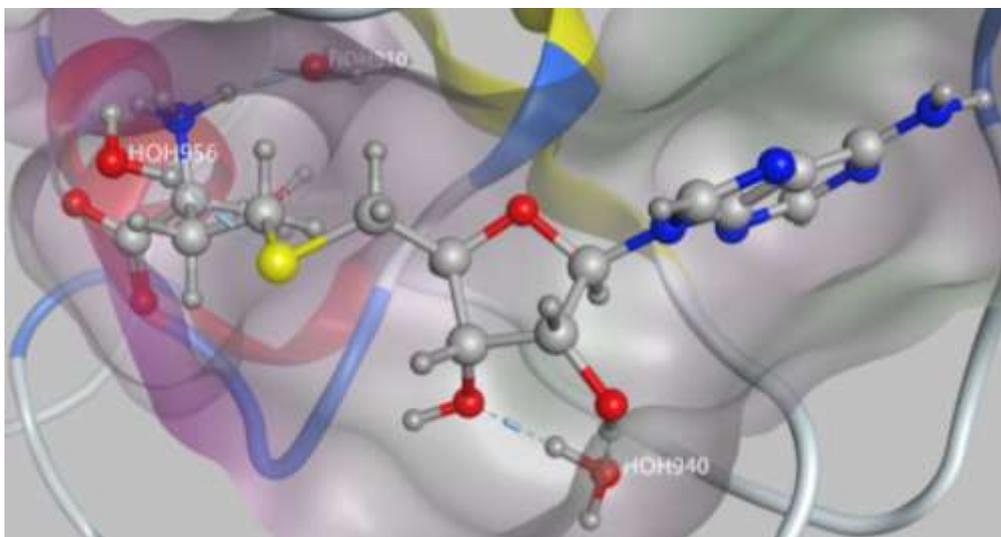


Figura 6.3: Bolsillo utilizado para el docking. Este es el bolsillo de la enzima para el cofactor en 1L9K-2, en la que se conservaron 4 moléculas de agua.

Se realizó el docking utilizando este nuevo archivo de la proteína 1L9K-2, donde luego de seleccionar las mejores poses de docking por inspección visual se calculó el valor de RMSD para cada una de las conformaciones ensayadas

anteriormente: SAH-1L9K, SAH-1L9K-Minimizado y SAH-Chemdraw-Minimización. Estos valores de RMSD se presentan en la Tabla 6.2 y la superposición de las poses obtenidas respecto a la original en la Figura 6.4.

<b>Estructura</b>	<b>1L9K-1 RMSD (Å)</b>	<b>1L9K- 2 RMSD (Å)</b>
SAH-1L9K	0.7482	0.5950
SAH-1L9K-Minimizado	0.9566	0.4311
SAH-Chemdraw-Minimizado	1.1516	0.9775

Tabla 6.2: Valores de RMSD en Å de la mejor posición de docking obtenida al utilizar la enzima 1L9K-1 y 1L9K-2 para las diferentes conformaciones de partida del SAH respecto a la posición reportada del SAH en la estructura del pdb (1L9K).

Se puede apreciar que al conservar estas moléculas de agua se puede recrear la pose de docking del SAH del cristal con valores de RMSD menores, es decir con mejores resultados, para todas las conformaciones de partida seleccionadas.

Por esta razón, se decidió continuar con la estructura 1L9K-2, que presenta las cuatro moléculas de agua, para continuar con la optimización del modelo de docking.

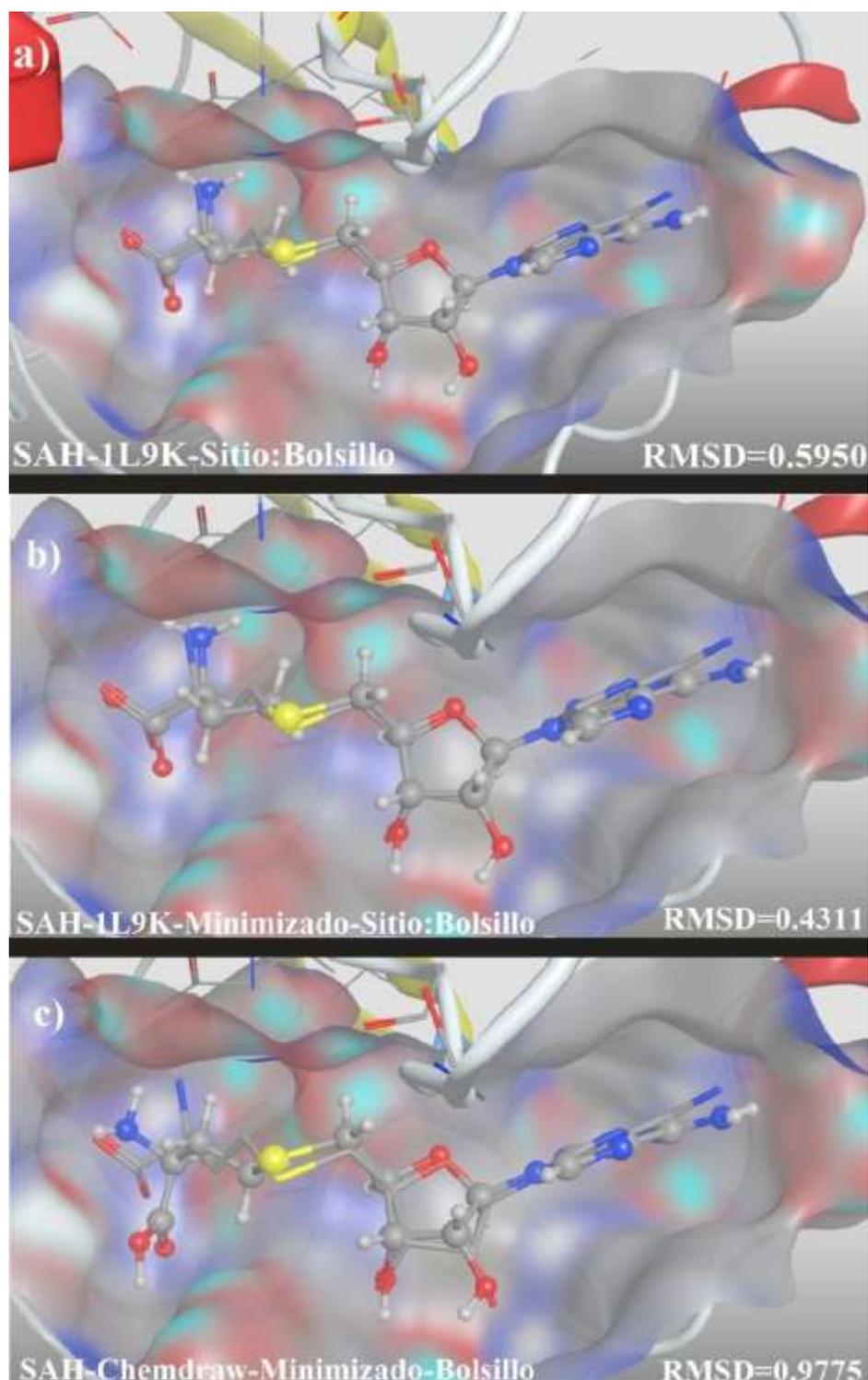


Figura 6.4: Mejor pose de docking obtenida para el SAH en distintas conformaciones de partida superpuestas al SAH del cristal, con su correspondiente valor de RMSD (Å). Este docking se realizó con la enzima 1L9K-2, utilizando como sitio de posicionamiento el bolsillo del SAM. a) SAH-1L9K: SAH con la conformación proveniente del pdb, b) SAH-1L9K-Minimizado: SAH proveniente del pdb (1L9K) al cual se le realizó una minimización de energía con MOE. c) SAH-Chemdraw-Minimizado: estructura dibujada en el chemdraw y sometida a una minimización de energía con MOE.

### 6.1.2.3. Optimización del sitio de posicionamiento:

El programa utilizado para el docking (MOE), permite focalizar el sitio donde se quiere realizar el posicionamiento de docking. Para este ensayo se decidió seleccionar como conformación inicial SAH-1L9K (conformación reportada en el cristal), con el fin de comparar únicamente la influencia del posicionamiento seleccionado en el programa MOE.

En los ensayos anteriores se utilizó como sitio de docking el bolsillo de SAH, lo que puede presentar cierto sesgo ya que no se le otorga libertad al modelo de seleccionar el lugar de anclaje. Por este motivo, se decidió ensayar otras opciones de sitio como lo son: el ligando, en nuestro caso es la molécula de SAH, el bolsillo del SAH, los “dummys” átomos y el receptor en su totalidad. De esta forma se ensayaron los posicionamientos de mayor a menor restricción.

Con respecto a los “dummys” átomos, se pueden definir como una zona seleccionada en la enzima a partir de una función del programa MOE que actúa reconociendo sitios de unión (Site finder).

<b>SITIO EN 19LK-2</b>	
<b>Sitio</b>	<b>RMSD (Å)</b>
Ligando	0.4294
Bolsillo	0.5950
Site Finder	0.7952
Receptor	0.5924

Tabla 6.3: Se presentan los valores de RMSD en Å de la mejor posición de docking obtenida al utilizar la enzima 1L9K-2 para la conformación de partida del SAH (SAH-1L9K) respecto a la posición reportada del SAH en la estructura del pdb (1L9K), utilizando distintas restricciones de posicionamiento al realizar el docking.

En la figura 6.5 y en la Tabla 6.3 se muestran los resultados obtenidos, con sus respectivos valores de RMSD obtenidos respecto a la pose del SAH del cristal. De estos, se puede determinar que, al otorgarle más libertad al programa al momento de posicionar el ligando, las poses de docking obtenidas presentan valores de RMSD muy similares entre ellas.

Se decidió seleccionar el bolsillo de unión del SAH como restricción del sitio de posicionamiento en el programa MOE, ya que presenta un RMSD de 0,59 Å, siendo igual al obtenido al seleccionar todo el receptor (0.59 Å). Se puede comprobar así, que la introducción del sesgo al seleccionar el bolsillo no es significativa. Sin embargo, el tiempo computacional requerido para realizar el docking seleccionando el bolsillo es mucho menor que al seleccionar el receptor en su totalidad. Si bien esto no afecta de manera significativa esta optimización, al momento de analizar varios ligandos el tiempo requerido para obtener las posiciones de docking cobra mayor importancia.

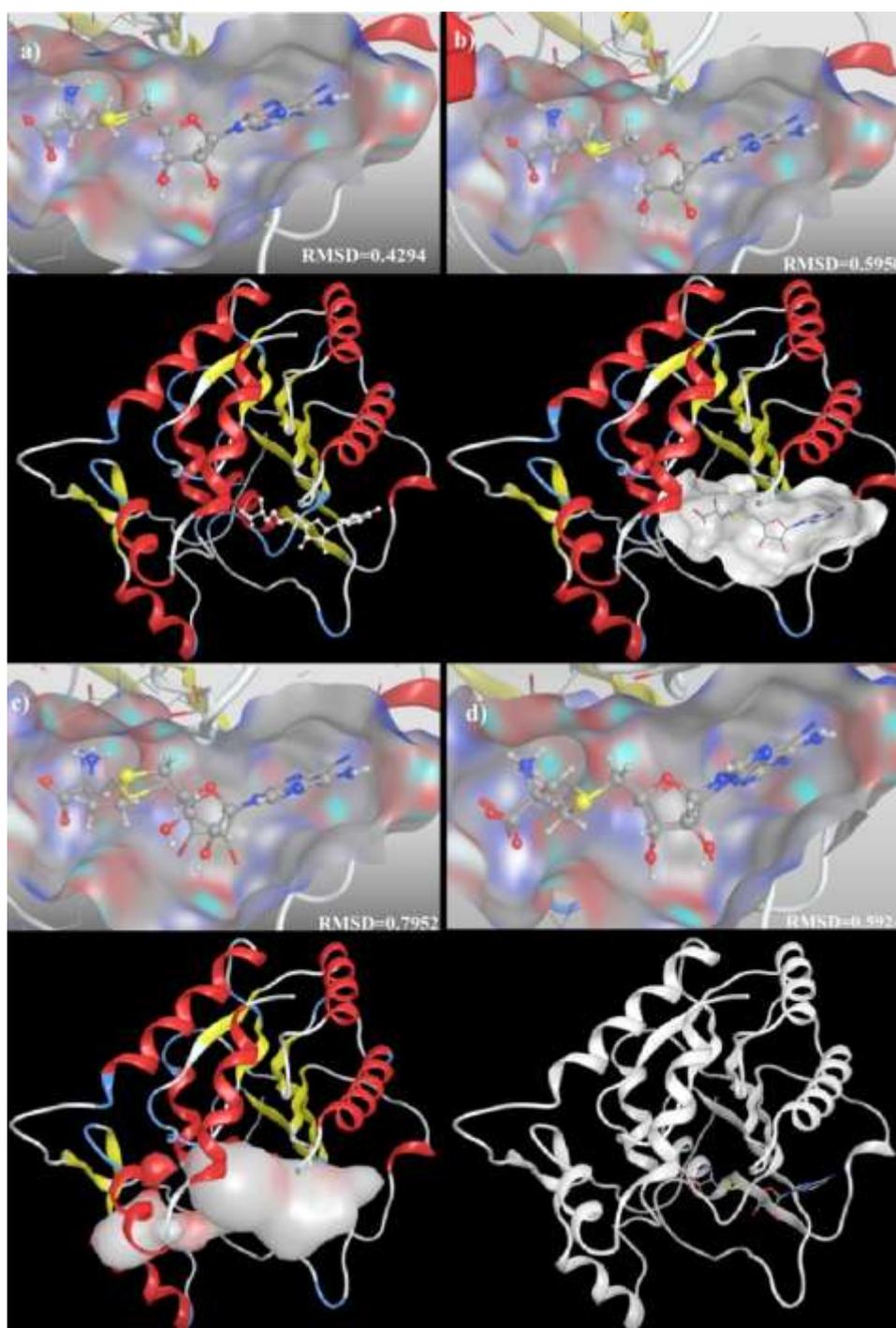


Figura 6.5: En la parte superior de cada sección se encuentra la mejor pose de docking superpuestas a la conformación reportada en el pdb (1L9K), con su correspondiente valor de RMSD (Å). Estos ensayos se realizaron al fijar distintos sitios de posicionamiento en el programa. En la parte inferior se encuentra en color blanco el sitio de posicionamiento que el programa reconoce en cada docking. a) Seleccionó el SAH del cristal. b) Se seleccionó el bolsillo del SAM. c) Se seleccionó los “dummys” átomos (usando el Site Finder). d) Se seleccionó el receptor, siendo este el menos restrictivo de las opciones analizadas.

### 6.1.3. Validación del método de docking MOE-GOLD:

La validación del modelo de docking se puede realizar de dos formas, una de ellas es reproduciendo los resultados reportados en la estructura cristalográfica del pdb. Mientras que la otra se realiza utilizando una proteína o ligando no empleado en la optimización y se evalúa la capacidad del modelo de reproducir los resultados reportados para esta nueva proteína o ligando. Estas validaciones se conocen como re-docking y docking cruzado respectivamente.<sup>9</sup>

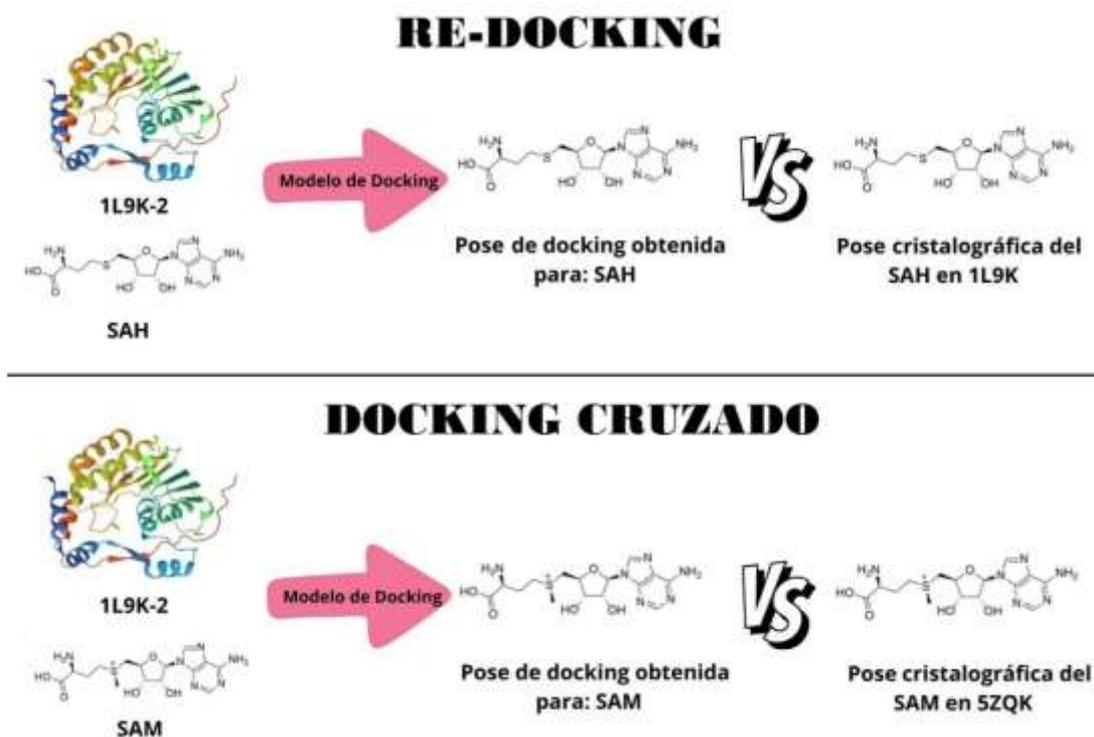


Figura 6.6: Esquema de las validaciones realizadas: Re-docking y Docking cruzado.

Al realizar la validación re-docking, se debe de replicar la pose del ligando co-cristalizado en el pdb del blanco de interés. Esto fue realizado en los puntos anteriores al optimizar el modelo, donde se utilizó SAH-Chemdraw-Minimizado como configuración de partida, la proteína 1L9K-2 y el sitio de posicionamiento seleccionado fue el del bolsillo del co-factor. (Figura 6.6)

Para la segunda parte de validación realizamos un docking cruzado para el cual seleccionamos la estructura del pdb: 5ZQK, donde se reportó la estructura de NS5-Mtasa-DEN2 co-cristalizada con SAM, por lo que, se realizó el docking de

la estructura de SAM con las condiciones optimizadas anteriormente utilizando la enzima 1L9K-2 y como sitio de posicionamiento el bolsillo del co-factor. Una vez que se obtuvo la mejor pose de docking, esta se comparó con la pose reportada para el SAM en el cristal 5ZQK. Esto se realiza con el fin de verificar que el modelo puede predecir la pose de un compuesto cualquiera. La ventaja de utilizar el SAM es que se conoce la pose que adopta en la NS5-Mtasa-Den2 ya que está reportada en el pdb (5ZQK), (Figura 6.6).

Se utilizaron dos conformaciones distintas de partida para el SAM, una es la proveniente del pdb 5ZQK, sometido a una minimización (SAM-5ZQK-Minimización) y la otra fue el SAM dibujado en el Chemdraw, sometido a una minimización de energía (SAM-Chemdraw-Minimización).

En la figura 6.7 y en la Tabla 6.4 se observan los resultados obtenidos en las dos validaciones realizadas (Re-Docking y docking cruzado)

<b>VALIDACIÓN</b>		
<b>Estructura</b>	<b>Re-Docking RMSD (Å)</b>	<b>Docking Cruzado RMSD (Å)</b>
SAH-Chemdraw- Minimizado	0.9775	-
SAM-5ZQK-Minimizado	-	0.4139
SAM-Chemdraw- Minimizado	-	0.9384

Tabla 6.4: Valores de RMSD en Å de la mejor posición de docking obtenida al utilizar la enzima 1L9K-2 para la conformación de partida del SAH (SAH-1L9K) respecto a la posición reportada del SAH en la estructura del pdb (1L9K). Adicionalmente, se muestran los valores de RMSD en Å de la mejor posición de docking obtenida al utilizar la enzima 1L9K-2 para diferentes conformaciones de partida SAM (SAM-5ZQK-Minimizado y SAM-Chemdraw-Minimizado) respecto a la posición reportada del SAM en la estructura del pdb (5ZQK).

Los valores obtenidos de RMSD para las 2 conformaciones iniciales de SAM son aceptables. Se puede apreciar que, al igual que en el caso del SAH, al utilizar la conformación de SAM que se presenta en el cristal el resultado de RMSD es menor, ya que existe cierto grado de sesgo debido a la conformación de partida.

A partir de estos resultados, se logró validar el modelo de docking ya que este es capaz de reproducir con valores aceptables de RMSD (menor a 2 Å) la pose reportada en la estructura cristalográfica del pdb tanto para el ligando SAH (redocking) como el SAM (docking cruzado).

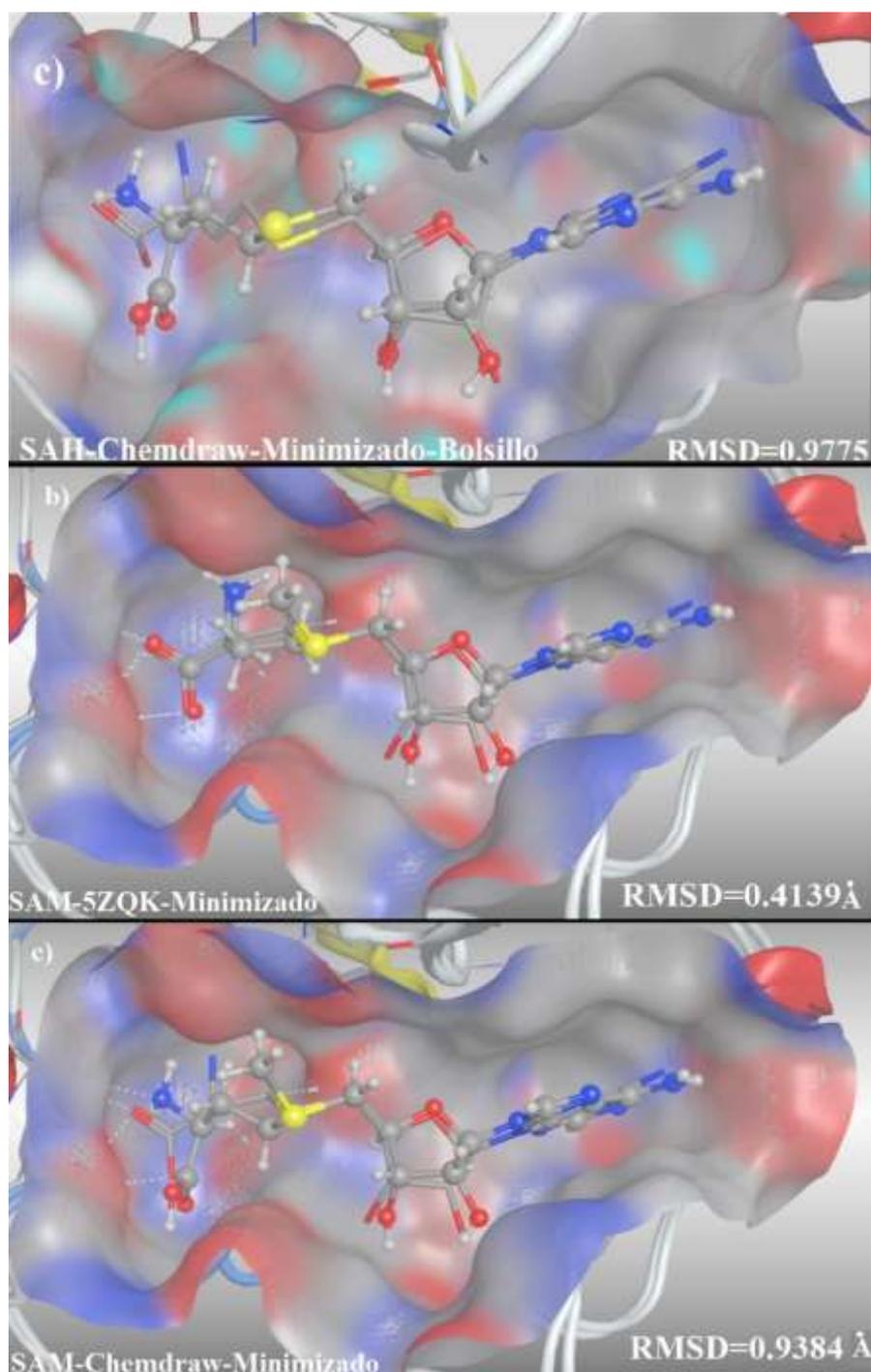


Figura 6.7 Validación del modelo. En a) se presenta la pose obtenida del re-docking en superposición con la pose reportada en el cristal 1L9K. En b) y c) se presenta la pose obtenida del SAM posicionada en 1L9K, superpuesta con la conformación reportada del SAM en el cristal 5ZQK. Se utilizan diferentes conformaciones de partida: b) SAM-5ZQK-Minimizado: SAM proveniente del pdb (5ZQK) al cual se le realizó una minimización de energía con MOE. c) SAM-Chemdraw-Minimizado: estructura dibujada en el chemdraw y sometida a una minimización de energía con MOE.

## 6.2. Estudio del poder predictivo

### 6.2.1. Estudio del poder predictivo del modelo: docking.

Una vez realizada la validación del modelo de docking continuamos con la evaluación del poder predictivo del mismo. Para esto realizamos una búsqueda bibliográfica de los inhibidores reportados en bibliografía para la enzima de interés. Entre estos seleccionamos los compuestos sintetizados y evaluados por Lim et al.<sup>10</sup> Estos fueron elegidos ya que presentan una estructura similar al SAM, manteniendo la base de adenosina y variando los sustituyentes de la amina en la purina, (Figura 6.8). Los compuestos fueron evaluados frente a distintas metiltransferasas, entre ellas la del virus del dengue, serotipo 3, donde los autores realizaron un análisis cinético a partir de un ensayo de proximidad de centelleo (SPA). En este ensayo, se suele inmovilizar al receptor de interés en unas perlas de SPA (en este caso lo autores utilizaron perlas de estreptavidina); cuando un ligando radiomarcado (en este caso el <sup>3</sup>H-SAM) se une al receptor, la proximidad que experimenta este ligando a la perla estimula el centelleo dentro de dicha perla emitiendo luz. Si el ligando no se une al receptor, este se encuentra demasiado lejos para transferir energía a la perla, por lo que no es detectado. De esta forma, los autores fueron capaces de estudiar la cinética de la reacción, obteniendo así los valores de la constante de inhibición (K<sub>i</sub>) correspondientes a los compuestos propuestos para ambas metilaciones (la metilación de la guanosina en posición N7 y la metilación de la adenosina en posición 2'O) (Tabla 6.5).<sup>11</sup>

---

10 Lim, S. P.; Sonntag, L. S.; Noble, C.; Nilar, S. H.; Ng, R. H.; Zou, G.; Monaghan, P.; Chung, K. Y.; Dong, H.; Liu, B.; Bodenreider, C.; Lee, G.; Ding, M.; Chan, W. L.; Wang, G.; Jian, Y. L.; Chao, A. T.; Lescar, J.; Yin, Z.; Vedananda, T. R.; Keller, T. H.; Shi, P.-Y. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (8), 6233–6240.

11 Lim, S.; Wen, D.; Yap, T.; Yan, C.; Lescar, J.; Vasudevan, S. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (3), 360–369.

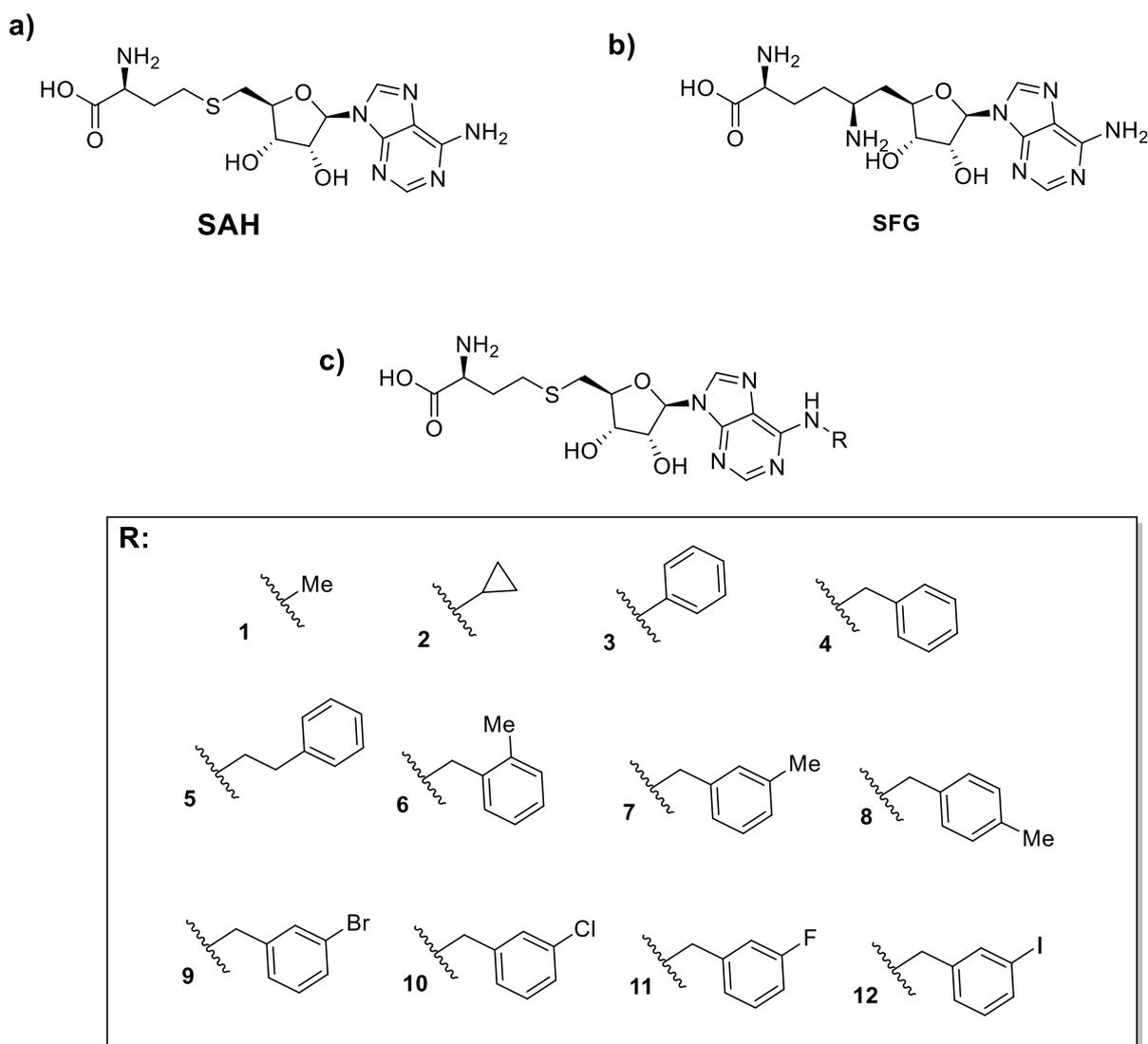


Figura 6.8: Estructuras de: a) SAH, b) SFG y c) los análogos propuestos y sintetizados por Lim et al.<sup>10</sup> del 1 al 12.

Compuesto	Ki para la metilación en N7 (μM)	Ki para la metilación en 2'O (μM)
<b>1</b>	5,91	1,51
<b>2</b>	21,94	2,07
<b>3</b>	10,86	3,45
<b>4</b>	2,10	0,52
<b>5</b>	8,26	2,10
<b>6</b>	6,03	4,23
<b>7</b>	0,85	0,28
<b>8</b>	1,76	0,75
<b>9</b>	2,15	0,15
<b>10</b>	0,82	0,17
<b>11</b>	0,77	0,19
<b>12</b>	1,30	0,20
<b>SAH</b>	3,19	0,57

Tabla 6.5: Valores de los Ki reportados por los autores Lim et al.<sup>10</sup> para la metilación en posición N7 y la posición 2'O de los compuestos del 1 al 12 y el SAH frente a NS5-Mtasa-Den3.

Si bien los compuestos fueron evaluados contra la enzima metiltransferasa de la subunidad NS5 del virus del dengue, serotipo 3 (NS5-Mtasa-Den3), se ha reportado que las metiltransferasas de los flavivirus se encuentran altamente conservadas.<sup>12</sup> Ya que las enzimas presentan un alto grado de similitud, los resultados y conclusiones obtenidos utilizando la enzima NS5-Mtasa-Den3 se pueden trasladar a nuestro sistema de interés (NS5-Mtasa-Den2) por homología de las enzimas utilizadas.

Ya que se contaba con la estructura de los compuestos y un valor experimental de inhibición reportado para cada uno de estos, comenzamos con la evaluación del poder predictivo del modelo de docking.

Para esto, se aplicó el modelo de docking optimizado con anterioridad a estos compuestos. Se comenzó dibujando todas las estructuras de los compuestos en

12 Dong, H.; Zhang, B.; Shi, P.-Y. Target. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (1), 1–10.

chemdraw para luego pasar estas al programa de MOE y aplicar la minimización de energía correspondiente.

El docking de estos compuestos se realizó frente a la enzima 5EHI reportada en el pdb para la NS5-Mtasa-Den3 co-cristalizada con el co-factor SAM. A esta estructura se le realizó el mismo tratamiento que el optimizado para el 1L9K-2. En este caso, se seleccionaron las moléculas de agua 4110, 4114, 4115, y 4430 (Figura 6.9), se aplicó el campo de fuerza Amber12 y se protonó la proteína utilizando la opción de protonate3d, para finalizar con una minimización de energía del sistema. De esto, se obtuvieron 5 poses de docking para cada uno de estos compuestos y se seleccionó la pose más adecuada por inspección visual.

Al realizar el docking, el programa calcula un valor de S (score), que es una puntuación otorgada a ese sistema proteína-ligando el cual se basa en la energía de unión, el adecuado posicionamiento del ligando en el receptor y la hidrofobicidad. En base a este valor, se puede adjudicar un orden a los compuestos evaluados, ya que un menor valor de S significaría una mayor afinidad entre la proteína y el ligando.

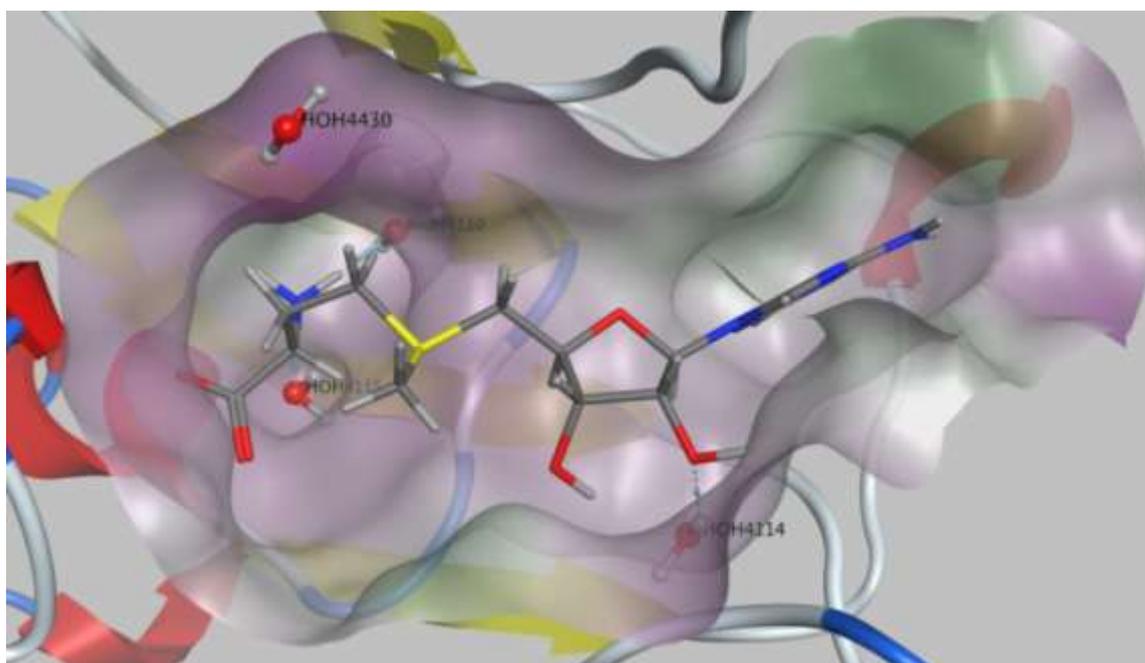


Figura 6.9: Se muestra el bolsillo utilizado para el docking. Este es el bolsillo de la enzima para el cofactor SAM en 5EHI, en la que se conservaron 4 moléculas de agua.

Compuesto	S docking	Compuesto	Ki para la metilación en N7 (µM)	Compuesto	Ki para la metilación en 2'O µM)
9	-9,6415	11	0,77	9	0,15
SFG	-9.2557	10	0,82	10	0,17
<b>SAH</b>	<b>-9,0600</b>	7	0,85	11	0,19
7	-8,9643	12	1,30	12	0,20
10	-8,9585	8	1,76	7	0,28
4	-8,8107	4	2,10	4	0,52
8	-8,6079	9	2,15	<b>SAH</b>	<b>0,57</b>
12	-8,5186	<b>SAH</b>	<b>3,19</b>	8	0,75
11	-8,5073	1	5,91	1	1,51
5	-8,3706	6	6,03	2	2,07
1	-8,2786	5	8,26	5	2,10
6	-8,1575	3	10,86	3	3,45
3	-8,0155	2	21,94	6	4,23
2	-7,8805				

Tabla 6.6: Se muestran los valores de S obtenidos con el programa de docking, y los valores de Ki para los compuestos analizados por los autores Lim et al.<sup>10</sup> Los compuestos se encuentran ordenados de menor a mayor valor en las 3 situaciones mencionadas.

En la tabla 6.6 se muestran los resultados obtenidos de S en las condiciones de docking ensayadas. Estos valores se ordenaron de menor a mayor y se compararon con los valores de Ki obtenidos para cada compuesto. Como ya se ha mencionado, el SAH tiene la capacidad de actuar en las metiltransferasas dependientes de SAM como regulador negativo,<sup>13</sup> por lo que se conoce que el SAH presenta cierto grado de afinidad al receptor. Debido a esto, seleccionamos al SAH como punto de corte para el estudio del poder predictivo. Es decir que todos los compuestos que presentaban valores de Ki menores al SAH se consideraron buenos inhibidores de la NS5-Mtasa-Den3, mientras que, aquellos compuestos cuyo valor de Ki era mayor que el del SAH no se consideraron inhibidores.

13 Saavedra, O. M.; Isakovic, L.; Llewellyn, D. B.; Zhan, L.; Bernstein, N.; Claridge, S.; Raepfel, F.; Vaisburg, A.; Elowe, N.; Petschner, A. J.; Rahil, J.; Beaulieu, N.; MacLeod, A. R.; Delorme, D.; Besterman, J. M.; Wahhab, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (10), 2747–2751.

Con el punto de corte seleccionado, se ordenaron los valores de  $K_i$  para ambas metilaciones y se compararon estos con los valores obtenidos de S. Adicionalmente, se agregó en el estudio el compuesto SFG (Figura 6.8), el cual se ha reportado como inhibidor de este tipo de enzimas metiltransferasas. Si bien este compuesto no fue evaluado por los autores, es de esperarse que presente un valor de  $K_i$  menor al SAH.

Analizando los resultados obtenidos se observó que, según el programa de docking, el SFG presentaría una afinidad mayor que el SAH, como era de esperarse y que el único compuesto evaluado por los autores que presentaría afinidad por el receptor sería el compuesto 9. Si observamos los valores de  $K_i$  de la metilación en N7 los compuestos que presentarían afinidad por el receptor, serían los compuestos: 11, 10, 7, 12, 8, 4, 9. En el caso de la metilación en 2'O, estos compuestos serían 9, 10, 11, 12, 7, 4. Si bien el compuesto 9 presenta una alta afinidad en la metilación 2'O y una afinidad media-baja en la metilación en N7, este es el único valor correcto que predijo el modelo de docking, generando de esta forma, entre 5 y 6 falsos negativos en este estudio.

De acuerdo con lo especificado, se determinó que el modelo de docking no pudo recrear el orden de inhibición presentado por el  $K_i$  en ninguna de las metilaciones de NS5-Mtasa-Den3, donde la mayoría de los valores que presentan mayor inhibición que el SAH el programa los determina como no activos.

Es importante resaltar que los valores de S calculados por el programa de docking son una puntuación empírica y puede que no siempre refleje la afinidad de unión real. Por esto, se suele recurrir a otros experimentos computacionales con el fin de predecir con mayor exactitud las energías de enlace y corroborar que la unión del ligando a la proteína sea estable.

### 6.2.2. Estudio del poder predictivo del modelo: Dinámica molecular

A partir de los datos obtenidos según la pose de docking se decidió recurrir a una dinámica molecular. En este tipo de simulaciones se deja evolucionar en el tiempo el sistema proteína-ligando, obteniéndose más información.

Para esto, se prepararon los archivos correspondientes para la realización de las simulaciones de dinámica molecular. Se comenzó con la simulación en una caja de agua que contenía al complejo proteína-ligando obtenido de la simulación de docking. Este sistema se sometió a la simulación que constó de cuatro etapas. La primera fue la etapa de minimización (10ps), seguida de una etapa de “annealing” o calentamiento ( $T=300\text{k}$ , 28.8ps), para luego tener una etapa de equilibración (1ns) y por último la dinámica molecular en si misma (5ns). En esta última etapa, se deja la enzima sin restricciones por lo cual el sistema evoluciona con libertad.

Una vez obtenidas las trayectorias de la dinámica, se realizaron varios estudios respecto a si el sistema se comportó como era de esperarse. Para eso graficamos la energía cinética vs tiempo (ns), la energía de VDW vs tiempo (ns) y la energía total del sistema vs tiempo (ns), para comprobar que el sistema total llegó a equilibrio luego de los 5ns de dinámica molecular. A modo de ejemplo se interpreta a continuación las gráficas para uno de estos análogos, los demás compuestos presentaron un comportamiento similar.

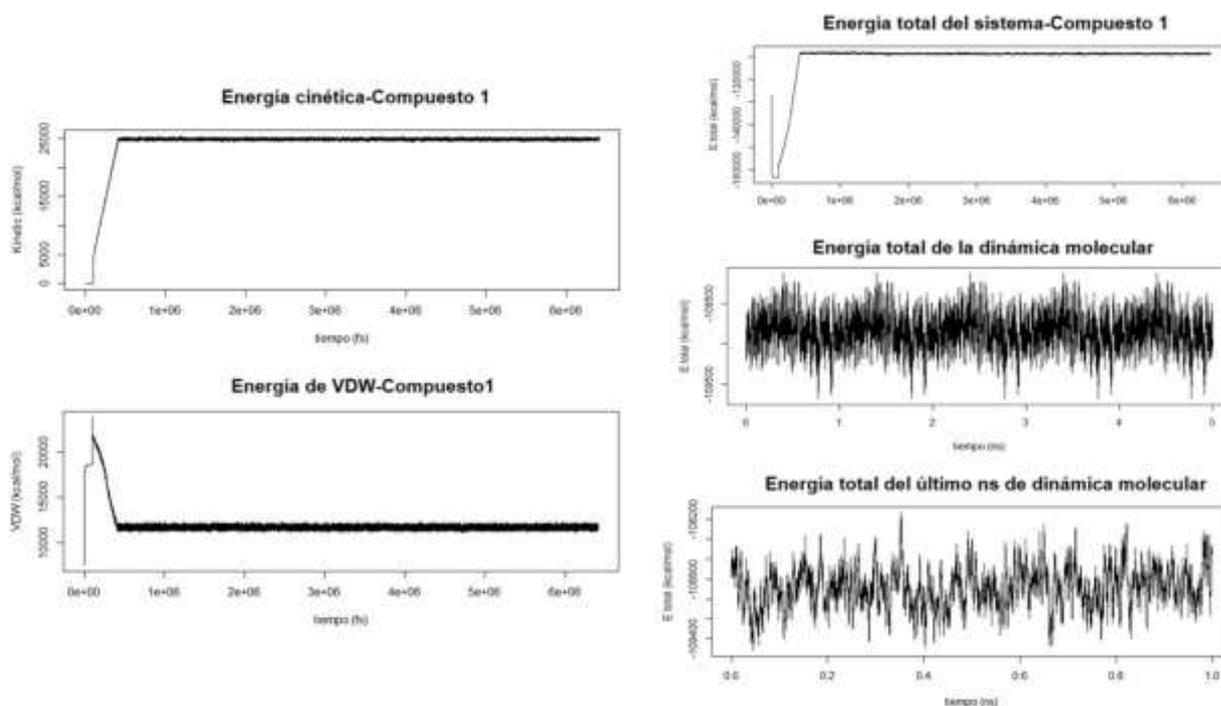
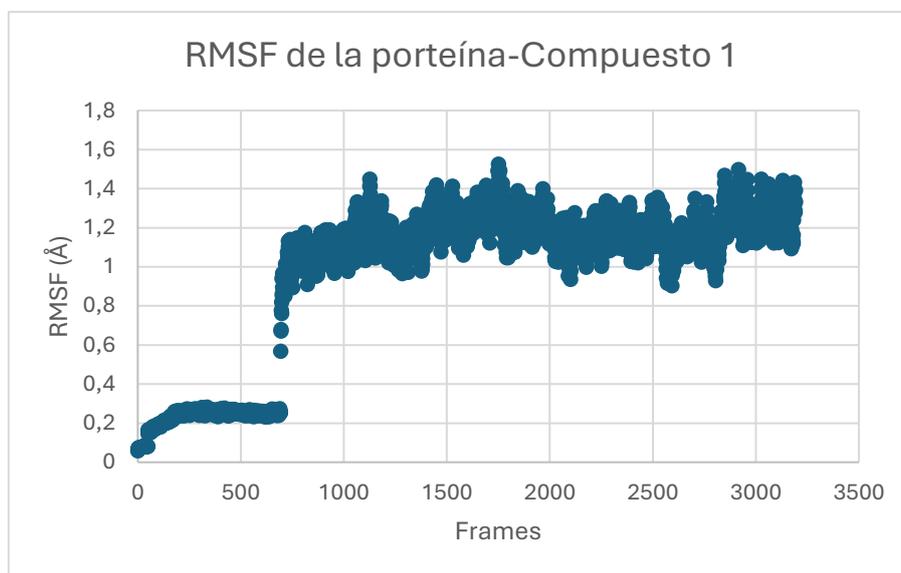


Figura 6.10 Gráficas de energía obtenidas para el compuesto 1, luego de la dinámica molecular., donde se presentan las gráficas de: energía cinética vs tiempo (ns) y la energía de VDW vs tiempo (ns) de lado izquierdo. En el lado derecho se encuentran las gráficas de la energía total del sistema vs tiempo (ns): Para todas las etapas de simulación, para la dinámica molecular y para el último nanosegundo de la dinámica molecular.

A partir de las gráficas obtenidas, reportadas en la figura 6.10, se determinó que el sistema llegó a equilibrio ya que los gráficos alcanzaron un gráfico paralelo al eje x al momento de realizar los 5ns de dinámica molecular. Esta meseta determina que la energía del sistema se mantuvo constante por lo cual se podría afirmar que el sistema permaneció estable y la simulación se llevó a cabo como era de esperarse. Si, por ejemplo, la caja de agua colapsase al momento de la simulación, que es algo inesperado, se haría notorio en estas gráficas.

Observando la gráfica de la energía total del sistema vs tiempo (ns) para todas las etapas de simulación se observa que presenta un comportamiento característico. Al comienzo la energía del sistema disminuye ya que se corresponde con la etapa de la minimización de la energía. La siguiente etapa corresponde al annealing (calentamiento) por lo que en la gráfica se observa un aumento de la energía, la cual posteriormente se estabiliza en la etapa de equilibrio continuando estable a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

Estas gráficas nos muestran la energía total del sistema, pero no nos da una idea clara de lo que pasó con la proteína o el ligando a lo largo de la simulación. Para esto se realizan las gráficas de fluctuación cuadrática media (RMSF) para cada punto de la dinámica (frame):



Gráfica 6.1: RMSF vs frames para la proteína para el compuesto 1.

El RMSF de la proteína a lo largo de toda la simulación para el compuesto 1 se mantiene menor a 2Å, y no presenta diferencias significativas a lo esperado. Se observó que la flexibilidad de la proteína aumenta en la etapa de “annealing”, lo que es de esperarse al someter al sistema a mayores temperaturas. En la etapa de dinámica, se presentaron una mayor cantidad de fluctuaciones que en las etapas anteriores ya que el sistema pierde las restricciones aumentando el grado de movimiento del sistema.

