



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
PROFÁRMACOS DE
NUCLEÓSIDOS DIFOSFATO
Y NUCLEÓSIDOS TRIFOSFATO**

Autor: María Cabañas Agudo.

Fecha: Julio 2019.

Tutor: Prof. Mónica María Söllhuber Kretzer.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
GLICERIDOS DE NDP Y NTP	9
NDP Y NTP ACILADOS	9
DIESTER DE PARA-METOXIBENCILO DE DNP	10
ESTRATEGIAS DE DISEÑO DiPPro	10
ESTRATEGIAS DE DISEÑO TriPPPPro	15
CONCLUSIÓN	18
BIBLIOGRAFIA	19

RESUMEN

Los análogos de nucleósidos, diseñados para imitar los nucleósidos naturales, son importantes agentes quimioterápicos antivirales y anticancerígenos. Sin embargo, estos nucleósidos no son activos como tales y deben metabolizarse a sus correspondientes nucleósidos trifosfato (NTP). Esto está mediado por enzimas de fosforilación, principalmente quinasas con una fuerte especificidad por sus sustratos; en muchos casos, esta especificidad impide la conversión eficiente en los NTP. Para superar esta limitación se han diseñado profármacos de nucleósidos monofosfato (NMP) que han encontrado buena aplicación terapéutica. Aunque existen estos profármacos de nucleósido monofosfato, en muchos casos no son suficientes, ya que el paso limitante de la bioactivación puede ser el paso a difosfato o trifosfato. Por ello es interesante disponer también de profármacos de nucleósidos di y tri fosfato. La menor estabilidad de estos compuestos es la causa de que no han sido muy estudiados en la literatura científica. Se hace referencia aquí a los últimos avances en este campo, en el que a pesar de su complejidad se han logrado los primeros profármacos de nucleósido difosfato DiPPro y de nucleósido trifosfato TriPPPro con resultados prometedores.

Palabras clave: nucleoside triphosphate prodrugs.

ABSTRACT

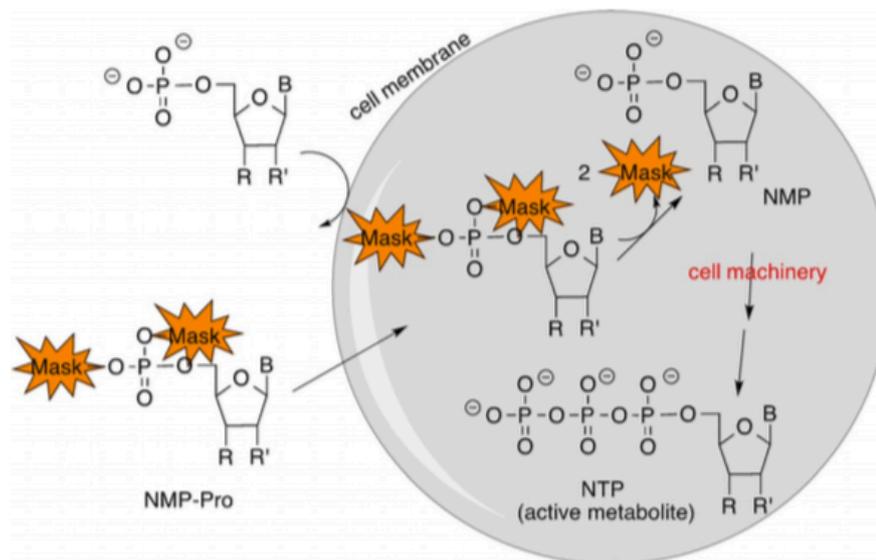
Nucleoside analogs, designed to mimic natural nucleosides, are important antiviral and anticancer chemotherapeutic agents. However, these nucleosides are not active as such and must be metabolized to their corresponding nucleoside triphosphates (NTP). This is mediated by phosphorylation enzymes, mainly kinases with a strong specificity for their substrates; in many cases, this specificity prevents efficient conversion to NTP. To overcome this limitation, prodrugs of nucleoside monophosphate (NMP) with good therapeutic applications have been designed. Although these prodrugs of nucleoside monophosphate are available, in many cases they are not sufficient, since the limiting step of bioactivation may also be the conversion into diphosphate or triphosphate. For this reason it is interesting to have prodrugs of nucleoside di and tri-phosphate as well. The lower stability of these compounds is the reason why they have not been yet studied. Reference is made here to the latest advances in this field, in which, despite of their complexity, the first prodrugs of DiPPro nucleoside diphosphate and of TriPPPro nucleoside triphosphate have been studied with promising results.