Adicionalmente, se realizó la gráfica de RMSF de cada carbono alfa de los residuos de la proteína. Esto se realizó para cada etapa por separado (figura 6.11) y para el total de las etapas (Figura 6.12)

## RMSF para los residuos de la proteína: Compuesto 1

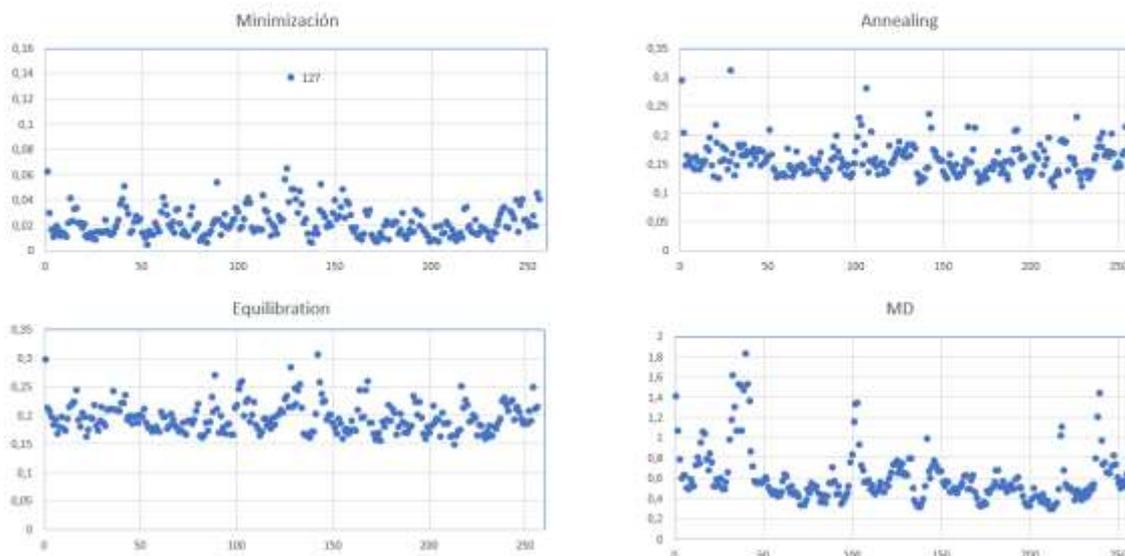


Figura 6.11 Se muestran las gráficas de RMSF para los carbonos alfas de los residuos de la proteína para cada una de las etapas simuladas.

## RMSF para los residuos de la proteína: Compuesto 1

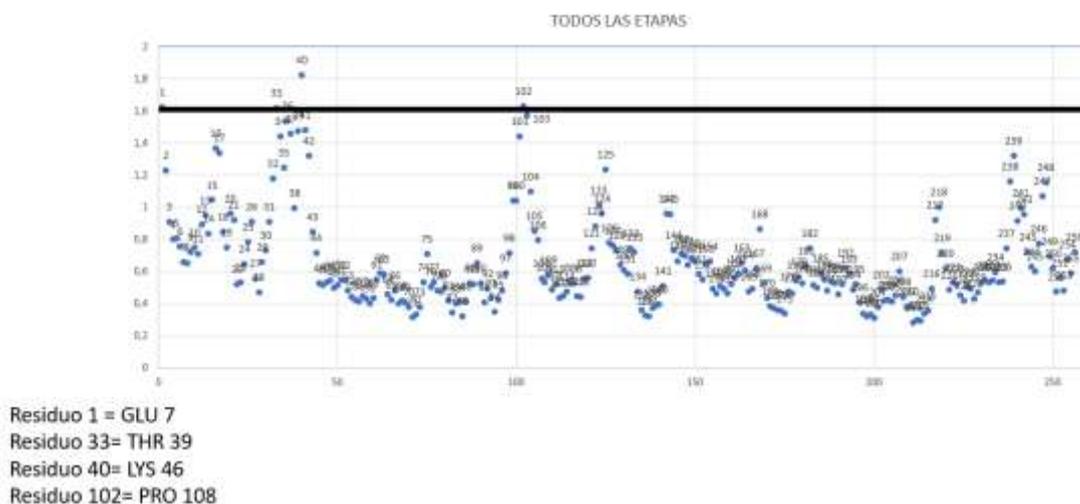


Figura 6.12 Se muestran la gráfica de RMSF para los carbonos alfas de los residuos de la proteína a lo largo de toda la simulación.

En este tipo de gráficas, los residuos cercanos al N y C terminal, o los que se hayan en un loop suelen presentar más movilidad. Se considera que los residuos

que presentan valores entre 0-1 se encuentran rígidos, de 1-3: móviles y mayores a 3: muy móviles.

Si bien ninguno de estos valores sobrepasa el valor de RMSF de 3, se decidió estudiar cuales presentan un RMSF mayor a 1,6, ya que fueron los valores de mayor movilidad en la simulación. Los residuos que presentan RMSF mayores a 1,6 corresponden a:

Residuo 1 = GLU 7

Residuo 33= THR 39

Residuo 40= LYS 46

Residuo 102= PRO108

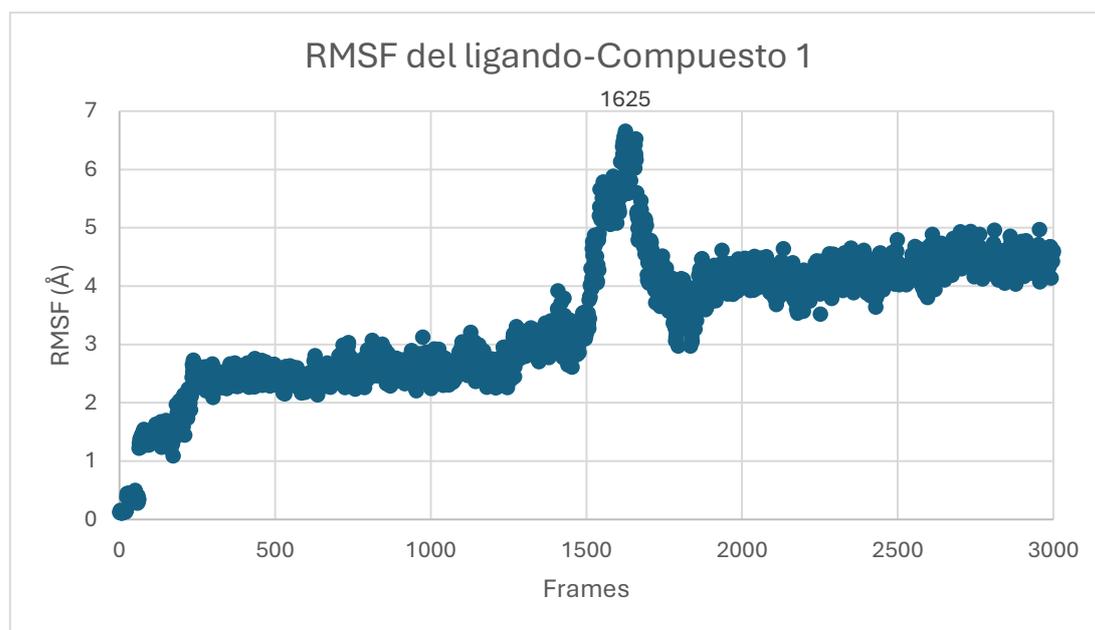
De estos, el GLU es el N-terminal, por lo cual la gran movilidad de este residuo es esperable. La movilidad de los residuos THR y LYS, podría deberse a interacciones con el solvente, y por último el residuo de PRO, se encuentra en un loop cercano al bolsillo del ligando lo que también explica su movilidad. (Figura 6.12)



Figura 6.12: Se muestran en la estructura de la proteína unida al compuesto 1 los residuos que presentaron un RMSF mayor a 1.6 (Glu 7, Thr 39, Lys 46, y Pro108).

Por último, se realizó la gráfica de RMSF para el ligando (Grafica 6.2), donde se puede observar un pico máximo en el frame 1625 presentando una desviación a lo esperado. La explicación a este pico fue que el ligando en la simulación se desplaza levemente del bolsillo de unión y luego regresa a este. Por inspección visual de la dinámica se observó que si bien el ligando presentó un cierto desplazamiento este no se desplazó fuera de la proteína.

Cabe aclarar, que la mayoría de los compuestos ensayados no presentaron este tipo de desviaciones abruptas como en el caso del compuesto 1. Sumado al hecho de que en los cálculos posteriores de energía se decidió no seleccionar estos valores que se desvían del comportamiento esperado, se decidió continuar con los estudios pertinentes.



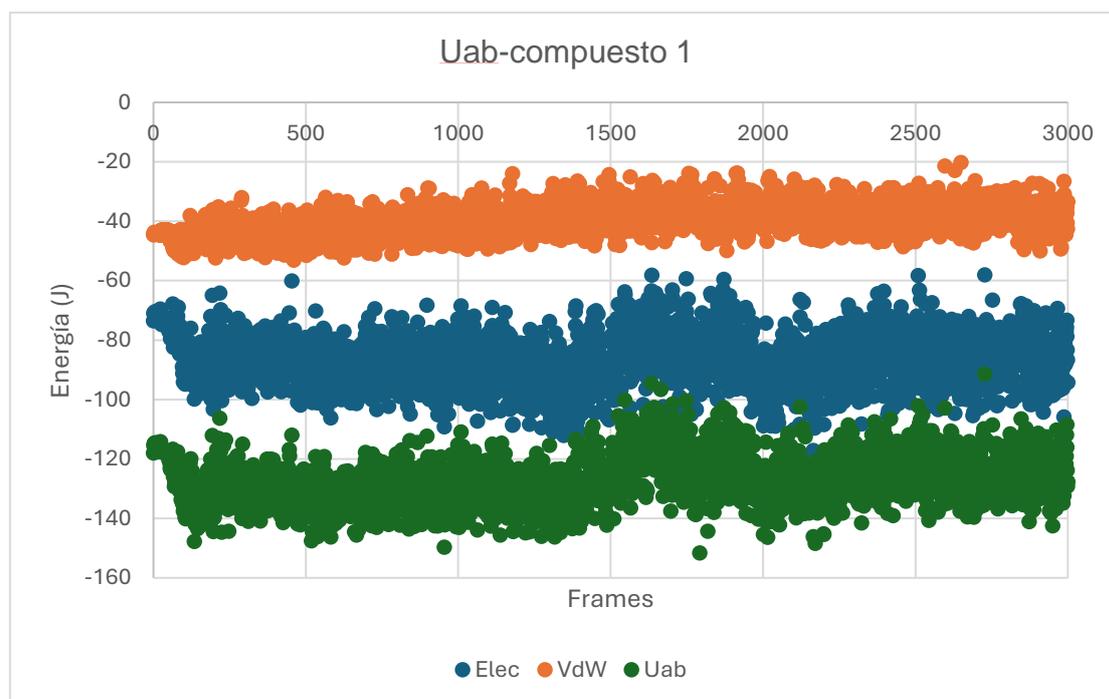
Gráfica 6.2: RMSF del compuesto 1 a lo largo de toda la trayectoria simulada.

Este estudio detallado se realizó para cada una de las dinámicas realizadas, concluyendo que todas ellas se encontraban aptas para ser utilizadas en los cálculos de energía. Se comenzó calculando el valor aproximado de la energía de interacción  $U_{ab}$ . Este se realizó calculando los valores de energía potencial total del sistema ( $U_{total}$ ), la energía potencial de todo el sistema excluyendo al

ligando ( $U_a$ ) y la energía potencial interna del ligando ( $U_b$ ), según la siguiente ecuación:

$$U_{ab} = U_{\text{total}} - U_a - U_b$$

Al realizar esta resta se obtiene la energía de interacción del ligando con el sistema, lo cual se debe realizar para cada uno de los puntos de la dinámica. El  $U_{ab}$  es análogo al S del docking, solo que el S del docking se basa en una sola pose mientras que la  $U_{ab}$  es un promedio de varias poses simuladas por dinámica molecular, lo que aumenta el grado de precisión. Ya que la energía potencial depende de los términos no enlazantes, ésta se calcula como la suma de las energías electrostáticas y las energías de Van der Waals (Gráfica 6.3).



Gráfica 6.3. Se muestran los gráficos de la energía electrostática, energía de Van der Waals y la energía potencial  $U_{ab}$ .

En este caso en particular, se puede observar que la energía presenta un pico positivo entre los 1500 y 2000 frames, lo que corresponde al pico de RMSF observado para el ligando, confirmando que este cambio no fue favorable

energéticamente, por lo cual el sistema tendió a condiciones más favorables. (Figura 6.13)

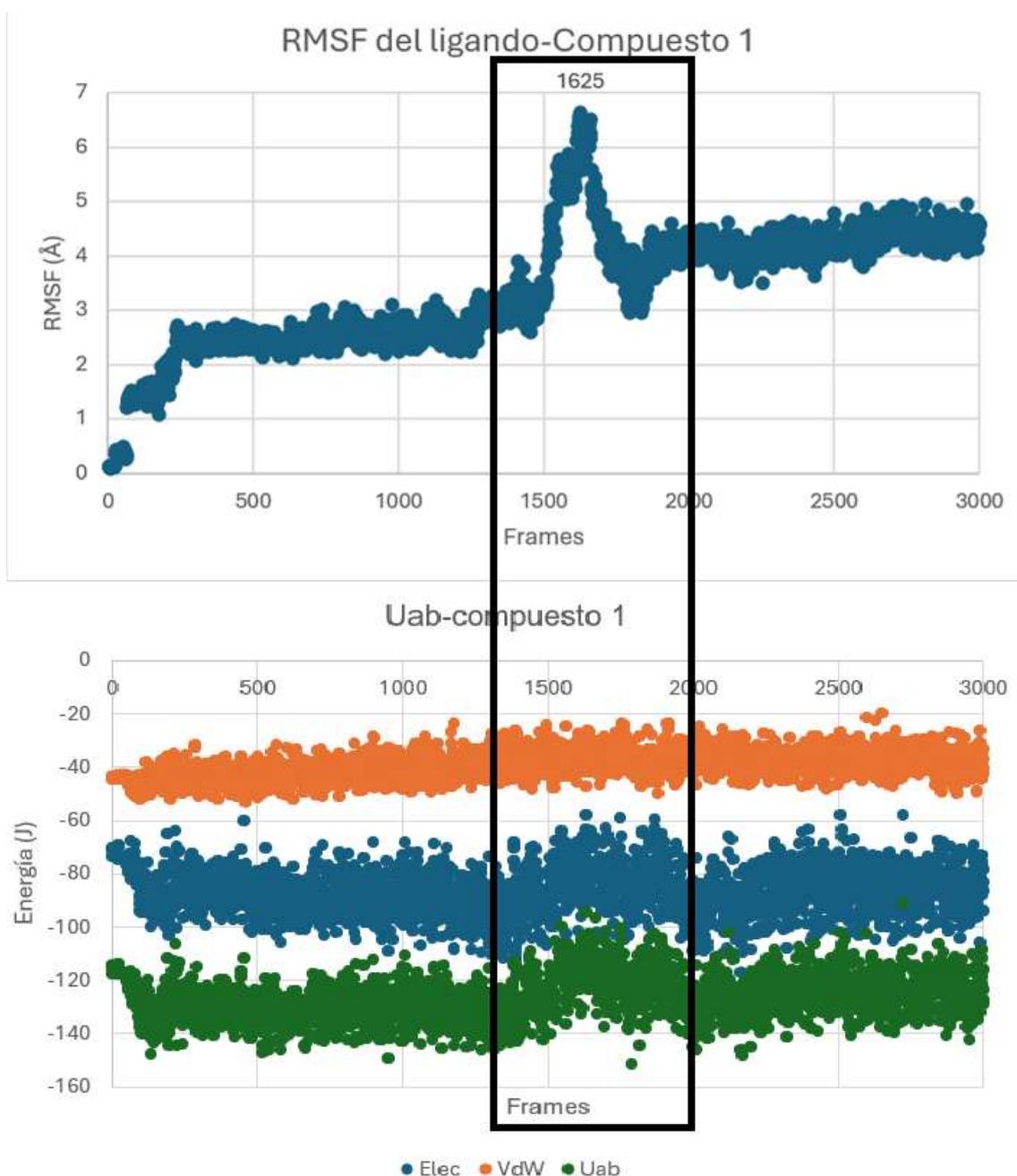


Figura 6.13: Comparación de la gráfica de RMSF del compuesto 1 y la gráfica de energía potencial total (Gráficas 6.2 y 6.3).

Luego de realizar las gráficas de Uab correspondientes, se calculó el valor de Uab promedio para cada uno de los compuestos estudiados. Estos valores se muestran en la tabla 6.7. Donde se aprecia que la estimación de la energía de interacción obtenida en la dinámica molecular no ordena los valores según lo

esperado, situando los compuestos denominados como activos por encima del SAH y los no activos por debajo. Los valores ordenados de Uab resulta en 2 falsos positivos y en 5 falsos negativos para la metilación en N7 y en 2 falsos positivos y 4 falsos negativos para la metilación en 2'O, de un total de 13 compuestos evaluados.

Compuesto	Uab	Compuesto	Ki para la metilación en N7 (µM)	Compuesto	Ki para la metilación en 2'O (µM)
5	-174,689	11	0,77	9	0,15
10	-157,501	10	0,82	10	0,17
3	-152,723	7	0,85	11	0,19
11	-151,233	12	1,30	12	0,20
9	-149,346	8	1,76	7	0,28
SAH	-148,877	4	2,10	4	0,52
SFG	-148,867	9	2,15	<b>SAH</b>	<b>0,57</b>
4	-146,608	<b>SAH</b>	<b>3,19</b>	8	0,75
6	-145,478	1	5,91	1	1,51
8	-144,704	6	6,03	2	2,07
7	-141,691	5	8,26	5	2,10
12	-140,607	3	10,86	3	3,45
2	-135,597	2	21,94	6	4,23
1	-126,440				

Tabla 6.7: Se muestran los valores de Uab calculados a partir de las trayectorias de las dinámicas moleculares realizadas y los valores de Ki para los compuestos analizados por los autores Lim et al.<sup>10</sup> Los compuestos se encuentran ordenados de menor a mayor valor en las 3 situaciones mencionadas.

Si bien esta es una mejor aproximación que la obtenida con el S de docking, se decide continuar con la evaluación del sistema por método más sofisticado. Por lo que se procedió a evaluar la energía de unión mediante MM/PBSA.

### 6.2.3. Estudio del poder predictivo del modelo: MM/PBSA

A partir de los resultados obtenidos en base a la puntuación del docking realizado y los valores de  $U_{ab}$ , se seleccionó la herramienta computacional conocida como: MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) para el cálculo de la energía de unión.<sup>14–16</sup> Este es un método computacional utilizado para la estimación de la energía libre de unión ( $\Delta G$ ) de un complejo proteína-ligando. El cálculo realizado para dicha estimación se basa en el ciclo termodinámico descrito en la figura 6.14.

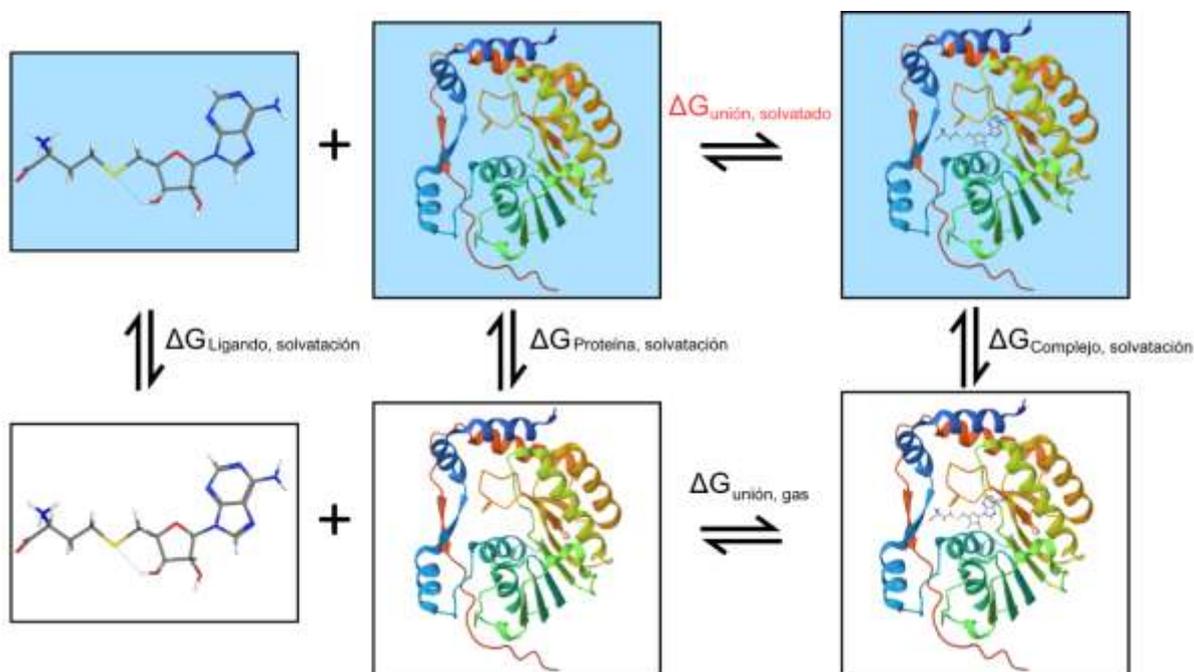


Figura 6.14: Basada en la figura reportada por Miller et al.<sup>14</sup> donde se presenta el ciclo termodinámico para el cálculo de la energía libre de unión. Los recuadros celestes hacen referencia a que los sistemas se encuentran solvatados y los recuadros blancos hacen referencia a que el sistema se encuentra en estado gaseoso. Las energías libres que se calculan directamente por MM/PBSA se muestran en color negro, mientras que la energía libre de interés en rojo.

14 Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8 (9), 3314–3321.

15 Genheden, S.; Ryde, U. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, 10 (5), 449–461.

16 Wang, C.; Greene, D.; Xiao, L.; Qi, R.; Luo, R. *Front. Mol. Biosci.* **2018**, 4, 87.

A partir de estos equilibrios, se observa que la energía de unión del complejo solvatado ( $\Delta G_{\text{unión, solvatado}}$ ), se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión, solvatado}} = \Delta G_{\text{complejo}} - (\Delta G_{\text{proteína}} + \Delta G_{\text{ligando}})$$

Donde en cada uno de los  $\Delta G$  se considera la especie solvatada y la especie en estado gas.

Sabiendo además que el  $\Delta G$  se define termodinámicamente como:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta H - T\Delta S$$

donde el  $\Delta H$  es la variación de la entalpía del sistema, la  $T$  es la temperatura y el  $\Delta S$  es la variación de la entropía del sistema. En las simulaciones de dinámica molecular la entalpía, que es la energía que el sistema intercambia con su entorno a presión constante, se calcula de la siguiente forma:

$$\Delta H = \Delta E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{solvatación}}$$

La energía de la fase gaseosa ( $\Delta E_{\text{gas}}$ ) es la energía calculada a partir de Mecánica Molecular (MM), que es la sumatoria de las energías de enlaces, ángulos, torsiones, interacciones de Van der Waals y electrostáticas. Este valor de  $\Delta E_{\text{gas}}$  se calcula a partir de la simulación de dinámica molecular. Mientras que la energía de solvatación ( $\Delta G_{\text{solvatación}}$ ) se calcula utilizando un modelo de solvente implícito. El  $\Delta G_{\text{solvatación}}$  se puede dividir en una componente polar y una componente no polar:

$$\Delta G_{\text{solvatación}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{no-polar}}$$

Donde el  $\Delta G_{\text{polar}}$  se obtiene típicamente resolviendo la ecuación Poisson-Boltzmann (PB), mientras que el término  $\Delta G_{\text{no-polar}}$  se estima a partir de una relación lineal con el área superficial accesible al solvente (SASA).

Estos cálculos de MM/PBSA se pueden realizar omitiendo el término entrópico ( $-T\Delta S$ ). Esto es factible de hacerse cuando los ligandos son similares entre sí y se evalúan en el mismo receptor. Por lo cual, en esta aproximación decidimos omitir este término, así que la ecuación final de  $\Delta G_{\text{unión}}$  quedaría como:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{no-polar}}$$

En este caso, el conjunto de datos para resolver la ecuación del  $\Delta G_{\text{unión}}$ , fueron extraídos de una única trayectoria de dinámica molecular (MD). El enfoque utilizado se conoce como protocolo de trayectoria única, ya que desde una misma trayectoria se generan los 3 conjuntos de datos.

Los pasos a seguir para realizar un análisis por MM/PBSA son los siguientes:

1. Simulación de Dinámica Molecular (MD): donde se genera una serie de estructuras representativas del sistema a lo largo del tiempo (frames)
2. Extracción de snapshots: Se seleccionan algunas de las trayectorias simuladas.
3. Cálculo de la energía de mecánica molecular (MM): Se obtiene la energía del sistema utilizando campos de fuerza, como AMBER o CHARMM.
4. Cálculo de Energía de Solvatación (PB/SA):
  - a. PB (Poisson-Boltzmann): Se resuelve la ecuación de Poisson-Boltzmann para estimar la contribución electrostática del solvente.
  - b. SA (Superficie accesible al solvente): Se estima la contribución no polar mediante el cálculo del área de superficie accesible.
5. Estimación de la Energía Libre de Unión: Se calcula la energía libre de unión a partir de los datos obtenidos anteriormente.

En nuestro caso, los pasos 3, 4 y 5, fueron realizados a partir de una herramienta conocida como CaFE 1.0 (“Calculation of free energy”),<sup>17</sup> donde se cargan los parámetros y se obtiene el valor de la energía libre de unión del sistema. Para el cálculo de PB, CaFE usa otro programa llamado APBS 1.3.

Para realizar el cálculo del  $\Delta G$  por el método MM/PBSA a partir de la dinámica molecular realizada con anterioridad, se seleccionaron los últimos 100 frames de dicha dinámica a los cuales se les eliminó el solvente para realizar los cálculos correspondientes. De estos frames se analizan por separado las estructuras del complejo, el ligando y la proteína utilizando la herramienta CaFE 1.0 y obtener así los valores de  $\Delta G_{\text{unión}}$  estimados.

En la tabla 6.8 y 6.9 se puede observar los valores obtenidos mediante MM/PBSA para cada uno de los análogos propuestos por los autores Lim et al.<sup>10</sup> En ambas

---

17 Liu, H.; Hou, T. *Bioinformatics* **2016**, 32 (14), 2216–2218.

tablas se ordenaron los compuestos de menor a mayor en base a su valor obtenido por MM/PBSA y se comparó con los compuestos ordenados según el  $K_i$  para la metilación en 2'O (tabla 6.8) y en N7 (tabla 6.9).

Compuestos	Energía MMPBSA	Compuestos	$K_i$ para la metilación en 2'O ( $\mu\text{M}$ )
12	5,3567	9	0,15
10	8,1781	10	0,17
9	10,1749	11	0,19
8	12,6028	12	0,2
1	13,1363	7	0,28
5	18,0812	4	0,52
<b>SAH</b>	<b>23,4606</b>	<b>SAH</b>	<b>0,57</b>
4	26,7916	8	0,75
3	30,4693	1	1,51
6	30,5846	2	2,07
7	30,5846	5	2,1
11	32,1007	3	3,45
SFG	34,7579	6	4,23
2	36,2192		

Tabla 6.8 Se muestran los valores de energía obtenidos por MM/PBSA y los valores de  $K_i$  para los compuestos analizados por los autores Lim et al.<sup>10</sup> en la metilación en 2'O. Los compuestos se encuentran ordenados de menor a mayor valor.

Compuestos	Energía MMPBSA	Compuestos	$K_i$ para la metilación en N7 ( $\mu\text{M}$ )
12	5,3567	11	0,77
10	8,1781	10	0,82
9	10,1749	7	0,85
8	12,6028	12	1,3
1	13,1363	8	1,76
5	18,0812	4	2,1
<b>SAH</b>	<b>23,4606</b>	9	2,15
4	26,7916	<b>SAH</b>	<b>3,19</b>
3	30,4693	1	5,91
6	30,5846	6	6,03
7	30,5846	5	8,26
11	32,1007	3	10,86
SFG	34,7579	2	21,94
2	36,2192		

Tabla 6.9 Se muestran los valores de energía obtenidos por MM/PBSA y los valores de  $K_i$  para los compuestos analizados por los autores Lim et al.<sup>10</sup> en la metilación en 7N. Los compuestos se encuentran ordenados de menor a mayor valor.

En ambos casos, se muestra la energía de unión por MM/PBSA del SFG es más elevada que la del SAH, lo que se contradice con lo esperado para este inhibidor.

Se decidió tomar como punto de corte el valor del SAH, de forma análoga que en el caso anterior. Donde los valores que estén por encima del SAH se consideraron como buenos inhibidores de la NS5-Mtasa-Den3.

En el caso de la metilación en 2'O, se reportan 3 falsos positivos y 3 falsos negativos con un total de 6 energías de unión calculadas erróneamente de un total de 13 compuestos evaluados. Mientras que en el caso de la metilación en N7, se reportan 2 falsos positivos y 4 falsos negativos con un total de 6 energías de unión calculadas erróneamente de un total de 13 compuestos evaluados.

Cabe aclarar que, en esta aproximación, para ambas metilaciones, solo se intentó recrear el orden de los compuestos dado por los valores de  $K_i$  siendo estos inhibidores o no, al seleccionar como punto de corte al SAH. No se evaluó el orden real que se esperaba de los compuestos dentro de estos dos grandes grupos.

Con el fin de intentar mejorar los valores obtenidos por MM/PBSA, se decidió seleccionar 4 de los compuestos para realizar la optimización del modelo. Estos compuestos fueron el compuesto 11 como inhibidor de la NS5-Mtasa-Den3, el SAH que fue el punto de corte seleccionado, y los compuestos 6 y 2 sin presentar actividad frente a NS5-Mtasa-Den3, que presentan el mencionado orden según su  $K_i$  reportado, para ambas metilaciones (Tabla 6.10).

Compuestos	Ki para la metilación en N7 ( $\mu\text{M}$ )	Compuestos	Ki para la metilación en 2'O ( $\mu\text{M}$ )
11	0,77	11	0,19
<b>SAH</b>	<b>3,19</b>	<b>SAH</b>	<b>0,57</b>
6	6,03	2	2,07
2	21,94	6	4,23

Tabla 6.10 Se muestran los valores de Ki para los compuestos seleccionados para la optimización ordenados de menor a mayor valor para ambas metilaciones.

La primera prueba fue realizar una nueva simulación de dinámica molecular de estos 4 compuestos con un total de 10 ns de simulación en vez de 5 ns (Tabla 6.11), donde se observaron pequeños cambios en los valores obtenidos de energía, pero el orden de los compuestos fue similar. Este orden determina que ninguno de los compuestos se presentaría como buen inhibidor, ya que presentan valores de Ki mayores que el SAH. Según el orden reportado en la tabla 6.11, se estaría en presencia de un falso negativo.

Compuestos	5 ns (spl2-mparse)	Compuestos	10 ns (spl2-mparse)
<b>SAH</b>	<b>23,4606</b>	<b>SAH</b>	<b>18,5457</b>
6	30,5846	6	28,8126
11	32,1007	11	32,5043
2	36,2192	2	35,1355

Tabla 6.11 Se muestran los valores de energía obtenidos por MM/PBSA realizando una dinámica molecular de 5ns y 10ns. El modelo de solvatación utilizado fue: spl2 en ambos casos. Los compuestos se encuentran ordenados de menor a mayor valor de energía.

Se decidió calcular a partir de la dinámica de 5 ns los valores de energía libre de unión utilizando el método MMPBSA, variando el cálculo del radio en los modelos de solvatación implícita (bondi, rowland, mparse), así como el método por el cual se asignan las cargas en el programa APBS (spl2, spl4) con el fin de obtener una mejor estimación en el cálculo.

En la Tabla 6.12 se presentan los valores de MMPBSA obtenidos para los diferentes modelos empleados. Al utilizar el modelo spl4-mparse se obtiene el mismo orden que en el caso anterior; al utilizar el modelo spl4-bondi el compuesto 11 se presenta como el mejor inhibidor, pero los compuestos 2 y 6 también se presentan como inhibidores, generando así dos falsos positivos; por último, el modelo spl4-rowland posicionó correctamente a los compuestos 11 y 6 respecto al SAH, pero no al compuesto 2. Lo que genera nuevamente un falso positivo.

Compuestos	5ns (spl4-mparse)	Compuestos	5ns (spl4-bondi)	Compuestos	5ns (spl4-rowland)
SAH	22,6044	11	-2,0836	11	-3,2455
6	29,5388	2	7,9215	2	7,5081
11	30,9351	6	9,4195	SAH	8,2063
2	35,4105	SAH	10,2408	6	8,6598

Tabla 6.12 Se muestran los valores de energía obtenidos por MM/PBSA realizando una dinámica molecular de 5ns variando el modelo de solvatación implícita utilizado: spl4, spl4-bondi, y spl4-rowland.

Se puede observar que, si bien el modelo puede predecir cierto orden acorde a los valores reportados de  $K_i$ , presenta algunos errores en la estimación. De los modelos ensayados, el modelo de solvatación implícita spl4-rowland se presume el más adecuado en su estimación, ya que solo se obtuvo un falso positivo. Mientras que el modelo de solvatación spl4 presentó un falso negativo y el de spl4-bondi dos falsos positivos.

Si comparamos los valores de  $K_i$  obtenidos para ambas metilaciones se aprecia que un mismo compuesto puede ser un buen inhibidor para una de las metilaciones y un inhibidor regular o nulo para la otra. Como ocurre con los compuestos 8 y 9. Esto sumado al hecho de que los compuestos evaluados son muy similares entre sí y presentan grandes diferencias en los valores de  $K_i$  reportados entre ellos, se podría concluir que no fue posible para el modelo utilizado predecir una variación tan sutil en la estructura que cause tal grado de diferenciación en la actividad inhibitoria.

A partir de estos, se plantearon tres caminos a seguir. Uno de ellos es volver a realizar los estudios de MM/PBSA sin omitir el término  $-T\Delta S$  en el cálculo. Esta omisión se realizó para simplificar los cálculos, pero al agregarlo podría mejorar la aproximación de los valores de  $\Delta G_{\text{unión}}$  obtenidos. Esto conlleva un mayor costo computacional y por ende un mayor tiempo, además de la necesidad de varias trayectorias de dinámica molecular para poder estimar este término. Otro camino, es utilizar métodos computacionales de simulación más sofisticados como SMD (“Steered Molecular Dynamics”),<sup>18</sup> FEP (“Free energy perturbation”),<sup>19</sup> con el fin de obtener una mejor predicción de los valores de energía libre de unión. Esta opción requiere que se evalúen y optimicen nuevos métodos de simulación, sumado al hecho de que ambas opciones requieren un costo computacional más elevado que los utilizados hasta el momento con MM/PBSA. El último camino, es el de introducir los datos experimentales obtenidos para nuestro propio sistema proteína-ligando. Utilizando la enzima de interés NS5-Mtasa-Den2 y los compuestos sintetizados para obtener datos de actividad se podría entrenar el sistema con el fin de poder predecir actividad de futuros compuestos. En este caso, de ser necesario se podría igualmente recurrir a métodos computacionales de simulación más sofisticados si no es posible obtener resultados al utilizar el método MMPBSA.

Seleccionamos esta última opción y se decidió esperar hasta obtener los compuestos de interés sintetizados y los datos de actividad inhibitorios para continuar con estos estudios computacionales.

---

18 Patel, J. S.; Berteotti, A.; Ronsisvalle, S.; Rocchia, W.; Cavalli, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (2), 470–480.

19 Wu, D.; Zheng, X.; Liu, R.; Li, Z.; Jiang, Z.; Zhou, Q.; Huang, Y.; Wu, X.-N.; Zhang, C.; Huang, Y.-Y.; Luo, H.-B. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12* (3), 1351–1362.

### 6.3. Aplicación del modelo de docking a los compuestos de interés.

A partir de lo discutido anteriormente, se decidió someter a los compuestos de interés al modelo de docking con el fin de obtener una pose de la proteína-análogo sintetizado para poder continuar con las simulaciones de dinámica molecular y posteriores cálculos de la energía libre de unión una vez obtenidos los datos de inhibición correspondiente.

Se decidió comenzar con el docking de los compuestos de las series A, B, y C con el fin de obtener el complejo proteína-análogo como punto de partida de la simulación de dinámica molecular. (Tabla 6.13)

	<b>Análogo al SAM sintetizado</b>	<b>S docking</b>
<b>SERIE A</b>	10	-8.1216
	12	-10.2141
	17	-8.8234
	18	-9.7282
	29	-9.3947
	41	-8.9017
	46	-7.9454
<b>SERIE B</b>	32a	-9.2132
	32b	-9.9485
	32c	-9.6007
	32d	-9.6952
	32e	-9.3516
	32f	-9.9088
	32g	-9.2002
	32h	-9.3694
	32i	-9.0829
	32j	-9.4403
<b>SERIE C</b>	50a	-8.7435
	50b	-9.7338
	50c	-9.5415
	51a	-8.0475
	51b	-8.8346
	51c	-8.9889

Tabla 6.13 Se muestran los valores de S obtenidos con el programa de Dcoking para los compuestos de la serie A, serie B y serie C tratados en los capítulos 3, 4 y 5.

Se decidió agregar al estudio de docking los compuestos **51a-c**, aunque no fue posible su síntesis. Si comparamos las poses obtenidas para los compuestos **50a-c** frente a los compuestos **51a-c**, se observa que estos últimos se acomodan con una mejor disposición en el bolsillo de unión al co-factor. Los compuestos **50a-c** tienen presente en su estructura el grupo fenilo el cual es muy voluminoso y no cabe dentro del bolsillo. Por lo cual, los compuestos 50a-c orientan el grupo etilo hacia el bolsillo y la cadena que soporta al triazol hacia afuera del bolsillo, esto se observa en la figura 6.15. Si se comparan los valores de S obtenidos para estos compuestos, los valores de S son menores para los compuestos **50a-c** respecto al valor de S de su respectivo análogo **51a-c**. Esto demuestra que la inspección visual se vuelve relevante al momento de seleccionar las poses a utilizar para la dinámica molecular.

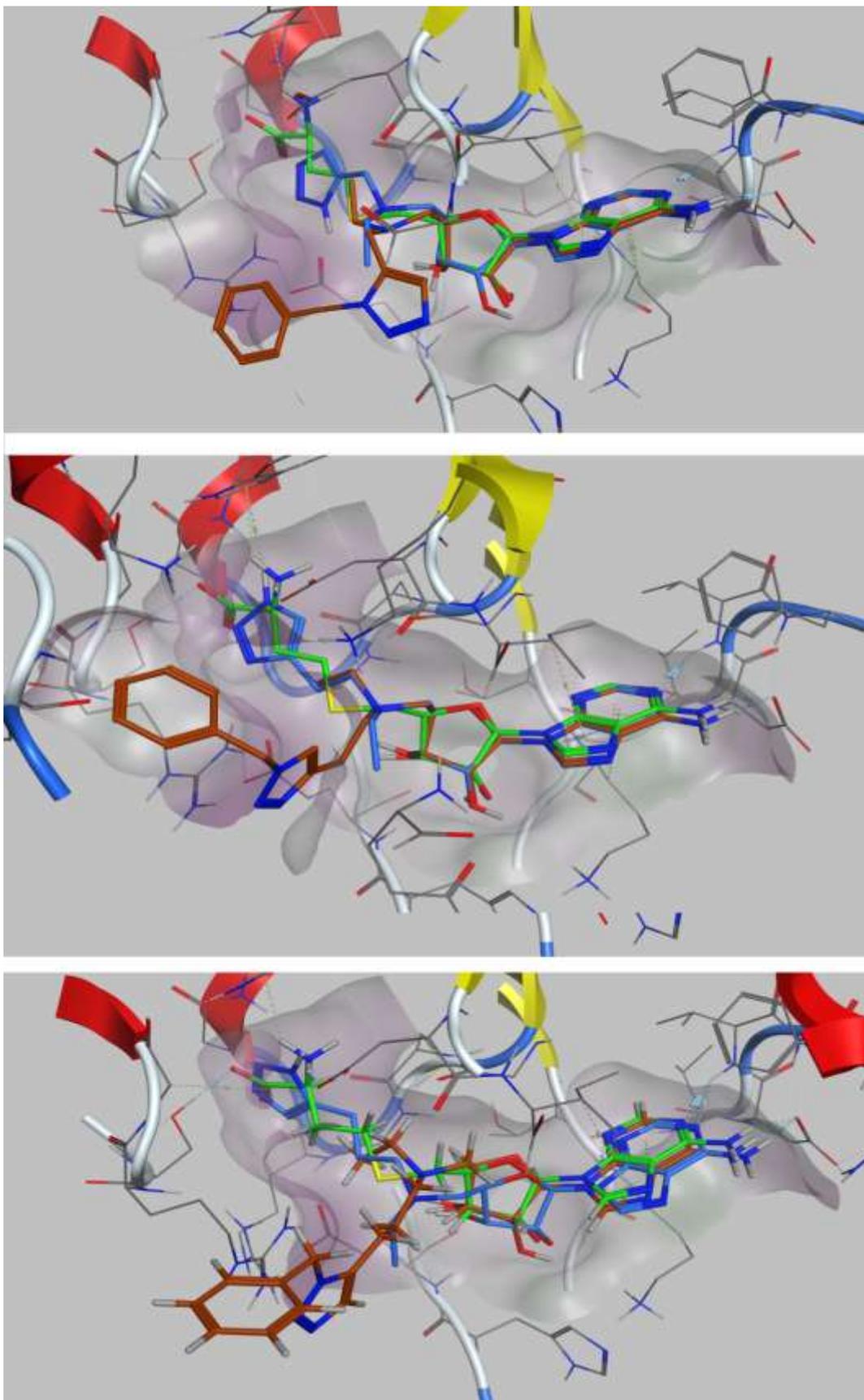


Figura 6.15: Se muestra la superposición de las estructuras obtenidas por docking para: SAH (verde), el compuesto 50 (marrón) y el compuesto 51 (azul), para los tres compuestos análogos a triazol de la a-c.



# Capítulo 6:



## Parte Experimental



### **Modelo Computacional:**

Los experimentos de docking se llevaron a cabo en el programa Molecular Operating Environment (MOE.2015.10).

#### **Preparación de la proteína 1L9K:**

Se abre la estructura 1L9K en el programa, se eliminan las moléculas de agua y las moléculas de sulfato. Se aplica el campo de fuerza Amber12: EHT y se realiza una protonación de la estructura con el Protonate 3D (parámetros por default). Posteriormente se realiza una minimización energética (parámetros por default). Se guarda el archivo con el nombre **1L9K-1**.

Se abre la estructura 1L9K en el programa, se conservan únicamente las 4 moléculas de agua seleccionadas: 910, 940, 955y 956. Se aplica el campo de fuerza Amber12: EHT y se realiza una protonación de la estructura con el Protonate 3D (parámetros por default). Posteriormente se realiza una minimización energética (parámetros por default). Se guarda el archivo con el nombre **1L9K-2**.

#### **Preparación de los ligandos:**

-Ligando-PDB: Estos ligandos fueron extraídos del cristal correspondiente al cual se le aplicó el campo de fuerza Amber12: EHT y el Protonate 3D (parámetros por default). Por lo cual la conformación que presenta el ligando es la misma que la reportada en el pdb.

-Ligando-PDB-Minimizado: Estos ligandos fueron extraídos del cristal correspondiente al cual se le aplicó el campo de fuerza Amber12: EHT y el Protonate 3D (parámetros por default). El ligando es guardado sin la proteína y posteriormente se le realiza una minimización de energía (parámetros por default).

-Ligando-Chemdraw-Minimizado: Estos ligandos fueron dibujados en el Chemdraw y luego guardados en el programa MOE. A estos se le aplicó el campo de fuerza Amber12: EHT y posteriormente se le realiza una minimización de energía (parámetros por default).

### **Parámetros del docking:**

Para la realización de los docking por MOE\_GOLD se seleccionaron los siguientes parámetros:

Receptor: Receptor+solvente

Sitio: -Ligando, bolsillo

-Dummy átomos

-Receptor

Ligando: -Ligando-1L9K

-Ligando-1L9K-Minimizado

-Ligando-Chemdraw-Minimizado

Otros parámetros relevantes:

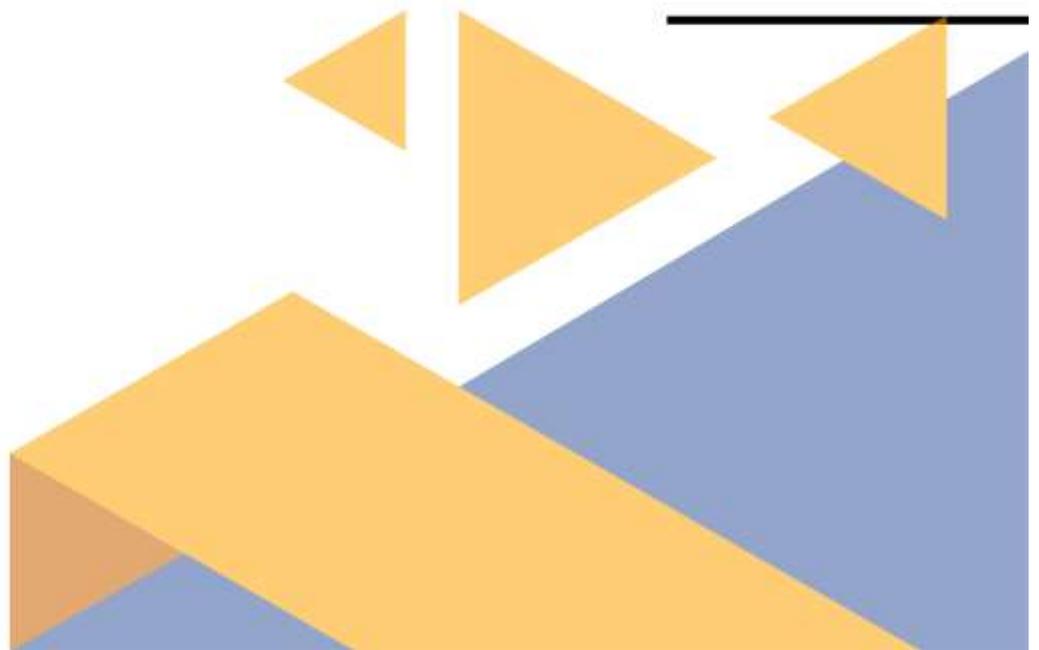
- Refinamiento: Receptor rígido (Docking semi-flexible)
- Minimización: GBVI/WSA dG
- Poses: Posicionamiento: 85/ Refinamiento: 5





## **Capítulo 7:**

# **Producción y evaluación de la enzima NS5-Mtasa-Den2.**



## Antecedentes

El virus del dengue es un virus de ARN de cadena simple de sentido positivo con envoltura (figura 7.1). Esta cadena de ARN viral funciona directamente como ARN mensajero (ARNm), el cual es liberado en el citosol de la célula huésped al ingresar el virus. Este ARNm es traducido en los ribosomas de la célula huésped para producir una poliproteína viral. Esta poliproteína es la precursora de 10 proteínas maduras, de las cuales, tres son proteínas estructurales (cápside (C), envoltura (E), premembrana (prM)), y las siete restantes son proteínas no estructurales denominadas como: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las cuales tienen diversas actividades enzimáticas. Entre ellas, la NS5 presenta 2 dominios con diferente actividad, en la zona del C terminal presenta actividad polimerasa, mientras que en la zona del N terminal presenta actividad metiltransferasa.<sup>1</sup>

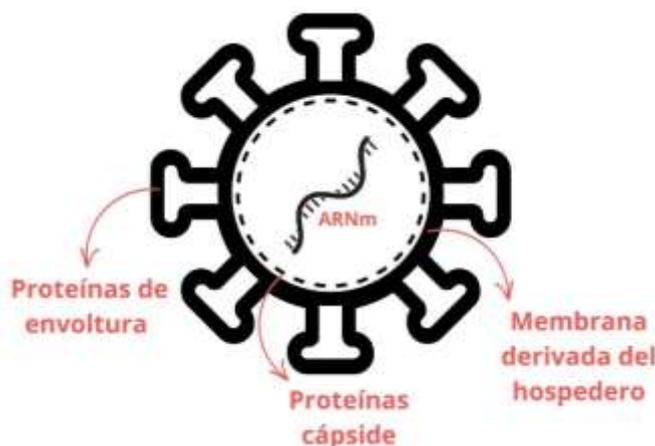


Figura 7.1: Esquema del virus del dengue.

Una vez que el ARNm viral es sintetizado es encerrado por las proteínas de cápside formando una nucleocápside. En el siguiente paso se agrega la envoltura viral y la capa externa protectora, obteniéndose virus inmaduros. Esto ocurre cuando la nucleocápside es envuelta por la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RE) de la célula hospedera y posteriormente es rodeada

<sup>1</sup> Dong, H.; Zhang, B.; Shi, P.-Y. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (1), 1–10.

por las proteínas de pre-membrana y de envoltura. Una vez formados estos virus inmaduros, viajan a través del aparato de Golgi donde maduran y se transforman en su forma infecciosa. Una vez que esto ocurre, los virus del dengue maduros son liberados y continúan infectando otras células.<sup>2,3</sup> (Figura 7.2).

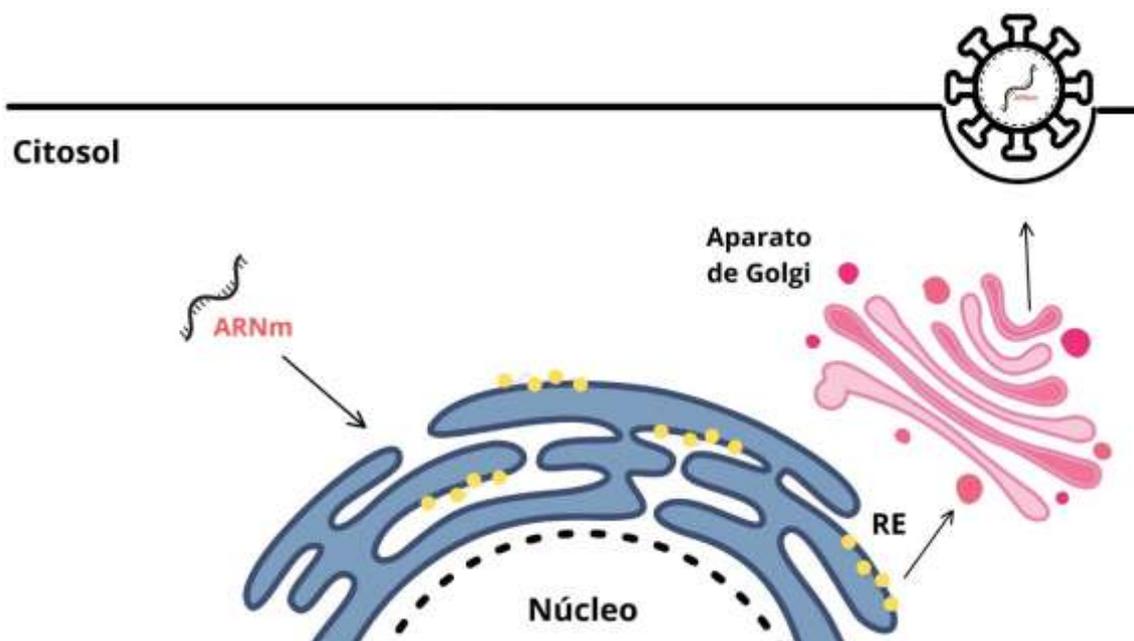


Figura 7.2: Resumen de parte del ciclo de vida del virus del dengue al infectar una célula humana. En azul se representa el retículo endoplasmático (RE), en rosado el aparato de Golgi y en amarillo las proteínas virales.

Se hace evidente a partir de lo discutido la importancia de la síntesis del ARNm para la replicación viral. Dicha síntesis comienza con la formación de la hebra complementaria de ARNm en sentido negativo (-ssARN), la cual sirve de molde para la producción de nuevas copias del ARNm (en sentido positivo). Tanto la formación del -ssARN como las nuevas copias del ARNm son llevados a cabo por la proteína no estructural NS5 en su dominio polimerasa. A medida que se está formando la hebra del nuevo ARNm, a partir del molde -ssARN, ocurre la formación de la caperuza en el extremo 5'. Dicha caperuza es una modificación estructural que se presenta fundamental ya que otorga estabilidad al ARNm viral

2 Nanaware, N.; Banerjee, A.; Mullick Bagchi, S.; Bagchi, P.; Mukherjee, A. *Viruses* **2021**, *13* (10), 1967.

3 Rodenhuis-Zybert, I. A.; Wilschut, J.; Smit, J. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (16), 2773–2786.

y genera una traducción eficiente. En este tipo de virus, la estructura de la caperuza es de tipo 1 (presenta metilación en el primer nucleótido de la secuencia), presentando una secuencia de dinucleótidos AG, altamente conservada dentro de la familia de los flavivirus. (m7GpppAmG).

La producción de esta caperuza en el ARNm consiste en cuatro modificaciones enzimáticas. Se comienza con la hidrólisis del extremo 5-trifosfato del ARNm naciente para dar un 5-difosfato, lo que ocurre mediante una ARN trifosfatasa, una de las actividades enzimáticas que presenta la proteína no estructural NS3. Como segundo paso, la fracción GMP (Gp) de GTP (Gppp) se transfiere al 5-difosfato del ARNm por una ARN guanililtransferasa, resultando en la estructura GpppA. Los autores Bussetta, C et al.,<sup>4</sup> afirman que la actividad guanililtransferasa se lleva a cabo por la subunidad NS5 en su dominio metiltransferasa. Una vez formada la estructura GpppA-ARNm, la subunidad NS5-metiltransferasa lleva a cabo 2 metilaciones consecutivas, la primera en la posición N-7 de la guanina (Caperuza tipo 0) y la segunda en la primera adenosina de la secuencia en la posición 2'O (Caperuza tipo1). Ver Figura 7.3 y Figura 7.4. Esta metiltransferasa utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como dador del grupo metilo y se genera como subproducto el S-adenosilhomocysteína (SAH).<sup>1-3</sup>

Como ya se ha mencionado, nuestro blanco de interés es la metiltransferasa de la subunidad NS5, en particular la perteneciente al virus del dengue del serotipo 2 (NS5-Mtasa-Den2).

---

4 Bussetta, C.; Choi, K. H. *Biochemistry* **2012**, 51 (30), 5921–5931.

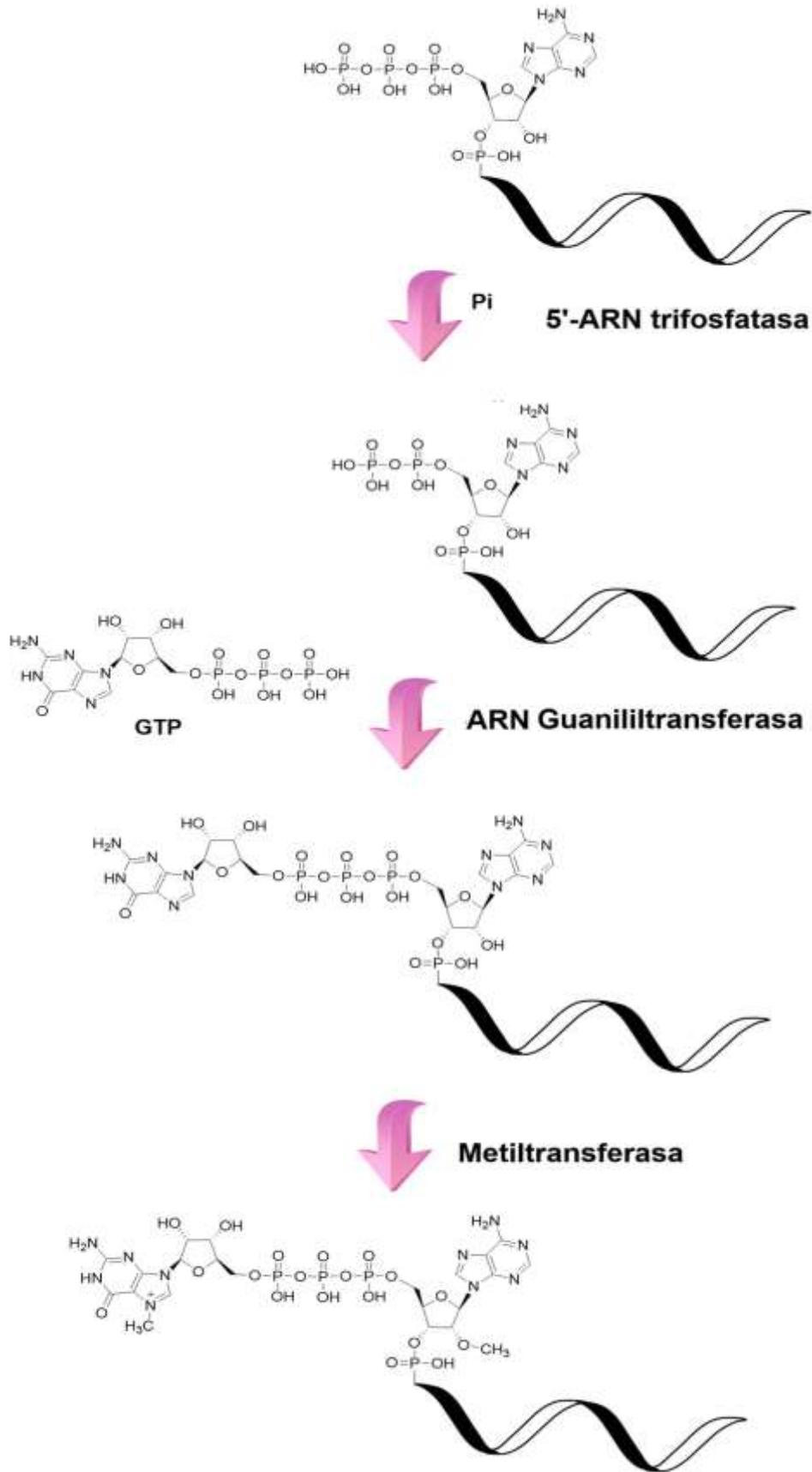


Figura 7.3: Formación de la caperuza 5' del ARN mensajero.

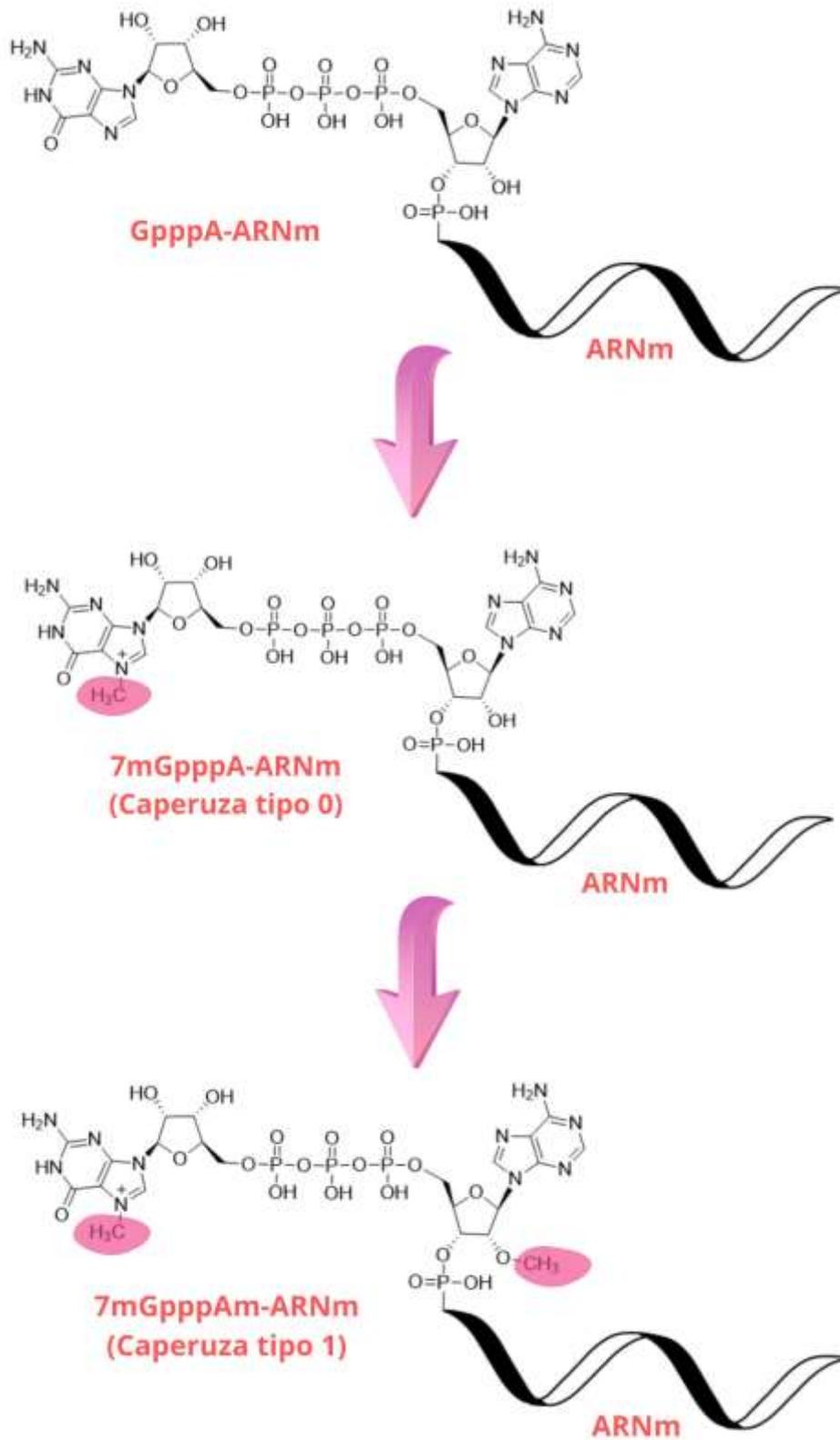


Figura 7.4: Metilaciones realizadas por la enzima NS5-Mtasa-Den2 para formar la caperuza 5' del tipo 1 del ARNm.

### 7.1. Evaluación de las metiltransferasas de origen comercial

Uno de los objetivos planteados fue el estudio de las interacciones proteína ligando mediante RMN. Para esto, es indispensable contar con el sistema de estudio completo, el cual comprende a la proteína y a los ligandos a ser evaluados.

En nuestro caso, al inicio de este trabajo no contábamos con la enzima de interés NS5-Mtasa-Den2 para la realización de los estudios de interacción proteína-ligando. Por lo cual, decidimos adquirir una enzima metiltransferasa para dicho estudio. Comenzamos con una búsqueda de enzimas metiltransferasas disponibles comercialmente, cuyo objetivo fue encontrar una metiltransferasa que presentara cierto grado de similitud con la enzima de interés (NS5-Mtasa-Den2), con el fin de utilizarla en los estudios interacción proteína ligando por RMN.

La búsqueda se concentró en enzimas metiltransferasas cuyo sitio activo y sistema metil dador-aceptor fueran adecuados como modelo. Comenzando con la búsqueda de las empresas que comercializan dichas enzimas, se destacaron New England Biolabs,<sup>5</sup> y Creative enzymes,<sup>6</sup> como posibles proveedores.

Seleccionamos 3 requisitos mínimos para la elección de estas metiltransferasas:

1. Utilizar SAM como dador de metilo.
2. Utilizar ARN como sustrato.
3. Tener una estructura cristalina reportada en el pdb.

En la tabla 7.1, se presentan las enzimas de origen comercial resumiendo si cumplen o no con estos requisitos.

---

5 [https://www.Neb.Uk.Com/](https://www.neb.uk.com/) Visitada: 20 de marzo 2019

6 [https://www.Creative-Enzymes.Com/](https://www.creative-enzymes.com/) Visitada: 20 de marzo 2019.

ENZIMA	PDB	SAM	SUSTRATO	
			ADN	ARN
AluI Metiltransferasa	NO	Si	X	
BamHI Metiltransferasa	NO	Si	X	
CpG Metiltransferasa (M.SssI)	NO	SI	X	
dam Metiltransferasa	SI	SI	X	
EcoGII Metiltransferasa	NO	Si	X	X
EcoRI Metiltransferasa	NO	SI	X	
GpC Metiltransferasa (M.CviPI)	NO	SI	X	
HaeIII Metiltransferasa	SI	SI	X	
HhaI Metiltransferasa	SI	Si	X	
HpaII Metiltransferasa	NO	Si	X	
MspI Metiltransferasa	NO	SI	X	
TaqI Metiltransferasa	SI	SI	X	
AluI Metiltransferasa	NO	Si	X	
BamHI Metiltransferasa	NO	SI	X	
CpG Methyltransferas (M.SssI)	NO	SI	X	
Nicotinamida N-Metiltransferasa de origen Humano	SI	SI	-	-

Tabla 7.1: Resumen de la información extraída para cada una de las enzimas de origen comercial en base a los 3 requisitos propuestos.

De las enzimas relevadas, ninguna cumple con los tres requisitos planteados. Si bien todas presentan SAM como co-factor, solo una de ellas tiene ARN como sustrato (EcoGII).<sup>7</sup> Con respecto al tercer requisito, solo 5 de ellas presentan estructura reportada en el pdb: la adenina-N6-metiltransferasa de *Thermus aquaticus* (TaqI),<sup>8</sup> la 5-Citosina-metiltransferasa de *Haemophilus influenzae* biotype *aegyptius* (HaeIII),<sup>9</sup> la 5-Citosina-metiltransferasa de *Haemophilus haemolyticus* (HhaI),<sup>10</sup> la adenina-metiltransferasa de *E. coli* (dam),<sup>11</sup> y la N-Nicotinamida metiltransferasa de origen humano (NNMT).<sup>12</sup>

---

7 Murray, I. A.; Morgan, R. D.; Luyten, Y.; Fomenkov, A.; Corrêa, I. R.; Dai, N.; Allaw, M. B.; Zhang, X.; Cheng, X.; Roberts, R. J. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (2), 840–848.

8 Schluckebier, G.; Kozak, M.; Bleimling, N.; Weinhold, E.; Saenger, W. *J. Mol. Biol.* **1997**, *265*, 56–67.

9 Reinisch, K. M.; Chen, L.; Verdine, G. L.; Lipscomb, W. N. *Cell* **1995**, *82* (1), 143–153.

10 Cheng, X.; Kumar, S.; Posfai, J.; Pflugrath, J. W.; Roberts, R. J. *Cell* **1993**, *74* (2), 299–307.

11 Horton, J. R.; Liebert, K.; Bekes, M.; Jeltsch, A.; Cheng, X. *J. Mol. Biol.* **2006**, *358* (2), 559–570.

12 Swaminathan, S.; Birudukota, S.; Thakur, M. K.; Parveen, R.; Kandan, S.; Juluri, S.; Shaik, S.; Anand, N. N.; Burri, R. R.; Kristam, R.; Hallur, M. S.; Rajagopal, S.; Schreuder, H.; Langer, T.; Rudolph, C.; Ruf, S.; Dhakshinamoorthy, S.; Gosu, R.; Kannt, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491* (2), 416–422.

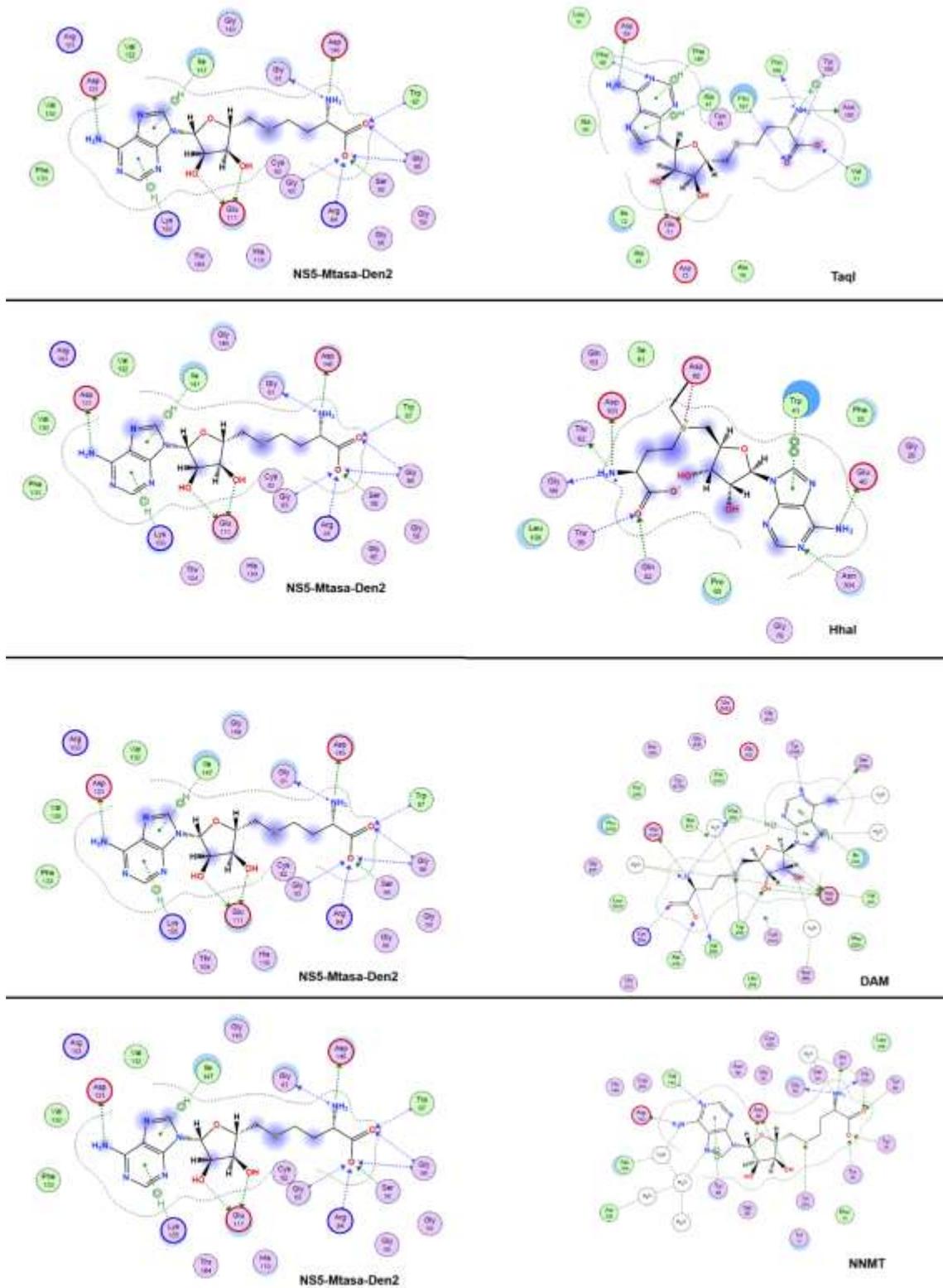


Figura 7.5: Interacciones presentes entre el bolsillo de las metiltransferasas de origen comercial respecto al SAM o SAH comparadas con las interacciones presentes en el bolsillo de NS5-Mtasa-Den2 de interés respecto al SAH.

Continuando con el estudio, realizamos una comparación del sitio de unión, por lo que seleccionamos los pdb's correspondientes a cada uno de las metiltransferasas. Se aplicó el campo de fuerza Amber:10 y posteriormente una minimización de energía al complejo con las condiciones preestablecidas por el programa MOE. Los pdb's seleccionados fueron: TaqI (1aqi), HhaI (1HMY), DAM (2g1p), NNMT (2iip) y NS5-Mtasa-Den2 (1L9K). La metiltransferasa HaeIII presentaba estructura reportada en el pdb pero no se encontraba co-cristalizada con SAH o SAM, por lo cual esta enzima quedó por fuera del mencionado análisis.

En la figura 7.5 se observan las interacciones que presenta el SAH o SAM en el sitio de unión de la metiltransferasa correspondiente. La metiltransferasa TaqI presentó solamente dos residuos similares en interacción con el SAH (Glu que interacciona con el diol de la ribosa y el Asp en la amina de la purina) respecto a la enzima de interés. Siendo esta la enzima que presentó una mayor similitud con la enzima NS5-Mtasa-Den2 en cuanto a la interacción entre los residuos aminoacídicos y el co-factor. En el caso de las enzimas estudiadas, ninguna presenta un grado aceptable de similitud con la metiltransferasa NS5-Mtasa-Den2 de interés, por lo cual ninguna sería apta para ser utilizadas en nuestro sistema de estudio.

A partir de estos resultados y de una búsqueda bibliográfica sobre estas metiltransferasas de origen comercial, la NNMT (la N-Nicotinamida metiltransferasa de origen humano) se presentó como un blanco interesante. Se ha relacionado esta enzima con enfermedades como el cáncer, la diabetes y el Parkinson.<sup>13</sup> Además, por ser una enzima metiltransferasa de origen humano, su estudio por RMN frente a los compuestos propuestos en el capítulo 2, sentaría las bases para futuros estudios de selectividad.

Por estas razones, se solicitó la cotización pertinente a distintas empresas y se comenzaron las gestiones necesarias para acceder a la misma. Debido a la pandemia por Covid19 entre los años 2020-2021, la obtención de la enzima de origen comercial se vio imposibilitada. Adicionalmente, al comenzar con la

---

13 Pissios, P. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, 28 (5), 340–353.

elección y optimización de los experimentos de RMN para el estudio proteína-ligando, se presentó como requisito indispensable una cantidad considerable de proteína para llevar a cabo el estudio de los compuestos propuestos (en los experimentos realizados utilizando sero albúmina de origen bobino, ver capítulo 8, se utilizaron aproximadamente 0.2 mg por muestra). Esto representaba un presupuesto mayor que era imposible de costear, por lo tanto, decidimos que la producción de la proteína sería una mejor opción. Para esto, establecimos una colaboración con el grupo de la Dra. Susana Castro-Sowinski de Facultad de Ciencias con el fin de producir en su laboratorio la NS-Mtasa-Den2 de interés.

El hecho de que la producción de esta enzima se lleve a cabo en nuestro país presenta grandes ventajas. La principal es la obtención de una mayor cantidad de proteína, así como también la disminución en los costos de obtención y la evasión de los problemas logísticos de importación y transporte. Por lo cual, se procedió a la producción de NS-Mtasa-Den2 como una proteína recombinante.

## 7.2. Producción de NS5-Mtasa-Den2

Las proteínas recombinantes son proteínas que se producen en condiciones de laboratorio, donde se inserta un plásmido (molécula de ADN circular que se replica de forma autónoma) en la célula de un organismo huésped, generalmente en bacterias *E.coli*.

Dentro de este plásmido, se encuentra el gen que codifica a la proteína de interés y se suele agregar una etiqueta His lo que codifica a una cola de residuos de histidinas (His) al final de la proteína. Esto se utiliza para purificar la proteína recombinante de interés a partir de la unión específica de estos residuos a varios tipos de iones metálicos inmovilizados en una resina, como por ejemplo el níquel. Adicionalmente, se agrega la resistencia a antibiótico, por ejemplo, a la kanamicina, lo que permite obtener únicamente las cepas de *E.coli* que efectivamente poseen el plásmido al crecer estas células en medios de cultivo enriquecidos con el antibiótico.

En nuestro caso, se adquirió el plásmido codificante de la proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2 con la empresa GenScript Biotech Corporation. Se seleccionó únicamente el dominio metiltransferasa como proteína recombinante, en vez de utilizar toda la subunidad NS5 con los dominios polimerasa y metiltransferasa ya que se ha reportado en varios artículos la utilización de esta estrategia.<sup>14</sup>

En una primera instancia, la producción y purificación de la proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2 se llevó a cabo por el Dr. Juan José Marizcurrena en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República.

Una vez que se realizó la producción de la enzima recombinante se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE con un indicador de peso molecular para comprobar que la proteína obtenida se encontraba alrededor del peso teórico de NS5-Mtasa-Den2 (35 kDa aproximadamente) más la cola de histidinas, (Figura 7.6).

---

<sup>14</sup> Eglhoff, M.-P. *EMBO J.* **2002**, 21 (11), 2757–2768.

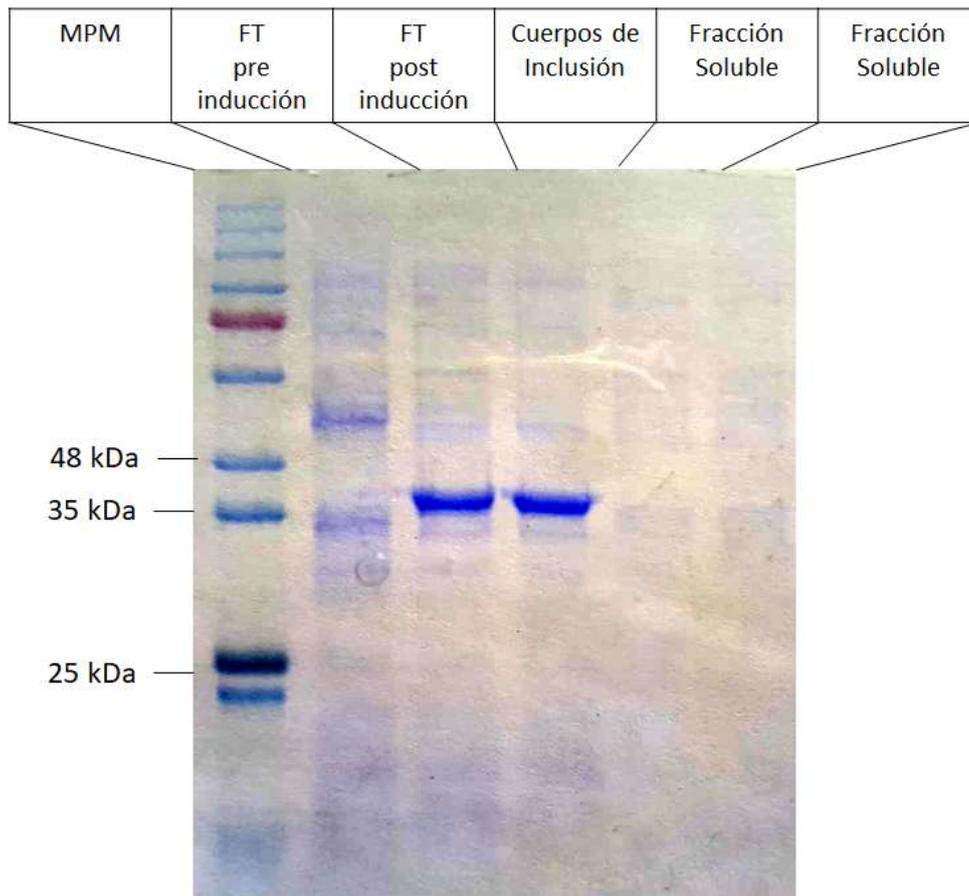


Figura 7.6: Gel resultado de la SDS-PAGE comparando el indicador del peso molecular, la pre-inducción, post-inducción, los cuerpos de inclusión y las fracciones solubles.

En el gel se determinó que la expresión de NS5-Mtasa-Den2 ocurrió. Esto se observa al comparar los carriles de pre-inducción y post-inducción. La franja azul mayoritaria, con un peso molecular levemente por encima de 35kDa, observada en el carril de post-inducción corresponde a la proteína de interés. Mientras que en el carril de pre-inducción, donde vemos las proteínas correspondientes a *E.coli*, no se observa dicha franja.

Asimismo, se observa que la NS5-Mtasa-Den2 se obtiene en una cantidad apreciable, pero que la mayoría de ésta se encuentra en cuerpos de inclusión. Éstos son agregados de proteínas que se producen en bacterias cuando se enfrentan a estrés celular. La obtención de proteína de cuerpos de inclusión presenta una mayor complejidad al momento de obtener una enzima activa, ya que se debe resolubilizar y replegar dicha proteína. Obtener las condiciones

óptimas para lograr esto es un trabajo que necesita una alta dedicación y conocimientos específicos en el área de producción de proteínas recombinantes.

Por estas razones, se decidió continuar con la purificación de la fracción soluble, aunque la concentración de proteína sea menor, (Figura 7.6). Se calculó la concentración en base al coeficiente de extinción molar de esta proteína ( $50420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), el peso molecular (35 kDa) y la absorción a 280 nm de la muestra, se determinó que la concentración fue de 1.5 mg/mL. Como se obtuvo 1 mL de muestra enriquecida en la proteína de interés, se traduce en 1.5 mg totales de proteína recombinante pura. Por tanto, el rendimiento fue de 0.01 g/L de cultivo en la fracción soluble.

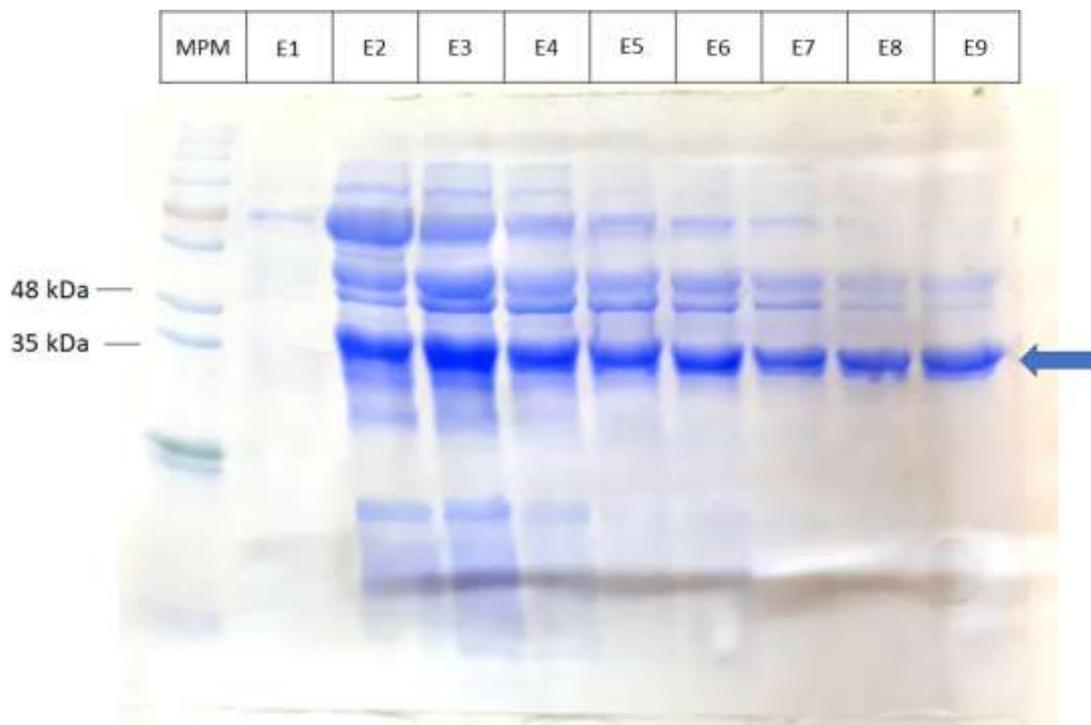


Figura 7.7: Purificación por IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmobilizados) de la proteína en la fracción soluble. Donde se comparan las diferentes fracciones de elución respecto a un indicador de peso molecular.

Al producir una proteína recombinante es necesario comprobar que la misma se encuentra plegada correctamente. Como la actividad enzimática depende del plegamiento de la proteína, una forma de comprobar que la NS5-Mtasa-Den2 se

encuentre en su forma nativa, y no desnaturalizada, es a partir de un ensayo de actividad metiltransferasa.

Si bien la purificación realizada no fue muy exhaustiva y se observan algunas proteínas como impurezas (fracciones E8 y E9), consideramos que la pureza era suficiente para continuar con el mencionado ensayo de actividad. (Figura 7.7)

### 7.3. Ensayo de actividad: Consideraciones iniciales.

Se han reportado varias estrategias para evaluar la actividad al producir metiltransferasas como proteínas recombinantes, que presentan SAM como dador de metilo.

La estrategia más utilizada es la reportada por los autores Egloff, M.-P et al.,<sup>14</sup> quienes realizaron la producción, purificación y cristalización de la enzima NS5-Mtasa-Den2. Posteriormente publicaron la estructura cristalográfica en pdb con el código 1L9K. En este trabajo, los autores evaluaron la actividad metiltransferasa siguiendo la transferencia del grupo metilo tritiado (<sup>3</sup>H) del SAM a varios sustratos de ARN utilizando un ensayo de unión a filtros. Este es un método rápido para el análisis de la unión entre proteína y ácidos nucleico.<sup>15,16</sup> Se basa en que al filtrar la muestra por una membrana de nitrocelulosa la proteína queda retenida mientras que el ADN o el ARN no lo hace, a menos que este se encuentre unido a la proteína. Posteriormente, los autores realizan un estudio de los productos obtenidos. Análogamente, los autores Fiorucci, D. et al,<sup>17</sup> utilizan el mismo enfoque al realizar un ensayo de unión a filtros, salvo que estos autores además de trabajar con la proteína NS5-Mtasa-Den2, trabajaron con la metiltransferasa del virus del zika (Zika-Mtasa).

Por otra parte, los autores Peyrane, F. et al.,<sup>18</sup> realizaron la metilación de distintos fragmentos de ARN conteniendo análogos al cap5'. El monitoreo de esta reacción fue realizado mediante HPLC-MS de forma cuantitativa y no se requirió el uso de núcleos radioactivos.

Respecto a estas dos opciones para evaluar la actividad metiltransferasa, ambas presentan grandes desventajas para su implementación en nuestro laboratorio.

---

15 Kihara, H. K.; Kuno, H. *Anal. Biochem.* **1968**, *24* (1), 96–105.

16 Söderman, K.; Reichard, P. *Anal. Biochem.* **1986**, *152* (1), 89–93.

17 Fiorucci, D.; Meaccini, M.; Poli, G.; Stincarelli, M. A.; Vagaggini, C.; Giannecchini, S.; Sutto-Ortiz, P.; Canard, B.; Decroly, E.; Dreassi, E.; Brai, A.; Botta, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (4), 2437.

18 Peyrane, F.; Selisko, B.; Decroly, E.; Vasseur, J. J.; Benarroch, D.; Canard, B.; Alvarez, K. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (4), e26–e26.

La primera opción presenta la necesidad de adquirir o producir el SAM con el grupo metilo tritiado, además de la necesidad de poner a punto el ensayo de unión a filtro. Si bien la segunda opción parecía más adecuada, la necesidad de conseguir el co-factor enzimático, así como, la realización del ensayo enzimático se presentó como un impedimento.

Seguimos investigando opciones y encontramos que existen kits comerciales para la evaluación de la actividad metiltransferasa. Por lo que, elegimos esta aproximación para evaluar la actividad metiltransferasa de la proteína recombinante producida. En particular, seleccionamos el kit: "Methyltransferase Fluorometric Assay Kit" item No. 700150 de la empresa Cayman Chemical.

Este kit de actividad monitorea la formación de SAH, del cual se desprende una cascada de reacciones enzimáticas. El kit contiene lo que denomina como "MT Enzyme Mixture" donde se encuentran las enzimas encargadas de transformar el SAH en resorufin, el cual presenta fluorescencia, (Figura 7.8).

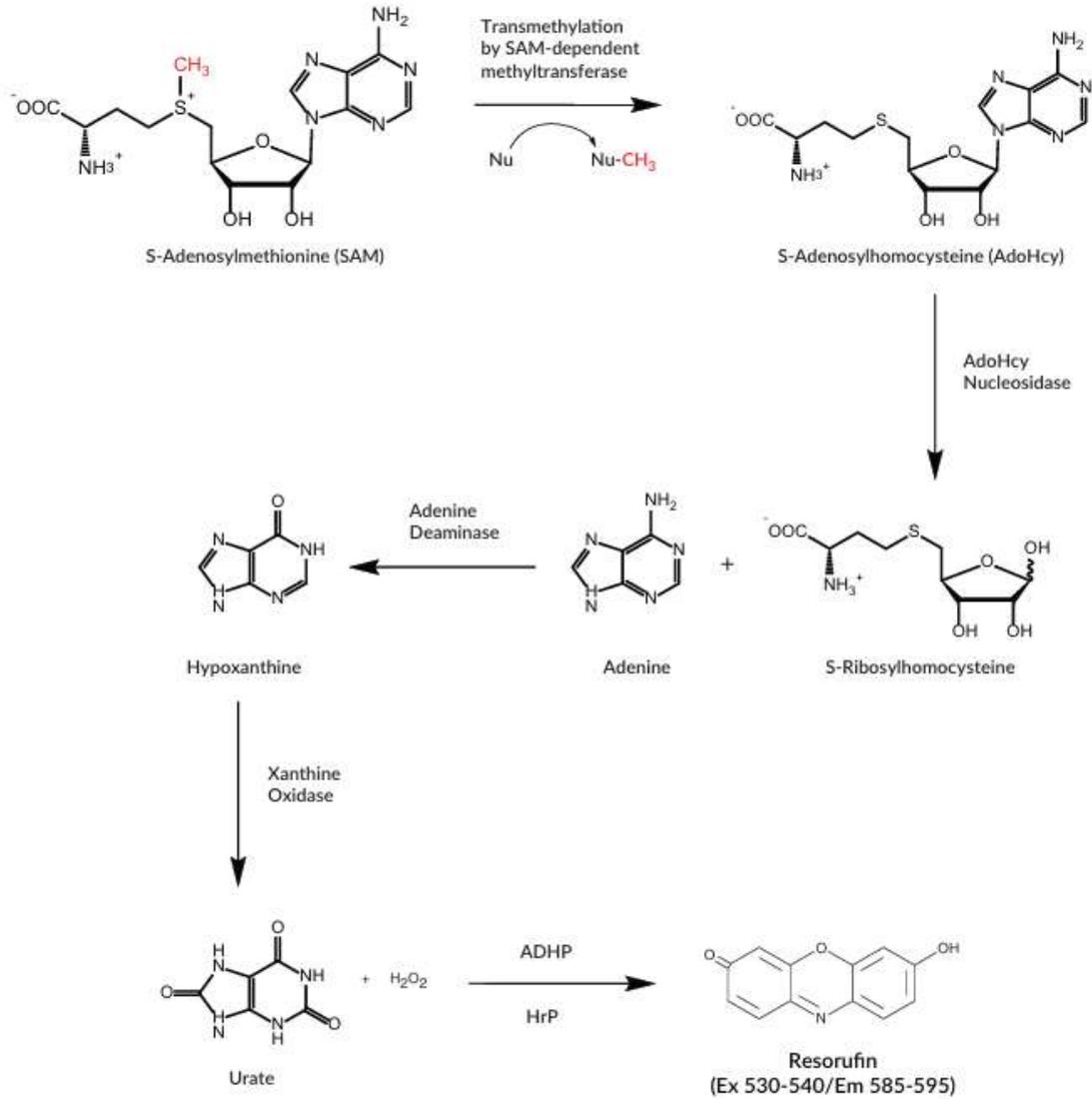


Figura 7.8: Imagen extraída del protocolo del kit, donde se muestra la cascada de reacciones enzimáticas que permiten observar indirectamente por fluorescencia la formación de SAH

De esta cascada de reacciones enzimáticas se desprenden varias limitantes en el uso de este kit. El proveedor no recomienda el uso de agentes reductores como DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol ni el uso de agentes quelantes, como, por ejemplo, el EDTA. Ya que estos interfieren en las reacciones que se llevan a cabo en la obtención del resorufin a partir del SAH formado.

Este kit comercial contiene además del set de enzimas, SAH utilizado como control positivo, SAM para llevar a cabo la reacción de metilación y resorufin para realizar una curva de calibración y poder así cuantificar la cantidad de SAH formado.

Los insumos necesarios para este kit de actividad son la enzima metiltransferasa de interés y el sustrato de ésta. En nuestro caso, este sustrato es el ARNm de origen viral.

#### 7.4. Producción del sustrato de la enzima: análogo al ARNm viral

Como ya se ha mencionado, el ARNm viral, sustrato de la NS5-Mtasa-Den2, presenta un cap5' en su estructura, el cual es doblemente metilado por la enzima de interés, (Figura 7.4).

Si bien los autores Dong, H. et al,<sup>19</sup> han reportado el ensayo biológico de actividad de la NS5-Mtasa-Den2 utilizando la estructura completa del ARNm viral, muchos otros autores como Peyrane, F. et al,<sup>18</sup> y Egloff, M.-P et al,<sup>14</sup> optaron por utilizar un fragmento de menor longitud.

Este fragmento consiste en una estructura de cap5': GpppA con una cola variable de citocinas C. Lo cual podríamos abreviar como: GpppAC<sub>x</sub>.

Los autores Egloff, M.-P et al,<sup>14</sup> utilizaron los fragmentos: GpppAC<sub>5</sub> y m7GpppAC<sub>5</sub> para llevar a cabo el estudio de actividad de la NS5-Mtasa-Den2. Los autores demostraron que el fragmento m7GpppAC<sub>5</sub> fue metilado en 2'O como era de esperarse ya que era la única metilación posible, obteniendo m7GpppAmC<sub>5</sub>. Sin embargo, el fragmento GpppAC<sub>5</sub> empleado fue metilado en 2'O y no en N7, resultando en GpppAmC<sub>5</sub> (Figura 7.9). A partir de estos estudios y otros experimentos realizados, se demostró que la actividad metiltransferasa en N7 solo se observó al emplear el ARN viral auténtico como sustrato. Cuando se utilizó un sustrato corto no viral GpppAC<sub>5</sub> o m7GpppAC<sub>5</sub> o sustratos de ARN no específicos del virus, no se pudo detectar metilación en N7 pero si en 2'O.<sup>20</sup>

---

19 Dong, H.; Ren, S.; Zhang, B.; Zhou, Y.; Puig-Basagoiti, F.; Li, H.; Shi, P.-Y. *J. Virol.* **2008**, 82 (9), 4295–4307.

20 Liu, L.; Dong, H.; Chen, H.; Zhang, J.; Ling, H.; Li, Z.; Shi, P.-Y.; Li, H. *Front. Biol.* **2010**, 5 (4), 286–303.

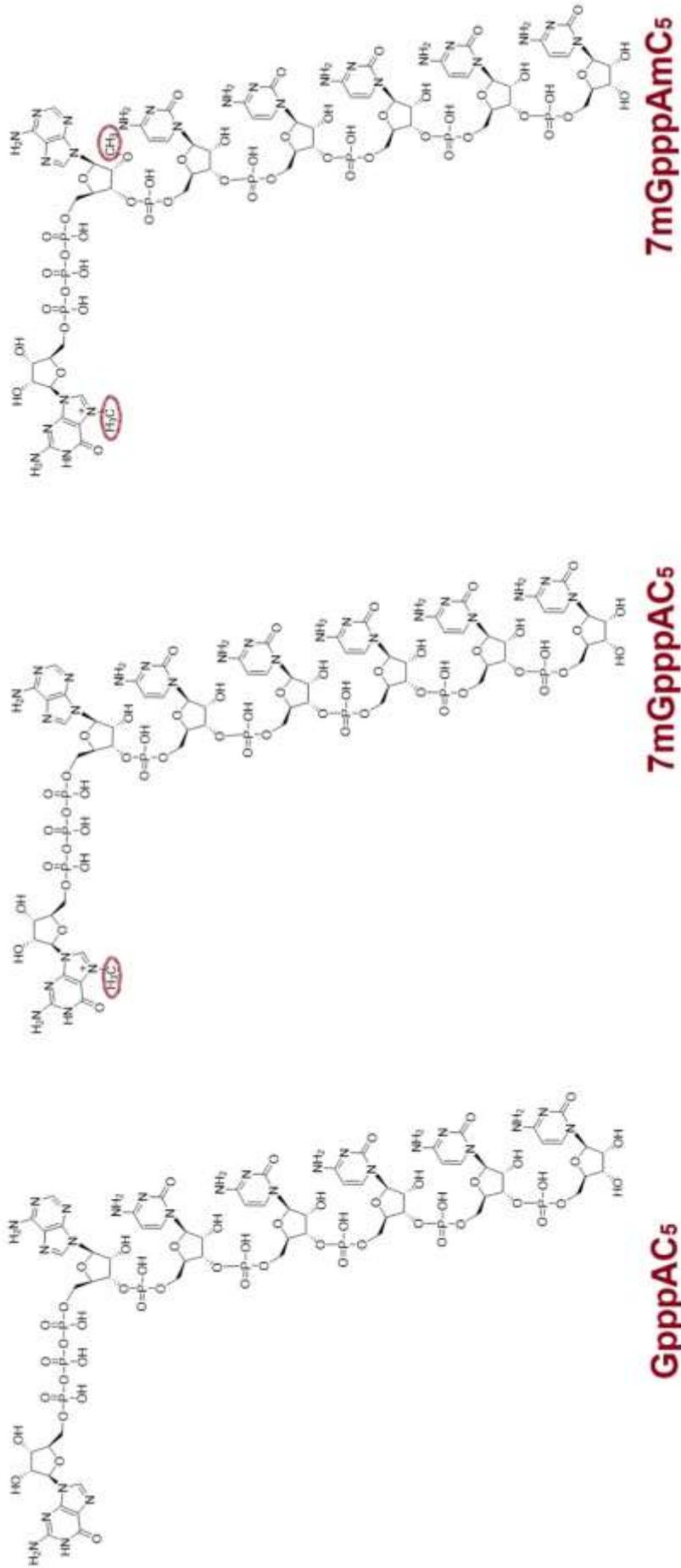


Figura 7.9: Estructuras del GpppAC<sub>5</sub>, 7mGpppAC<sub>5</sub> Y 7mGpppAmC<sub>5</sub>.

Por otra parte, los autores Selisko, B. et al.,<sup>21</sup> determinaron la longitud de cadena de citocina que debe de tener el fragmento para que ocurra la metilación en 2'O. Ensayaron los fragmentos m7GpppAC<sub>x</sub>, GpppAC<sub>x</sub> y pppAC<sub>x</sub> para valores de x de 0 a 7. Para el fragmento pppAC<sub>x</sub> no se mostró metilación para ningún valor de x, lo que deja en evidencia la necesidad de la base de Guanosina en el Cap5' del fragmento de ARNm para que ocurra la metilación en 2'O. Por otra parte, observaron que la actividad y unión en 2'O aumentaba al aumentar x, alcanzando una meseta a x=5 (Figura 7.10).

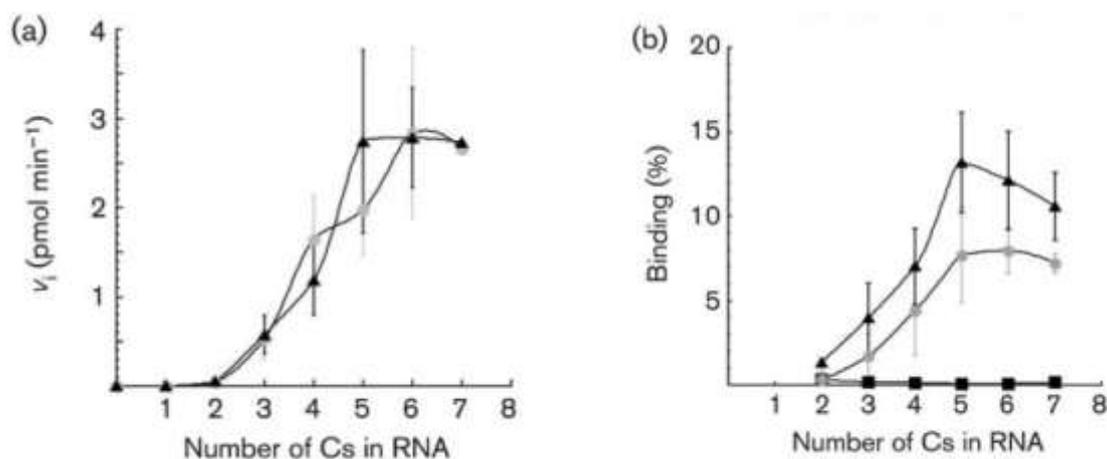


Figura 7.10: Gráficos extraídos del artículo de Selisko, B. et al.<sup>21</sup> En a) los autores graficaron la actividad de 2'O en 7mGpppAC<sub>x</sub> (▲) y GpppAC<sub>x</sub> (●) utilizando HPLC. En b) los autores reportaron el porcentaje de unión de 7mGpppAC<sub>x</sub> (▲), GpppAC<sub>x</sub> (●) y pppAC<sub>x</sub> (■) a la NS5-Mtasa-Den2.