INTRODUCCIÓN

Los nucleósidos naturales son los componentes de los ácidos nucleicos, y son por tanto esenciales para la síntesis de ARN y ADN. Los nucleósidos intervienen adicionalmente en muchos otros procesos biológicos. Sus análogos sintéticos, son una parte importante del arsenal de los agentes antivirales y anticancerígenos. Son componentes clave en la combinación de fármacos que se usa actualmente (TARGA) para el tratamiento de personas infectadas por el VIH, así como para el tratamiento de muchas otras enfermedades virales entre las que se pueden destacar las hepatitis B y C. Así mismo juegan un papel muy

importante en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Los análogos de nucleósidos tienen generalmente el objetivo de inhibir las ADN o ARN polimerasas. Cuando se incorporan a la cadena pueden causar una terminación del proceso de elongación o causar variaciones en el ADN o ARN correspondiente entre muchos otros procesos. En términos generales están diseñados para imitar los nucleósidos naturales. (1)(2)(3)

Sin embargo, estos nucleósidos no son activos como tales; son profármacos que deben biotransformarse a través de sus nucleósidos monofosfato (NMP) y nucleósidos difosfato (NDP) en sus correspondientes nucleósidos trifosfato (NTP), responsables de la interacción con la diana biológica. Esta bioactivación está mediada por enzimas de fosforilación, principalmente por quinasas celulares o virales con una fuerte especificidad por sus sustratos. (3)



Esquema 1: Captación celular de profármacos de nucleósidos monofosfato y formación del metabolito activo. (3)

Por otro lado, los NMP, NDP o NTP a diferencia de los nucleósidos que aprovechan mecanismos de transporte selectivos, muestran una permeabilidad celular muy pobre, ya que son demasiado polares para cruzar la membrana celular, impidiendo así su uso como fármacos. Adicionalmente presentan poca estabilidad dentro del organismo al ser hidrolizadas por las fosfatasas. (3)

Aunque los nucleósidos y sus análogos son capaces de atravesar la membrana celular por acción de transportadores selectivos, es necesario que una vez en el interior de la célula se lleve a cabo su fosforilación progresiva siendo esta en muchos casos una reacción muy lenta. Así, por ejemplo, es muy común que la primera fosforilación sea el paso limitante para que el fármaco logre tener una acción antiviral o anticancerígena eficaz. Por ello se llevó a cabo el diseño de nucleósidos monofosforilados, en los cuales el problema de la primera fosforilación estaría solventado, pero que, como se ha indicado anteriormente, no van a ser capaces de penetrar en el interior celular y adicionalmente van a tener poca estabilidad in vivo por ser hidrolizados por fosfatasas (esquema 1). (4)

Para superar estas desventajas se han buscado profármacos de NMP que (i) sean resistentes a la degradación por las fosfatasa, (ii) sean capaces de penetrar a través de la membrana celular y (iii) sean transformados fácilmente en sus correspondientes derivados trifosforilados en el interior de la célula. (5) Una alternativa para mejorar la estabilidad de los nucleósidos monofosfato fue diseñar fosfonatos, que serían estables a la hidrólisis por fosfatasa. (4) Pero tanto los nucleósidos monofosfato como los derivados fosfonato continúan presentando el problema del paso de estos compuestos a través de las diferentes membranas del organismo, incluida la membrana de la célula diana. Ello ha llevado al diseño de un gran número de profármacos de NMP en los que se ha enmascarado el grupo fosfato a fin de evitar su ionización y disminuir su hidrofiliya y favorecer de esta forma una difusión pasiva a través de las membranas celulares.

Entre las múltiples alternativas de diseño de profármacos de NMP que se han estudiado y que están recogidas detalladamente en la literatura científica (4,6,7) son de destacar los ésteres de tipo carboniloximetilo que incluyen los bis(pivaloiloximetil)-ésteres (POM) y los bis(isopropiloximetilcarbonil)-ésteres (POC), los ProTide (o ariloxifosfor(n)amidatos), los alcoxilquill-monoesteres de Hostetler y los HepDirect como derivados más representativos.

Estos esfuerzos han dado lugar a diversos análogos utilizados en clínica como son, tenofovir disoproxil fumarato, adefovir dipivoxilo, sofosbuvir ó tenofovir alafenamida. En la actualidad los dos últimos son los fármacos más utilizados para tratar pacientes con VHC y VIH, respectivamente. La aprobación de sofosbuvir ha dado un nuevo impulso a la estrategia de emplear profármacos de nucleósidos y está ayudando en el descubrimiento de nuevas terapias con nucleótidos (figura 1). (4)

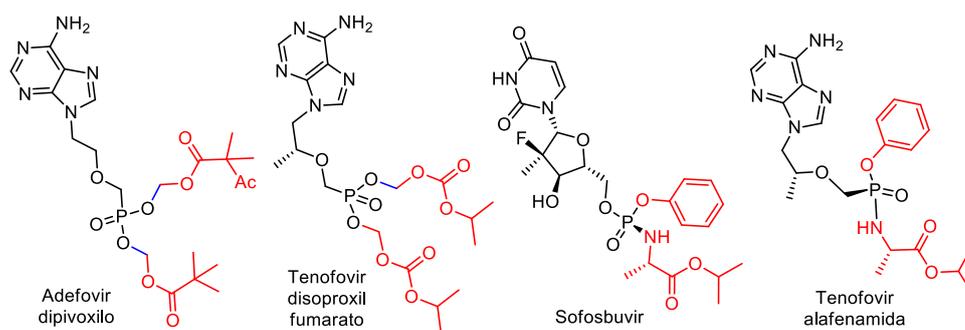
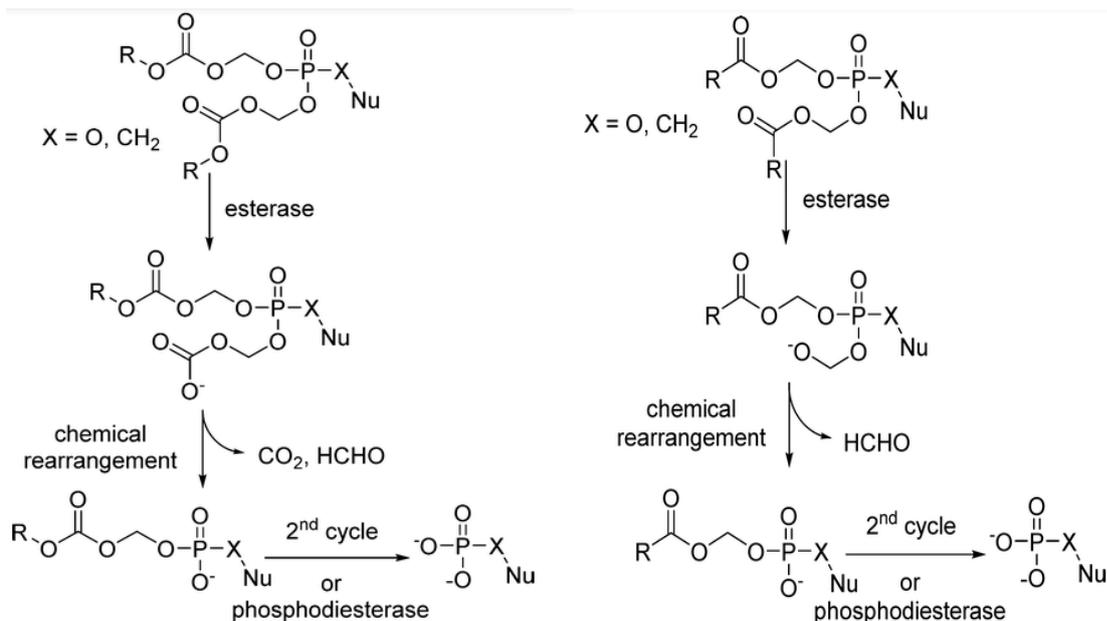