Frente a la necesidad de obtener el sustrato de NS5-Mtasa-Den2 para realizar el ensayo de actividad, decidimos utilizar un fragmento del tipo GpppAC<sub>x</sub> sobre el ARN viral original.

Para la obtención de este fragmento, establecimos una colaboración con el grupo del Dr. Juan Pablo Tosar del Instituto Pasteur. El Msc, Mauricio Castellano llevó a cabo la optimización de la producción del fragmento análogo al ARNm.

21 Selisko, B.; Peyrane, F. F.; Canard, B.; Alvarez, K.; Decroly, E. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91* (1), 112–121.

### **7.5. Evaluación de la actividad metiltransferasa de NS5-Mtasa-Den2 utilizando el kit comercial seleccionado.**

Una vez obtenidos todos los insumos, comenzamos con los ensayos de actividad para evaluar de forma indirecta el correcto plegamiento de la NS5-Mtasa-Den2 producida.

Realizamos un primer ensayo de actividad según las recomendaciones del fabricante testeando la concentración de la NS5-Mtasa-Den2. Se midió la fluorescencia en un Fluorímetro Varioskan Lux, donde se colectó la fluorescencia de forma continua durante 40 min excitado a 530nm y registrando la fluorescencia a 590nm.

Comenzamos con la preparación del denominado “Master mix” (MM), el que se realizó según las especificaciones del fabricante. Se mezcló el buffer con un aditivo, el MT Enzyme mixture (mezcla de enzimas que desata la cascada enzimática para la conversión de SAH a resorufin), el ADHP (reductor del último paso de la cascada enzimática del kit) y el SAM, en las cantidades especificadas.

Ya que el MM contiene al SAM, el agregado de este es el que determina el inicio de la reacción, por lo que fue agregado a los pocillos de la placa a lo último, segundos antes de realizar las medidas de fluorescencia correspondiente. Según el fabricante se deben de agregar 100  $\mu$ L del MM por pocillo.

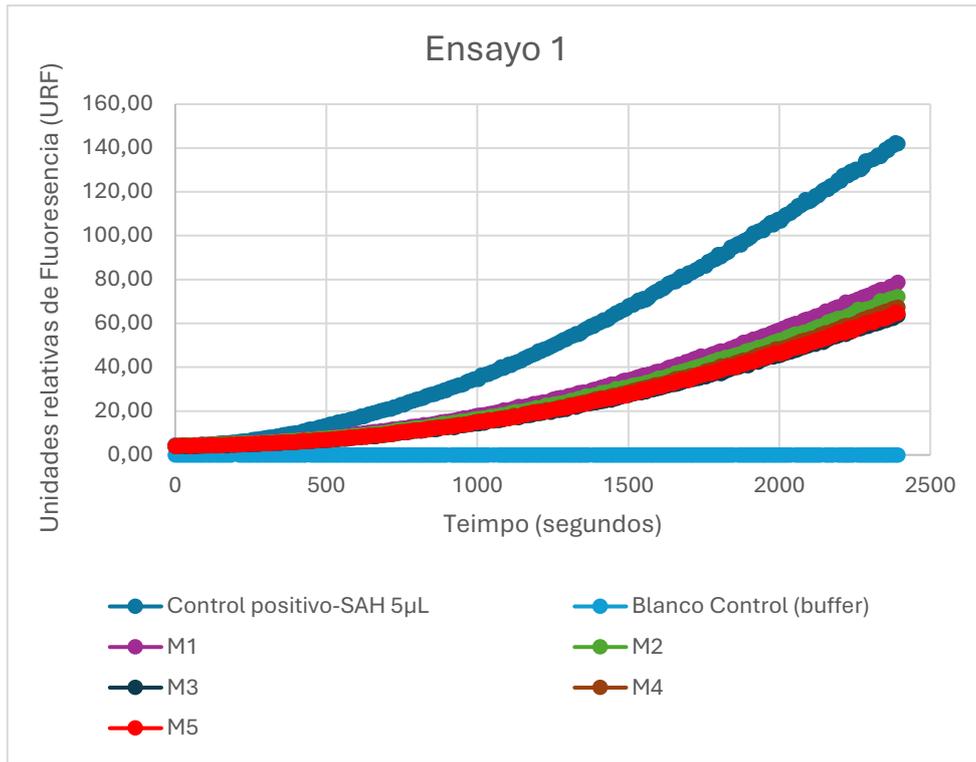
Continuando con las muestras a ensayar se prepararon:

- El punto de mayor concentración de la curva de calibración del resorufin con una concentración final de 10 $\mu$ M. (1000  $\mu$ L de resorufin stock (10 $\mu$ M)).
- El punto de menor concentración de la curva de calibración del resorufin con una concentración final de 1.25 $\mu$ M (125  $\mu$ L de resorufin stock (10 $\mu$ M) y 875  $\mu$ L de buffer conteniendo el aditivo).

- El control positivo del ensayo con 5  $\mu\text{L}$  de SAH (5  $\mu\text{L}$  de SAH, 10  $\mu\text{L}$  de buffer, 100  $\mu\text{L}$  de MM)
- El buffer del kit como primera aproximación de un blanco de control (15  $\mu\text{L}$  de buffer, 100  $\mu\text{L}$  de MM).
- Las muestras Mx corresponden al ensayo donde se colocó la enzima NS5-Mtasa-Den2, el ARN capeado: (5  $\mu\text{L}$  de enzima, 10  $\mu\text{L}$  ARNcap, 100  $\mu\text{L}$  de MM)
  - M1: la enzima sin dilución previa (concentración inicial de 1.5mM).
  - M2: una disolución 1/10 de M1.
  - M3: una dilución 1/100 de M1.
  - M4: una dilución 1/1000 de M1.
  - M5: una dilución 1/10000.

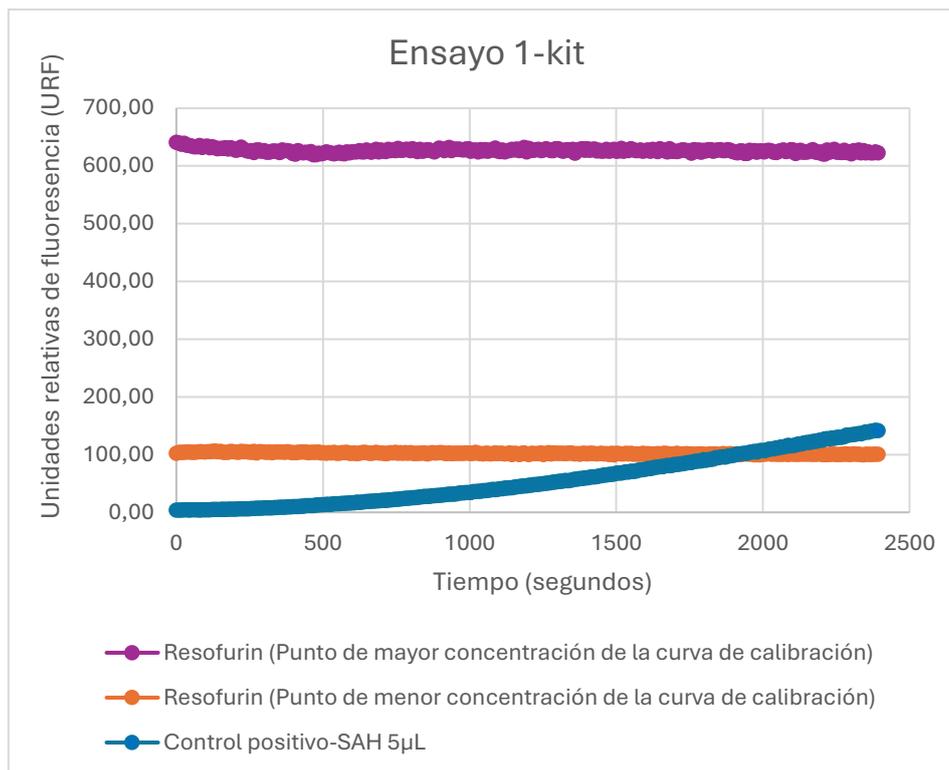
Los resultados obtenidos se representaron en dos gráficas para una mejor comprensión.

En la gráfica 7.1 se presentan los datos obtenidos para el control positivo (SAH 5  $\mu\text{L}$ ), blanco control (buffer) y las muestras: M1, M2, M3, M4, M5, donde se aprecia que el buffer que funciona como blanco se mantiene estable y no produce fluorescencia a lo largo de la corrida. Por otra parte, los valores de M1, M2, M3, M4 y M5 son muy similares entre ellos, si bien M1 y M2 se encuentran a valores un poco por encima del resto, todas las muestras ensayadas quedaron por debajo del control positivo.



Grafica 7.1: Grafica de los resultados obtenidos en el Ensayo 1 para la evaluación de la actividad de NS5-Mtasa-Den2. Se graficaron los datos obtenidos para el Control positivo de SAH, el blanco control, y las muestras M1, M2, M3, M4 y M5

Con el fin de determinar la respuesta instrumental del equipo al utilizar las condiciones estipuladas en el kit, se realizaron unas pruebas cuyos resultados se muestran en la gráfica 7.2, donde se observan los datos obtenidos para los dos puntos de la curva de calibración del resorufin. El gráfico en violeta es el correspondiente al de mayor concentración y el gráfico de color naranja corresponde al de menor concentración. Por otro lado, el gráfico en azul es el correspondiente al control positivo con el agregado de 5 µL de SAH. Se observó que el control positivo de SAH, que es el control de la cascada de reacciones enzimáticas del kit a lo largo de la adquisición, apenas sobrepasa en sus valores finales al menor punto de la curva de calibración, lo que nos hizo considerar que el kit debía de ser optimizado para que el valor del control positivo estuviera en el rango de la curva de calibración.



Grafica 7.2: Grafica de los resultados obtenidos en el Ensayo 1 para la evaluación de la actividad de NS5-Mtasa-Den2. Se graficaron los datos para el control positivo de SAH, el punto de mayor concentración de la curva de calibración de resorufin y el punto de menor concentración de dicha curva.

A partir de los resultados obtenidos en la primera aproximación en el uso del kit decidimos realizar un segundo ensayo donde:

Seleccionamos como muestras a evaluar M6 y M7, para ambas se seleccionó la utilización de la enzima sin diluir (análogo a M1) y se invirtieron las cantidades seleccionadas, aumentando la concentración de enzima de 5 µL a 10 µL y reduciendo la cantidad de ARN de 10 µL a 5 µL. Se utilizaron dos tipos de ARN diferentes, el ARN utilizado en M6 fue el ARN con caperuza (ARN-Cap), el utilizado en el ensayo anterior y para el caso de M7 el ARN utilizado fue el ARN sin caperuza (ARN-sinCap):

- M6 (10 µL de enzima, 5 µL ARN-Cap, 100 µL de MM)
- M7 (10 µL de enzima, 5 µL ARN-sinCap, 100 µL de MM)

Con respecto al control positivo se decidió cambiar el volumen de SAH de 5  $\mu\text{L}$  a 15  $\mu\text{L}$ , dentro del rango estipulado por el kit:

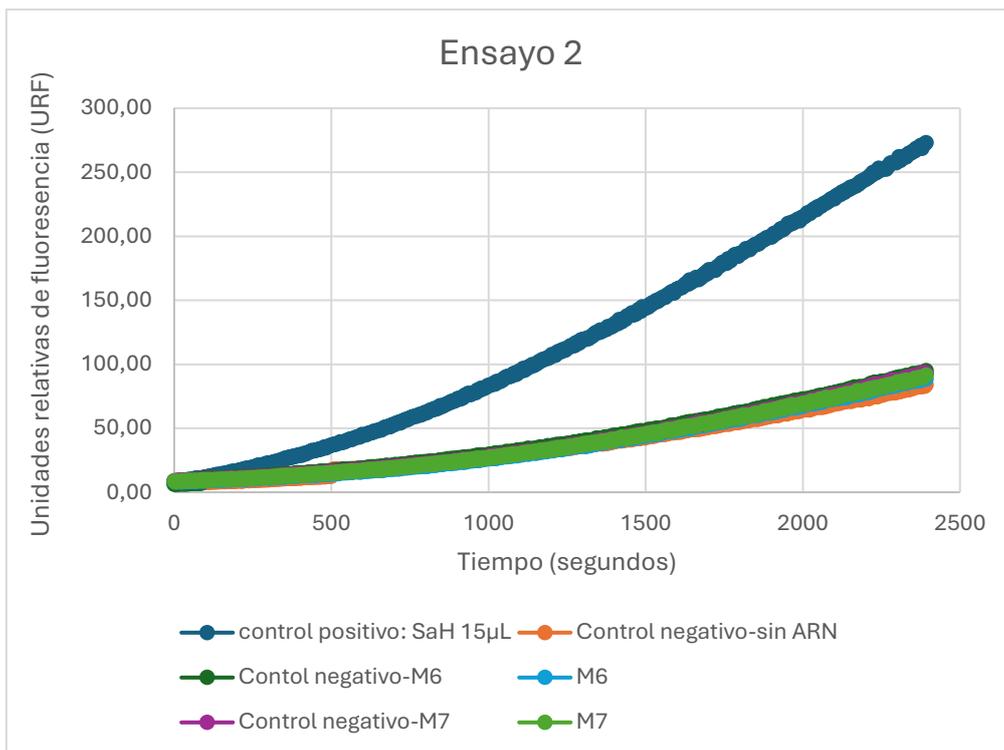
- Control positivo SAH-15 $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{L}$  de SAH, 100  $\mu\text{L}$  de MM)

Por otra parte, se realizó un control negativo, denominado: “Control negativo-sin ARN”. Este se preparó en iguales condiciones que M6 sustituyendo el ARN por el buffer del kit:

- Control negativo-sin ARN (10  $\mu\text{L}$  de enzima, 5  $\mu\text{L}$  buffer, 100  $\mu\text{L}$  de MM)

Adicionalmente se prepararon dos controles negativos para M6 y M7, denominadas como Control negativo-M6 y Control negativo-M7. En éstos se utilizaron las mismas condiciones que en M6 y M7 (respectivamente) sustituyendo los 10  $\mu\text{L}$  de enzima por buffer.

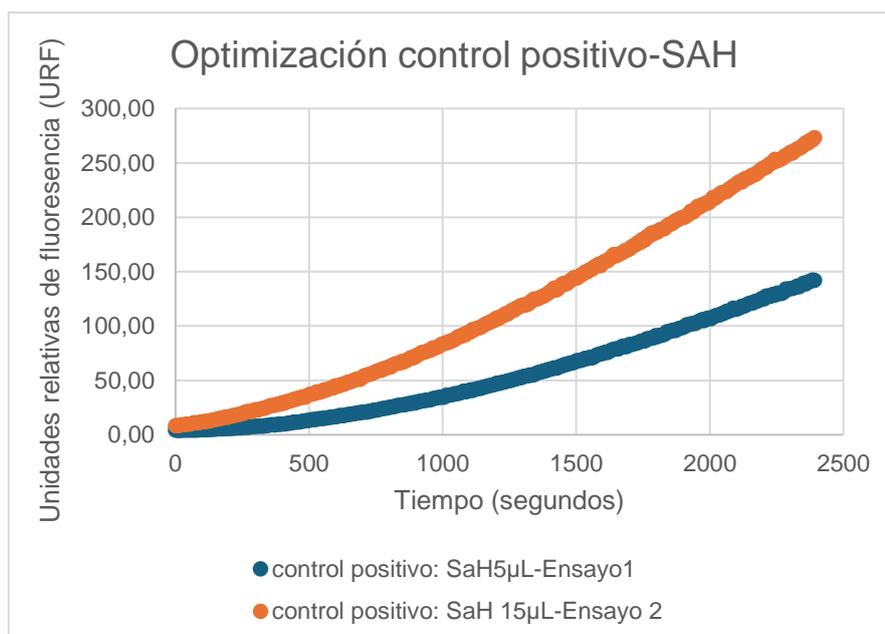
- Control negativo-M6 (10  $\mu\text{L}$  de buffer, 5  $\mu\text{L}$  ARN-Cap, 100  $\mu\text{L}$  de MM)
- Control negativo-M7 (10  $\mu\text{L}$  de buffer, 5  $\mu\text{L}$  ARN-sinCap, 100  $\mu\text{L}$  de MM)



Grafica 7.3: Grafica de los resultados obtenidos en el Ensayo 2 para la evaluación de la actividad de NS5-Mtasa-Den2. Se graficaron los datos obtenidos para el Control positivo de SAH, el control negativo: Sin ARN, de M6 y de M7. Además de las muestras M6 y M7.

Los resultados de este segundo ensayo reportados en la gráfica 7.3, no son alentadores. Era de esperar que la muestra M7 no mostrara actividad, ya que al no contar con la caperuzza la metilación no debería de ocurrir. Si comparamos los resultados de M6 y M7 son prácticamente iguales. Asimismo, si comparamos los valores obtenidos para estas muestras respecto a sus controles negativos se observa que no se presentan diferencias significativas. Por último, si comparamos los resultados de las muestras M6 y M7 con respecto al control negativo-sin ARN, el cual solo presenta a la enzima sin sustrato (ARN-Cap), tampoco se observaron diferencias.

Con respecto al control positivo, el aumento de la concentración de SAH resultó en un aumento de la señal observada, como era de esperarse (Gráfica 7.4). De todas formas, este dista de lo esperado como control positivo si comparamos los valores obtenidos para la curva de calibración del ensayo 1. (Gráfica 7.1)



Gráfica 7.4: Grafica de los datos obtenidos para el Control positivo de SAH-5µL del ensayo 1 y el Control positivo de SAH-15µL del ensayo 2.

Como aspecto positivo de este ensayo remarcamos que los controles negativos seleccionados son acordes al ensayo de actividad. Ya que al no realizar un control negativo en el ensayo 1 se pierde la comparación del efecto que tienen los componentes por separado. Se decidió agregar en los ensayos posteriores, un blanco control del kit más apropiado que el utilizado en el ensayo 1.

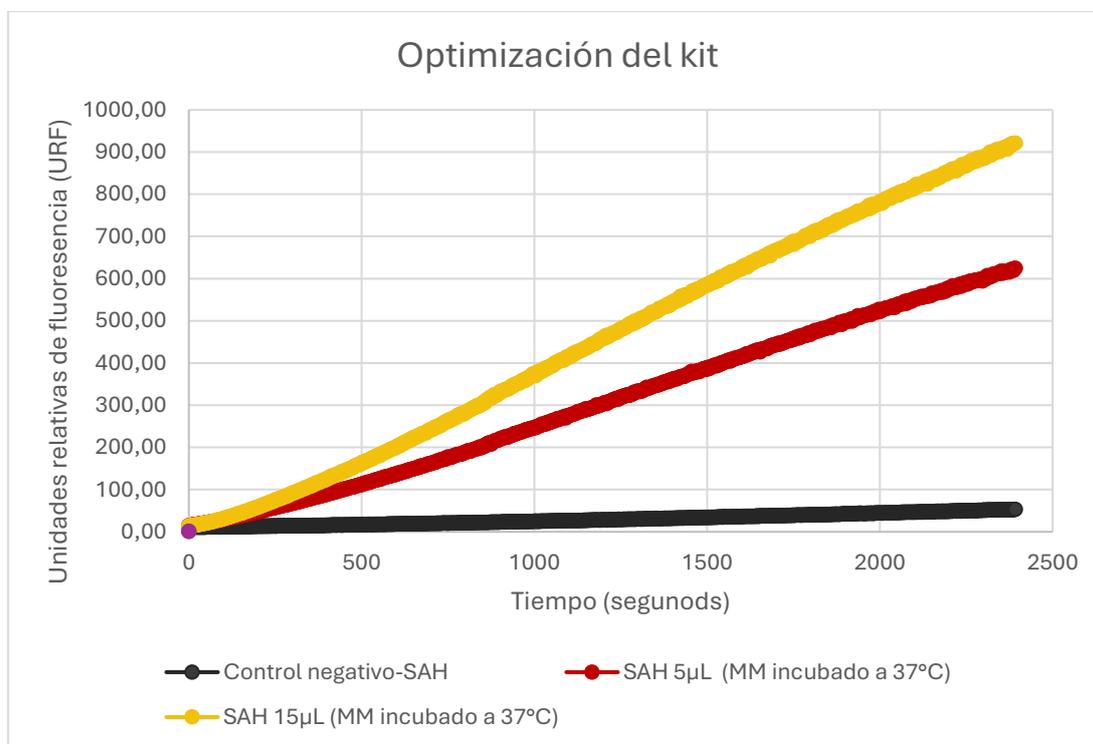
En base a estos resultados se decidió optimizar las condiciones del kit antes de repetir la evaluación de la enzima NS5-Mtasa-Den2.

### 7.5.1. Optimización del kit de actividad

Para realizar la optimización de las condiciones del Kit elegimos las dos concentraciones de SAH empleadas SAH-5 $\mu$ L y SAH-15 $\mu$ L. Como control negativo usamos las mismas condiciones sustituyendo la cantidad de SAH por buffer:

- SAH 5 $\mu$ L (MM incubado a 37°C) (5  $\mu$ L de SAH, 10  $\mu$ L de buffer, 100  $\mu$ L de MM)
- SAH 15 $\mu$ L (MM incubado a 37°C) (15  $\mu$ L de SAH, 100  $\mu$ L de MM)
- Control negativo-SAH (15  $\mu$ L de buffer, 100  $\mu$ L de MM)

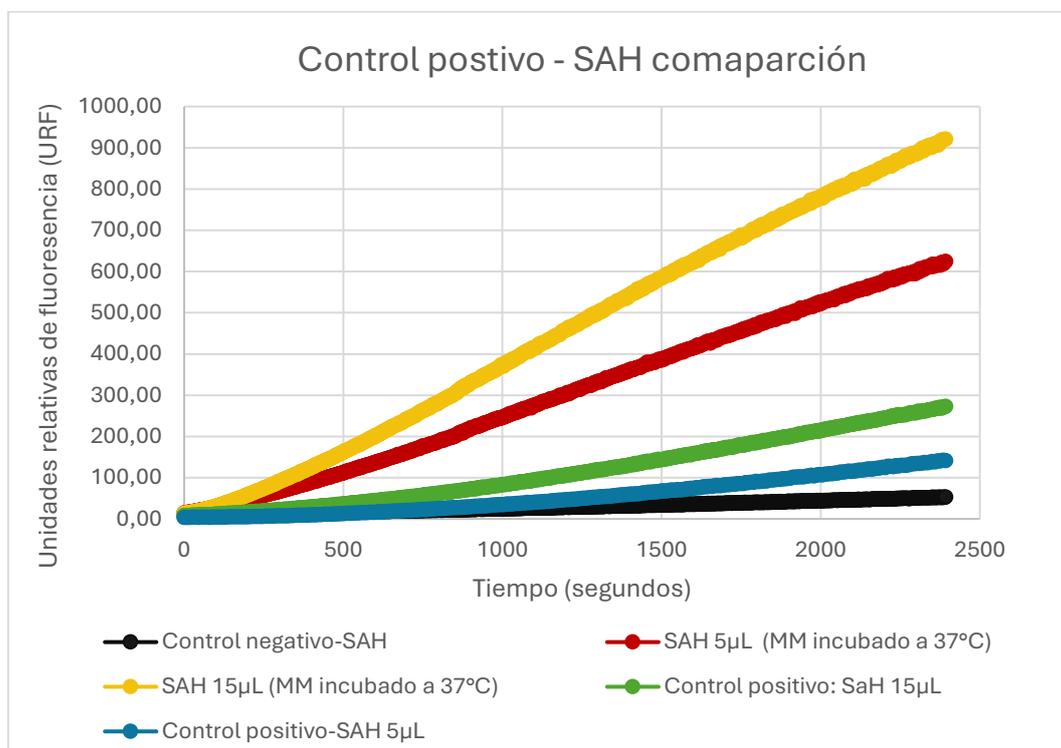
Comenzamos con un cambio en la temperatura. Si bien el experimento se lleva a cabo a 37°C, según especificaciones del fabricante, los reactivos del kit deben de almacenarse a distintas temperaturas. Por ejemplo, el buffer debe de almacenarse a 0°C y el SAM a -80°C.



Gráfica 7.5: Gráfica de la optimización del kit de actividad. Se graficaron los datos obtenidos para el Control negativo de SAH, el SAH 5 $\mu$ L (MM incubado a 37°C) y el SAH 15 $\mu$ L (MM incubado a 37°C) de la optimización.

En el ensayo 1 y el ensayo 2 el MM se realizó a temperatura ambiente. En esta optimización, decidimos dejar al MM unos 10 minutos aproximadamente a 37°C antes de utilizarlo. Los resultados de este cambio se observan en la gráfica 7.5, donde los valores alcanzados superaban a los obtenidos en los primeros ensayos.

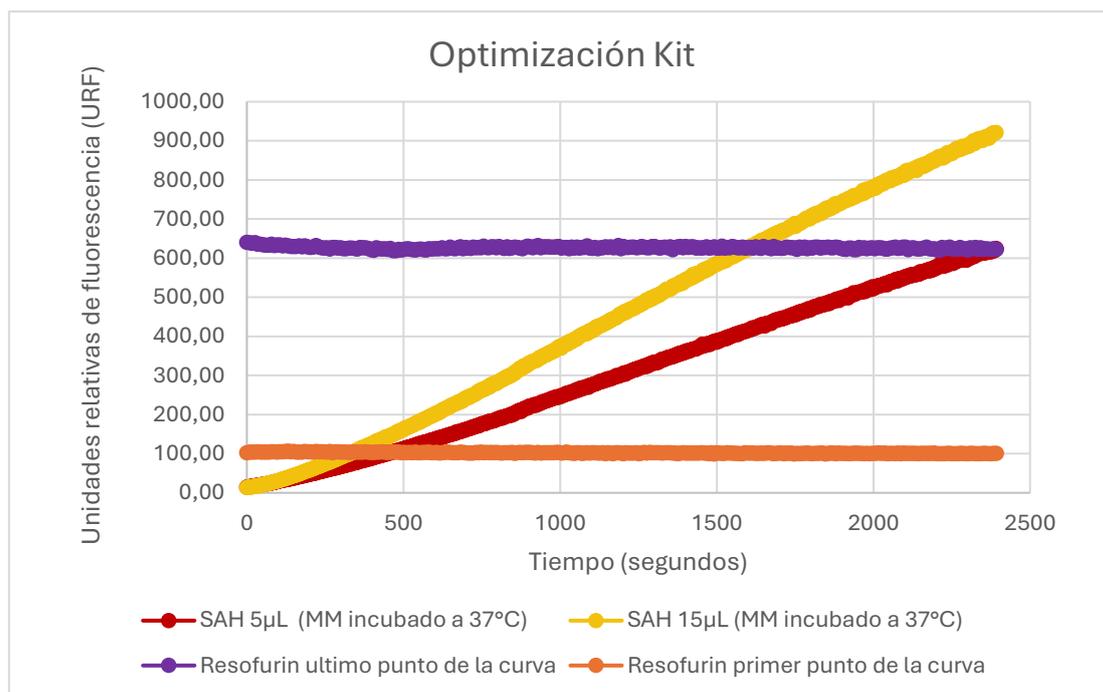
Con el fin de visualizar esta optimización se decidió graficar en el mismo par de ejes las gráficas correspondientes al SAH 5µL (MM incubado a 37°C) y SAH 15µL (MM incubado a 37°C) de esta optimización, al control positivo (SAH 5µL) del ensayo 1 y al control positivo (SAH 15 µL) del ensayo 2. (Gráfica 7.6). Donde se observa el aumento en la fluorescencia generada en las muestras SAH 5µL (MM incubado a 37°C) y SAH 15µL (MM incubado a 37°C) respecto a cada control positivo de SAH, tanto para SAH 5µL como para SAH 15µL. Se hace notoria la necesidad de llevar a 37°C el MM producido por unos minutos antes de realizar el ensayo correspondiente.



Gráfica 7.6: Gráfico de la comparación de los valores obtenidos para los controles positivos de SAH. Donde se graficó el control positivo de SAH-5µL del ensayo 1, el control positivo de SAH-15µL del ensayo 2, el control negativo de SAH y las optimizaciones realizadas de SAH 5µL (MM incubado a 37°C) y SAH 15µL (MM incubado a 37°C).

Para continuar con la evaluación de la optimización de las condiciones de ensayo utilizando el kit comercial, graficamos en un mismo par de ejes las gráficas obtenidas para los controles positivos utilizados en esta optimización: SAH 5µL (MM incubado a 37°C) y SAH 15µL (MM incubado a 37°C) y las curvas obtenidas para ambas concentraciones de resorufin en el ensayo 1. (Gráfica 7.7).

Realizando esta comparación evidenciamos que los valores de fluorescencia obtenidos en la optimización se encuentran dentro de los valores de la curva de calibración del resorufin. Frente a esta evidencia, se presenta que el control de SAH 5µL (MM incubado a 37°C) sería suficiente para continuar con el ensayo de actividad en base a la curva de calibración. Por lo cual seleccionamos el SAH 5µL (MM incubado a 37°C) para continuar con los posteriores ensayos de actividad.



Grafica 7.7: Gráfica optimización del kit, comparación con los valores de la curva de calibración. Se graficaron los valores de SAH 5µL (MM incubado a 37°C) y SAH 15µL (MM incubado a 37°C) ensayados en la optimización del kit y los puntos de mayor y menor concentración de resorufin de la curva de calibración.

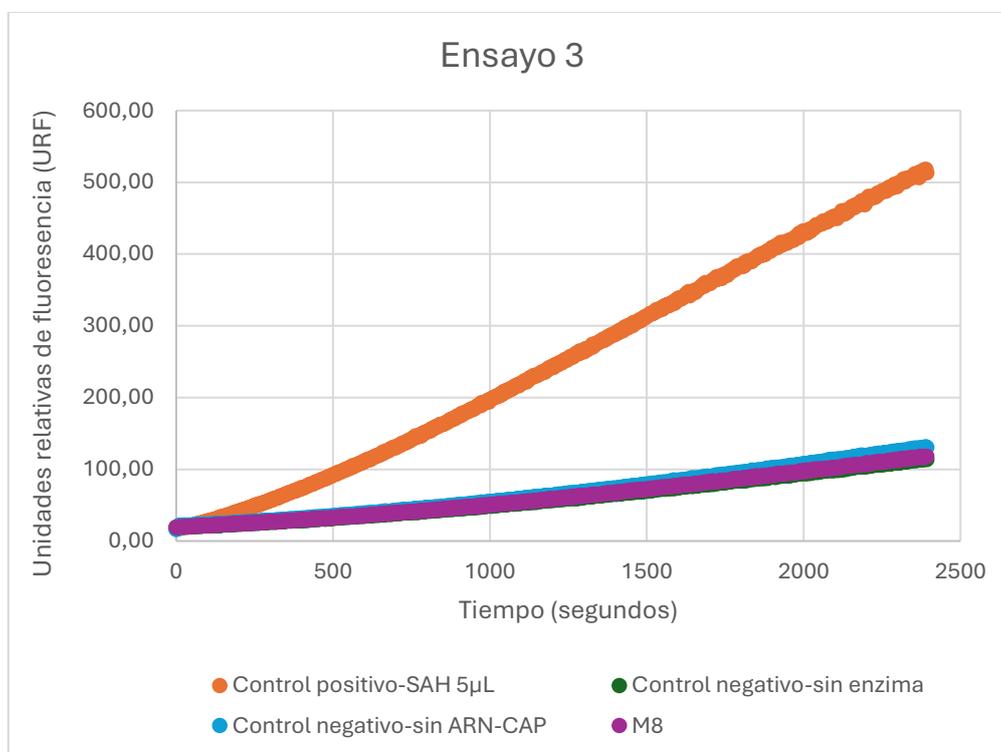
Con estos resultados, dimos por finalizada la optimización del kit comercial. Y continuamos con la evaluación de la enzima NS5-Mtasa-DEN2.

### 7.5.2. Re-evaluación de la actividad metiltransferasa de NS5-Mtasa-Den2 utilizando el kit comercial optimizado.

Una vez optimizadas las condiciones del kit de actividad, volvimos a evaluar la actividad metiltransferasa de la NS5-Mtasa-Den2.

Para lo que decidimos realizar el ensayo 3, donde se preparó:

- M8 (5  $\mu$ L de enzima, 10  $\mu$ L ARN-Cap, 100  $\mu$ L de MM).
- Control positivo SAH-5 $\mu$ L (5  $\mu$ L SAH, 100  $\mu$ L de MM).
- Se realizaron 2 controles negativos:
  - Control negativo-sin enzima (5  $\mu$ L de buffer, 10  $\mu$ L ARN-Cap, 100  $\mu$ L de MM)
  - Control negativo-sin ARN-Cap (5  $\mu$ L de enzima, 10  $\mu$ L buffer, 100  $\mu$ L de MM)



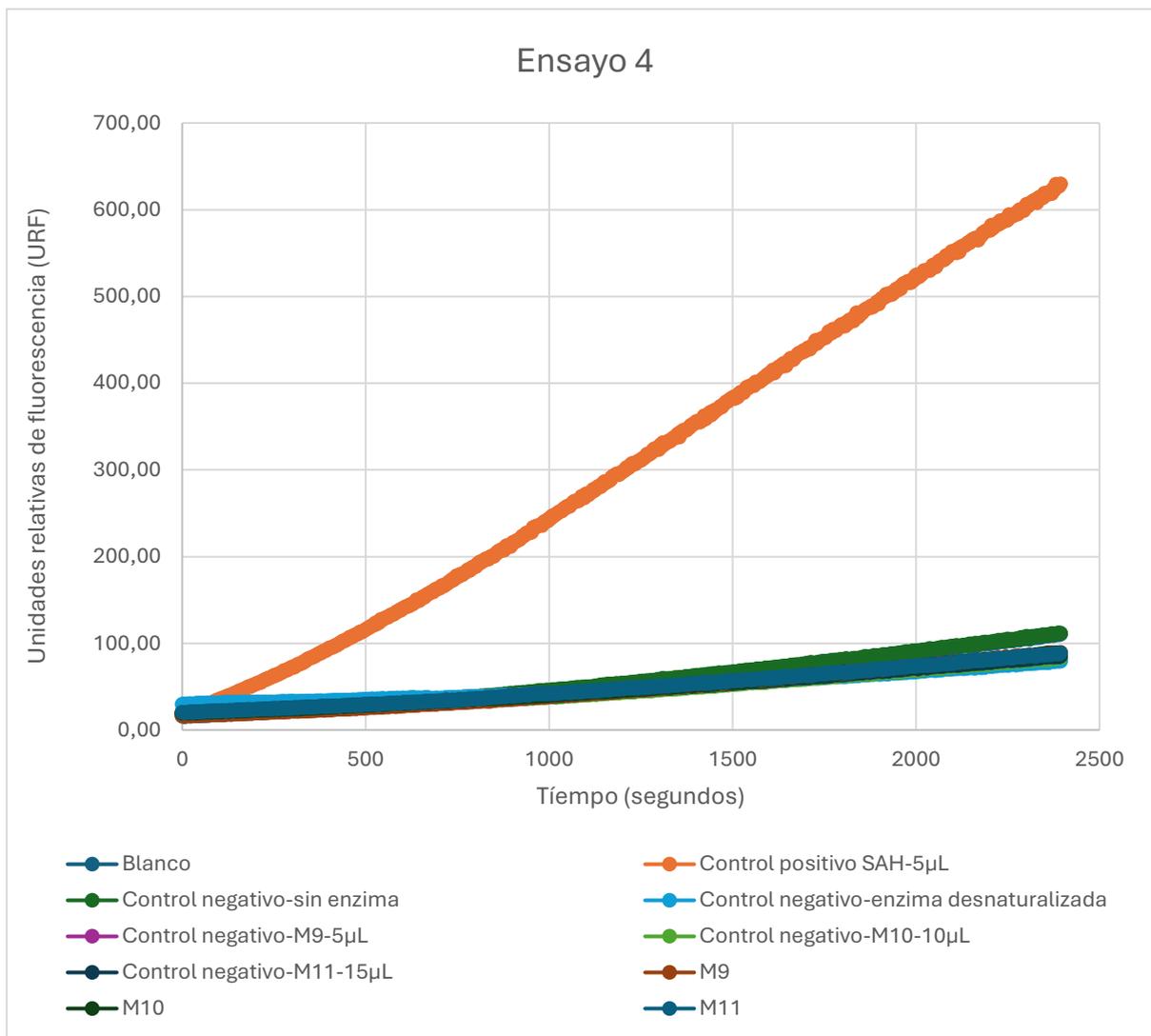
Gráfica 7.8: Gráfica obtenida en el Ensayo 3. Donde se grafican los datos obtenidos para el control positivo de SAH-5  $\mu$ L, el control negativo sin enzima y el control negativo sin ARN-Cap, además de la muestra M8.

En la gráfica 7.8 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que ambos controles negativos y la muestra M8 presentan gráficos similares.

Optamos por realizar una última prueba respecto a esta producción de enzima, desarrollando así el ensayo 4 de la siguiente forma:

- Control positivo SAH-5 $\mu$ L (5  $\mu$ L SAH, 10  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM)
- Blanco control (15  $\mu$ L buffer, 100  $\mu$ L de MM)
- Se prepararon las muestras:
  - M9-5  $\mu$ L (5  $\mu$ L de enzima, 5  $\mu$ L de ARN-Cap, 5  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
  - M10-10  $\mu$ L (10  $\mu$ L de enzima, 5  $\mu$ L de ARN-Cap, y 100  $\mu$ L de MM).
  - M11-15  $\mu$ L (15  $\mu$ L de enzima, 5  $\mu$ L de ARN-Cap, y 100  $\mu$ L de MM).
- Se realizaron los controles negativos:
  - Control negativo-sin enzima (10  $\mu$ L de buffer, 5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo- M9-5  $\mu$ L (5  $\mu$ L de enzima, 10  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo- M10-10  $\mu$ L (10  $\mu$ L de enzima, 5  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo- M11-15  $\mu$ L (15  $\mu$ L de enzima, 5  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo-Enzima desnaturalizada: Se llevó la enzima a 100°C por unos minutos para lograr la desnaturalización. (15  $\mu$ L de enzima desnaturalizada y 100  $\mu$ L de MM).

El objetivo de este nuevo ensayo era evaluar si se presenta actividad al aumentar la concentración de enzima en el ensayo. Análogamente, se añadió el control negativo con la enzima desnaturalizada con el fin de tener otro punto de comparación.



Gráfica 7.9: Gráfica obtenida en el Ensayo 4. Se graficaron los datos obtenidos para El blanco control, el control positivo SAH-5 µL, los controles negativos: sin enzima, de enzima desnaturalizada y los controles negativos de M9, M10 y M11. Además de los datos obtenidos para las muestras M9, M10 y M11.

Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 7.9, donde no se observan diferencias significativas entre los controles negativos y las muestras ensayadas. En el gráfico 7.10, se eliminó el control positivo para poder observar los demás gráficos a una menor escala.

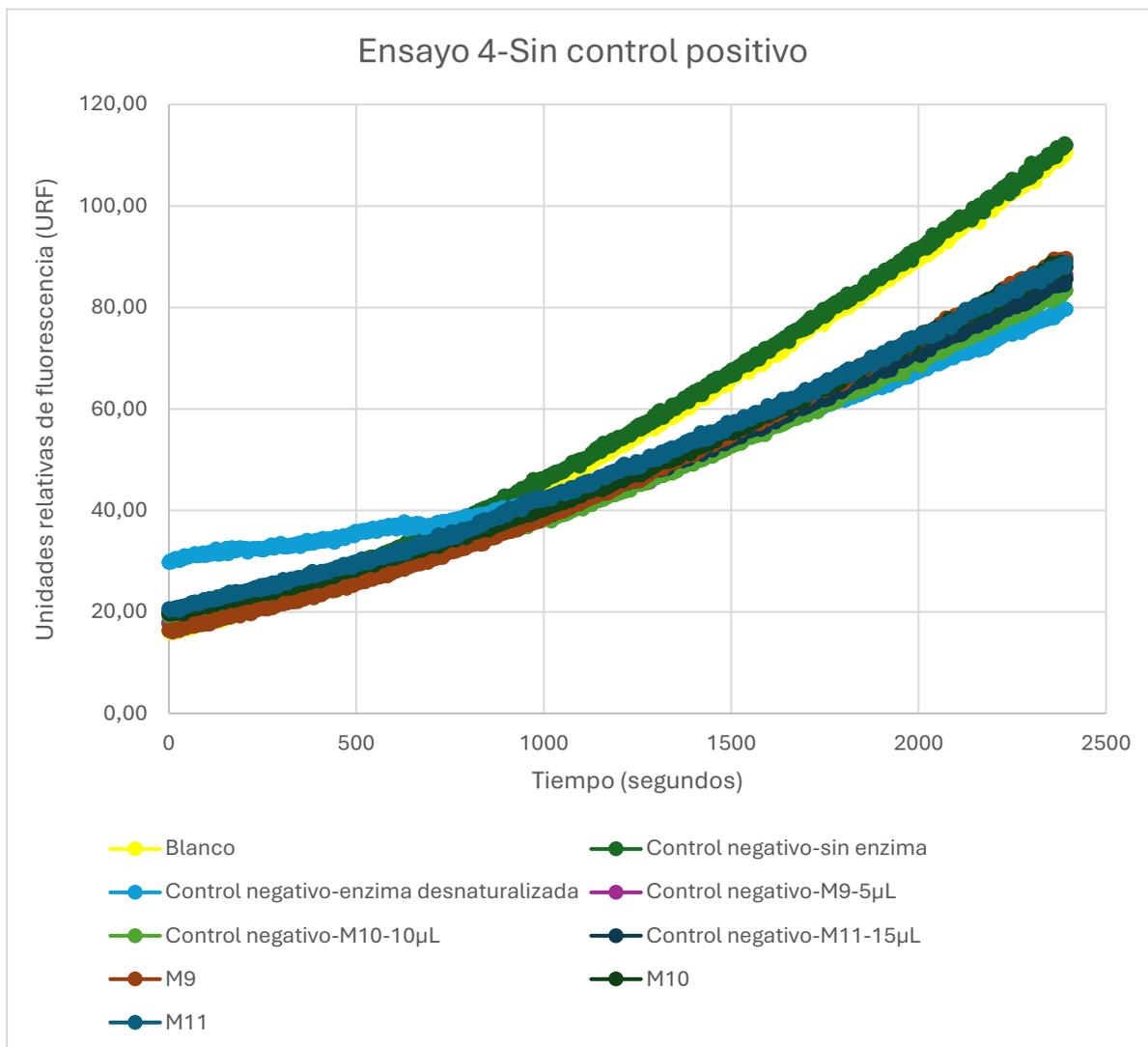


Gráfico 7.10: Grafica obtenida del Ensayo 4 sin control positivo. Esto se realizó para observar los gráficos a una escala más adecuada.

En el gráfico 7.10 podemos observar dos gráficos que sobresalen del resto. Estos corresponden al control negativo-sin enzima y el blanco control.

A partir de este ensayo pudimos afirmar que la producción de la proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2 no presenta actividad metiltransferasa.

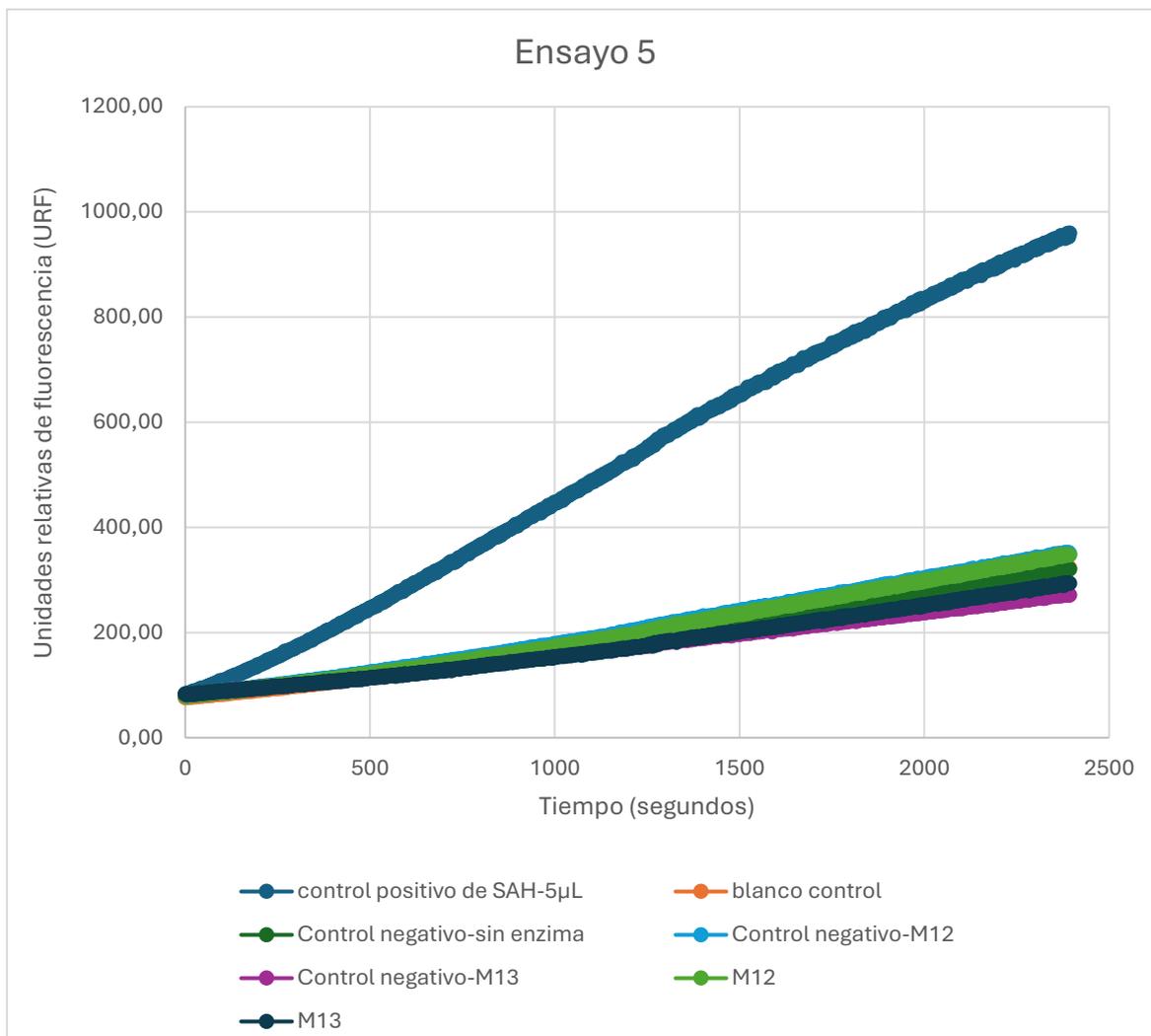
### 7.5.3. Nueva producción y evaluación de la NS5-Mtasa-Den2

A partir de los resultados anteriores decidimos realizar una nueva producción de proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2, ya que desde la producción anterior transcurrió alrededor de un año entre la obtención de la proteína y su evaluación con el kit de actividad.

Por otra parte, se logró optimizar la obtención de ARN-Cap produciendo una mayor cantidad de ARN-Cap. En las primeras producciones se logró en promedio una concentración de ARN-Cap de 384 ng/ $\mu$ L en 50  $\mu$ L, mientras que al optimizar el protocolo de obtención del ARN-Cap, se logró un promedio de 3503 ng/ $\mu$ L de ARN-Cap en 20  $\mu$ L.