Figura 1: Profármacos de NMP de aplicación terapéutica.

Estos nucleósidos monofosfato enmascarados diseñados como profármacos son capaces de penetrar en las membranas celulares en su forma intacta como resultado de su alta lipofilia y, no van a ser propensos a la degradación por fosfatasa plasmáticas no específicas (8). La idea de estos profármacos ha sido enmascarar las cargas del grupo fosfato con restos lipófilos para facilitar la penetración celular y evitar así adicionalmente la acción de la fosfatasa. Una vez dentro de las células, se liberan los monofosfatos de nucleósidos que utilizan la maquinaria celular para finalmente producir el metabolito activo. De esta forma van a dar lugar a una mejora de biodisponibilidad y eficacia respecto al nucleósido original. (3)

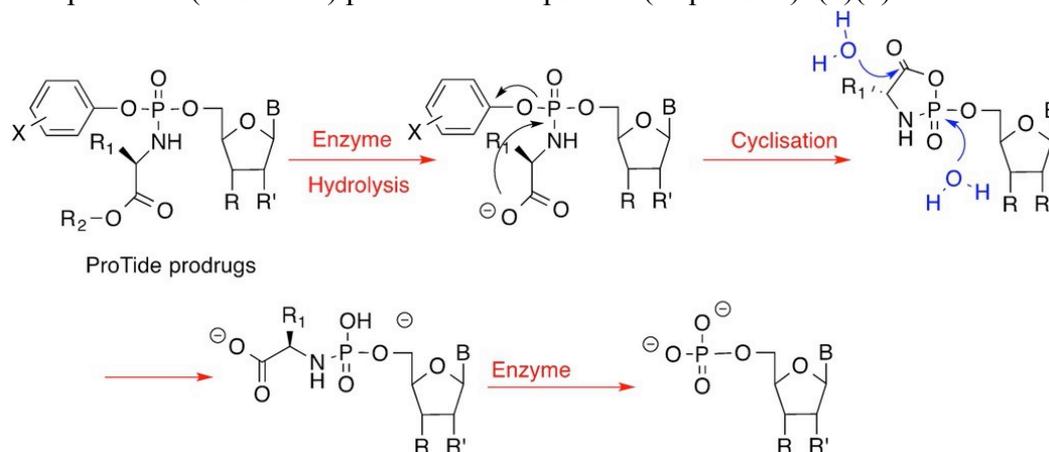
Los profármacos adefovir dipivoxilo y tenofovir disoproxil fumarato, empleados para el tratamiento de la infección por el virus VIH y la infección crónica del virus de la hepatitis B, son profármacos de tipo éster carboniloximetilo POM y POC, respectivamente. En ellos el grupo fosfonato están enmascarados por sustituyentes que presentan una elevada lipofilia; pivaloiloximetilo en el caso de POM, ó isopropiloxicarboniloximetilo en el caso de POC. La bioactivación de estos dos tipos de profármacos se inicia por esterases endógenas, produciéndose a continuación una descomposición química espontánea que libera el fosfonato, que posteriormente da lugar al principio activo por la acción de quinasas. La degradación de ambos profármacos se representa en el esquema 2. (6)



Esquema 2: Activación de profármacos POC y POM. (6)

Los profármacos sofosbuvir, empleado en el tratamiento de la hepatitis C, y tenofovir alafenamida utilizado en el tratamiento de la hepatitis B crónica y el tratamiento de la infección por el virus VIH, son profármacos que corresponden a la estrategia ProTide o estrategia de fosforamidato que fue desarrollada por el grupo de McGuigan. Son profármacos lipófilos de monofosfato de nucleósido en los que las dos cargas aniónicas del grupo fosfato están enmascaradas por un éster de un α -aminoácido y por un grupo ariloxi, respectivamente. Este profármaco lipófilo de NMP facilita la permeabilidad celular por difusión pasiva. Una vez que entra en la célula, los grupos de enmascaramiento se separan en dos pasos enzimáticos para liberar el análogo de nucleósido monofosf(on)ato. Las esterases escinden el éster del aminoácido y el grupo carboxilato cargado negativamente a pH fisiológico lleva a cabo un ataque nucleófilo al grupo fosfo(on)ato, lo que supone la escisión del fenóxido y formación de un anillo inestable que es atacado por una molécula de agua dando lugar a un metabolito fosfor(n)amidato. Tras esto participa una segunda enzima, fosforamidasa, que media la escisión del enlace P-N, liberando al análogo de nucleósido monofosf(on)ato. (4) Los fosforamidatos de NMP (ProTides) son mucho más estables en

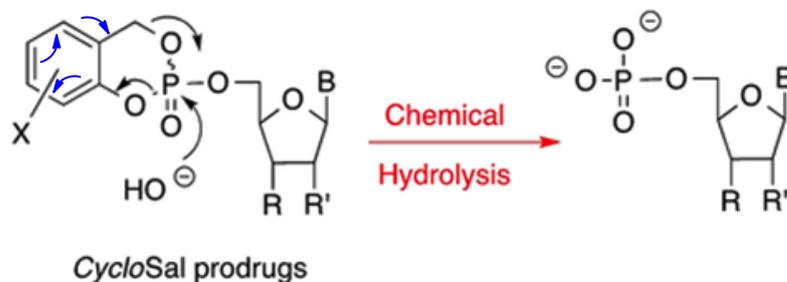
plasma que sus nucleósidos monofosfato correspondientes, ya que no sufren degradación por enzimas específicas (fosfatasas) presentes en el plasma (esquema 3). (3)(9)



Esquema 3: Profármacos ProTide profármacos y liberación de los NMP. (3)

El uso de tales profármacos de NMP ha demostrado que no sólo son útiles para mejorar la actividad de los nucleósidos progenitores, sino que también han generado nuevos compuestos potentes que de otra forma no podrían tener aplicación terapéutica como nucleósidos debido a una deficiente monofosforilación. (6)