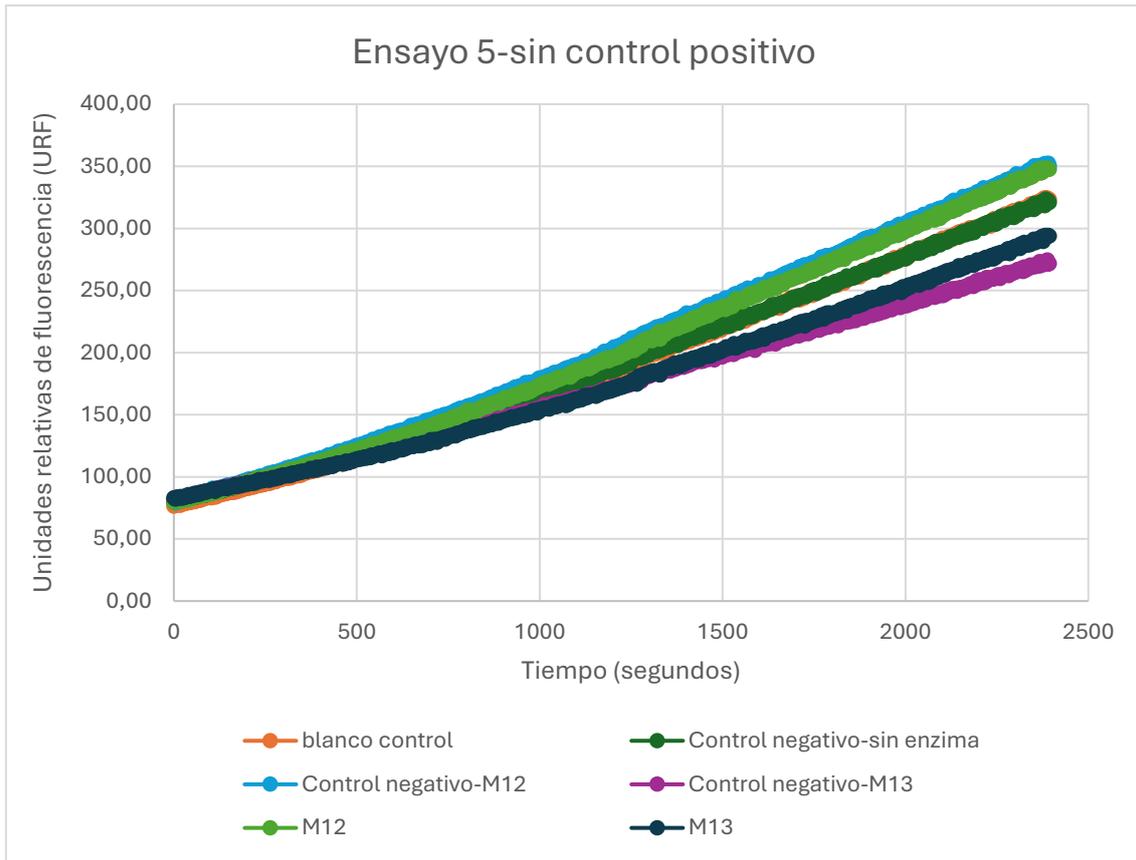
Realizamos así el ensayo 5 utilizando la enzima anterior y la enzima de la nueva producción, preparando las siguientes muestras:

- Control positivo SAH-5 $\mu$ L (5  $\mu$ L de SAH, 10  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Blanco control (15  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Las muestras ensayadas fueron:
  - M12 (10  $\mu$ L enzima anterior, 5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
  - M13 (10  $\mu$ L enzima nueva, 5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
- Como controles negativos se utilizaron:
  - Control negativo-sin enzima (10  $\mu$ L de buffer, 5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo-M12 (10  $\mu$ L enzima anterior, 5  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo-M13 (10  $\mu$ L enzima nueva, 5  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).



Gráfica 7.11: Gráfica obtenida en el Ensayo 5. Se graficaron los datos obtenidos para el control positivo SAH-5 µL, el blanco control, los controles negativos: sin enzima, el de M12 y M13. Además de las muestras M12 y M13.

Los resultados de este ensayo se presentan en la gráfica 7.11. Donde se puede apreciar que las muestras y los controles negativos tanto de la antigua producción como de la nueva se presentan semejantes. A modo de facilitar la comparación se graficó el ensayo 5 sin el control positivo para observar las diferencias a una menor escala. (Gráfica 7.12). En dicha gráfica, se puede apreciar con mayor facilidad que los gráficos de las muestras y sus respectivos controles negativos presentan una alta similitud.



Gráfica 7.12: Gráfica obtenida en el Ensayo 5, sin la gráfica del control positivo. Esto permitió observar los demás gráficos a una escala más adecuada.

A partir de los datos obtenidos en este último ensayo 5, podemos concluir que ninguna de las producciones de la proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2 presentó actividad metiltransferasa al emplear el kit comercial seleccionado.

## **7.6. Optimización de la producción de NS5-Mtasa-Den2 y su evaluación biológica.**

A partir de los resultados obtenidos decidimos realizar una optimización en la producción de NS5-Mtasa-Den2, ya que se formaban cuerpos de inclusión y la proteína soluble no presentó actividad. Esto se realizó mediante una colaboración con el grupo de la Dra. Sonia Rodríguez, del departamento DEP BIO de la Facultad de Química.

El Msc. Diego Umpierrez fue el encargado de la supervisión de las nuevas producciones de NS5-Mtasa-Den2 como una proteína recombinante, así como también de mi capacitación en dicha disciplina.

Decidimos realizar una optimización desde cero, utilizando las condiciones de producción de enzimas recombinantes que el Msc. Umpierrez utilizó en su tesis de maestría titulada: “Biocatálisis aplicada a la síntesis de radiotrazadores: síntesis de S-Adenosil metionina por metodologías enzimáticas” del año 2023.

### **7.6.1. Primera optimización en la producción de NS5-Mtasa-Den2:**

Para comenzar, debimos realizar una transformación para introducir el plásmido en una cepa *E. coli* BL21. Para esto realizamos una electroporación, donde se utiliza un pulso eléctrico corto para hacer que la célula sea permeable al ADN, es decir al plásmido. Las células electroporantes fueron facilitadas por el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB) de la Facultad de Química.

Luego incubamos estas células en placa con un medio LB con kanamicina por 24hs a 37°C. Transcurridas estas 24hs, seleccionamos e incubamos algunas de las colonias aisladas en un tubo con 5mL de medio LB con kanamicina con el fin de formar un pre-cultivo. Este se incubó a 28°C y 200 rpm por 24hs.

Una alícuota del cultivo anterior se transfirió a 500 mL de medio autoinductor (AIM) y se incubó a 37°C por 2 h a 220 rpm y posteriormente a 28°C por 24hs.

Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se descartó el medio. Dichas células se almacenaron en el freezer hasta su uso.

Al momento de comenzar con la lisis, se descongelaron las células y se re-suspendieron en 40mL buffer fosfato 20 mM, suplementado con NaCl 500 mM (pH 7.6). La lisis se realizó agregando 2 mg/mL de lisozima y se incubó por 40 min con una agitación suave (53 rpm) a una temperatura cercana a los 0°C utilizando baño de hielo. Posteriormente se agregó ARNasa (10 mg/mL), ADNasa (1 mg/mL) y 0.1% de Tritón y se incubó en las mismas condiciones por 40min. Una vez concluidos los 40 min, se centrifugaron las células a 10000 rpm a 4°C durante 40 min.

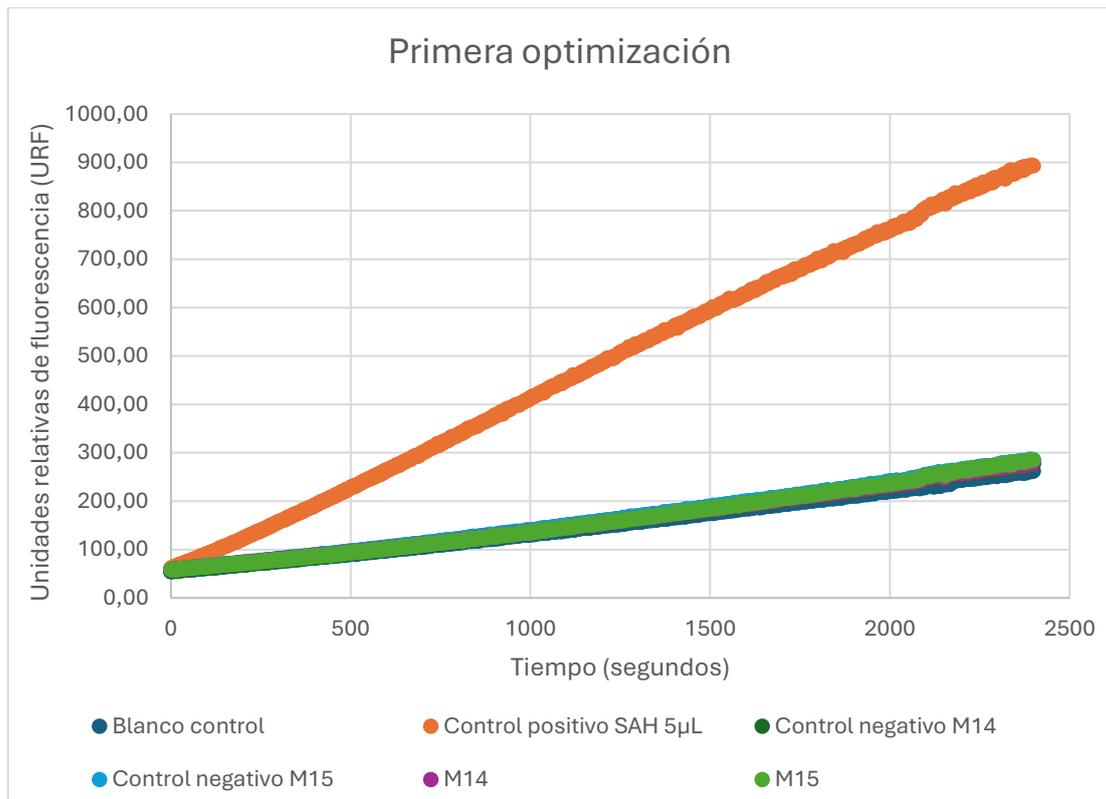
El sobrenadante (40mL aprox) se sembró en una columna de afinidad Ni-NTA (Cytiva Histrap Chelating HP). Se lavó la columna con un buffer fosfato 50 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 250 mM y se eluyó la proteína de interés con un buffer fosfato 50 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 500 mM. Al realizar esta purificación se observa como la proteína comienza a precipitar al salir de la columna y queda parte de la proteína precipitada en la columna.

Luego de obtener la proteína se realizó una diálisis para eliminar el imidazol en dos pasos: el primero en buffer fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 100 mM por 12hs y el segundo paso en buffer Tris-HCl 100 mM durante 5hs. Luego de sacar la proteína de la diálisis se realizó el ensayo con el kit correspondiente en el Instituto Pasteur ese mismo día.

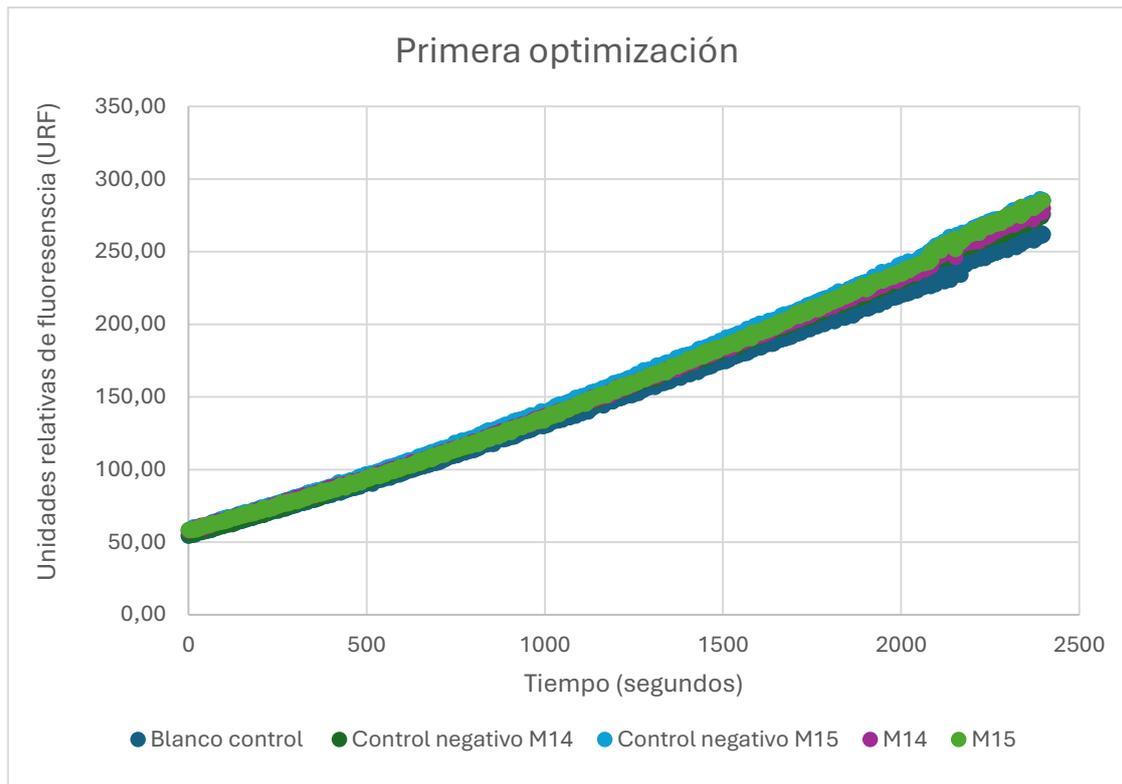
Se decidió ensayar la proteína a pesar de la precipitación observada, apelando a que quedara algo de NS5-Mtasa-Den2 soluble. Se ensayaron la enzima en las condiciones obtenidas después de la diálisis (enzima diluida) y se concentró la misma utilizando un Centricon® (enzima concentrada). Se prepararon las siguientes muestras:

- Control positivo SAH-5µL (5 µL de SAH, 10 µL de buffer y 100 µL de MM).
- Blanco control (15 µL de buffer y 100 µL de MM).
- Las muestras ensayadas fueron:

- M14 (15  $\mu$ L enzima diluida, 2,5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
- M15 (15  $\mu$ L enzima concentrada, 5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
  
- Como controles negativos se utilizaron:
  - Control negativo-M14 (15  $\mu$ L enzima diluida y 100  $\mu$ L de MM).
  - Control negativo-M15 (15  $\mu$ L enzima concentrada y 100  $\mu$ L de MM).



Gráfica 7.13: Gráfica de los datos obtenidos para la primera optimización de la producción de la proteína recombinante. Se graficaron los datos obtenidos para el blanco control, el control positivo SAH-5  $\mu$ L, los controles negativos de M14 y M15, y las muestras M14 y M15.



Gráfica 7.14: Gráfica obtenida de la primera optimización en la obtención de la proteína recombinante de interés sin graficar el control positivo. De esta forma los demás datos se aprecian a una escala más adecuada para su comparación.

El resultado de este ensayo se muestra en la gráfica 7.13 y 7.14, donde no se observan diferencias significativas entre los controles positivos y negativos ensayados. Por lo que se concluye que esta primera producción no presentó actividad.

### 7.6.2. Segunda optimización en la producción de NS5-Mtasa-Den2.

En base a los resultados obtenidos en el primer intento, se analizaron las posibles razones de la precipitación observada. Una de las razones podría ser la cantidad de proteína cargada en la resina.

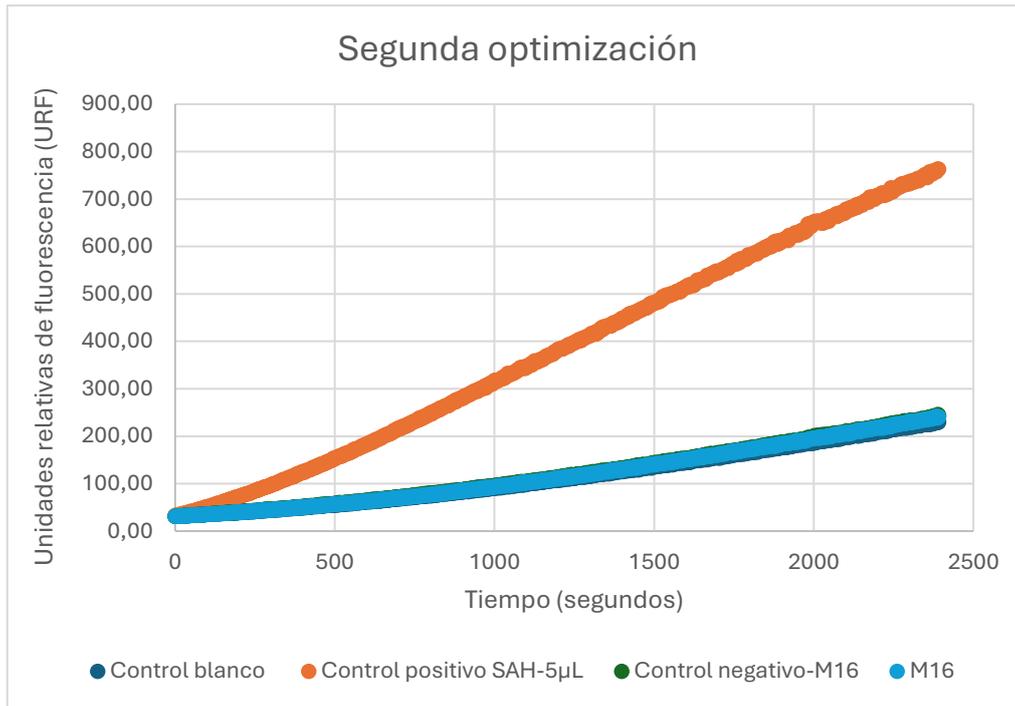
Por esto, decidimos realizar un segundo intento con una menor cantidad de proteína. Para esto, se volvió a realizar la producción anterior, donde se dividieron los 500 mL de medio con células en tubos falcon cada 50 mL de medio. Se centrifugaron las células a 4000 rpm a 4 °C, se descartó el medio y las células se almacenaron en el freezer hasta su uso.

Se utilizaron 2 falcón, correspondiente a 100 mL del medio original para la lisis y purificación. Se procedió en las mismas condiciones que en el intento anterior, la única diferencia fue la cantidad de proteína cargada en la resina.

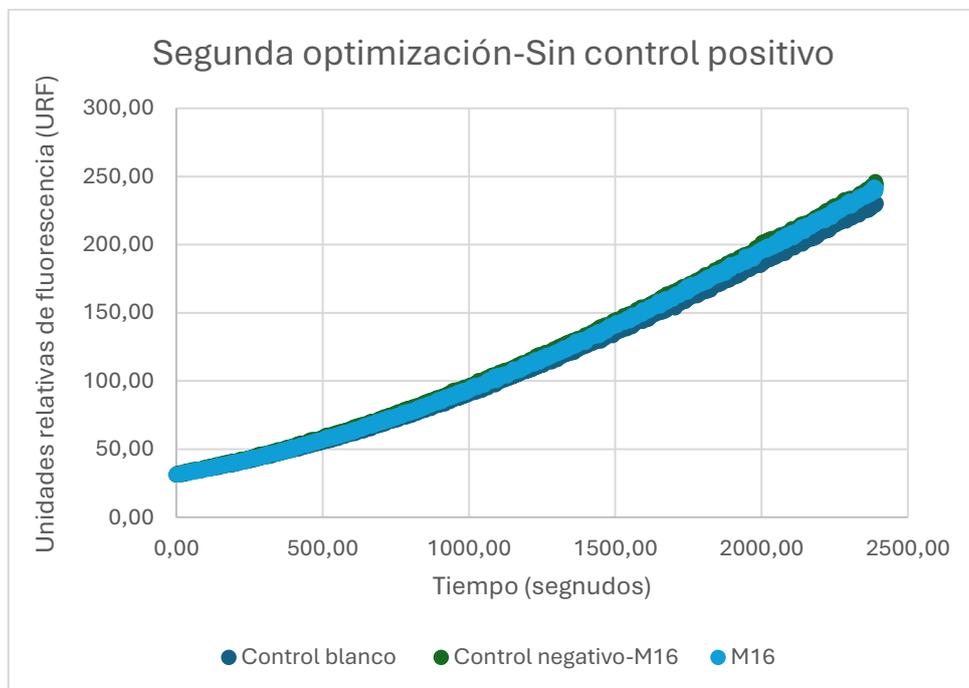
La proteína volvió a precipitar al salir de la columna, la única salvedad es que en esta ocasión no quedó proteína remanente en la resina. Se decidió realizar una diálisis en 2 pasos, el primero con Tris-HCl 100 mM y 100 mM de imidazol por 12 hs y el segundo con Tris-HCl 100 mM por 12 hs. Se decidió ensayar esta producción con el kit comercial al igual que en el caso anterior, al día siguiente de la diálisis en el Instituto Pasteur.

Para la evaluación de esta nueva producción se prepararon las siguientes muestras:

- Control positivo SAH-5 $\mu$ L (5  $\mu$ L de SAH, 10  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Blanco control (15  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Las muestras ensayadas fueron:
  - M16 (15  $\mu$ L enzima diluida, 2,5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
- Como controles negativos se utilizaron:
  - Control negativo-M16 (15  $\mu$ L enzima diluida y 100  $\mu$ L de MM).



Gráfica 7.15: Gráfica de la segunda optimización de la producción de la proteína recombinante de interés. Se graficaron los datos obtenidos para el Blanco, el control positivo SAH-5 µL, el control negativo de M16 y la muestra M16.



Gráfica 7.16: Gráfica de la segunda optimización de la producción de la proteína recombinante de interés sin graficar los datos del control positivo. De esta manera se pueden comparar los demás datos obtenidos a una escala más apropiada.

En las gráficas 7.15 y 7.16 se presentan las gráficas obtenidas en el segundo intento de producción de NS5-Mtasa-Den2. Se puede observar que no existen diferencias significativas entre la muestra y los controles negativos. Por lo cual concluimos que en esta segunda producción no se obtuvo la proteína de interés soluble ni activa.

### 7.6.3. Tercer intento de producción de NS5-Mtasa-Den2.

En la tercera prueba decidimos cambiar todos los buffers fosfato utilizados por Tris-HCl 100mM, sumando al agregado de DTT 1mM. Se ha reportado que algunas metiltransferasas necesitan un medio reductor para su producción,<sup>22</sup> por lo cual decidimos agregar el DTT en la lisis celular y posterior purificación. El DTT se elimina al momento de la diálisis ya que no puede ser usado en el kit comercial adquirido.

El proceso y las cantidades utilizadas en la lisis fueron las mismas que en el segundo intento. La lisis ocurrió como se esperaba, sin embargo, la fase de purificación presentó ciertos contratiempos. Al momento de acondicionar la resina utilizando las nuevas condiciones de buffer Tris-HCl 100mM con el DTT 1mM la resina se volvió de color marrón. Decidimos continuar con la purificación de todas maneras, en dicha purificación no se observó la enzima precipitada, pero tampoco observamos señal de absorbancia en un espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop)(Allsheng nano-300 microspectrophotometer) en las fracciones de elución. en el equipo de nanodrop en las fracciones de elución.

Con respecto al cambio de color de la columna, suponemos que fue debido al DTT, donde este se encontraría formando un complejo con el níquel de la resina (según las especificaciones del fabricante se puede utilizar hasta 10 mM de DTT). Una vez que se realizó la purificación se pasó a la resina un buffer Tris-HCl sin DTT recuperando el color de la resina a su color celeste característico.

---

22 Bobrovs, R.; Kanepe, I.; Narvaiss, N.; Patetko, L.; Kalnins, G.; Sisovs, M.; Bula, A. L.; Grinberga, S.; Boroduskis, M.; Ramata-Stunda, A.; Rostoks, N.; Jirgensons, A.; Tars, K.; Jaudzems, K.. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (12), 1243

Con respecto a la no obtención de la proteína en las fracciones de elución, supusimos que la competencia por parte del DTT con el níquel impidieron la correcta purificación de la proteína recombinante.

Por estas razones, decidimos no llevar a cabo el ensayo de actividad de este intento y realizar un nuevo intento eliminando el DTT del buffer de acondicionamiento de la columna, el buffer de lavado y el de elución. Análogamente, decidimos bajar la concentración de Tris-HCl de 100mM a 50mM en estos buffers ya que el tris (trisaminometano), presenta una amina e hidroxilos en su estructura lo que lo hace actuar como agente quelante de iones metálicos como el Ni, lo que genera una competencia en este tipo de resinas.

Decidimos no evaluar en el ensayo de actividad esta producción de proteína.

#### **7.6.4. Cuarto intento de producción de NS5-Mtasa-Den2.**

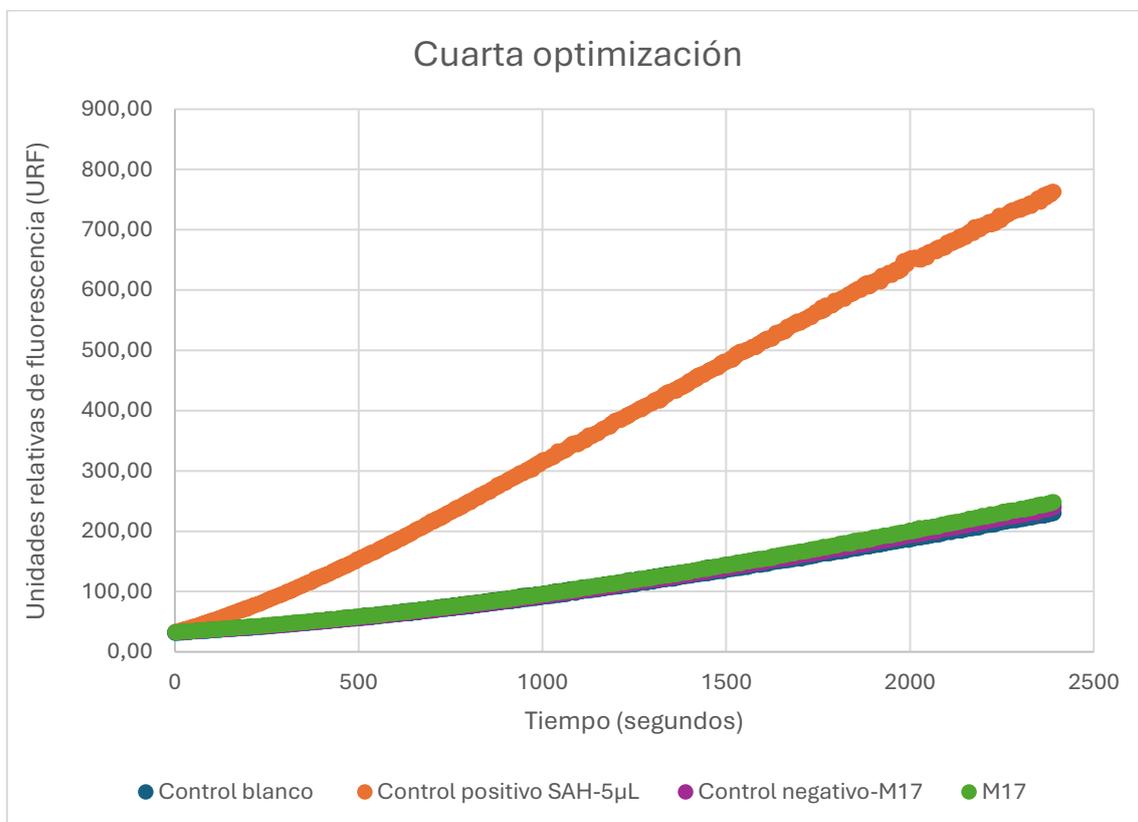
En el último intento para la producción de la proteína recombinante NS5-Mtasa-Den2 decidimos repetir la lisis y la purificación con las condiciones mencionadas anteriormente. Utilizando DTT solo en el buffer de lisis (eliminando el DTT en los buffers utilizados en la purificación) y la disminución en la concentración de Tris-HCl de 100 mM a 50 mM.

Utilizando estas condiciones la lisis de las células ocurrió como era de esperarse y la purificación de la proteína no presentó precipitaciones ni cambios de color en la resina utilizada. Sin embargo, y al igual que en el intento anterior, no se observó señal de absorbancia en el equipo de nanodrop en ninguna de las fracciones recolectadas en la fase de elución.

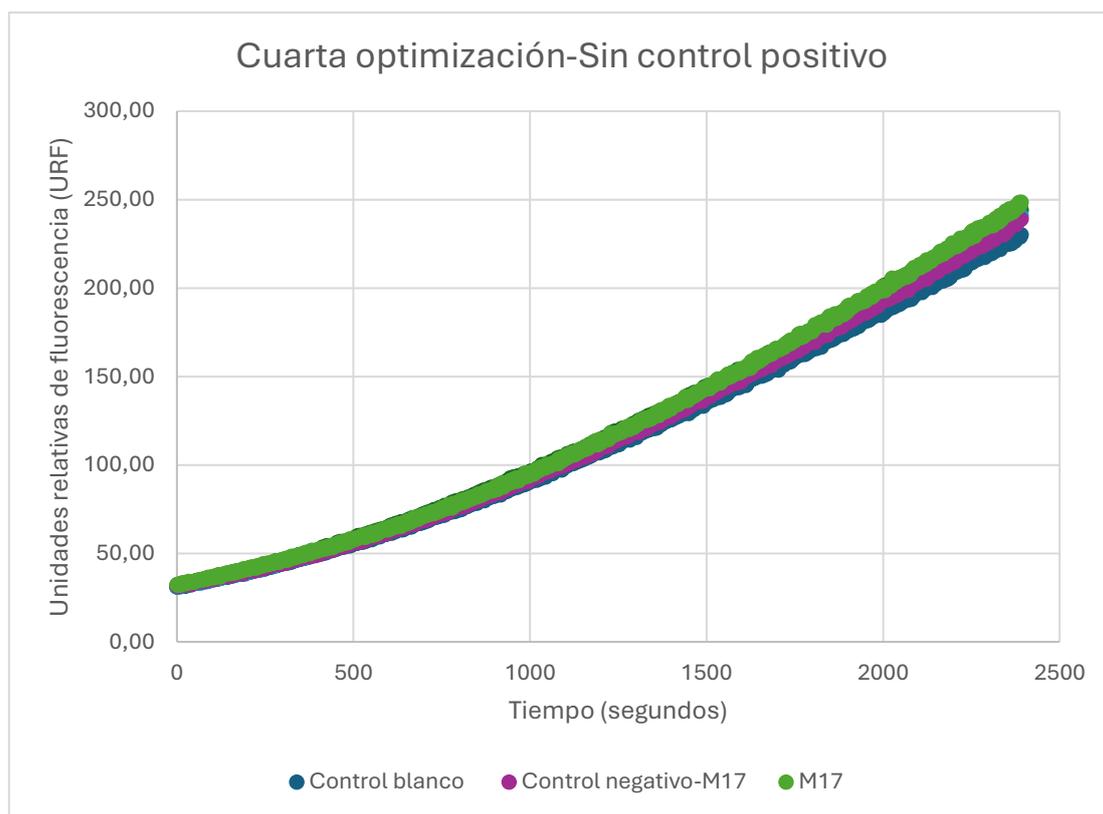
Decidimos recolectar todas las fracciones de la fase de elución y realizar la diálisis correspondiente. Con Tris-HCl 50 mM y 100 mM de imidazol por 12 hs y con Tris-HCl 50 mM por 12 hs. Llevamos a cabo el ensayo de actividad correspondiente el mismo día de terminada la diálisis.

Para el ensayo con el kit comercial se prepararon las siguientes muestras:

- Control positivo SAH-5 $\mu$ L (5  $\mu$ L de SAH, 10  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Blanco control (15  $\mu$ L de buffer y 100  $\mu$ L de MM).
- Las muestras ensayadas fueron:
  - M17 (15  $\mu$ L enzima, 2,5  $\mu$ L de ARN-Cap y 100  $\mu$ L de MM).
- Como controles negativos se utilizaron:
  - Control negativo-M17 (15  $\mu$ L enzima y 100  $\mu$ L de MM).



Gráfica 7.17: Gráfica de la cuarta optimización de la producción de la proteína recombinante de interés. Se graficaron los datos obtenidos para el Blanco, el control positivo SAH-5  $\mu$ L, el control negativo de M17 y la muestra M17.



Gráfica 7.18: Gráfica de la cuarta optimización de la producción de la proteína recombinante de interés sin graficar los datos del control positivo. De esta manera se pueden comparar los demás datos obtenidos a una escala más apropiada.

Los resultados obtenidos para este último intento en la producción de la NS5-Mtasa-Den2 se presentan en las gráficas 7.17 y 7.18, donde se puede observar que los gráficos de la muestra y de los controles negativos son semejantes. Si bien ya sabíamos que en las fracciones de elución no se encontraba proteína o se encontraba en muy baja concentración, este ensayo permitió determinar que el uso del DTT en el buffer de lisis, luego de la purificación y de la diálisis no afectaron el ensayo, por lo que su eliminación fue completa.

A partir de los resultados obtenidos, decidimos realizar un gel para comprobar que la proteína fue eluida en las fracciones de lavado.

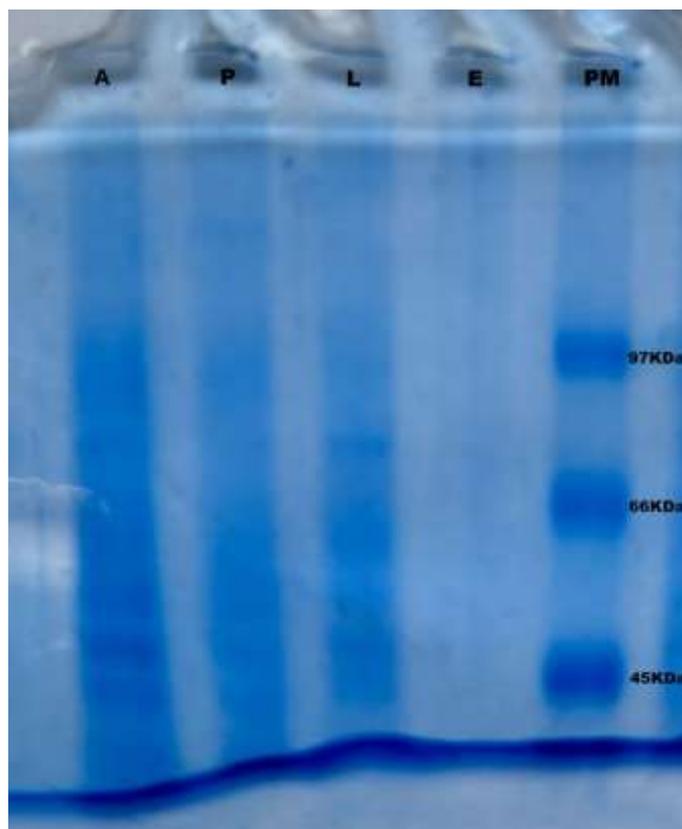


Figura 7.11: Gel resultado de la SDS-PAGE comparando la mezcla aplicada a la columna (A), el percolado (P), el lavado (L) y la elución de la proteína (E) contra un indicador de bajo peso molecular (PM).

En la figura 7.11 se observa el gel resultante de la SDS-PAGE donde se sembraron: el aplicado a la columna (A) que comprende el resultado de la lisis y se encuentran las proteínas provenientes de *E.coli* así como nuestra proteína de interés; el percolado (P) que se obtiene al sembrar la columna, el lavado de la columna (L), donde se eliminan aquellas proteínas que no presentan la cola de His y por lo tanto no tienen interacciones con la columna; la elución de la proteína (E) y un indicador de bajo peso molecular (PM).

Si bien se puede apreciar que el gel obtenido por electroforesis no se desarrolló adecuadamente ya que la línea del frente no se observa recta, se pueden realizar ciertas observaciones. A partir de este gel, se observa que el aplicado contenía una gran cantidad de proteínas, al igual que el percolado y el lavado, como era de esperarse ya que en estas fracciones deben de encontrarse las proteínas pertenecientes a *E. coli*. Al no contar con un control negativo de la expresión de

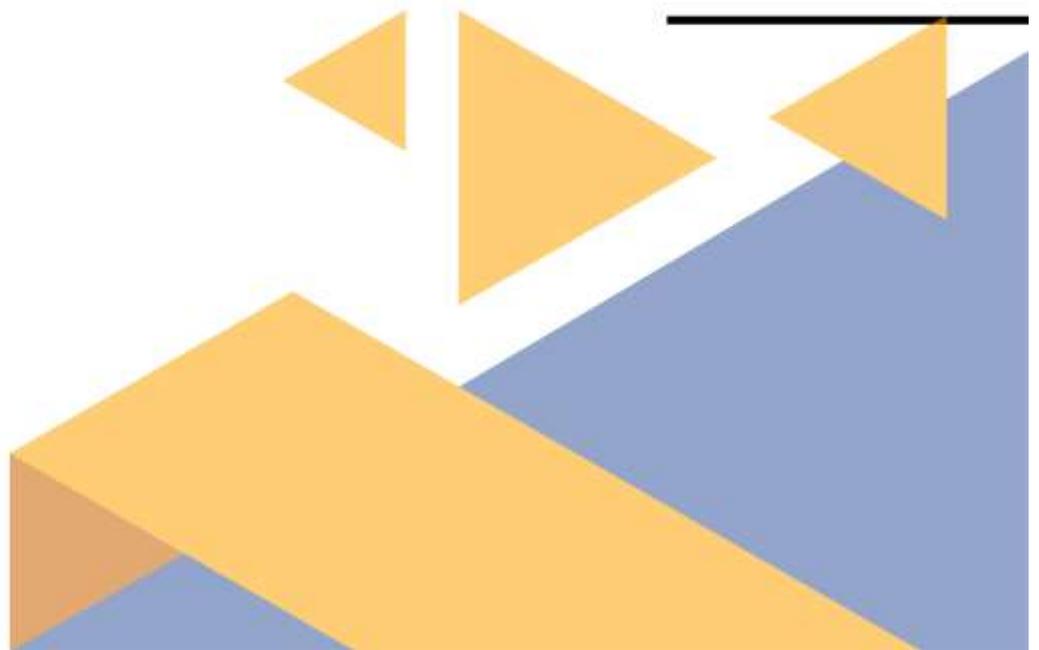
proteínas donde se observen las proteínas pertenecientes únicamente a *E. coli* es difícil determinar cuál es la proteína de interés. Sin embargo, debido al patrón de bajo peso molecular sabemos que la NS5-Mtasa-Den2 debería de encontrarse en la porción inferior del gel ya que presenta un peso molecular de 35 kDa aproximadamente. Por otro lado, se observa claramente que la fracción de elución no presenta proteínas.

Como perspectiva a futuro se plantea continuar con distintos ensayos para la producción de la NS5-Mtasa-Den2 empleando distintas condiciones tanto en la lisis como en la posterior purificación. Se plantean las siguientes pruebas que se podrían ensayar: (i) disminuir la concentración del buffer Tris-HCl de 50mM a 20mM o a una concentración menor; (ii) utilizar otro buffer que sea más compatible con la producción y purificación enzimática de interés; (iii) evaluar el uso de otro agente reductor, (iv) el uso de otros medios de purificación como por ejemplo por cromatografía por intercambio iónico, entre otros.

# Capítulo 7:



## Parte Experimental



## Producción y purificación de la NS5-Mtasa-Den2

### Datos proporcionados por el grupo de la Dra. Susana Castro-Sowinski

Para la producción recombinante de enzima, el plásmido pET-28a(+) se transformó a la cepa para expresión de *E. coli* BL21 (DE3). Se realizaron precultivos de *E. coli* BL21, conteniendo el plásmido en LB a 37 °C y 220 rpm. Una alícuota del 1 % se transfirió a 200 mL de medio auto-inductor Zym-5052 (Tryptona 10 g, Extracto de levadura 5 g, Glicerol 5 g, Glucosa 0.5 g, Lactosa 0.2 g, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.45 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.34 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.27 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.07 g, CaCl<sub>2</sub> 20 µM, MnCl<sub>2</sub> 10 µM, ZnSO<sub>4</sub> 10 µM, CoCl<sub>2</sub> 2 µM, CuCl<sub>2</sub> 2 µM, NiCl<sub>2</sub> 2µM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 µM, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 2 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 µM, csp 1L (20)), suplementado con Kanamicina (50 mg mL<sup>-1</sup>), y se creció a 14°C por 48 h y 220 rpm. Las células se centrifugaron a 7000 g durante 10 min a 4 °C, se re suspendieron en tampón fosfato 50 mM, suplementado con NaCl 50 mM (pH 7.4), se lisaron por sonicación (40 % amplitud) y se centrifugaron a 16000 g durante 30 min a 4 °C.

El sobrenadante se aplicó a una resina de afinidad Ni-NTA (Invitrogen, Cat. No. R907). Se utilizó una relación de 20 mL de fracción soluble por mL de resina, en tampón de unión (tampón fosfato 50 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 40 mM). La resina se lavó con cuatro volúmenes de tampón de unión, y se eluyó con tampón de unión suplementado con imidazol a una concentración final de 250 mM. El eluato resultante se desaló con una columna tipo PD-10 (GE Healthcare, 17-0851-01). Finalmente, la MTAasa recombinante se almacenó en tampón PBS suplementado con glicerol 50% a -80°C.

## Producción y purificación de la NS5-Mtasa-Den2

### Datos proporcionados por el grupo del Dr. Juan Pablo Tosar

Se comenzó realizando una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con los cebadores F y Reverse 2 del fragmento de dsADN 5'-ATGACCTAATACGACTCACTATTACCCCCCTCGTTGAGAGCCTTCCAGTG.

Luego de purificar los fragmentos de ADN amplificado, se cuantificó la cantidad de ADN producido siendo este de 45ng/μL. Posteriormente, se realizó una transcripción *in-vitro* a partir de estos fragmentos de ADN para la formación de los fragmentos de ARN, para lo que utilizó el kit "HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit".

La primera aproximación realizada fue la producción del ADN a partir de los primers, para luego obtener la secuencia de ARN sin caperuza (ARN-sinCap). Posteriormente, se sometió al ARN-sinCap a la purificación correspondiente. La secuencia obtenida de los fragmentos de ADN fue GGAGCAACTCTCGGAAGGTCAC por lo que el fragmento de ARN-sinCap generado fue CCUCGUUGAGAGCCUCCAGUG.

Una vez optimizados los pasos en la producción de ARN-sinCap, se procedió a realizar la síntesis del ARN con caperuza (ARN-Cap), para lo que se siguió la misma estrategia que en el caso anterior realizando ciertas optimizaciones, obteniendo mayor cantidad de ADN en esta segunda optimización que en el caso anterior (393ng/μL frente a los 45ng/μL obtenidos). Una vez sintetizado el ADN, se utilizó el kit mencionado anteriormente para la formación del ARN-Cap, para lo que se utilizó un análogo al cap: GpppA (G(5')ppp(5')A RNA Cap Structure Analog, NEB S1406Sy). Una vez obtenido el fragmento de ARN viral, se realizó la purificación correspondiente, obteniéndose de esta manera el ARN-Cap: GpppACCUCGUUGAGAGCCUCCAGUG.

Una vez finalizada la producción y de haber realizado los geles y medidas de absorbancia necesarios en la optimización de la producción del ARN-sinCap y del ARN-Cap, se realizó un tratamiento con 5'fosfatasa y el Terminator™ 5-Phosphate-Dependent Exonuclease de Lucigen con el fin de determinar que el

ARN-cap efectivamente presentaba la caperuza. Los resultados de esta prueba fueron que el ARN-Cap producido efectivamente incluyó la caperuza.

Adicionalmente, una vez obtenido el kit de actividad se comprobó que la actividad ARNasa que podía presentar la proteína recombinante no afectara al ARN-Cap producido, así como también los insumos del kit. Esta actividad ARNasa se puede controlar utilizando el inhibidor recombinante de ARNsas de la familia A (RI). Además, se comprobó que ARN-Cap producido por transcripción *in-vitro* que utilizamos como sustrato parecía ser resistente a la actividad de ARNsas. Lo cual se explica porque algunas moléculas de ARN pequeños son intrínsecamente resistentes a la degradación por parte de estas enzimas y el hecho de que esté capeado probablemente también lo proteja de 5' exonucleasas.

### Protocolo Transcripción in Vitro para ARN-Cap

- 1) Se sintetiza ARN viral con el kit HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit a partir de 1 µg de producto obtenido por PCR. El capeado se hace co-traduccional con el análogo de CAP G(5')ppp(5')A RNA Cap Structure Analog, NEB S1406Sy y se siguen las instrucciones y concentraciones del fabricante. La relación CAP: GTP=2:1. Se espera obtener con este protocolo 40-60 µg de ARNviral.
- 2) Se realizó la siguiente mezcla (vt 20 µL):

Agua libre de nulceasas	1.9 µL	
10X Buffer de reacción	2 µL	
ATP (100mM)	2 µL	10 mM final
UTP (100mM)	2 µL	10 mM final
CTP (100mM)	2 µL	10 mM final
GTP (100mM)	2 µL	2 mM final
Cap análogo (40mM)	4 µL	8 mM final
Template ADN	2.1 µL	1 µg
Mix T7 polimerasa de ARN	2 µL	
Volumen total de reacción	20 µL	

- 3) La IVT se incubó por 2 hs a 37°C.
- 4) Se agregó 2 µL de ADNasa Turbo (Thermo) para degradar el Template ADN.
- 5) Se incubó 20 min a 37°C.
- 6) La IVT se limpió con el ARN cleanup (50 µg) de Monarch (tres lavados con wash buffer).
- 7) Se eluyó en 50 µL.

### **Preparación de los medios de cultivo utilizados.**

**Medio Luria Bertani (LB):** Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L.

Se agregó agar (15 g/L) para la preparación de medio sólido y se suplementó con antibiótico (Kanamicina) cuando fue necesario.

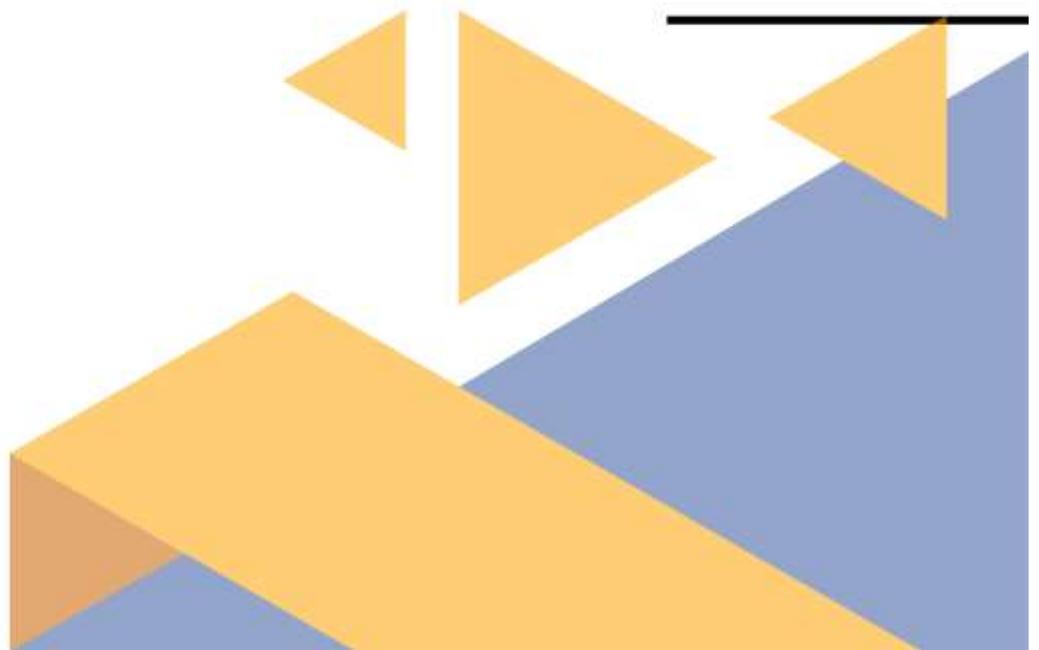
**Medio de autoinducción (AIM):** Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18 g/L. Antes de utilizar agregar 1 mL/L de solución de metales traza 1000x y 20 mL/L de solución de glucosa 2.5% + lactosa 10.5%.

**Solución de metales traza (1000x):**  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  380 mg/100mL, HCl c.s.p 0.05 M,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  8.87 mg/100mL,  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  13 mg/100mL,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2 mg/mL,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.1 mg/100mL,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  14 mg/mL,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mg/100mL,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  190.3 mg/100mL.



## **Capítulo 8:**

# **Estudio de la interacción proteína-ligando por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**



## Antecedentes

En la búsqueda de nuevos inhibidores se han desarrollado varias técnicas para el estudio de las interacciones proteína-ligando como la difracción de rayos X,<sup>1</sup> los estudios computacionales,<sup>2</sup> y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear,<sup>3</sup> entre otras.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es una herramienta fundamental en nuestro trabajo de síntesis orgánica, utilizada para la elucidación y confirmación estructural de los compuestos sintetizados. En los últimos años, se han desarrollado una amplia gama de experimentos de RMN para el estudio de interacciones proteína-ligando, los cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos que se enfocan en la proteína y aquellos que lo hacen en el ligando. Los experimentos que se enfocan en la proteína presentan ciertas desventajas prácticas para su aplicación en nuestro laboratorio, como la necesidad de utilizar proteínas marcadas con los isótopos <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C, así como el uso de equipos de RMN con imanes superiores a 600 MHz.<sup>4,5</sup> Por estas razones nos concentraremos en los experimentos que se enfocan en el ligando.

Los experimentos de RMN enfocados en el ligando presentan dos aplicaciones principales. La primera es el cribado de alto rendimiento (HTS), donde se emplean estos experimentos de RMN para identificar posibles ligandos a la proteína y obtener candidatos a fármacos. La segunda es el diseño de fármacos basado en fragmentos (FBDD), la cual es una estrategia que busca diseñar inhibidores a partir de uno o varios fragmentos (moléculas pequeñas) que se

- 
- 1 Turnbull, A. P.; Emsley, P. *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, **2013**, 1008, pp 457–477.
  - 2 Patil, V. M.; Gupta, S. P.; Masand, N.; Balasubramanian, K. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2024**, *10*, 100133.
  - 3 Pellecchia, M.; Bertini, I.; Cowburn, D.; Dalvit, C.; Giralt, E.; Jahnke, W.; James, T. L.; Homans, S. W.; Kessler, H.; Luchinat, C.; Meyer, B.; Oschkinat, H.; Peng, J.; Schwalbe, H.; Siegal, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (9), 738–745.
  - 4 Zhang, X.; Tang, H.; Ye, C.; Liu, M. *Drug Discov. Today Technol.* **2006**, *3* (3), 241–245.
  - 5 Harner, M. J.; Mueller, L.; Robbins, K. J.; Reily, M. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *628*, 132–147.

unen débilmente a la proteína, utilizándolos como punto de partida para el diseño de compuestos de mayor afinidad.<sup>6</sup>

Los experimentos de RMN que se utilizan en este tipo de estudios se basan en diferentes propiedades del ligando.<sup>5</sup> La diferencia entre la relajación que experimenta el ligando libre y unido a la proteína fueron el punto de partida para el desarrollo de los experimentos de relajación transversal ( $T_2R$ ), donde se espera que el ligando unido a la proteína experimente un tiempo de relajación  $T_2$  más corto que el que experimenta el ligando libre. Aplicando un filtro a  $T_2$  bajos, se puede determinar si el ligando presenta distintos tiempos de relajación en ausencia como en presencia de la proteína, obteniéndose así datos respecto a la unión del ligando. Por otra parte, se han desarrollado varios experimentos para el estudio de la interacción proteína-ligando basados en espectros de  $^{19}F$ -RMN para los ligandos que presentan átomos de flúor en su estructura. Por último, se encuentran los experimentos que se basan en el efecto nuclear Overhauser (NOE). Existen dos experimentos que se basan en este efecto: los que transfieren magnetización desde la proteína al ligando (STD) y los que transfieren la polarización desde las moléculas de agua al ligando (WaterLOGSY). (Figura 8.1)

---

6 Li, Q.; Kang, C. *Molecules* **2020**, *25* (13), 2974.

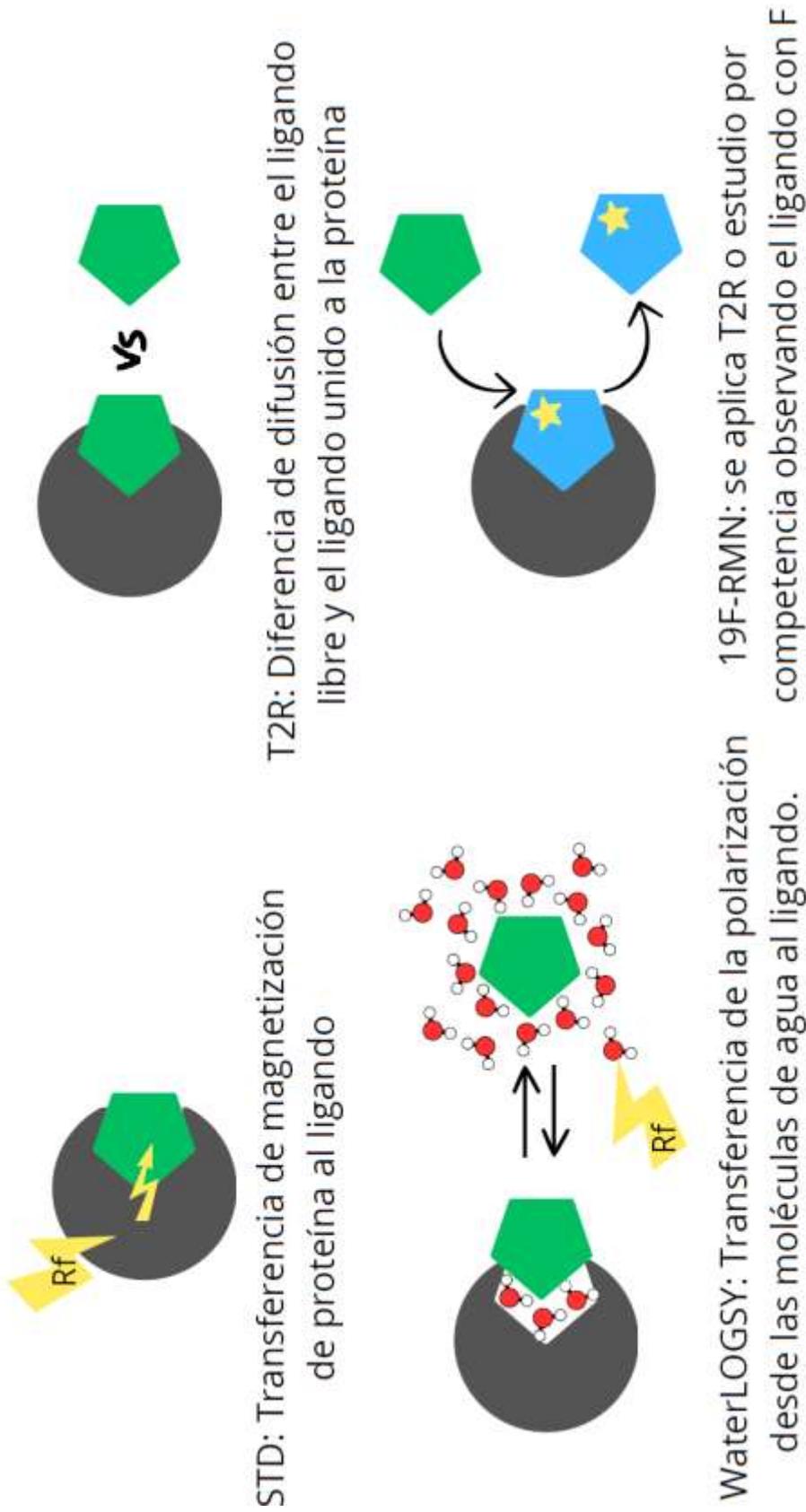


Figura 8.1: Esquema general de los experimentos STD, T2R, WaterLOGSY y  $^{19}\text{F}$ -RMN.

De los experimentos mencionados, se seleccionó el experimento de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD-RMN) para el estudio de la interacción proteína-ligando para nuestro sistema de interés.<sup>7,8</sup>

El experimento de STD-RMN se basa en el efecto NOE, el cual se manifiesta en un átomo cuando otro átomo cercano es perturbado. Visualmente se observa como un cambio en la intensidad del pico en el espectro de RMN. El efecto descrito es la base de los experimentos de RMN conocidos como NOE (NOE-RMN) y NOESY (experimento bidimensional) utilizados ampliamente en la elucidación estructural de moléculas orgánicas. En este se estudia indirectamente el acoplamiento dipolar entre átomos, el cual podría definirse como el acoplamiento magnético directo entre dos núcleos y que a su vez se puede relacionar con la distancia internuclear y el movimiento molecular.

Experimentalmente para la obtención de un espectro de NOE-RMN de una molécula orgánica se adquieren dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN. Uno de estos es un espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto de interés y el otro es un espectro de <sup>1</sup>H-RMN donde un protón es irradiado con un pulso de radiofrecuencia (rf) selectivo, llamaremos a este protón H<sub>s</sub>. Este pulso de rf en H<sub>s</sub>, que genera la perturbación necesaria para el efecto NOE, afectará la relajación de los núcleos que presenten un acoplamiento dipolar con H<sub>s</sub> (llamaremos a estos portones H<sub>x</sub>). El estudio indirecto por NOE del acople dipolar se presenta de importancia en elucidación estructural de moléculas orgánicas ya que, a diferencia de los otros experimentos de RMN, no se trata de una correlación a través del enlace, sino que ocurre a través del espacio. En general, se estima que los átomos deben de estar a una distancia no mayor de 5Å para que experimente el efecto NOE.

Sin entrar en detalle en las vías de relajación que ocurren en H<sub>x</sub> a partir de la saturación de H<sub>s</sub>, es importante señalar como se realiza el cálculo del efecto NOE. Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente de que el pulso de rf en H<sub>s</sub> genera un cambio en la intensidad de la señal de H<sub>x</sub> en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, se define el efecto NOE según la siguiente ecuación:

---

7 Viegas, A.; Manso, J.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E. J. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88* (7), 990–994.

8 Monaco, S.; Tailford, L. E.; Juge, N.; Angulo, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (48), 15289–15293.

$$N_x(s) = I - I_0 / I_0$$

### Ecuación 8.1

Donde  $N_x(s)$  es el efecto NOE que percibe el átomo Hx al saturar al átomo Hs;  $I_0$  es la intensidad de la señal que presenta Hx en el espectro de protón  $^1\text{H-RMN}$  sin irradiar Hs;  $I$  es la intensidad de la señal que presenta Hx en el espectro de protón  $^1\text{H-RMN}$  irradiando Hs. Lo importante de esta ecuación es que dependiendo del valor de  $I$  respecto al de  $I_0$  el efecto de NOE puede ser positivo, negativo o cero. Se ha determinado en base a las vías de relajación, así como los tiempos de correlación ( $T_c$ ) que presentan distintas especies que en general las moléculas pequeñas presentan un efecto NOE positivo mientras que las moléculas de mayor tamaño un efecto de NOE negativo. El valor de  $T_c$  es una medida del movimiento molecular experimentado, por lo cual se debe de tener en cuenta principalmente el peso molecular, la viscosidad de la muestra y la temperatura de la molécula estudiada.<sup>7,9</sup>

Como se mencionó anteriormente, el experimento de STD-RMN se basa en el efecto NOE descrito con anterioridad para el estudio de las interacciones proteína-ligando. En este tipo de experimentos ocurre la transferencia de magnetización de la proteína (saturada por un pulso de rf selectivo, análogo a Hs) hacia el ligando por efecto NOE. Es importante resaltar, que este efecto NOE que percibe el ligando es un efecto NOE negativo ya que proviene de la proteína.

Estos experimentos de STD-RMN son aplicables a sistemas que están en equilibrio rápido con respecto al tiempo del experimento. Esto se debe a que la señal que se observa en el espectro de STD-RMN del ligando proviene de las moléculas que están libres en solución, ya que las que se encuentran unidas a la proteína adquieren el régimen de relajación de la misma, con tiempos de relajación  $T_2$  muy cortos como para ser observados en el espectro.

El experimento comienza por generar la saturación de la proteína irradiando con un pulso rf selectivo a cierto grupo de protones. Generalmente, la irradiación se realiza en frecuencias que corresponden a 0 y -1 ppm lo cual excita selectivamente los grupos metilo de la proteína. (Figura 8.2)

---

9 Derome, A. E.; Baldwin, J. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*; Tetrahedron Organic Chemistry; Elsevier Science: Burlington, 2013.

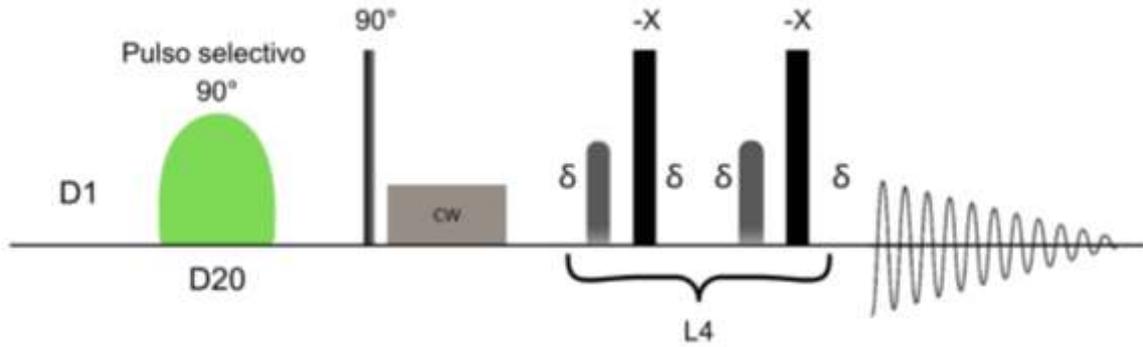


Figura 8.2: Esquema de la secuencia de pulso utilizada para STD-RMN

Una vez aplicado el pulso de rf, esta magnetización se extiende al resto de la proteína por un mecanismo conocido como difusión de espín. Al mismo tiempo, parte de esta magnetización se transfiere a las moléculas de ligando que interaccionan con la proteína a través del efecto NOE. El espectro se mide aplicando un pulso de lectura luego del período de saturación.

Para que se observe el fenómeno de la transferencia de saturación en el espectro STD-RMN del ligando, es necesario que exista un intercambio entre el estado proteína-ligando y el ligando libre en los tiempos en que se desarrolla el experimento. Por lo cual es necesario que el ligando presente una unión débil a la proteína con una constante de disociación (KD) entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-3}$  M. (Figura 8.3 a))

Experimentalmente se realiza la adquisición de dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, uno saturando la proteína con el pulso de rf selectivo (on-resonancia) y el otro sin saturación (off-resonancia). El espectro de STD-RMN se obtiene al restar el espectro on-resonancia del off-resonancia, donde se observará únicamente las señales correspondientes a los protones del ligando que presentaron transferencia de saturación por parte de la proteína. Como ya se mencionó, esto ocurre por un efecto NOE negativo, por lo cual en el espectro on-resonancia las señales de aquellos protones que efectivamente interaccionan con la proteína presentarán una disminución en la intensidad de sus señales. Cuanto mayor sea dicha interacción, mayor será el efecto NOE lo que se traducirá en una mayor señal en el espectro de STD-RMN. Las señales de la proteína, las impurezas presentes en ambos espectros, y los compuestos que no interaccionan con la

proteína o que lo hacen con una alta afinidad, no se verán en el espectro resultante de STD-RMN, ya que las señales en los espectros on-resonancia y off-resonancia serán idénticas y se cancelarán al hacer la diferencia. (Figura 8.3, b), c))

Cabe destacar, que este experimento no discrimina entre la unión específica y no específica del ligando al unirse a la proteína. Para determinar la unión específica de un compuesto a la proteína se utilizan los ligandos conocidos como “espías” en experimentos de competencia. Este ligando espía se toma como control positivo, conociendo la intensidad y lugar de interacción con la proteína. Si se realiza el estudio por competencia entre el compuesto de interés y el ligando espía se puede determinar cuál es el tipo de unión que experimenta el compuesto de interés frente a la proteína. (Figura 8.3 d))

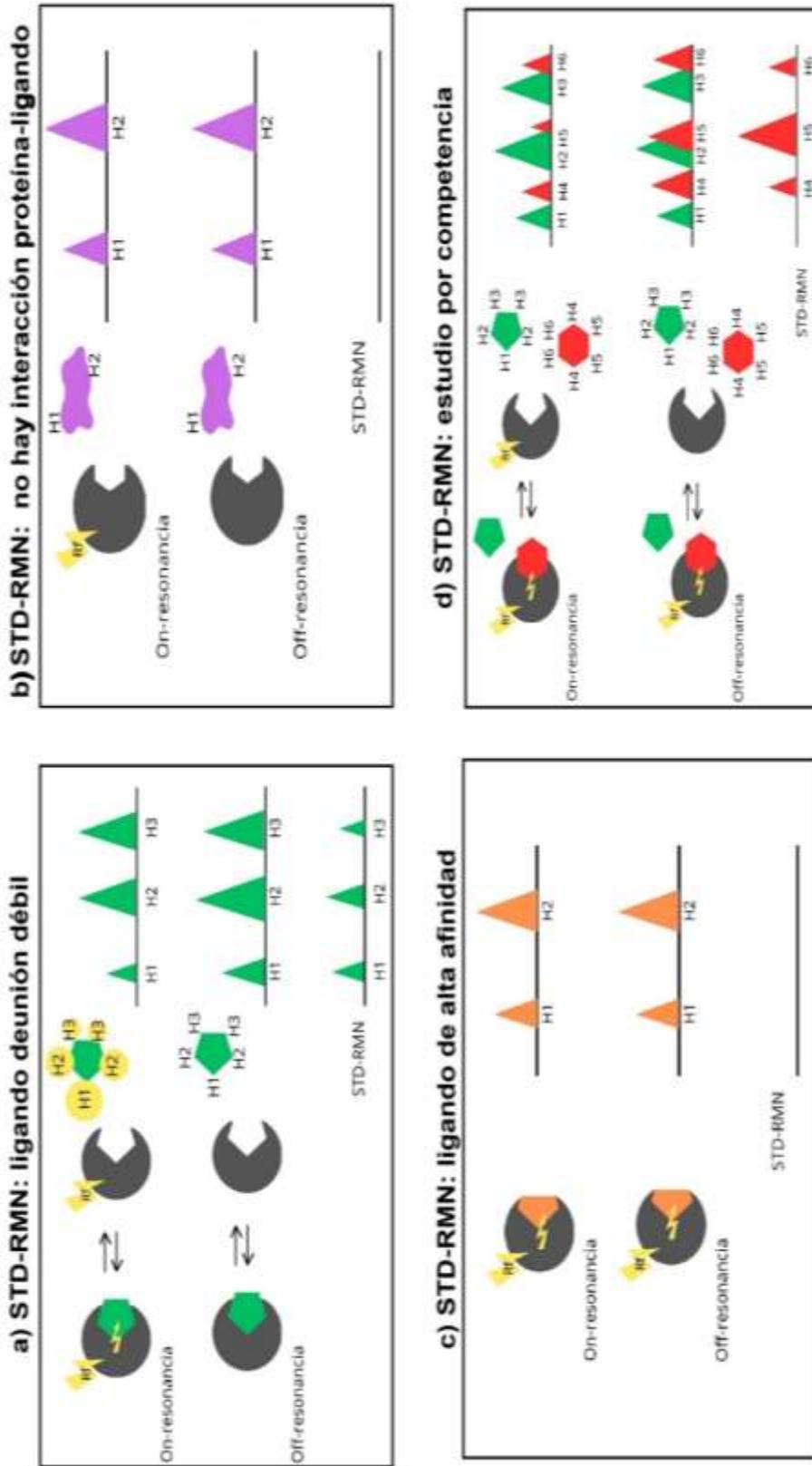


Figura 8.3: Posibles escenarios en el experimento de STD, dependiendo de la interacción proteína-ligando. a) El Compuesto A (en verde) presenta una unión débil a la proteína, se observan señales en el espectro de STD-RMN. b) No existe interacción proteína-ligando para el compuesto B (en violeta), el espectro STD-RMN no presenta señales de B. c) El compuesto C (en naranja) presenta una alta afinidad por la proteína por lo que no existe una disociación del complejo proteína-ligando en los tiempos que dura el experimento, el espectro de STD-RMN no presenta señales de C. d) El compuesto D (en rojo) presenta una mayor afinidad que el compuesto A (en verde) por la proteína, de forma tal que D logra desplazar totalmente al compuesto A. En el experimento de STD-RMN se observan solo las señales correspondientes a D, ya que A en estas circunstancias no presenta interacción la proteína.

## **8.1. Puesta a punto de experimento de STD-RMN**

Seleccionamos un modelo proteína-ligando sencillo para la optimización del experimento STD-RMN debido a la necesidad de conocer la respuesta instrumental. El modelo seleccionado fue la Seroalbumina de origen bovino (BSA) como proteína y como ligando el L-triptofano (L-trp). Se optimizaron varios parámetros experimentales como ser la secuencia de pulsos para la supresión de agua, el tiempo de saturación y el rango de concentraciones de proteína y ligando.

### **8.1.1. Optimización del experimento de STD-RMN:**

#### **8.1.1.1. Optimización del experimento $^1\text{H}$ -RMN para STD-RMN.**

Como ya se ha mencionado, el experimento de STD-RMN consta de la adquisición de dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, uno en condiciones normales (off-resonancia) y otro irradiando la proteína con un pulso de rf selectivo (on-resonancia). Comenzamos adquiriendo un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra M0 que contiene BSA y L-trp. En la figura 8.4 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN resultante, donde se observan principalmente las señales de solventes, DMSO y  $\text{D}_2\text{O}$ , mientras que las señales del ligando son muy poco intensas en comparación.

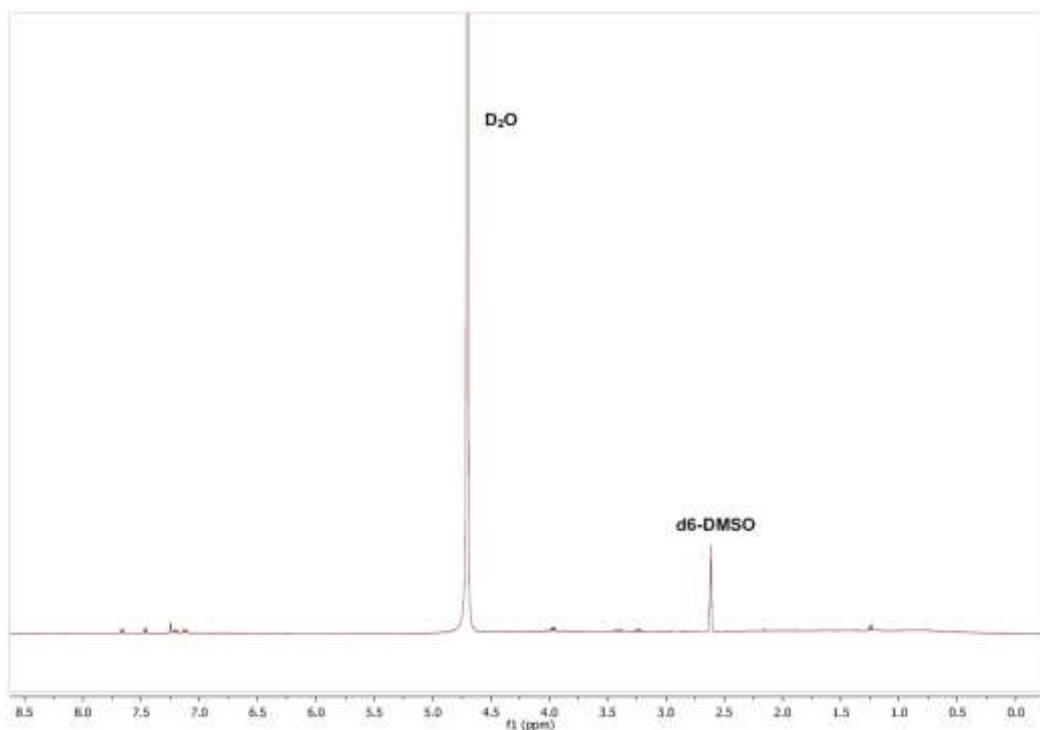


Figura 8.4: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra M0

Considerando que las señales del ligando se presentaron muy disminuidas en relación con el pico del solvente, se presenta de interés disminuir la señal del solvente en el espectro resultante de STD-RMN para aumentar así las señales del ligando y facilitar el estudio. Si bien la señal del solvente se verá disminuida al restar los experimentos on-resonancia y off-resonancia, no se verá eliminada en su totalidad.<sup>7</sup>

Cabe destacar, que la eliminación del solvente en los espectros de RMN, afecta a las señales que se encuentran próximas a este. Se deberá de evaluar el uso de esta aproximación al momento de aplicar el estudio al sistema NS5-Mtasa-DEN2 y los análogos al SFG, ya que estos análogos presentan señales en torno al pico del solvente.

Con el fin de eliminar esta interferencia, se decidió realizar los experimentos de STD-RMN con una supresión del pico del solvente.<sup>10</sup> Se ensayaron 2 tipos de

10 Claridge, T. D. W. Introduction. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Elsevier, 2016; pp 1–10.

experimentos para la supresión de la señal utilizando una muestra de L-trp en D<sub>2</sub>O.

Comenzamos con una presaturación de la señal de solvente con un pulso de rf (1Hpr). En este tipo de experimentos se selecciona el valor en Hz donde aparece la señal de interés en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN. Posteriormente, se aplica un pulso de rf a esa frecuencia en específico, lo que genera que los protones que se presentan a esta frecuencia no puedan relajarse como es debido mientras que ocurre el experimento de RMN, generando que se elimine esta señal en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

El otro experimento ensayado fue la supresión de la señal del solvente utilizando lo que se conoce como “excitation sculpting” (1Hes). Este último, emplea una excitación selectiva y robusta que se logra combinando pulsos conformados por PFG (Eco de espín de gradiente de campo pulsado simple). Lo que implica una secuencia de pulso más sofisticada que la anterior.

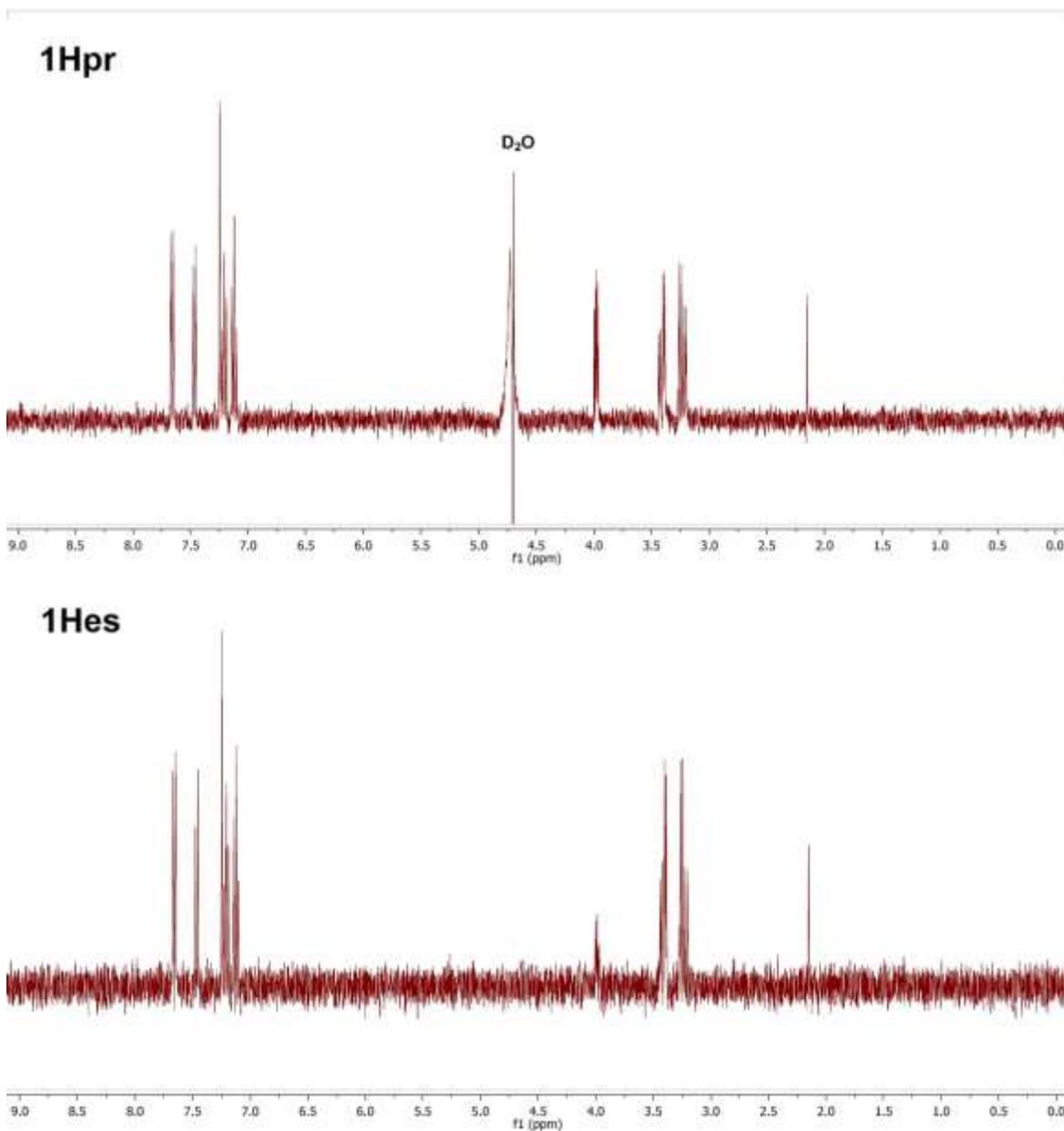


Figura 8.5: 1Hpr: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN con una presaturación en la señal del solvente. 1Hes: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN con una supresión de la señal del solvente utilizando excitation sculpting. Ambos espectros se realizaron a una muestra de L-trp en D<sub>2</sub>O.

Si comparamos los espectros obtenidos en ambos experimentos (figura 8.5) se observa que en ambos la señal del solvente disminuye drásticamente. Sin embargo, la eliminación de la señal del solvente fue más efectiva en el caso de 1Hes. Por esto, decidimos utilizar la supresión de solvente 1Hes para la adquisición del experimento de SDT-RMN.

A partir de esta selección, se decidió realizar los experimentos de  $^1\text{H}_{\text{es}}$  con estas condiciones para la BSA ( $M_{\text{BSA}}$ ) y para la muestra M1 que contiene BSA y L-trp en  $\text{D}_2\text{O}$ , con el fin de tener una referencia del espectro de cada uno de los componentes de la muestra a evaluar por STD-RMN. (Figura 8.6)

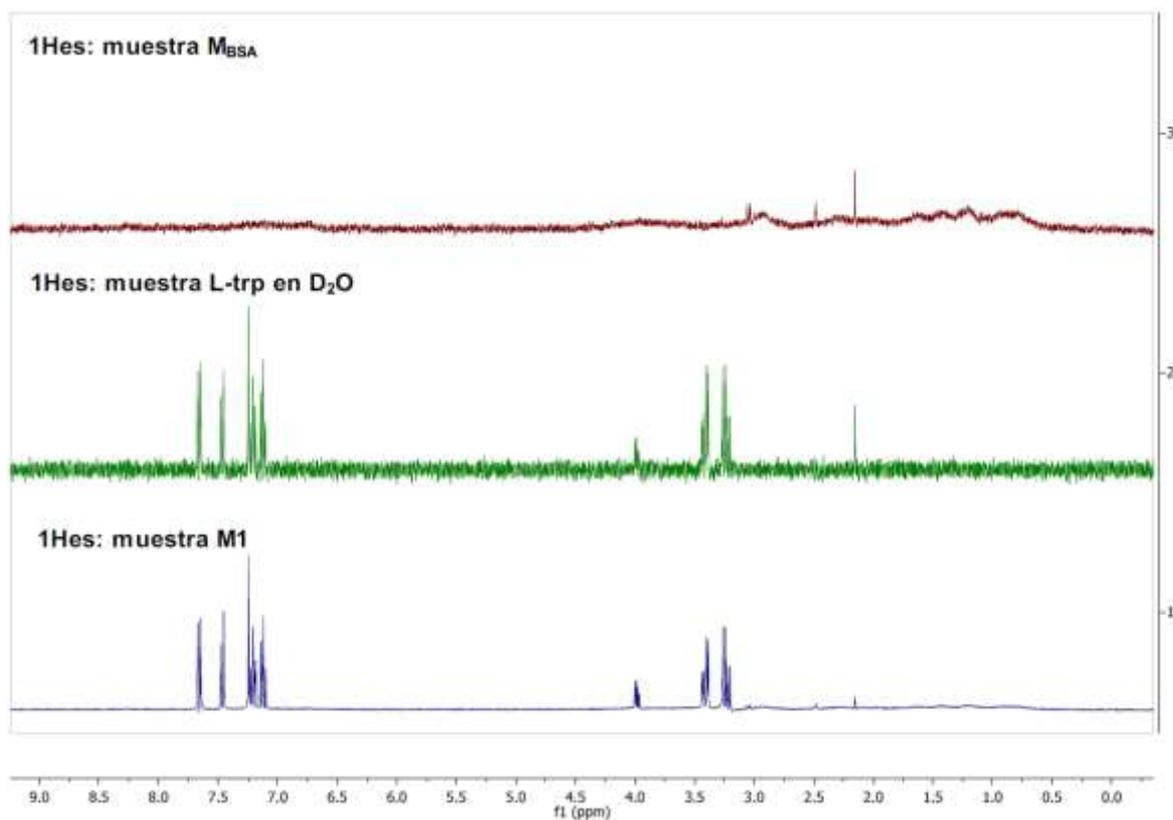


Figura 8.6: Superposición de los espectros de  $^1\text{H}_{\text{es}}$  para la muestra M0, L-trp en  $\text{D}_2\text{O}$  y M1.

### 8.1.1.2. Primeras aproximaciones del experimento STD-RMN

Una vez optimizada la eliminación del pico del solvente se continuó con el experimento de STD-RMN. Se utilizó la muestra M1, con el fin de determinar el tipo de interacción que presenta el L-trp con la BSA.

Como ya se mencionó, el tipo de interacciones que se pueden apreciar en los experimentos de STD-RMN son aquellas interacciones débiles entre proteína-ligando. Para aquellos ligandos que presentan una interacción fuerte con el receptor o aquellos compuestos que no interaccionan con la proteína no presentan señales en los espectros de STD-RMN.

En la figura 8.7 se observa que en el experimento de STD-RMN para el L-trp presenta señales correspondientes al L-trp, lo que determina que este es un ligando de la BSA. También se observa que las señales presentan diferente relación de intensidad respecto al espectro de  $^1\text{H}$ -RMN off-resonancia, lo que nos permite afirmar que la interacción entre la BSA y el L-trp ocurre principalmente en la zona del indol del L-trp.

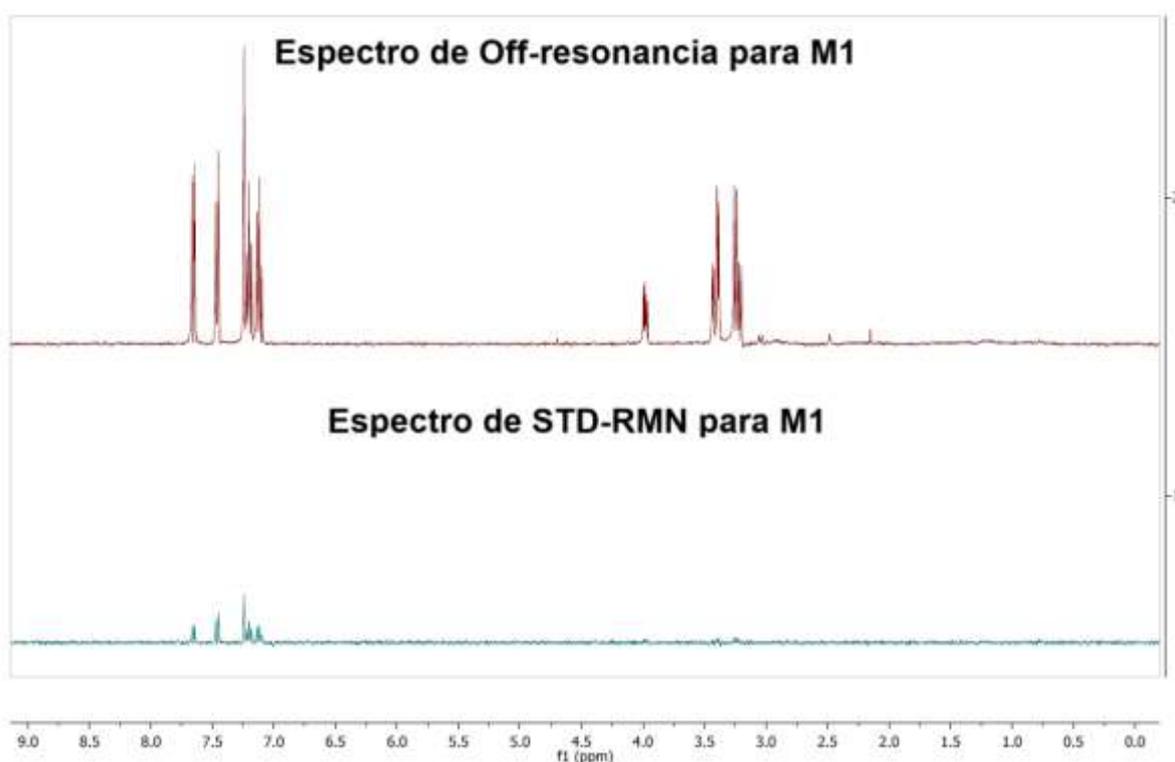


Figura 8.7: Espectro off-resonancia y de STD-RMN para la muestra M1.

### 8.1.1.3. Concentración de la proteína BSA en el experimento de STD-RMN.

Para determinar la incidencia de la cantidad de proteína en el experimento de STD-RMN, se decidió realizar 3 experimentos variando la concentración de BSA. La evaluación de dichos cambios se realizó a partir de los valores de la relación señal/ruido haciendo referencia al aumento o la disminución de la sensibilidad del experimento. Para esto, se realizó una solución stock de BSA y se determinó la concentración de esta por absorbancia a 280nm. Con una absorbancia de 1.463 uA se determinó que la concentración de la solución estándar fue de 33 $\mu$ M.

A partir de la solución estándar de BSA se prepararon tres muestras, las que denominaremos M1, M2 y M3. Se calculó la concentración final de cada una de estas muestras a partir del valor de la concentración de la solución stock de BSA. Por lo que, la muestra M1 presentó una concentración final de BSA de 13.2 $\mu$ M, la muestra M2 una concentración final de BSA de 18.0 $\mu$ M y la muestra M3 una concentración final de BSA de 24.0 $\mu$ M.

Se realizaron los experimentos de STD-RMN a las tres muestras. A partir de los espectros obtenidos se determinó la relación señal/ruido de los espectros en el pico 7.67ppm y se graficaron en función de la concentración de BSA. (Figura 8.8 y 8.9)

Como se observa en la figura 8.8, la relación señal/ruido tiende a aumentar a medida que aumenta la concentración de BSA. Esto se debe a que un aumento en la cantidad de proteína genera una mayor cantidad de ligandos que reciben la transferencia de magnetización, aumentando la señal de STD en el espectro.

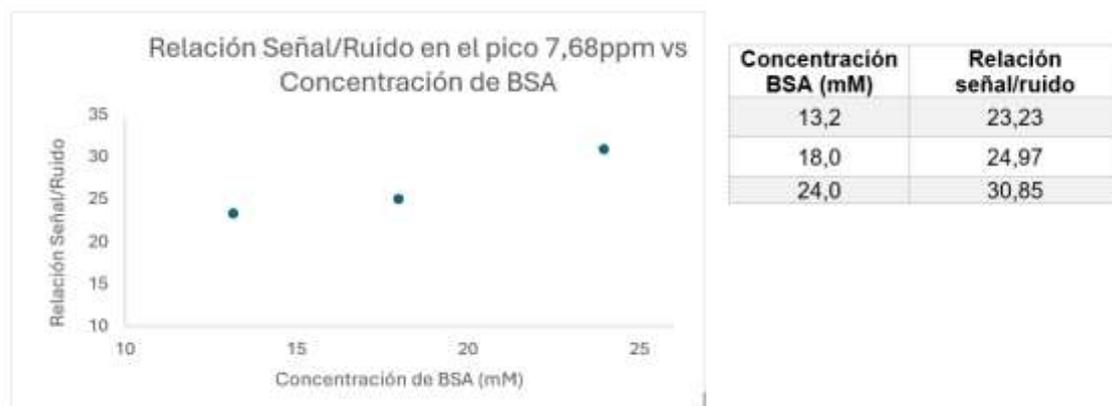


Figura 8.8: Gráfico de la Relación señal/ruido para el pico 7,68ppm vs la concentración de BSA.

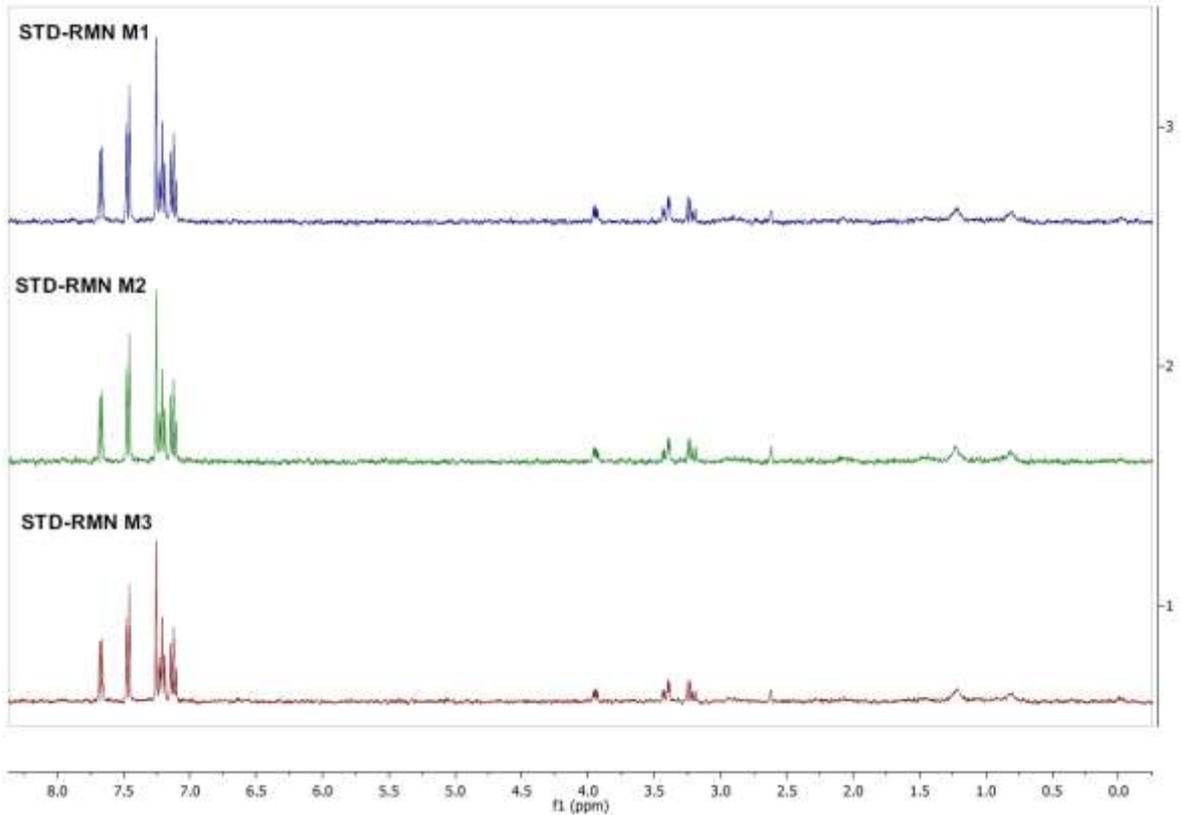


Figura 8.9: Espectros de STD-RMN a concentraciones variables de BSA.

A partir de los datos obtenidos, donde se observa una curva poco pronunciada, seleccionamos la concentración de  $13.2\mu\text{M}$  (M1) para los estudios de competencia, ya que al ser un análisis cualitativo no es necesario un gasto mayor de proteína. Por otra parte, en los análisis cuantitativos como, por ejemplo, la determinación del mapa de epítipo (desarrollado en el punto 8.1.2.) se seleccionó la concentración de  $24.0\mu\text{M}$  (M3) debido a que presenta una mayor relación señal/ruido.

#### 8.1.1.4. Concentración del ligando L-trp en el experimento de STD-RMN

Por otra parte, la concentración del ligando puede influir en el experimento de STD-RMN. Si bien es necesario que el ligando se encuentre en una relación aproximada de 50:1 respecto a la proteína, cambios en esta concentración conlleva variaciones en el espectro de STD-RMN.<sup>5</sup>

Para determinar la influencia de la concentración de ligando se llevaron a cabo los experimentos de STD-RMN utilizando diferentes concentraciones de L-trp.

En las figuras 8.10 y 8.11 se muestra la comparación de los espectros y la gráfica resultantes de estos experimentos. Como es de esperarse, un aumento en la concentración del ligando genera un aumento en la señal del espectro. Para determinar la influencia de la concentración del ligando se calculó la relación señal/ruido con el fin de obtener una aproximación de la sensibilidad del experimento para las diferentes concentraciones de ligando. A pesar de que se presentaron algunas desviaciones a la tendencia general, la relación señal/ruido tiende a aumentar con el aumento en la concentración de L-trp.



Figura 8.10: Gráfico de la Relación señal/ruido para el pico 7,68ppm vs la concentración de L-trp.

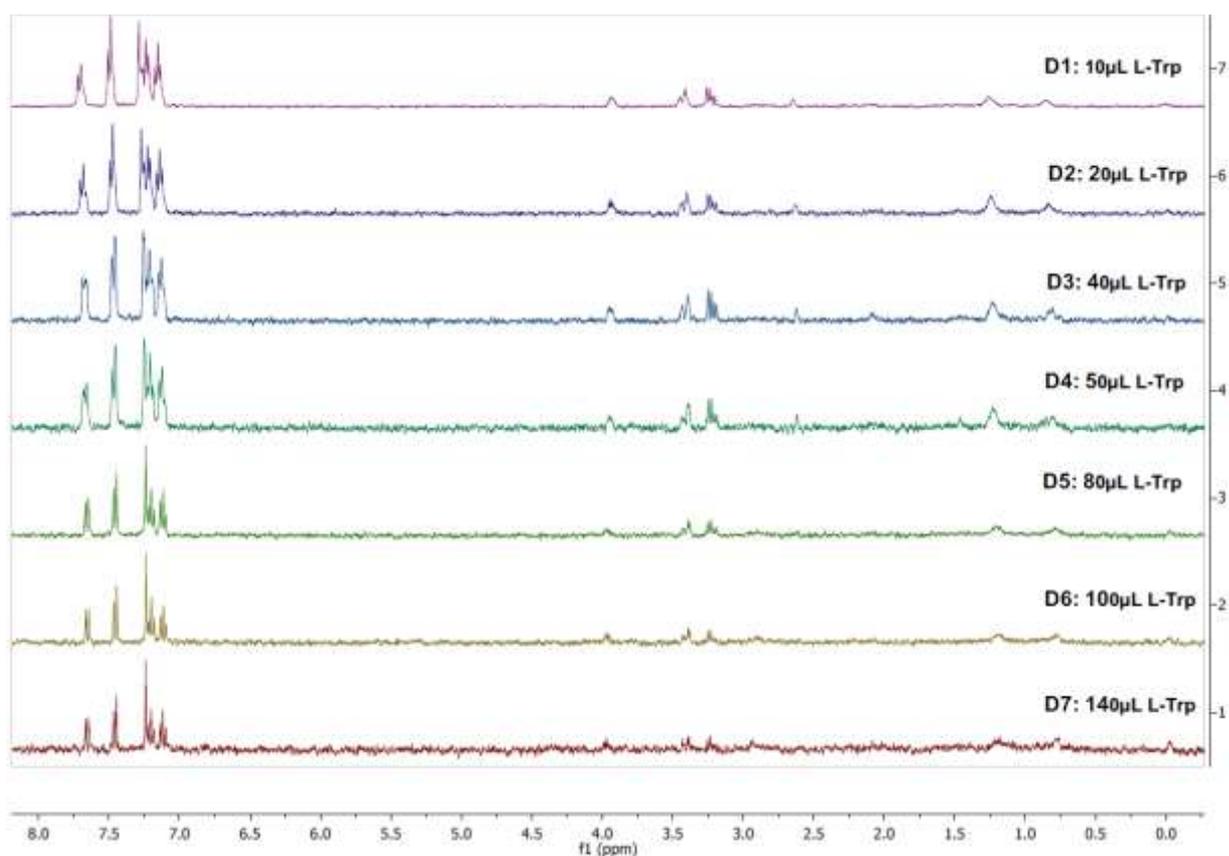


Figura 8.11: Espectros de STD-RMN a concentraciones variables de L-trp.

Se seleccionó la concentración de 5mM ya que presenta una relación señal/ruido intermedia y un aumento en la concentración de ligando no presenta grandes beneficios en cuanto a la sensibilidad del experimento.

### 8.1.1.5 Elección del tiempo de saturación: $D_{20}$

Una vez optimizados los parámetros experimentales para obtener un experimento de STD-RMN aceptable, decidimos optimizar el tiempo de saturación  $D_{20}$ . Este parámetro determina el tiempo que se aplica el pulso de saturación de la proteína en la adquisición del espectro on-resonancia. Utilizando el modelo anterior de BSA y L-trp (M3) se ensayaron variaciones en  $D_{20}$  (0.5s, 0.75s, 1.0s, 1.25s, 1.50s, 2.0s, 2.5s, 3s, 4s, 5s).

En la figura 8.12 se presentan los espectros resultantes al variar  $D_{20}$ . Se calculó la relación señal/ruido en el pico 7.67 ppm con el fin de determinar la influencia de  $D_{20}$ . Se observó que al aumentar el valor de  $D_{20}$  el valor en la relación señal/ruido aumenta, por lo cual se traduce en un aumento en la sensibilidad. Sin embargo, el aumentar  $D_{20}$  conlleva un aumento en el tiempo de adquisición del experimento. (Figuras 8.13 y 8.15)

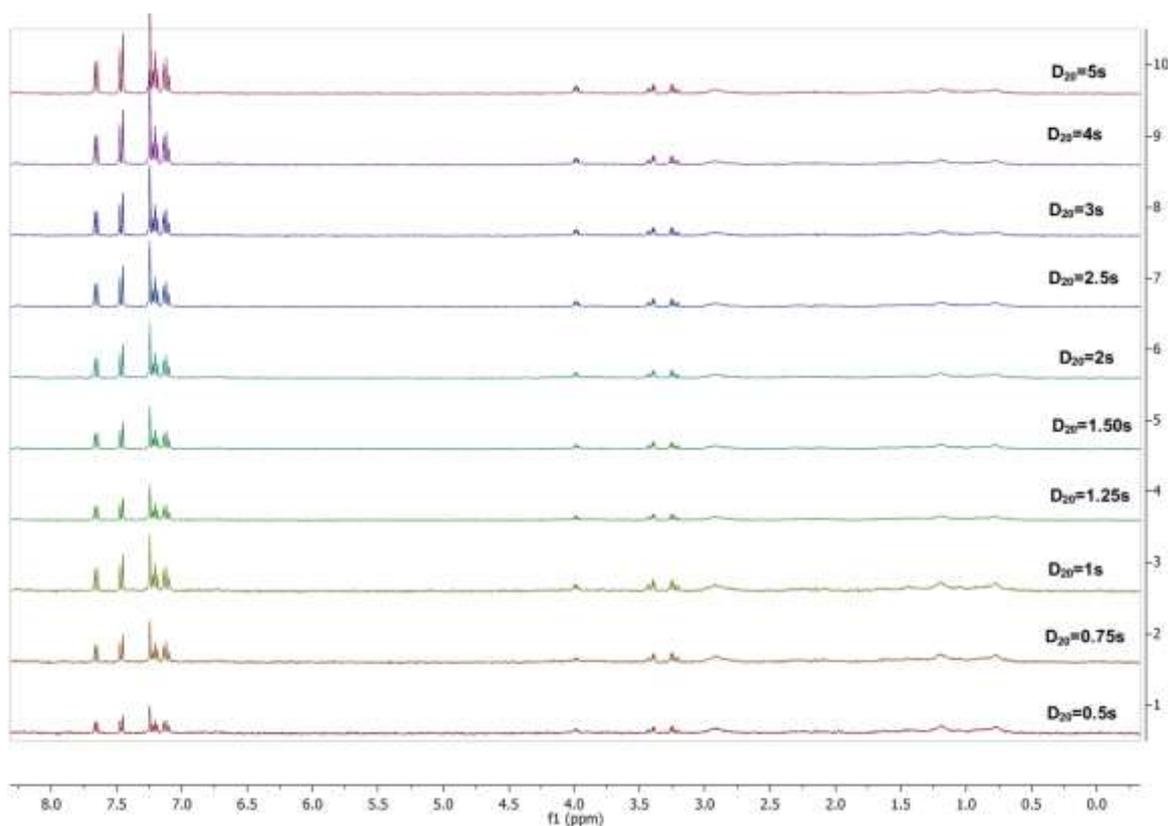


Figura 8.12: Superposición de los espectros de STD-RMN variando  $D_{20}$ .