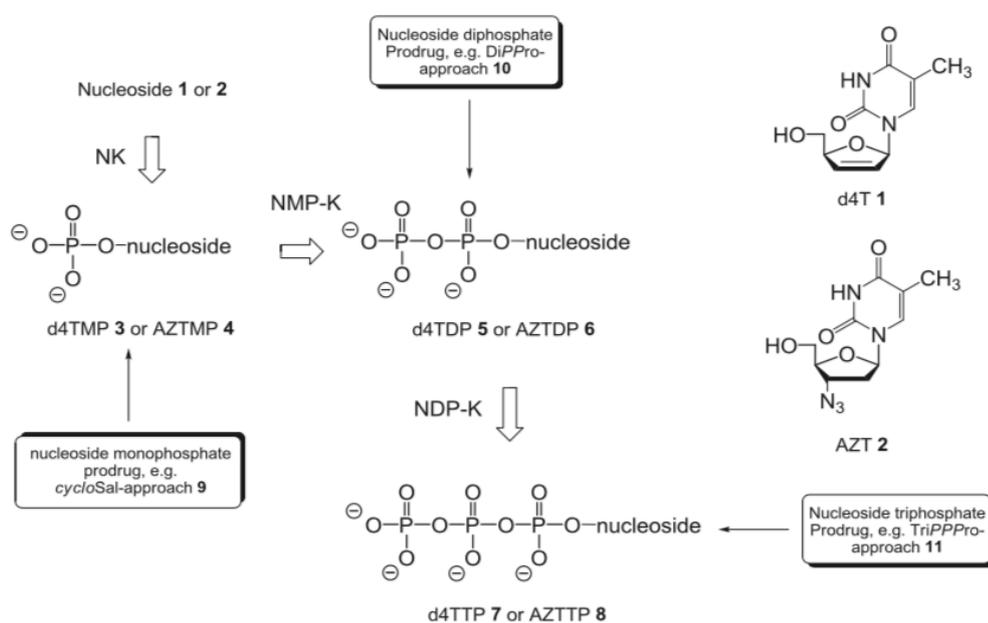
Dentro de las diferentes estrategias diseñadas para profármacos de NMP es importante mencionar aquí también la estrategia ciclo-Sal del grupo de investigación de Chris Meier, por su relación con los profármacos de NDP y NTP que se van a estudiar en este trabajo. Los profármacos ciclo-Sal (cyclo-Sal-NMP), una vez dentro de la célula, liberan los metabolitos NMP por una hidrólisis química impulsada por el pH celular. Este tipo de profármacos se han aplicado con éxito en diferentes experimentos de liberación intracelular de NMP de agentes antivirales como el aciclovir y la zidovudina. En el concepto de *ciclo-Sal*, el grupo de enmascaramiento es un grupo bifuncional cíclico que combina dos tipos diferentes de enlaces éster, éster de fenilo y éster bencílico (esquema 4). En condiciones básicas se hidroliza primero el éster fenólico seguido de una escisión espontánea del enlace P-O del éster bencílico. (10)(3)



Esquema 4: Los profármacos de ciclo-Sal y la liberación de los NMP por hidrólisis química. (3)

Como se ha indicado anteriormente, la eficacia antiviral de muchos análogos de nucleósidos, como la estavudina (d4T) y la zidovudina (AZT), depende de su conversión en los

nucleósidos trifosfato (NTP) bioactivos a través de las formas de mono y difosfato por las quinasas celulares. Sin embargo, las quinasas celulares a menudo catalizan de manera insuficiente la fosforilación de los análogos de nucleósidos. En el caso de la estavudina, el paso limitante del metabolismo en las células humanas es la fosforilación inicial catalizada por la timidina quinasa (TK). En contraste, se demostró que la fosforilación de la zidovudina por TK-1 celular se realiza de manera eficiente, pero la segunda fosforilación catalizada por timidilato quinasa (TMPK) es limitante en la bioactivación, lo que conduce a una acumulación intracelular de monofosfato de AZT (AZTMP), que es responsable de algunos de sus efectos secundarios graves. Se produce por tanto un cuello de botella en la etapa de fosforilación (11)(6)(12). Por otra parte se observó recientemente que el d4U o el ddU-difosfato eran sustratos muy pobres para la nucleósido difosfato quinasa (NDP-K), lo que demostró que la conversión enzimática de NDP a NTP también puede ser un paso limitante importante de la velocidad de activación a NTP. (13)



Esquema 5: Metabolismo de los nucleósidos de timina y las diferentes opciones de diseño de profármacos para los tres nucleósidos fosforilados. (1)

De ello se concluye que no solamente es importante tener buenos profármacos de NMP, si no que en muchos casos se requieren profármacos de NDP y NTP (esquema 5).

La estrategia de diseño de profármacos de NDP, estrategia DiPPPro, tiene la finalidad de que sólo se tenga que llevar a cabo una fosforilación para obtener el fármaco activo. También aquí será necesario que para poder entrar en el interior de la célula, el NDP tiene que enmascararse. La dificultad reside en la inestabilidad inherente del enlace anhídrido del resto pirofosfato, porque es un enlace energéticamente rico. Ello requiere grupos de enmascaramiento de alta estabilidad química.

La estrategia TriPPPro, es decir diseñar profármacos de NTP, permite el suministro intracelular directo de los NTP activos, y evita todos los pasos de fosforilación por quinasas

requeridos.(3) También aquí, a priori, como los nucleósidos trifosfato (NTP) no pueden considerarse como candidatos a fármacos viables debido su poca estabilidad química y su mala farmacocinética, se requieren profármacos lipófilos químicamente estables. (6)

OBJETIVOS.