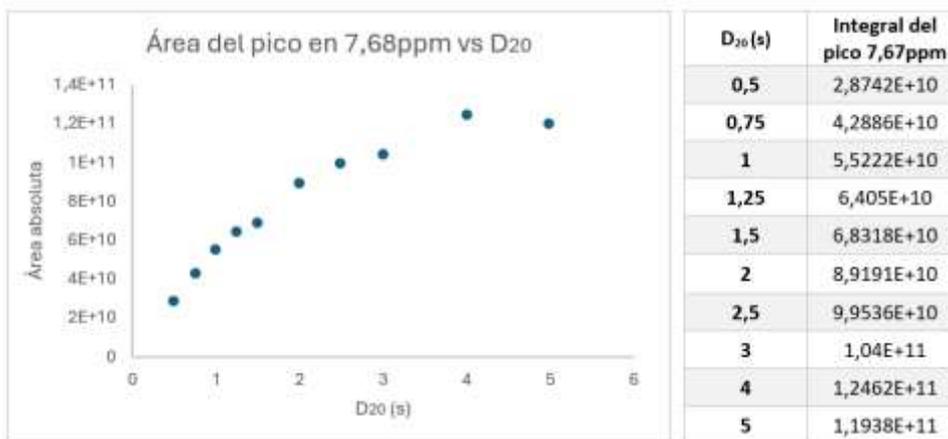


Figura 8.13: Gráfico del área del pico 7.68 vs  $D_{20}$  para la muestra M3.

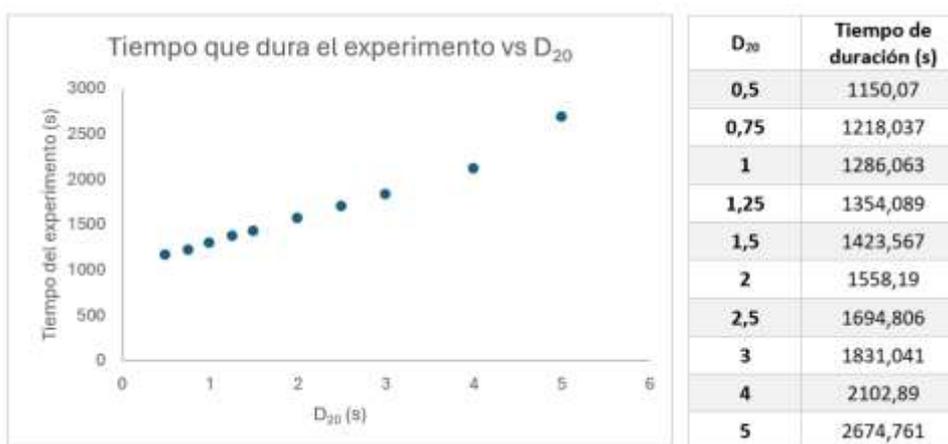


Figura 8.14: Gráfico del tiempo de duración del experimento vs  $D_{20}$  para la muestra M3.

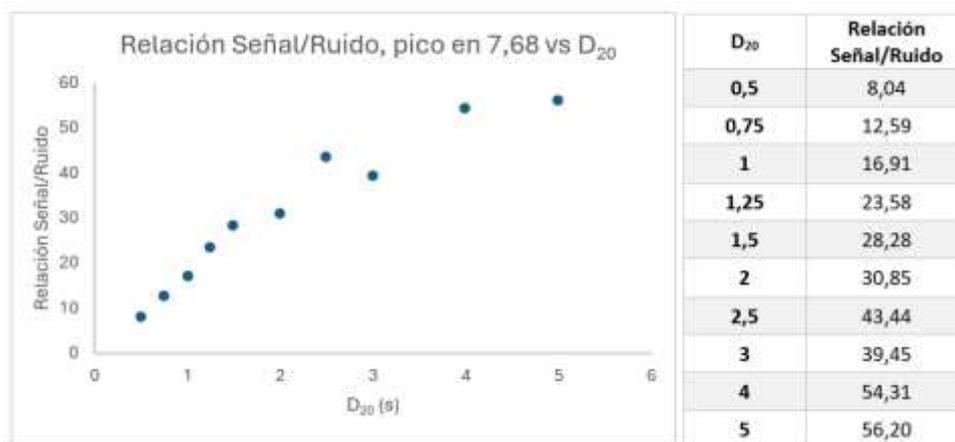


Figura 8.15: Gráfico de la relación señal/ruido para el pico 7.68 ppm vs  $D_{20}$  para la muestra M3.

En base a estos resultados y considerando no aumentar demasiado el tiempo de adquisición del experimento, se decidió utilizar el  $D_{20}$  de 2s para la realización de los estudios posteriores de competencia y de screening de los posibles

ligandos de la proteína. La utilización de  $D_{20}$  de 2s presenta una relación señal/ruido de 30 en un tiempo de 26 minutos por experimento.

### 8.1.2. Mapa de epítomos de unión de ligando

El mapa de epítopo de unión del ligando se determina a partir del estudio de las intensidades relativas de STD a lo largo de la estructura del ligando. Analizando cada protón del ligando se obtiene una idea de la interacción de éste con la proteína. Esto se basa en que los protones del ligando que estén más cercanos a la proteína recibirán una mayor saturación. Estos mapas son interesantes para el estudio de las interacciones proteína-ligando en conjunto con estudios computacionales de docking.

A partir de la adquisición del experimento de STD-RMN para una misma muestra a distintos valores de  $D_{20}$ , se puede calcular el mapa de epítomos correspondiente.<sup>11,12,13</sup>

Si bien un mapa de epítopo de unión se puede determinar a partir de un único  $D_{20}$ , no se aconseja este acercamiento ya que puede generar problemas al momento de interpretar los datos. Si bien la adquisición a  $D_{20}$  cortos es lo aconsejable ( $D_{20} \ll 1s$ ) las señales no son fácilmente detectables. Es por esto que se recurre al enfoque de tasas de crecimiento inicial, donde es necesario determinar la tasa inicial de acumulación de STD ( $STD_0$ ), mediante el ajuste a una curva monoexponencial del tiempo de saturación ( $D_{20}$ ) en función de la intensidad de STD:

$$STD(D_{20}) = STD_{max} (1 - \exp(-k_{sat} \times D_{20})) \quad \text{Ecuación 8.2}$$

En condiciones iniciales, se determina que:

$$STD_0 = STD_{max} \times k_{sat} \quad \text{Ecuación 8.3}$$

---

11 Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (25), 6108–6117.

12 Walpole, S.; Monaco, S.; Nepravishta, R.; Angulo, J. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **2019**; 615, pp 423–451.

13 Angulo, J.; Díaz, I.; Reina, J. J.; Tabarani, G.; Fieschi, F.; Rojo, J.; Nieto, P. M. *ChemBioChem* **2008**, 9 (14), 2225–2227.

donde  $STD(D_{20})$  es la intensidad de STD en un tiempo de saturación dado,  $STD_{max}$  es la intensidad de STD en equilibrio y  $k_{sat}$  es la constante de velocidad de transferencia de saturación.

Para el cálculo de  $STD_0$  se realizan las gráficas de  $STD(D_{20})$  en función de  $D_{20}$ , a partir de esta se aplica un fitting a la curva:  $y = a(1 - \exp(-B \cdot t))$ , donde  $y$  es el valor de STD ( $D_{20}$ ),  $a$  es la  $STD_{máx}$ ,  $b$  es la  $K_{sat}$  y  $t$  es el  $D_{20}$ . A partir de esto se obtienen los valores de  $a = STD_{máx}$ ,  $b = K_{sat}$ , con los que se puede calcular  $STD_0$ . Posteriormente se normaliza  $STD_0$  respecto al mayor valor de  $STD_0$  obtenido y se calcula en porcentaje la interacción entre la proteína y el ligando. Análogamente, se pueden calcular teóricamente los valores de  $STD(D_{20})$  para todos los valores de  $D_{20}$  de 0-5s y obtener una gráfica de la interacción proteína-ligando para cada protón del ligando.

$STD(D_{20})$  se puede calcular de dos formas a partir de los espectros obtenidos en el experimento. La primera forma, a la que llamaremos analítica, se realiza a partir de las integrales absolutas de los espectros de on-resonancia ( $I_{sat}$ ) y off-resonancia ( $I_0$ ), a partir de la siguiente ecuación:

$$STD = (I_0 - I_{sat}) / I_0 \quad \text{Ecuación 8.4}$$

La otra forma, a la que llamaremos geométrica, es utilizada en muestras complejas donde existen señales superpuestas o donde no se puede integrar correctamente la señal. En este caso, se utilizan los espectros off-resonancia y STD-RMN. Para cada pico, se escala la señal de STD-RMN con respecto a la intensidad de una señal correspondiente en el espectro de off-resonancia y se mide el factor  $I(std)/I(off)$ . Dicho factor, se extrajo del programa Topspin (Bruker Biosciences; RRID:SCR\_014227) procurando que las líneas de base de cada espectro se superpongan.

Se comenzó asignando los protones del ligando L-trp en el espectro de  $^1H$ -RMN de la muestra L-trp en  $D_2O$  (figura 8.16). La asignación de estos protones es necesaria para la realización del mapa de epítipo.

A partir de los datos recolectados para la muestra M3 en la sección anterior, se calculó el  $STD(D_{20})$  para cada uno de los protones del L-trp en cada espectro de STD-RMN generados al variar  $D_{20}$  (datos no mostrados). Este cálculo se realizó

por los dos métodos desarrollados, el analítico y el geométrico. Se realizaron las gráficas  $STD(D_{20})$  vs  $D_{20}$  para cada uno de los protones y se calcula  $STD_0$  como se describió con anterioridad.

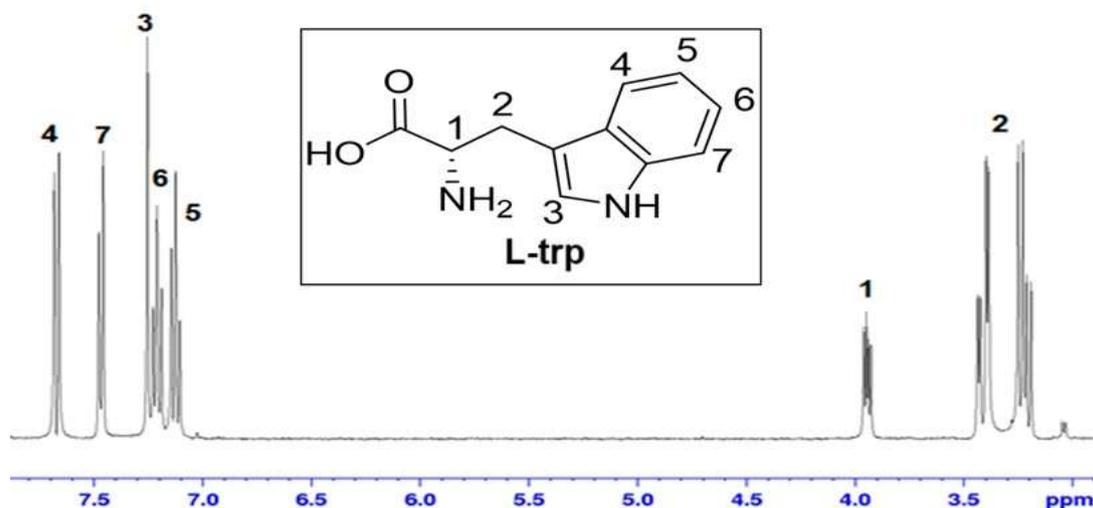


Figura 8.16: L-TRP en  $D_2O$ , asignación del espectro para la realización del mapa de epítipo.

En la figura 8.17 se reporta el análisis realizado en el caso del cálculo de  $STD(D_{20})$  por el método geométrico, mientras que la figura 8.18 se reporta el análisis realizado en el caso del cálculo de  $STD(D_{20})$  por el método analítico. En ambas figuras se informan los valores de  $STD_{m\acute{a}x}$ ,  $b=K_{sat}$ ,  $STD_0$  calculados para cada protón y la normalización del valor de  $STD_0$ . Además, se muestra el mapa de epítipo de la interacción de la proteína ligando. Se muestra, por un lado, la gráfica de  $STD(D_{20})$  vs  $D_{20}$  donde se superpusieron las curvas obtenidas en el estudio de cada protón del espectro y por el otro la representación del porcentaje de interacción de cada protón sobre la estructura del L-trp.

De ambos mapas de epítipo generados se observó que el L-trp presenta una mayor interacción con la proteína en la zona del indol. Si bien existen mínimas diferencias en los porcentajes calculados, ambos mapas se consideraron equivalentes.

Protón	a=STDmáx	b=Ksat	STD0	STD0 Normalizado	%
H1	5,12072	0,96683	4,95085727	0,426543097	43
H2	3,52553	1,37422	4,84486645	0,417411414	42
H3	14,82637	0,69501	10,304487	0,887787219	89
H4	9,89525	0,76030	7,52335601	0,648177759	65
H5	12,71523	0,75338	9,57937222	0,825314661	83
H6	14,25907	0,74387	10,6068882	0,913840716	91
H7	16,03627	0,72379	11,6069333	1	100

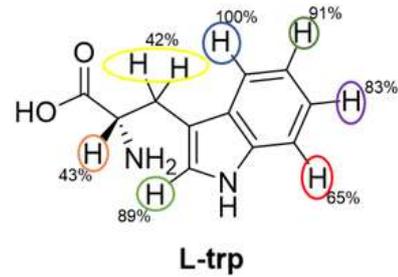
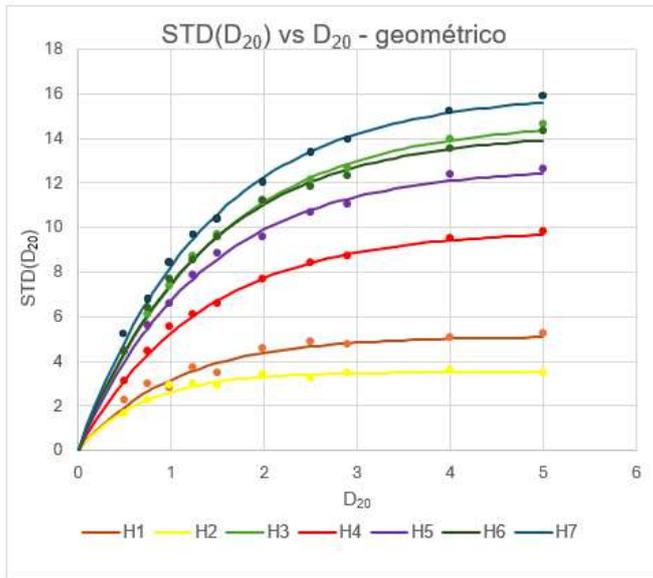


Figura 8.17: Mapa de epitopo para el L-trp a partir del cálculo geométrico.

Protón	a=STDmáx	b=Ksat	STD0	STD0 Normalizado	%
H1	5,27358	1,04100	5,489776156	0,46755543	47
H2-3,2ppm	3,90783	1,33247	5,207068228	0,44347764	44
H2-3,4ppm	5,41029	1,00897	5,458845576	0,46492112	46
H3	14,91950	0,69619	10,38686269	0,88463243	88
H4	9,79204	0,85952	8,416447658	0,71681534	72
H5	12,97701	0,77088	10,00377756	0,85200568	85
H6	14,21779	0,74373	10,57425878	0,90059265	90
H7	16,81007	0,69848	11,74144468	1	100

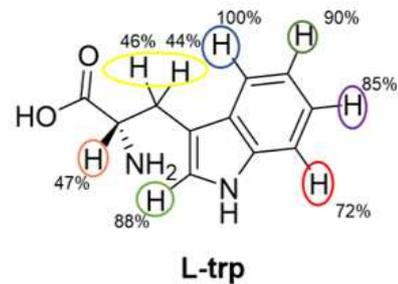
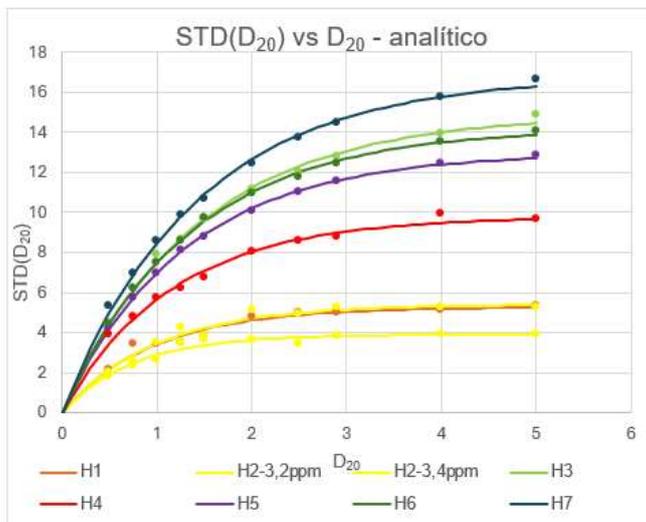


Figura 8.18: Mapa de epitopo para el L-trp a partir del cálculo analítico.

## 8.2. Estudio por competencia en STD-RMN

Los experimentos de STD-RMN pueden utilizarse para evaluar la competencia por un sitio de unión de un ligando frente al otro. Con el fin de comprobar el funcionamiento de este tipo de experimentos decidimos realizar un estudio por competencia empleando la BSA como proteína y ligandos reportados para la misma como el L-trp y el ácido salicílico (AS).<sup>14-16</sup> Posteriormente, agregamos el ácido 3,5-diiodosalicílico (3,5 ADIIS) para continuar con los estudios de competencia. (Figura 8.19).

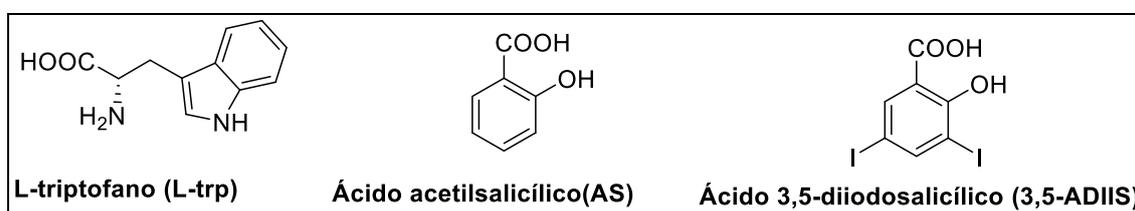


Figura 8.19: Estructuras de L-triptofano (L-trp), el ácido salicílico (AS) y el ácido 3,5-diiodosalicílico (3,5 ADIIS).

Para esto, realizamos los experimentos de <sup>1</sup>Hes y STD-RMN por competencia en dos muestras. El espectro de <sup>1</sup>Hes se realizó para determinar dónde salen las señales de los ligandos para luego continuar con el experimento de STD-RMN (Datos no mostrados).

En la primera muestra se utilizaron L-trp y AS como ligandos para el estudio de unión a la BSA (C2).

En la tabla 8.1, se pueden apreciar los resultados procesados del experimento STD-RMN. Para facilitar la comparación, se seleccionó una señal de referencia de cada uno de estos compuestos. Para el L-trp se seleccionó la señal a 7.68 ppm y en el caso del As se seleccionó la señal a 7.75 ppm. Posteriormente, se

14 Akdogan, Y.; Emrullahoglu, M.; Tatlidil, D.; Ucuncu, M.; Cakan-Akdogan, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (32), 22531–22539.

15 Bo, T.; Pawliszyn, J. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1105* (1–2), 25–32.

16 Kragh-Hansen, U. *Biochem. J.* **1983**, *209* (1), 135–142.

calculó el %STD entre el espectro de STD-RMN y el espectro off-resonancia (Ver parte experimental). Mayores valores de %STD supone una mayor interacción entre la proteína y el ligando.

Este cálculo se realizó para los ligandos interactuando por separado con la BSA M1 (L-trp, BSA), C1 (AS, BSA) y en la muestra de competencia C2 (L-trp+AS+BSA). Las comparaciones se realizaron entre los valores de M1 y C2 para el L-trp y para el AS entre C1 y C2, siempre haciendo referencia a los picos seleccionados como referencia. Este cálculo podría realizarse para cada uno de los protones involucrados.

La interacción entre el L-trp con la BSA en ausencia de AS (M1) fue un 8%, mientras que la interacción entre el L-trp con la BSA en presencia de AS (C2) fue de 3%. Por lo que la interacción en la muestra M1 fue de un 5% mayor que en la muestra C2. (Figuras 8.20 y 8.22, tabla 8.1)

Por otro lado, la interacción entre el AS con la BSA en ausencia de L-trp (C1) fue un 42%, mientras que la interacción entre el AS con la BSA en presencia de L-trp (C2) fue de 34%. Por lo que la interacción en la muestra C1 fue de un 8% mayor que en la muestra C2. (Figuras 8.21 y 8.22, tabla 8.1)

<b>Experimento STD-RMN</b>	<b>%STD</b>
L-trp (M1)	8
L-trp (C2-competencia)	3
As (C1)	42
As (C2-comptencia)	34

Tabla 8.1: %STD del pico seleccionado para L-trp y AS en las muestras: M1, C1 y C2 (competencia).

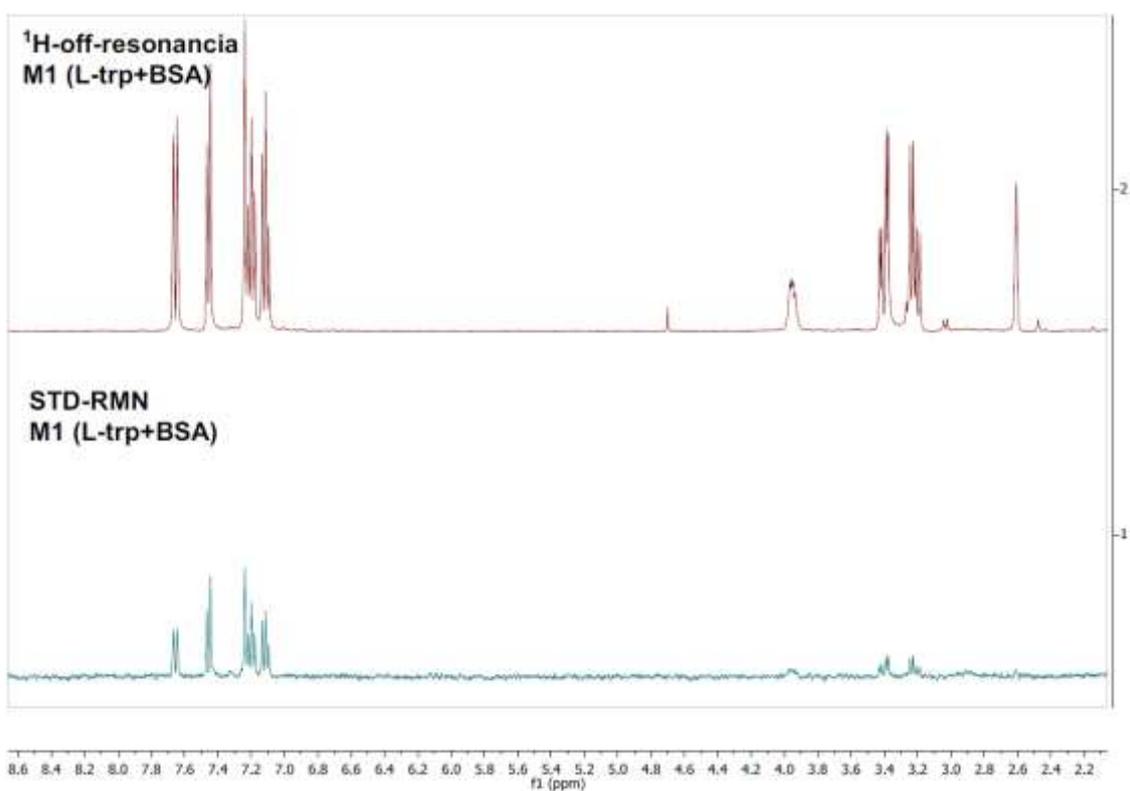


Figura 8.20: Espectros off-resonancia y STD-RMN para la muestra M1 (L-trp+BSA)

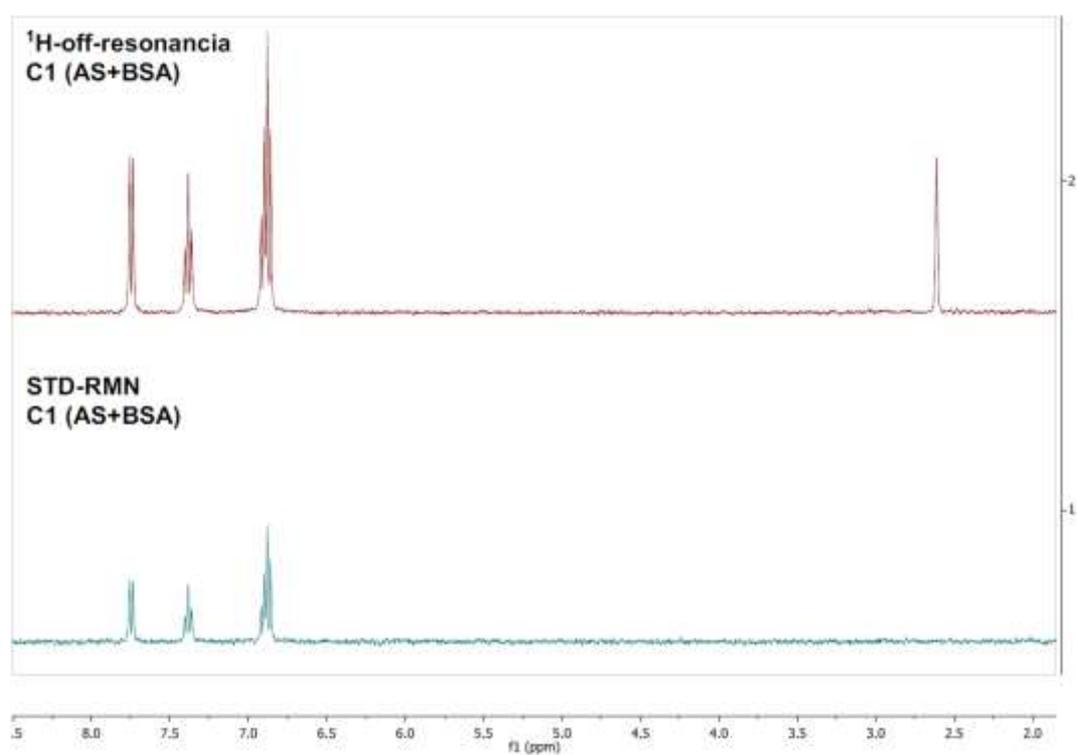


Figura 8.21: Espectros off-resonancia y STD-RMN para la muestra C1 (AS+BSA)

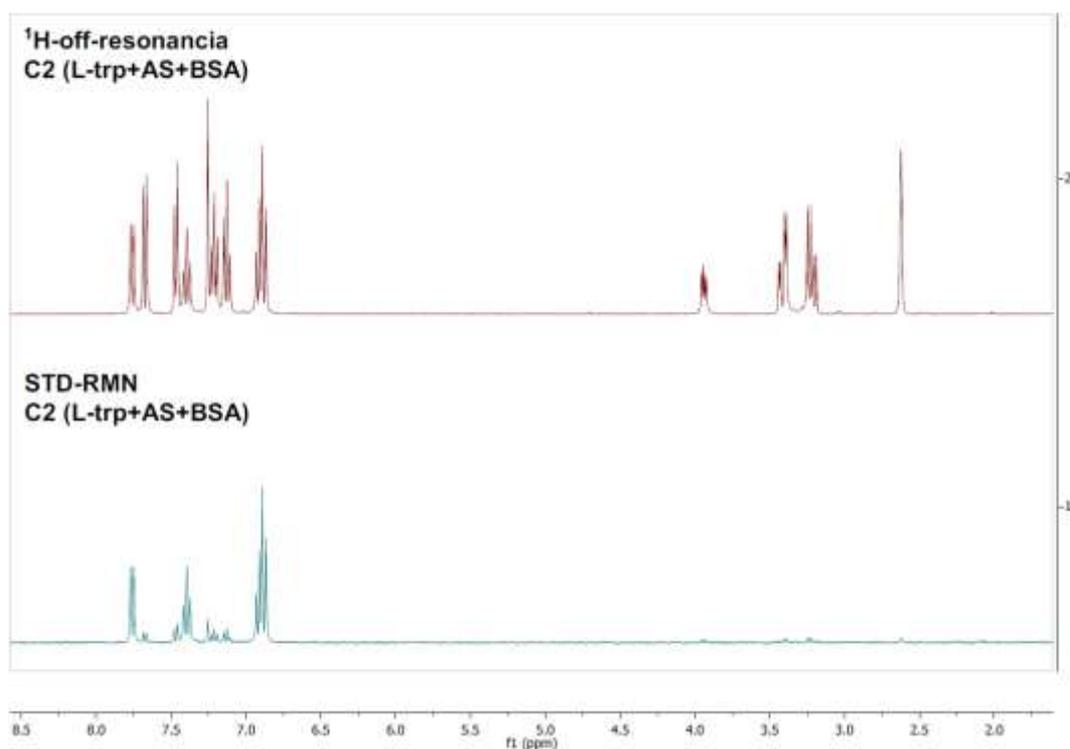


Figura 8.22: Espectros off-resonancia y STD-RMN para la muestra C2 (L-trp+AS+BSA)

A partir de los datos obtenidos, se presume que los ligandos tienen diferentes sitios de unión a la BSA, ya que se comportan de manera similar en presencia como en ausencia del otro ligando. En ambos casos, se observa que ambos ligandos presentan una interacción mayor al estar en las muestras M1 y C1 que en el estudio por competencia. Este comportamiento puede explicarse de dos formas. Uno es que las diferencias entre uno y otro valor son pequeñas y que podrían despreciarse por la existencia de errores aleatorios en la preparación de las muestras. Debe de recordarse que se analizaron tres muestras distintas. La otra explicación en base a la teoría de que existen dos sitios de unión a la BSA es que ambos ligandos interaccionan con ambos sitios de unión. Por ejemplo, el L-trp interacciona con ambos sitios de unión a la BSA cuando se encuentra en la muestra M1. En cambio, en la muestra C2 el AS ocupa uno de esos sitios de unión donde presenta mayor afinidad que el L-trp. Por lo que en el estudio por competencia (C2) se observa la interacción en el sitio de unión de mayor afinidad al L-trp. Lo mismo ocurre con el AS.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en estudios de otros autores.<sup>14,15</sup> Se ha demostrado que la BSA presenta dos sitios de unión denominados I y II. Los ligandos como el L-trp, ibuprofeno y diazepam interaccionan con la BSA en el sitio II. Mientras que las warfarinas y salicilatos interaccionan con la BSA en el sitio I. Además, han demostrado que si bien el L-trp y el AS interaccionan principalmente con los respectivos sitios de unión mencionados, también presentan interacciones débiles con el otro sitio de unión. Análogamente en el trabajo presentado por Kragh-Hansen,<sup>16</sup> se realizó un estudio de competencia en la sero albúmina de origen humana (HSA) utilizando L-trp y AS, entre otros. En éste, concluyeron que ambos compuestos interaccionarían con la HSA en sitios distintos, pero que esta unión disminuye con la presencia conjunta de ambos ligados frente a la HSA.

Para la segunda muestra de competencia ensayada decidimos seleccionar el 3,5-ADIIS y el AS. Para esta elección se supuso que el 3,5-ADIIS y el AS compartirían el mismo sitio de unión en la BSA, debido a su semejanza estructural. Se realizó el estudio por competencia con AS, 3,5-ADIIS y BSA (C4) y el experimento de 1Hes y STD-RMN con 3,5-ADIIS y BSA (C3).

Como se mencionó anteriormente la interacción entre el AS con la BSA en ausencia de 3,5-ADIIS (C1) fue un 42%, mientras que la interacción entre el AS con la BSA en presencia de 3,5-ADIIS (C4) fue de 7%. Por lo que la interacción en la muestra C1 fue de un 35% mayor que en la muestra C2. (Figuras 8.21 y 8.24, tabla 8.2)

Para el cálculo del porcentaje de área para el 3,5-ADIIS se utilizó el pico en 8.10ppm. Se determinó que la interacción entre el 3,5-ADIIS con la BSA en ausencia de AS (C3) fue un 76%, mientras que la interacción entre el 3,5-ADIIS con la BSA en presencia de AS (C4) fue de 79%. Por lo que la interacción en la muestra C3 fue de un 3% menor que en la muestra C4. (Figuras 8.23 y 8.24, tabla 8.2).

Experimento STD-RMN	%STD
As (C1)	42
As (C4-competencia)	7
3.5 ADIIS (C3)	76
3.5 ADIIS (C4-competencia)	79

Tabla 8.2: %STD seleccionado para L-trp y AS en las muestras: C1, C3 y C4 (competencia).

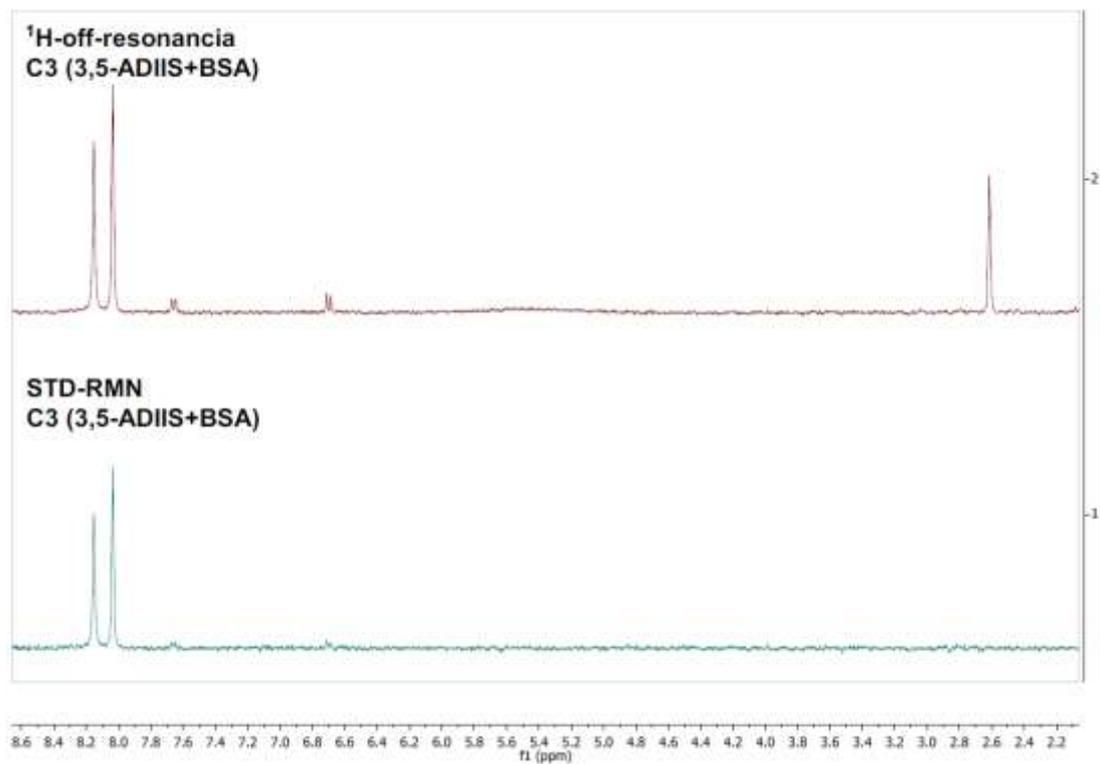


Figura 8.23: Espectros off-resonancia y STD-RMN para la muestra C3 (3.5-ADIIS+BSA)

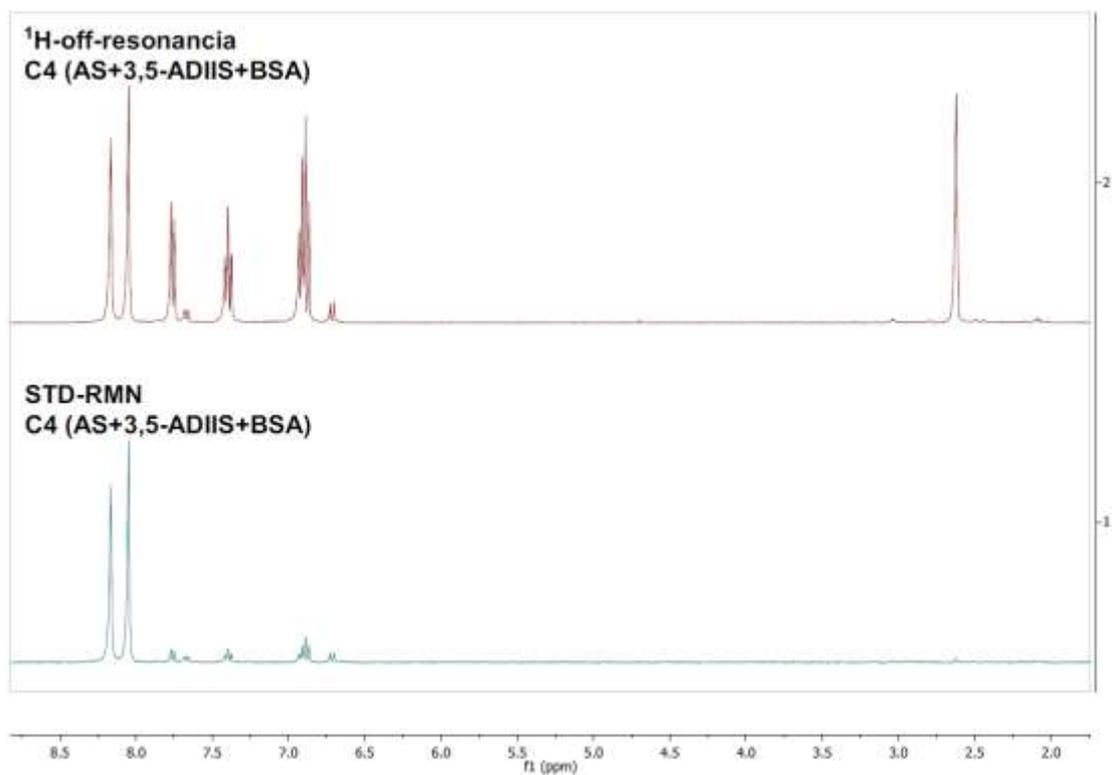


Figura 8.24: Espectros off-resonancia y STD-RMN para la muestra C4 (AS-3.5-ADIIS+BSA)

Esto demuestra que el 3,5-ADIIS y el AS comparten el mismo sitio de unión a la BSA. Donde la BSA presenta una mayor afinidad por el 3,5-ADIIS que por el AS.

### **8.3. Aplicación del experimento STD-RMN a los análogos propuestos**

A partir de la optimización realizada en el experimento de STD-RMN utilizando un modelo sencillo como la BSA, se estaría en condiciones de trasladar estos parámetros a modelos más complejos como la NS5-Mtasa-DEN2.

Los ligandos sintetizados son solubles en solventes polares como D<sub>2</sub>O, MeOD y d<sub>6</sub>-DMSO. Debería determinarse que los compuestos no presenten problemas conformacionales en las condiciones en las que se realizan los experimentos de STD-RMN, debido a que, a diferencia de los experimentos realizados para la asignación estructural, los experimentos de STD-RMN no pueden llevarse a cabo a temperaturas altas debido a la estabilidad de la proteína. De presentar algún inconveniente podría optarse por la realización de los experimentos de STD-RMN a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente.

Como no fue posible producir la enzima de interés en su forma activa, los experimentos de STD-RMN no pudieron realizarse. Considerando las producciones de enzima que no precipitaron, la inactividad de esta frente al kit de actividad comercial puede deberse a un mal plegamiento. La realización de un ensayo de STD-RMN con una proteína mal plegada no produciría datos útiles para el estudio de la interacción proteína-ligando.

Queda como perspectiva a futuro la implementación del estudio de las interacciones proteína-ligando por STD-RMN, con los parámetros optimizados en este trabajo, una vez obtenida la NS5-Mtasa-DEN2.



# Capítulo 8:



## Parte Experimental



A continuación, se presentan las condiciones utilizadas en los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN y STD-RMN, así también como el análisis de los datos obtenidos. Todos los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un equipo de 400Hz Advance-Neo de Bruker con una sonda pabbo.

## 1. Preparación de muestra:

### 1.1- Preparación de las soluciones stock:

Todas las muestras se prepararon a partir de las soluciones stock correspondientes:

- Solución stock de BSA (50M): se disuelven 10.2 mg de BSA en 10mL de Buffer fosfato en  $\text{D}_2\text{O}$  (75mM, pH=7.5).
- Solución stock de L-Trp-DMSO (50mM): se disuelven 49.9 mg de L-trp en 5mL de DMSO.
- Solución stock de L-Trp- $\text{D}_2\text{O}$  (50mM): se disuelven 49.9 mg de L-trp en 5mL de  $\text{D}_2\text{O}$ .
- Solución stock de AS (50mM): se disuelven 6.9 mg de AS en 1 mL de DMSO.
- Solución stock de ADIIS (50mM): se disuelven 19.5 mg de ADIIS en 1 mL de DMSO.

### 1.2- Muestras para la optimización del experimento STD-RMN:

$M_{\text{BSA}}$ : 200 $\mu\text{L}$  de solución stock de BSA, 300 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

M0: 50 $\mu\text{L}$  de solución stock de L-trp-DMSO, 200 $\mu\text{L}$  de solución stock de BSA, 250 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

M1: 50 $\mu\text{L}$  de solución stock de L-trp- $\text{D}_2\text{O}$ , 200 $\mu\text{L}$  de solución stock de BSA, 250 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

M2: 50 $\mu\text{L}$  de solución stock de L-trp, 300 $\mu\text{L}$  de solución stock de BSA, 200 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

M3: 50 $\mu\text{L}$  de solución de L-trp, 400 $\mu\text{L}$  de solución stock de BSA, 200 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

### **1.3-Muestras para la optimización de la concentración de L-trp:**

D1: 10µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 290µL de D<sub>2</sub>O.

D2: 20µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 280µL de D<sub>2</sub>O.

D3: 40µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 260µL de D<sub>2</sub>O.

D4=M1: 50µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 250µL de D<sub>2</sub>O.

D5: 80µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 220µL de D<sub>2</sub>O.

D6: 100µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 200µL de D<sub>2</sub>O.

D7: 140µL de solución stock de L-trp, 200µL de solución stock de BSA, 160µL de D<sub>2</sub>O.

### **1.4- Experimentos de competencia:**

C1: 50µL de solución stock de AS, 200µL de solución stock de BSA, 250µL de D<sub>2</sub>O.

C2: 50µL de solución stock de L-trp, 50µL de solución stock de AS, 200µL de solución stock de BSA, 200µL de D<sub>2</sub>O.

C3: 50µL de solución stock de 3.5-ADIIS, 200µL de solución stock de BSA, 250µL de D<sub>2</sub>O.

C4: 50µL de solución stock de AS, 50µL de solución stock de 3.5-ADIIS, 200µL de solución stock de BSA, 200 µL de D<sub>2</sub>O.

**2. Parámetros en la adquisición de los espectros:**

**2.1 Parámetros para los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN:**

Pulprog	zg30
Número de escaners	64
Dummy scaners	2

**2.2 Parámetros para los experimentos de  $^1\text{H}_{\text{pr}}$ :**

Pulprog	zgpr
Número de escaners	64
Dummy scaners	2

**2.3 Parámetros para los experimentos de  $^1\text{H}_{\text{es}}$ :**

Pulprog	zgesgp
Número de escaners	64
Dummy scaners	4

**2.4 Parámetros para los experimentos de STD-RMN:**

Pulprog	stddiffesgp.3
Número de escaners	64
Dummy scaners	8
D1	1+ D <sub>20</sub>
L4	2
D <sub>20</sub>	0.5s, 0.75s, 1.0s, 1.25s, 1.50s, 2.0s (usado en la optimización), 2.5s, 3s, 4s, 5s.

### **3. Procesamiento de los datos de RMN:**

Se utilizó el programa TopSpin 4.0.9 de Bruker para la visualización de los espectros y el procesamiento de los datos.

### **4. Procesamiento de los espectros:**

Todos los experimentos fueron procesados con el comando efp, sometido a una corrección de fase con el comando apk, y luego al arreglo de la línea de base con el comando abs.

### **5. Cálculo del área absoluta del pico:**

El área absoluta del pico a 7.68 ppm en los espectros de L-trp, se obtuvo con la integración del pico en la región de 7.584 ppm-7.722 ppm del espectro.

El área absoluta del pico a 7.75 ppm en los espectros de AS, se obtuvo con la integración del pico en la región de 7.718 ppm-7.798 ppm del espectro.

El área absoluta del pico a 8.10 ppm en los espectros de 3,5-ADIIS, se obtuvo con la integración del pico en la región de 7.941 ppm-8.255 ppm del espectro.

Para los experimentos de competencia se seleccionó el mismo rango de integración. Esto es posible a que no se presentaron superposiciones de las señales ni de los rangos de integración.

### **6. Cálculo de la relación señal/ruido:**

Para el cálculo de la relación señal/ruido en los espectros de L-Trp se utilizó el pico a 7.68 ppm. La región seleccionada en el cálculo de la señal fue: 7.7256 ppm - 7.6210 ppm. Mientras que la región seleccionada en el cálculo del ruido fue: 7.9047 ppm - 7.8002 ppm.

### **7. Cálculo de %STD de los picos seleccionados en los experimentos de competencia:**

Para determinar las diferencias en el comportamiento de un ligando A al interactuar con la BSA en presencia y ausencia de otro ligando B se calculó el porcentaje del área absoluta de los picos resultantes en el experimento de STD-RMN.

Para esto, se obtuvo el área absoluta de los picos correspondientes en los experimentos: off-resonancia y STD-RMN de la muestra del ligando A con BSA y de la muestra del ligando A + ligando B + BSA.

Se calculó %STD a partir de la Ecuación 8.4 utilizada para el cálculo de la señal de STD en el espectro de STD-RMN. La ecuación 8.4, puede escribirse de la siguiente manera:

$$STD = (I_0 - I_{sat})/I_0 = \frac{\text{área del pico en el espectro STD - RMN}}{\text{área del pico en el espectro off - resonancia}}$$

### Ecuación 8.5

Para el cálculo del %STD, se multiplica el valor de STD obtenido por 100%. El %STD es análogo a asignar el valor del 100% a la integral absoluta del pico seleccionado en el espectro de off-resonancia y calcular a que porcentaje corresponde el valor del área absoluta para el mismo pico en el espectro de STD-RMN.

$$\%STD = \frac{\text{área del pico en el espectro STD - RMN}}{\text{área del pico en el espectro off - resonancia}} \times 100\%$$

### Ecuación 8.6

Para ejemplificar este cálculo, se calcula a continuación el porcentaje para el pico a 7.68ppm del L-trp en la muestra de competencia C2.