El presente trabajo analizará las diferentes estrategias de diseño de profármacos de NDP y NTP, es decir los DiPPro y los TriPPPPro, y su posible viabilidad como profármacos de uso terapéutico. Se estudiarán los diferentes tipos de enmascaramiento empleados en su diseño. Por otra parte se analizarán las ventajas y desventajas que presentan estos profármacos de nucleósidos di y tri fosforilados frente a los profármacos de los nucleósidos monofosforilados, de los cuales ya hay una buena representación en el arsenal terapéutico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo realizado es de una revisión bibliográfica sobre profármacos de nucleótidos, y se centra en los profármacos de nucleótidos, di y tri fosforilados. Este tipo de profármacos aún están en fase de investigación y para su estudio se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica rigurosa en bases de datos como PubMed, Science Direct y Google Académico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos veinte años se han hecho grandes avances en el diseño de profármacos de nucleótidos de acción antiviral o antineoplásica, que han permitido el paso directo de los nucleósidos monofosfato (NMP) al interior de las células, lo que ha permitido sortear la primera fosforilación por quinasas necesaria para la formación de los nucleósido trifosfato (NTP) y que en muchos casos es el paso limitante de estas biotransformaciones.

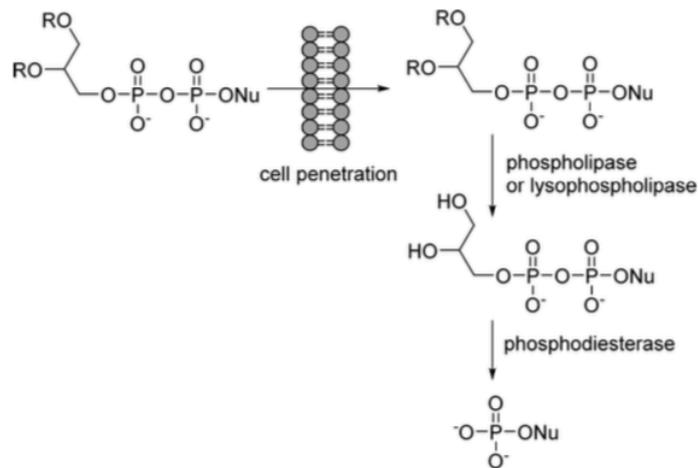
Los profármacos de los nucleósidos difosfato (NDP) y de los nucleósidos trifosfato (NTP), en cambio, están poco estudiados, a pesar de que, como ya se ha visto, el paso limitante en el camino de bioactivación hacia el NTP también puede ser la segunda o la tercera fosforilación realizada por quinasas. Este es, por ejemplo, el caso de la zidovudina, cuya conversión en NMP es eficaz, pero la conversión ulterior a NDP es lenta, lo que se traduce en una acumulación intracelular de zidovudina-MP con sus consiguientes efectos secundarios (14) (15). Otro ejemplo es la citarabina que por este procedimiento además de mejorar la biodisponibilidad del fármaco activo, evita también la desaminación de la base pirimídica. La falta de datos sobre profármacos de NDP y NTP se debe en parte a la poca estabilidad de los enlaces anhídrido del resto pirofosfato. Estos enlaces sólo son estables en el caso de los aniones fosfato, en los que la resonancia de la carga negativa evita un ataque nucleofílico al fósforo.

Los primeros diseños de profármacos de NDP y NTP se realizaron a principios de 1980, y consistieron en la introducción de cadenas lipófilas de tipo alquilo o acilo sobre la última unidad fosfato (unidad β en el caso de NDP y unidad γ en el caso de los NTP). Entre los primeros profármacos diseñados se pueden destacar los glicéridos de nucleósido di- y

trifosfato, los acil-fosfatos y los diésteres de *p*-metoxibencilo de NDP, de los cuales sólo los últimos han demostrado ser interesantes como profármacos de NDP.