Los valores de las áreas absolutas son las siguientes:

- Área del pico a 7.68ppm-espectro off resonancia: 31,906,908.77
- Área del pico a 7.68ppm-espectro STD-RMN: 971,985.16

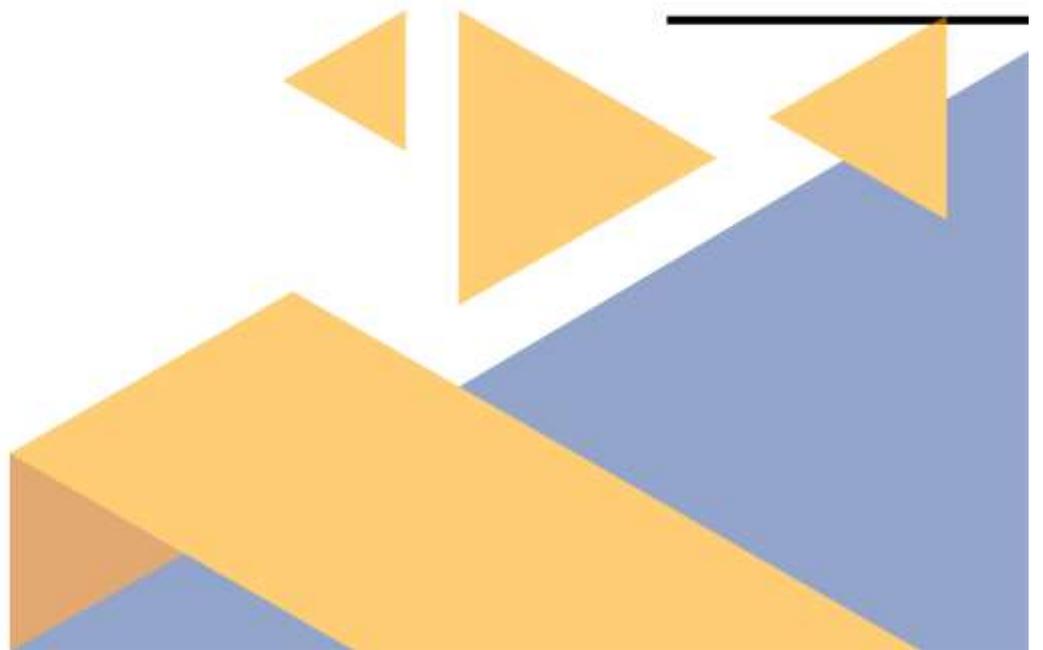
$$\%STD = \frac{971,985.16}{31,906,908.77} \times 100\% = 3.0\%$$

Se decidió utilizar el espectro off-resonancia en vez del <sup>1</sup>Hes ya que el primero es utilizado en el cálculo de la diferencia del espectro de STD-RMN. Por lo cual, se comparan datos obtenidos exactamente en las mismas condiciones.



## **Capítulo 9:**

# **Evaluación biológica de los compuestos sintetizados análogos al SAM y el SFG**



Una vez sintetizados y caracterizados, los compuestos de las series A, B y C fueron evaluados en ensayos *in-vitro* frente a la NS5-Mtasa-Den2 y frente al virus del dengue serotipo 2. Estos ensayos se realizaron a partir de colaboraciones establecidas con diferentes grupos.

### 9.1. Evaluación biológica: ensayo *in-vitro* frente a la NS5-Mtasa-Den2

Los ensayos *in-vitro* frente a la NS5-Mtasa-Den2 fueron realizados por el Dr. Etienne Decroly y la Dra. Priscila Sutto-Ortiz del Laboratorio de Arquitectura y Función de Macromoléculas Biológicas (AFMB) de la CNRS, Aix Marseille Université, Francia.

El ensayo consistió en la detección de la actividad de la metiltransferasa de la enzima NS5-Mtasa-Den2 mediante ensayo de unión al filtro (FBA), donde se detecta la transferencia de metilo tritiado desde  $^3\text{H-SAM}$  al sustrato de ARN.<sup>1</sup>

El ensayo de unión a filtros es un método rápido para el análisis de la unión entre proteína y ácidos nucleicos. Se basa en la utilización de varios filtros donde la muestra es filtrada por una membrana de nitrocelulosa pudiendo retener selectivamente el ARN. Si se incubaba, en nuestro caso, la NS5-Mtasa-Den2 (500 nM) con el  $^3\text{H-SAM}$ , el sustrato 7mGpppAC<sub>4</sub> y el compuesto de interés en las condiciones y el tiempo necesario para que ocurra la metilación del sustrato y luego se filtra por la membrana, se obtendrían los fragmentos de ARN. Estos pueden ser el fragmento 7mGpppAC<sub>4</sub> y/o el fragmento 7mGpppmAC<sub>4</sub>, de ocurrir la reacción de metilación. Cuantificando la concentración de sustrato 7mGpppmAC<sub>4</sub> a partir de un contador de centelleo líquido, se cuantifica la transferencia del grupo metilo tritiado desde el  $^3\text{H-SAM}$  al sustrato 7mGpppAC<sub>4</sub>. A partir de esto, es posible determinar la actividad de NS5-Mtasa-Den2 en esas

---

1 Fiorucci, D.; Meaccini, M.; Poli, G.; Stincarelli, M. A.; Vagaggini, C.; Giannecchini, S.; Sutto-Ortiz, P.; Canard, B.; Decroly, E.; Dreassi, E.; Brai, A.; Botta, M. Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (4), 2437.

condiciones y determinar así la capacidad inhibitoria del compuesto de interés.<sup>2,3</sup>

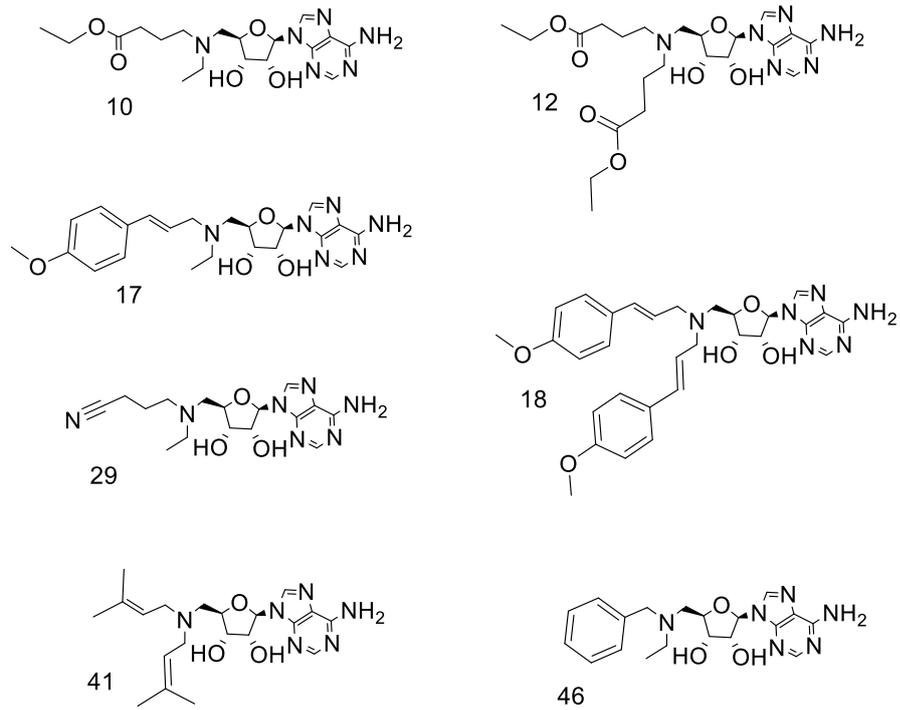
Se evaluaron 20 compuestos pertenecientes a las series A, B y C (Figura 9.1.), los cuales fueron incubados con la NS5-Mtasa-Den2 utilizando dos concentraciones: 50  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , según el protocolo seguido por los colaboradores. Como control positivo de la inhibición de la actividad metiltransferasa se empleó el Sinefungin (SFG) y como controles negativos: 1. El ensayo sin compuesto. 2. El ensayo sin ARN. 3. El ensayo sin enzima y sin ARN. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.1. y el gráfico 9.1.

---

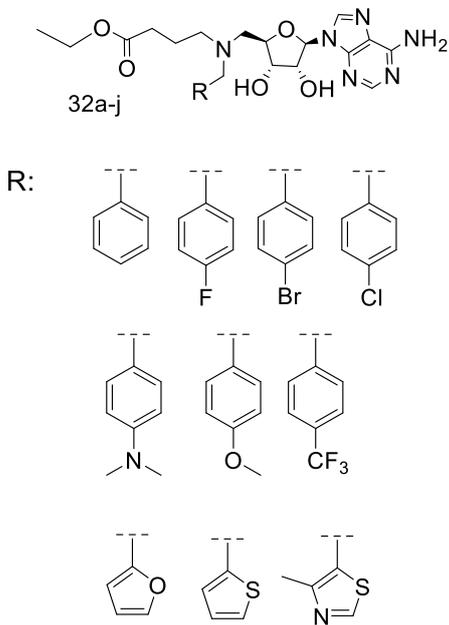
2 Zeng, H.; Xu, W. Enzymatic Assays of Histone Methyltransferase Enzymes. In *Epigenetic Technological Applications*; Elsevier, 2015; pp 333–361.

3 Stockley, P. G. Filter-Binding Assays. In *DNA-Protein Interactions*; Leblanc, B., Moss, T., Eds.; Methods in Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 543, pp 1–14.

SERIE A



SERIE B



SERIE C

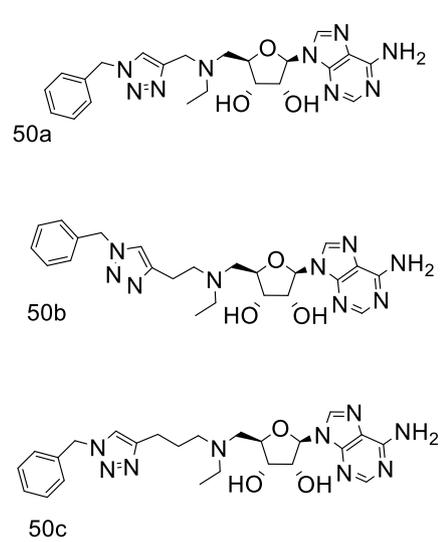
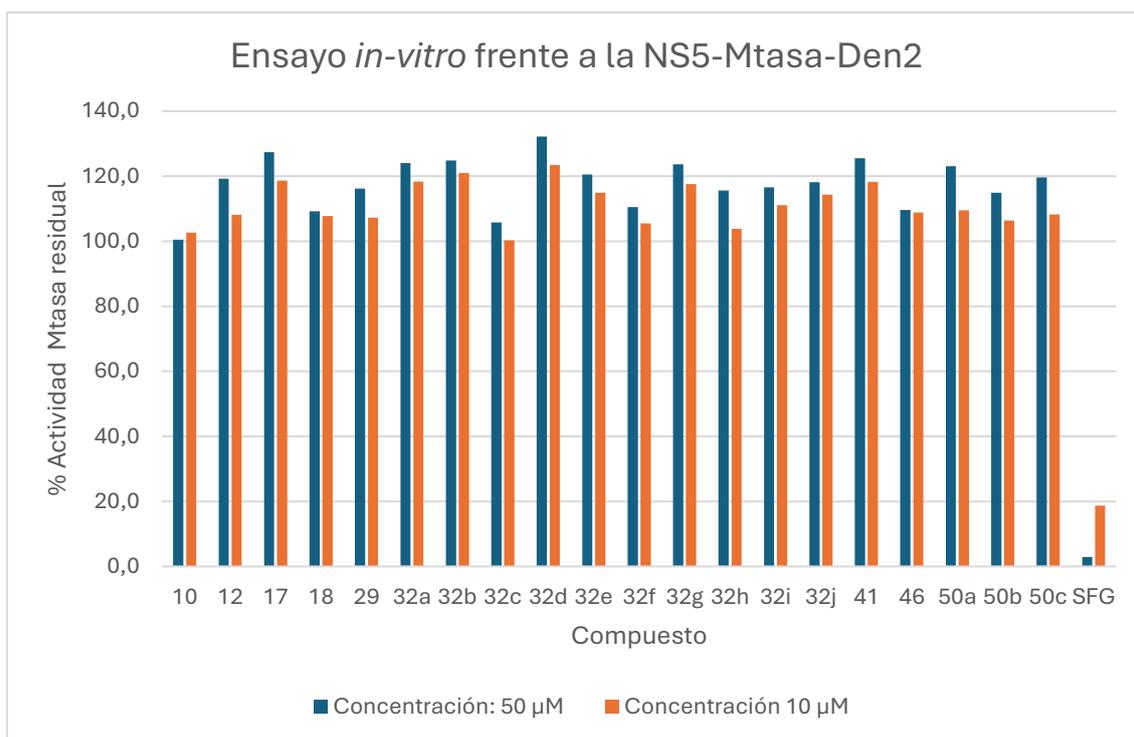


Figura 9.1. Estructura de los compuestos de la serie A, B y C evaluados.

<b>Actividad MTase residual (%)*</b>		
<b>Compuestos</b>	<b>Concentración: 50 µM</b>	<b>Concentración 10 µM</b>
<b>10</b>	100,5	102,6
<b>12</b>	119,2	108,1
<b>17</b>	127,4	118,7
<b>18</b>	109,2	107,8
<b>29</b>	116,2	107,3
<b>32a</b>	124,1	118,3
<b>32b</b>	124,8	121,0
<b>32c</b>	105,7	100,3
<b>32d</b>	132,2	123,4
<b>32e</b>	120,5	114,9
<b>32f</b>	110,5	105,5
<b>32g</b>	123,6	117,6
<b>32h</b>	115,6	103,8
<b>32i</b>	116,6	111,1
<b>32j</b>	118,1	114,3
<b>41</b>	125,5	118,2
<b>46</b>	109,6	108,8
<b>50a</b>	123,1	109,5
<b>50b</b>	115,0	106,4
<b>50c</b>	119,7	108,3
<b>SFG</b>	2,9	18,7

\* Los compuestos fueron testeados una única vez, por lo que no se calculó la desviación estándar.

Tabla 9.1. Resultados obtenidos de los compuestos de las series A, B, C y el control positivo SFG frente a la NS5-Mtasa-Den2 mediante FBA.



Gráfica 9.1. Gráfico de barras de los resultados obtenidos de los compuestos de las series A, B, C y el control positivo SFG frente a la NS5-Mtasa-Den2 mediante FBA.

De los resultados obtenidos se puede observar que ninguno de los compuestos evaluados presentó actividad inhibitoria frente a la NS5-Mtasa-Den2, ya que todos los compuestos presentaron una actividad residual de la enzima igual o superior al 100%. Si bien los valores mayores al 100% se pueden adjudicar al error instrumental del experimento, se sigue una tendencia general donde el valor asociado a la actividad sea mayor a mayor concentración del compuesto. Esto podría determinar una dependencia entre el valor de la actividad obtenido y la concentración del compuesto evaluada, lo que podría generarse debido a una interferencia por parte de estos compuestos. Como perspectiva a futuro, se plantea reevaluar estos compuestos a una menor concentración para determinar que los resultados son adecuados y no debidos a los compuestos evaluados. Por otra parte, se observa que el SFG, inhibidor reportado, disminuyó la actividad metiltransferasa en aproximadamente un 80% a una concentración de 10 µM y de más de un 90% a una concentración de 50 µM.

Con respecto a los compuestos **10**, **12** y **32a-j**, estos fueron diseñados y sintetizados con el objetivo de que los mismos fueran capaces de atravesar la

membrana plasmática de la célula. Por este motivo, se propuso la eliminación del grupo amina de la estructura del SAM y el cambio del grupo carboxílico por un grupo etiléster (Ver capítulo 2). Este grupo sería hidrolizado al ingresar a la célula llegando al blanco de interés como ácido carboxílico, lo que corresponde a los compuestos **9**, **11** y **31a-j**, respectivamente (figura 9.2.).

Al establecer la colaboración con el Dr. Etienne Decroly los compuestos finales ya se encontraban sintetizados y no se habían reservado los precursores correspondientes (compuestos **9**, **11** y **31a-j**). Por lo tanto, se decidió evaluar los compuestos finales **10**, **12** y **32a-j** frente a la NS5-Mtasa-Den2 y como trabajo a futuro, se plantea la evaluación de los compuestos **9**, **11** y **31a-j** frente a la NS5-Mtasa-Den2. Realizando estos nuevos ensayos se podría determinar si es suficiente la presencia del ácido carboxílico en estos análogos al SAM o si la estructura aminoacídica es esencial para la actividad inhibitoria.

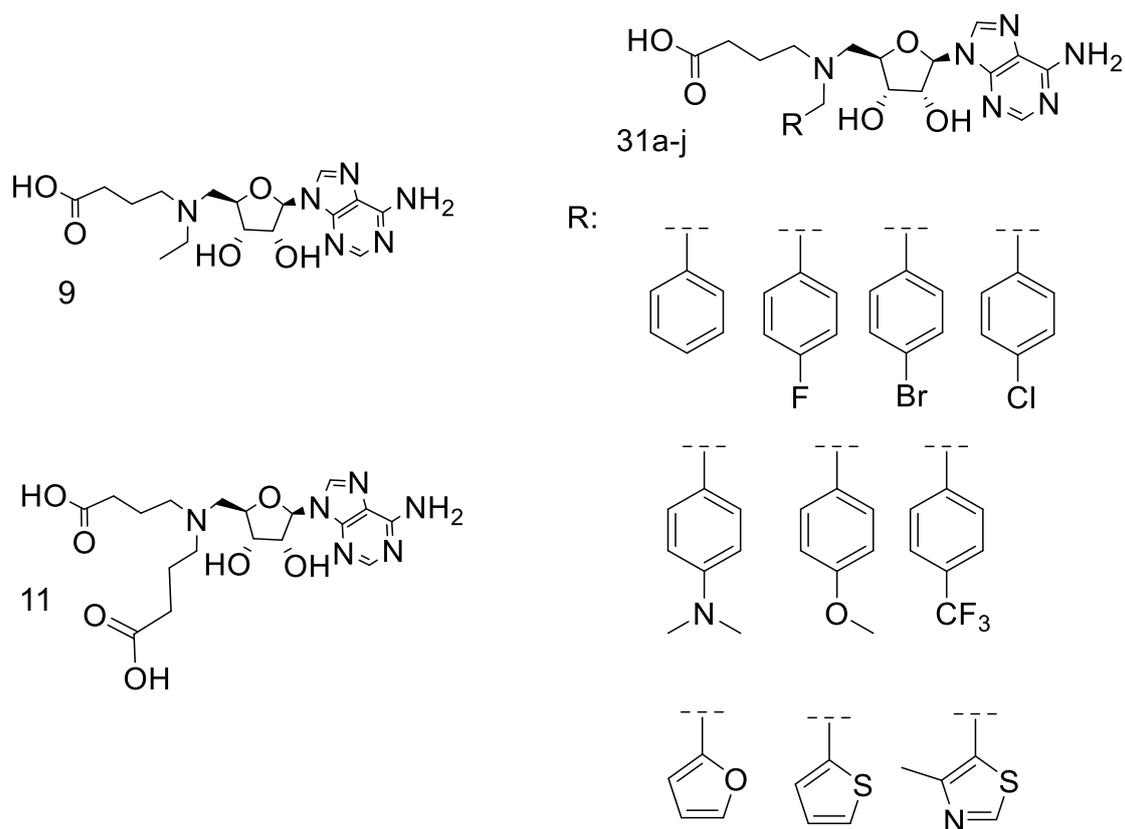


Figura 9.2. Estructura de los compuestos de los compuestos **9**, **11** y **31a-j**.

Con respecto a los compuestos de la serie C, como ya se mencionó en el capítulo 5, no fue posible realizar la hidrogenolisis del bencilo de la estructura del triazol en las condiciones ensayadas. En el capítulo 6, se puede observar cómo estos análogos a diferencia de los compuestos **51a-c** no encastran adecuadamente en el bolsillo de unión del receptor. Además, no contar con el anillo triazol libre imposibilita las posibles interacciones con el receptor. Si bien se planteó una nueva ruta sintética para la obtención de los compuestos de interés **51a-c** (Figura 9.3.), no fue posible sintetizar estos compuestos en el presente trabajo. Como perspectiva a futuro, se plantea la síntesis de los compuestos **50a-c** y su evaluación frente a la NS5-Mtasa-Den2.

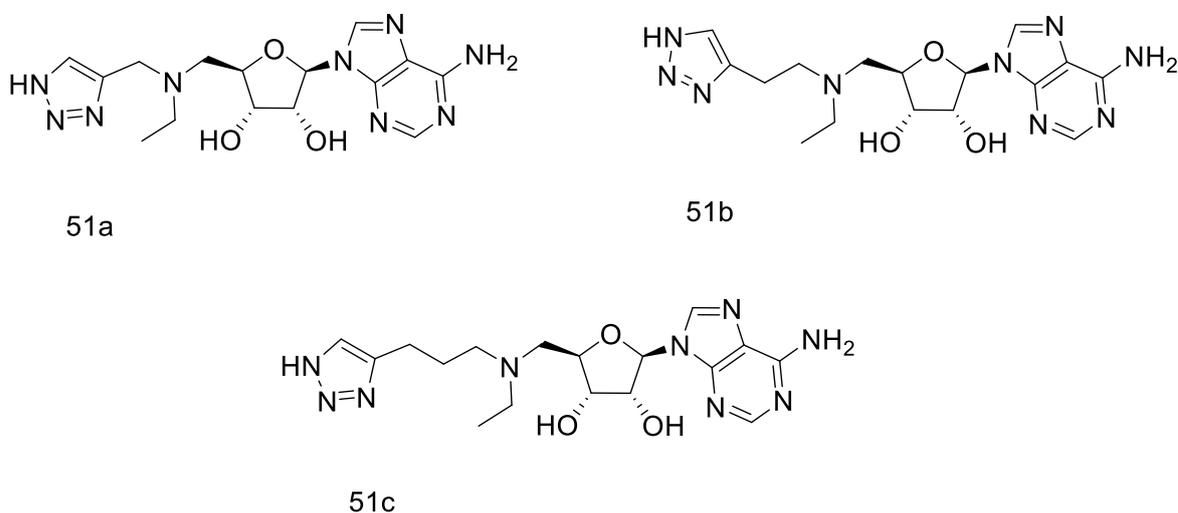


Figura 9.3. Estructuras de los compuestos **51a-j**.

## 9.2. Evaluación biológica: ensayo *in-vitro* frente a células infectadas con el virus del dengue, serotipo 2.

Los ensayos *in-vitro* frente a células infectadas con el virus del dengue serotipo 2 fueron realizados por el grupo de la Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, en particular por la estudiante de doctorado Biol. Eliza Flores De Souza del Instituto René Rachou, Belo Horizonte, Brasil.

El ensayo constó de dos instancias: la primera instancia fue la determinación de la citotoxicidad de los compuestos a partir de la concentración citotóxica media máxima (CC50) y la segunda instancia fue un testeo inicial de la actividad antiviral de los compuestos. El cálculo de la concentración efectiva media máxima (EC50) se realizó para aquellas muestras que presentaron actividad contra el virus del dengue en el testeo inicial.<sup>4</sup>

Para este ensayo se emplearon células Vero (ATCC #CCL-81) y el Interferon- $\alpha$  2B C6/36 (ATCC #CRL-1660) como control positivo antiviral.

### 9.2.1. Determinación de la citotoxicidad celular, determinación del CC50

El CC50 de los compuestos fue calculado como la concentración en la que el 50% de las células se encontraban viables, en comparación con las células control no tratadas. La viabilidad celular se observó por microscopía óptica y fue medido por el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

El método MTT es un ensayo colorimétrico en el que se mide la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es de color amarillo a formazán de color azul e insoluble. Las células son incubadas con MTT, luego se agrega un detergente para lograr la lisis celular para posteriormente descartar el medio. El formazán formado se disuelve con el agregado de un solvente orgánico, por ejemplo, DMSO y se mide la absorbancia

---

4 De Castro Barbosa, E.; Alves, T. M. A.; Kohlhoff, M.; Jangola, S. T. G.; Pires, D. E. V.; Figueiredo, A. C. C.; Alves, É. A. R.; Calzavara-Silva, C. E.; Sobral, M.; Kroon, E. G.; Rosa, L. H.; Zani, C. L.; De Oliveira, J. G. *Virolog. J.* **2022**, *19* (1), 31.

a 570 nm. Ya que esta reacción es llevada a cabo por deshidrogenasas presentes en la mitocondria celular, cuando la célula muere pierde la capacidad de reducir el MTT a formazán. Por lo cual, la cantidad de color azul producido es directamente proporcional a la cantidad de mitocondrias funcionales y por lo tanto a la viabilidad celular. Este método es un método cuantitativo utilizado ampliamente en el estudio de proliferación celular y citotoxicidad ya que presenta una relación lineal entre la actividad celular y la absorbancia medida. Sin embargo, este ensayo presenta varias limitaciones, entre estas se encuentra el hecho de que al ser un ensayo que monitorea la actividad mitocondrial de la célula, el metabolismo celular se presenta como un factor importante a tener en cuenta ya que se puede interpretar erróneamente un resultado al no contemplar este factor. Adicionalmente, al ser un ensayo colorimétrico en el que se monitorea la formación de formazán por absorbancia, pueden existir compuestos que interfieran con esta medida. generando falsos positivos. Ambas limitantes se pueden subsanar agregando los controles apropiados al ensayo. Adicionalmente, se debe de evitar agentes reductores, como por ejemplo el DTT, que pueden llevar a la reducción del MTT al formazán de forma no enzimática.<sup>5,6</sup>

## 9.2.2. Evaluación de la actividad antiviral en Den2

### 9.2.2.1. Testeo inicial de la actividad antiviral

El testeo inicial de actividad antiviral se determinó en base a la reducción del efecto citopático (CPE) por microscopía óptica y fue medido a través del método MTT descrito anteriormente.

El efecto citopático (CPE) es el daño celular que se presenta a causa de la replicación viral en células infectadas. Este daño celular se observa como

---

5 Gutiérrez, L.; Stepien, G.; Gutiérrez, L.; Pérez-Hernández, M.; Pardo, J.; Pardo, J.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. Nanotechnology in Drug Discovery and Development. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Elsevier, 2017; pp 264–295.

6 Selvakumaran, J.; Jell, G. A Guide to Basic Cell Culture and Applications in Biomaterials and Tissue Engineering. In *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*; Elsevier, 2005; pp 215–226.

cambios morfológicos apreciables en un microscopio óptico. Este efecto es utilizado para el estudio de la actividad antiviral, donde se busca que el compuesto con actividad antiviral proteja a las células del daño (se incuba primero el compuesto con la célula antes de la infección) o que disminuya el efecto citopático existente debido a la infección (se agrega el compuesto una vez que las células se encuentran infectadas con el virus de interés).

Básicamente se infectan las células con el virus de interés (antes o después de tratar a las células con el compuesto a evaluar) y después de un determinado tiempo de incubación se mide la viabilidad de las células y se compara con un control de células no infectadas. Si el compuesto de interés logra proteger a las células de la infección o disminuir el efecto citopático generado por el virus, respectivamente, se considera que el compuesto presenta actividad antiviral frente al virus seleccionado. Generalmente, se espera que el compuesto de interés sea capaz de proteger o reducir aproximadamente un 50% del CPE viral.<sup>4,7</sup>

#### 9.2.2.2. Determinación del EC50

Si el compuesto presentó actividad antiviral en el testeo inicial, se calcula el valor de EC50, como la concentración a la cual el 50% de las células son viables en comparación con el control de células no infectadas.

---

7 Fenner, F.; Bachmann, P. A.; Gibbs, E. P. J.; Murphy, F. A.; Studdert, M. J.; White, D. O. Cultivation and Assay of Viruses. In *Veterinary Virology*; Elsevier, 1987; pp 39–53.

### 9.2.3. Resultados obtenidos

En la tabla 9.2. se presentan los resultados obtenidos para cinco de los compuestos de interés (**10, 12, 17, 18, 46**). Actualmente los demás compuestos se encuentran en evaluación. En la figura 9.1. se muestran las estructuras de estos compuestos.

	Compuesto	CC50 (Vero)	Teste inicial de la actividad antiviral	EC50 (Den2)
<b>SERIE A</b>	<b>10</b>	> 1000 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>12</b>	> 1000 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>17</b>	> 500 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>18</b>	17 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>29</b>	89 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>41</b>	106 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>46</b>	487 $\mu$ M	No activo	ND
<b>SERIE B</b>	<b>32a</b>	151 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32b</b>	110 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32c</b>	95 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32d</b>	105 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32e</b>	227 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32f</b>	145 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32g</b>	92 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32h</b>	150 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32i</b>	122 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>32j</b>	120 $\mu$ M	No activo	ND

<b>SERIE C</b>	<b>50a</b>	100 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>50b</b>	167 $\mu$ M	No activo	ND
	<b>50c</b>	157 $\mu$ M	No activo	ND
ND: No Determinada				

Tabla 9.2: Evaluación *in-vitro* de las series A, B y C.

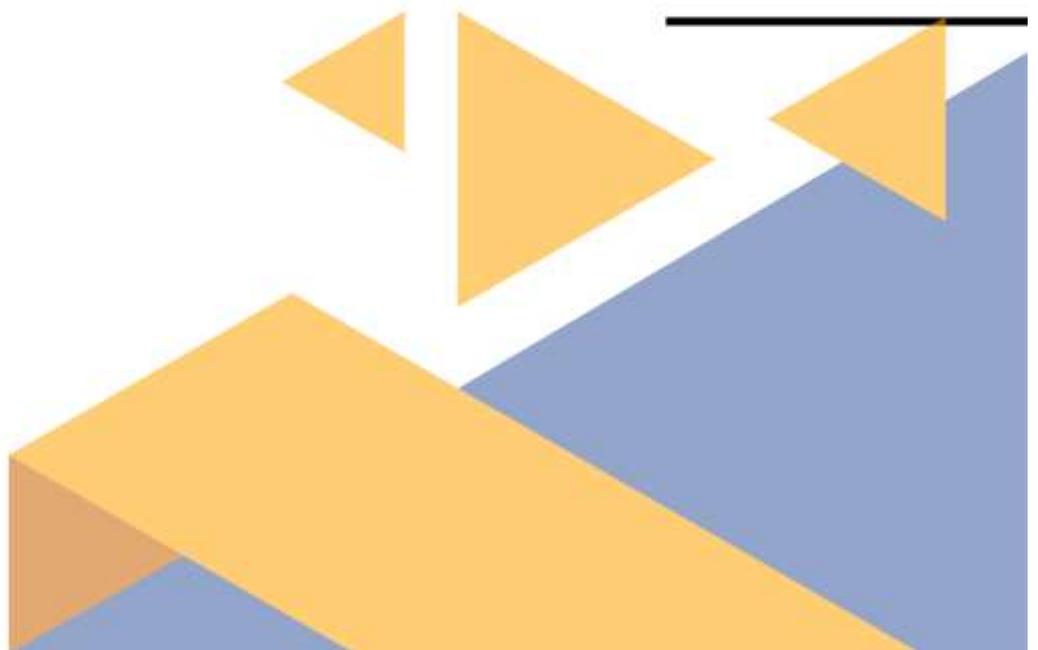
De los compuestos evaluados, se determinó que el compuesto **18** se presenta citotóxico a nivel celular, presentando un valor de CC50 de 17  $\mu$ M. Con respecto a la actividad de los compuestos, estos no presentaron actividad antiviral frente al virus del dengue, serotipo 2 en el testeo inicial.



# Capítulo 9:



## Parte Experimental



## **Protocolo del ensayo de actividad *in-vitro* frente la NS5-Mtasa-Den2, suministrado por la Dra. Priscila Sutto-Ortiz. (Traducción)**

La transferencia del grupo metilo tritiado desde [<sup>3</sup>H]SAM al sustrato de ARN fue monitoreada mediante un ensayo de unión a filtro (filter-binding assay), realizado según el método descrito previamente (PMID: 26549102). El dominio metiltransferasa recombinante de la proteína no estructural NS5 del serotipo 2 del virus del dengue (NS5MTaseDV2), correspondiente a los residuos 1–296 de NS5, fue expresado y purificado como se describió anteriormente (PMID: 12032088).

El ensayo FBA se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía [40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 2 μM SAM y 0.1 μM <sup>3</sup>H-SAM (Perkin Elmer)] en presencia de 0.7 μM de ARN sintético 7mGpppAC<sub>4</sub> y 500 nM de la proteína NS5MTaseDV2. La enzima se mezcló primero con los compuestos suspendidos en DMSO (o en agua, en el caso de Sinefungin) antes de añadir el sustrato de ARN y el SAM, y luego se incubó a 30 °C. Las mezclas de reacción se detuvieron después de 30 minutos mediante una dilución 10 veces en agua fría.

Las muestras se transfirieron a filtros de dietilaminoetilo (DEAE, Perkin Elmer) utilizando un recolector de filtros (Filtermat Harvester, Packard Instruments). Las membranas que retenían el ARN se lavaron dos veces con formiato de amonio 10 mM pH 8.0, dos veces con agua y una vez con etanol antes de ser secadas. Posteriormente, se empaparon con líquido de centelleo (Perkin Elmer), y la transferencia de <sup>3</sup>H-metilo a los sustratos de ARN se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Wallac MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). La actividad relativa se determinó estableciendo la actividad enzimática en ausencia del compuesto como el 100%.

## **Protocolo del ensayo de actividad *in-vitro* frente a células infectadas con el virus del dengue, serotipo 2, Dra. Jaquelline Germano de Oliveira (Traducción)**

### Evaluación de la actividad antiviral mediante la reducción del efecto citopático y el método MTT

Se evaluaron los compuestos para determinar su citotoxicidad y actividad antiviral contra el DENV en células Vero, en placas de cultivo de 96 pocillos, observando la reducción del efecto citopático viral (CPE, por sus siglas en inglés) y luego midiendo mediante el método MTT. Los compuestos se disolvieron en DMSO, y su concentración se normalizó a 50 µg/ml con medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2%. Posteriormente, se sembraron  $1 \times 10^4$  células Vero por pocillo en una placa de 96 pocillos e incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La solución del compuesto y la suspensión viral, a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 2, se añadieron simultáneamente sobre monocapas confluentes al 70%. Cada compuesto se evaluó por duplicado.

Se incluyeron controles de células infectadas no tratadas y células no infectadas no tratadas, incubadas con o sin DMSO. El interferón- $\alpha$  2B, en concentraciones de 500 y 1000 UI/mL, se utilizó como control antiviral positivo en todos los ensayos. Después de tres días post-infección (p.i.) con DENV-2, la reducción del CPE viral se verificó por microscopía óptica usando un sistema de puntuación según lo descrito por Kudi y Myint (1999) y mediante el método MTT. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y se añadieron 30 µL de una solución stock de MTT (2 mg/ml) disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada pocillo. Tras 90 minutos de incubación a 37 °C, se añadieron 130 µL de DMSO a cada pocillo y las placas se homogeneizaron durante 5 minutos a 500 rpm. Los valores de absorbancia de cada reacción se midieron en un lector ELISA (Spectra Max, Molecular Devices, EE.UU.) a  $\lambda_{540}$  nm. Se consideraron activos aquellos compuesto que mostraron al menos un 50% de protección o una reducción del CPE viral de al menos el 50%. Los

experimentos de citotoxicidad (CC50) y de actividad antiviral contra DENV-2 (CE50) se realizaron por duplicado y se repitieron al menos tres veces.

#### Determinación de CC50

La concentración citotóxica media (CC50) se calculó como la concentración del compuesto a la cual solo el 50% de las células permanecen vivas, en comparación con los controles de células no tratadas. Los compuestos seleccionados que dieron resultados positivos frente al DENV-2 en la etapa de cribado tuvieron su CC50 determinada utilizando una gama de 8 concentraciones en placas de microtitulación de 96 pocillos con monocapas de células Vero.

La viabilidad celular se observó por microscopía óptica y se midió mediante el método MTT como se describió previamente. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos tres veces.

#### Determinación de EC50

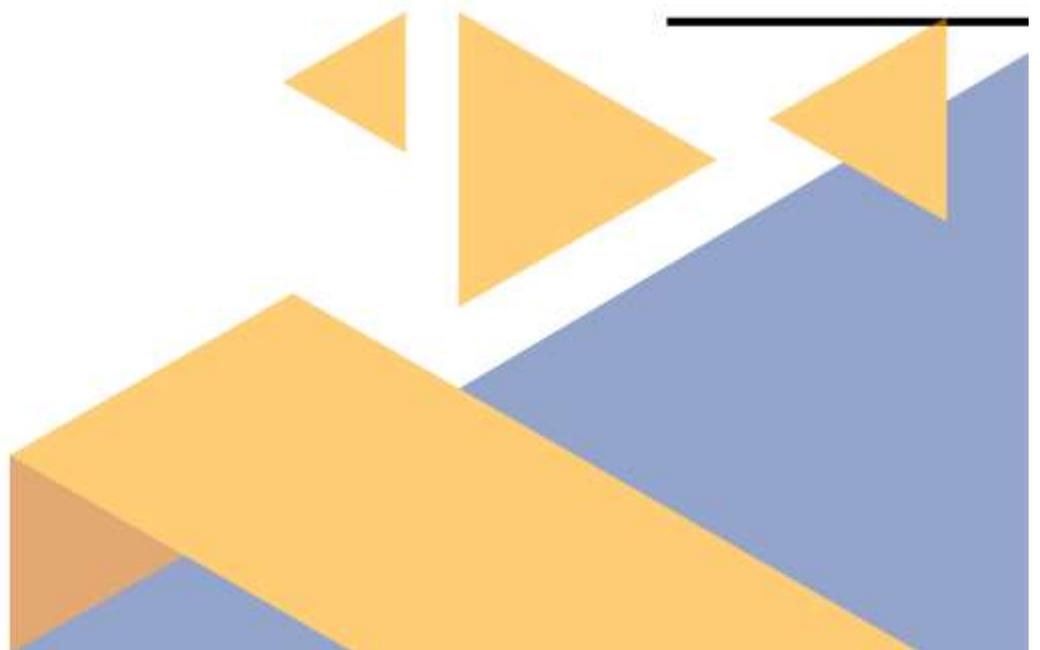
El efecto citopático viral y la viabilidad celular se observaron por microscopía óptica y se midieron mediante el método MTT como se describió anteriormente. La concentración efectiva media (EC50) se calculó como la concentración del compuesto a la cual el 50% de las células permanecen vivas, en comparación con los controles de células no infectadas. Los compuestos que mostraron actividad antiviral contra DENV-2 en la etapa de cribado tuvieron su EC50 determinada usando una gama de 8 concentraciones en placas de microtitulación de 96 pocillos con monocapas de células Vero.

Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos tres veces.



## **Capítulo 10:**

# **Conclusiones y Perspectivas**



Como objetivo general del presente trabajo planteamos el desarrollo y optimización del diseño racional de inhibidores de la NS5-Mtasa-Den2, con el fin de obtener una estructura líder con actividad antiviral. Se realizó la propuesta racional de los análogos al SAM y SFG como análogos estructurales a partir del estudio detallado del bolsillo de la NS5-Mtasa-Den2. Para lo cual, se desarrollaron y optimizaron las rutas sintéticas pertinentes para la síntesis total de tres series de compuestos (Serie A, B y C, ver figura 10.1). Se sintetizaron en total 20 compuestos finales, los cuales fueron caracterizados por espectroscopia de RMN y HMRS. Su pureza fue determinada por HPLC a 220 nm y 250 nm.

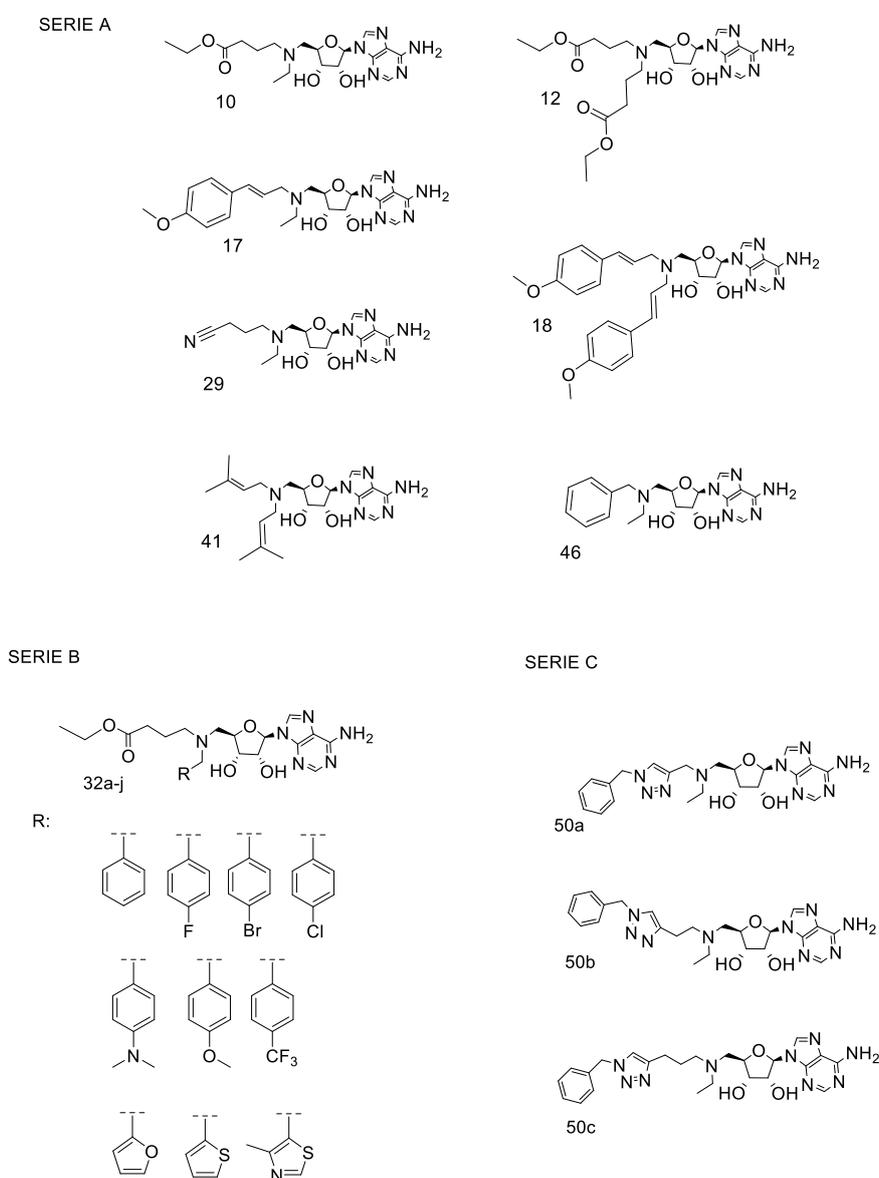


Figura 10.1: Estructuras de los compuestos sintetizados.

De la serie C de compuestos, no fue posible la síntesis de los compuestos finales 51a-c, por lo que, se plantea una ruta alternativa para la síntesis de estos compuestos donde primero se realizaría la eliminación del grupo bencilo del triazol antes de la desprotección del diol (ver figura 10.2). Adicionalmente como perspectiva a futuro se plantea la optimización de la obtención y purificación del compuesto **49c**, ya que presentó muy bajo rendimiento.

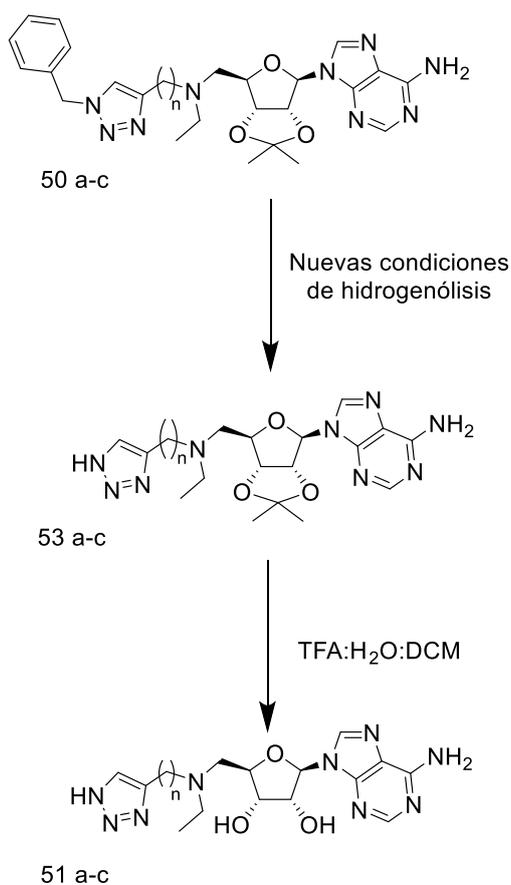


Figura 10.2: Ruta sintética propuesta para la obtención de los compuestos **51a-c**

Los compuestos sintetizados de las series A, B y C fueron evaluados en dos ensayos de actividad biológica. Uno de estos fue un ensayo *in-vitro* frente a la NS5-Mtasa-Den2, donde los compuestos no presentaron actividad inhibitoria. Sin embargo, estos datos nos permitieron proponer pequeñas variaciones en los compuestos ensayados con el fin de sintetizar estos y evaluarlos. El otro ensayo *in-vitro* fue realizado frente a células infectadas con el virus del dengue, serotipo 2, donde el compuesto **18** se presentó citotóxico frente a células Vero con un CC50 de 17  $\mu$ M. Con respecto a la actividad antiviral frente al virus del dengue serotipo 2, los compuestos resultaron inactivos. La obtención de estos resultados nos permite proponer futuros cambios en los compuestos evaluados a nivel estructural y poder así proponer una nueva serie de compuestos.

Se realizaron grandes avances en el modelo computacional, en el cual se puso a punto el modelo de docking realizando la validación de este modelo a partir de re-docking y docking cruzado. Sin embargo, no fue posible el estudio del poder predictivo del mismo. Se presume que los compuestos seleccionados para el estudio del poder predictivo no fueron adecuados para nuestro modelo. Se decidió entonces, utilizar los datos de los ensayos biológicos obtenidos para la enzima de interés NS5-Mtasa-Den2 de los análogos sintetizados, para el estudio del poder predictivo del modelo. Al momento de obtener los resultados de actividad biológica y determinar que los compuestos evaluados no presentaron actividad inhibitoria frente a la NS5-Mtasa-Den2, estos no podrán ser utilizados en el estudio del poder predictivo del sistema ya que no se cuenta con valores positivos de actividad. Sin embargo, las colaboraciones establecidas para la evaluación de los compuestos frente a la NS5-Mtasa-Den2 y el virus del dengue, nos permiten continuar con el testeo de otros análogos permitiendo a futuro continuar con el desarrollo del modelo computacional con el fin de obtener los datos necesarios para la optimización de nuestro diseño racional.

Adicionalmente, se plantea evaluar la permeabilidad celular de los compuestos finales, tanto los sintetizados como los planteados a futuro, en un ensayo *in-silico* apropiado para este fin.

En cuanto a los estudios de interacción proteína-ligando, se seleccionó la técnica de STD-RMN para dicho estudio, donde aplicando un modelo sencillo, se realizaron las optimizaciones necesarias para la utilización del mismo. Se estudió la forma de adquirir el espectro de STD-RMN, la influencia en los cambios de la concentración de proteína y ligando y como éstos influyeron en los espectros obtenidos. No se pudo realizar el estudio de la interacción proteína-ligando en el sistema NS5-Mtasa-Den2 y los análogos al SAM y SFG sintetizados debido a que no obtuvimos la proteína de interés de forma activa. Como perspectiva a futuro se plantea continuar con distintos ensayos para la producción de la NS5-Mtasa-Den2 empleando distintas condiciones tanto en la lisis como en la posterior purificación. Se plantean las siguientes pruebas donde se podrían ensayar: (i) disminuir la concentración del buffer Tris-HCl de 50mM a 20mM o a una concentración menor; (ii) utilizar otro buffer que sea más compatible con la producción y purificación enzimática de interés; (iii) evaluar el uso de otro agente reductor al DTT. Adicionalmente, a partir de la colaboración con el Dr. Etienne Decroly y la Dra. Priscila Sutto-Ortiz, quienes producen la NS5-Mtasa-Den2, sería posible obtener asistencia en la producción enzimática, con el fin de obtener la enzima NS5-Mtasa-Den2 en su forma activa y poder continuar con el estudio de las interacciones proteína-ligando por STD-RMN, con los parámetros ya optimizados en este trabajo.

Se concluye que se realizaron grandes avances en el desarrollo del diseño racional planteado inicialmente para el desarrollo de inhibidores de la NS5-Mtasa-Den2. El desarrollo y aplicación de técnicas utilizadas en el diseño racional de compuestos con actividad antiviral nos permiten entender como los ligandos se posicionan en el sitio de unión y qué interacciones ocurren entre el ligando y el receptor. Esto sumado a los datos de actividad biológica promueven la propuesta de nuevos análogos guiando racionalmente la búsqueda hacia un compuesto líder con actividad antiviral. En nuestro caso, a partir de la puesta a punto del diseño racional para la búsqueda de análogos al SAM y SFG con actividad antiviral frente al virus del dengue del serotipo 2, logramos la síntesis total de 20 análogos estructurales al SAM y SFG. Si bien estos no presentaron actividad antiviral frente al virus del dengue serotipo 2 y no fueron capaces de

inhibir la enzima de interés, este fue el primer paso para el desarrollo de nuestro diseño racional enfocado en 4 herramientas principales. Logramos así diseñar y optimizar las rutas sintéticas necesarias para la obtención de estos compuestos finales, lo que facilitará la propuesta y síntesis de nuevos compuestos análogos para continuar con la búsqueda de un compuesto antiviral adecuado.

Así mismo, la implementación y optimización de los estudios de STD-RMN en el laboratorio de RMN de la Facultad de Química es un desarrollo novedoso ya que es la primera vez que se realizan este tipo de experimentos en el país. Esto permitirá a futuro utilizar esta técnica para el estudio de interacciones proteína-ligando en este y otros sistemas de interés. La aplicación de esta técnica a otros sistemas proteína-ligando permitiría establecer futuras colaboraciones y ampliar el conocimiento sobre distintos sistemas proteína-ligando.

Es importante resaltar que las colaboraciones establecidas a lo largo del presente trabajo de tesis permitieron abarcar varias disciplinas para ser incluidas en el diseño racional. Estas colaboraciones junto al trabajo realizado sentaron las bases del diseño racional para futuros estudios de este tipo de inhibidores por las técnicas empleadas, lo que adicionalmente puede aplicarse a otros flavivirus, así como a otros sistemas de interés.