1. GLICÉRIDOS DE NDP Y NTP

El diseño de estos profármacos se basó en el diglicérido de difosfato de citidina de origen natural (16). Estos profármacos se desarrollaron principalmente para alcanzar los reservorios de VIH como son los macrófagos, pero la aplicación de estos profármacos a antivirales como zidovudina (AZT) o estavudina (d4T) daba lugar a profármacos que liberaban nucleósidos monofosfato en el interior de la célula debido a una hidrólisis de la función pirofosfato (esquema 6).

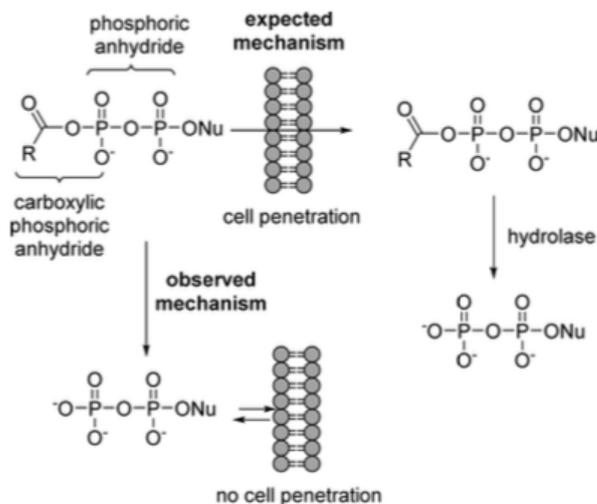


Esquema 6: Biodegradación de los triglicéridos NDP. (6)

Algo parecido también se observó en ésteres alquílicos, portadores de restos esteroides o lipídicos (6), lo que los hace inviables como profármacos de NDP.

2. NDP y NTP ACILADOS

En la literatura se describen varios casos de profármacos acilados. Después de la penetración celular, se espera que el acilfosfato sea escindido por una hidrolasa para obtener el NDP o NTP correspondiente. A pesar de que la hidrólisis del profármaco se realiza preferentemente en el enlace $C-O-P$ deseado, dejando intacto el enlace $P-O-P$, la inestabilidad de estos profármacos hizo que la hidrólisis se produjera preferentemente en el medio extracelular, por lo que no fueron aptos para una buena difusión transmembrana, produciéndose una concentración intracelular muy deficiente (esquema 7). (17)



Esquema 7: Biotransformación y farmacocinética de los NDP acilados.(6)

3. DIÉSTERES DE *p*-ACILOXIBENCULO DE NDP.

En 2008 Meier y cols. proponen el empleo de grupos protectores biodegradables para el diseño de profármacos de NDP (11). En los primeros ensayos emplearon la estrategia ciclo-Sal de los NMP para enmascarar los dos grupos hidroxilo del resto β -fosfato, pero se observó que en la bioactivación del profármaco se hidrolizaba preferentemente el enlace anhídrido del pirofosfato con la consiguiente liberación de NMP. Para evitar esta hidrólisis, se probó introducir cadenas degradables por enzimas, empleándose el grupo modulador de para-aciloxibencilo. A diferencia del caso del ciclo-Sal aquí la desprotección se inició por una hidrólisis enzimática o química del grupo éster y no por ataque nucleofílico al resto pirofosfato.

Estos compuestos poseen una alta estabilidad química en solución tampón, pero también se observa a una escisión enzimática rápida y altamente selectiva en extracto celular liberándose el metabolito esperado NDP. Los profármacos de difosfato de estavudina mostraron tener actividad antiviral, lo que demuestra su capacidad para penetrar en las células y liberar en su interior el metabolito difosfato. Estos últimos profármacos diseñados por el equipo de Meier son la base de los profármacos de NDP y NTP objetos de este estudio. A continuación se pasará a estudiar con más profundidad el diseño de profármacos basados en esta última estrategia, que permitan una liberación intracelular de NDP o NTP.

I. Estrategia de diseño diPPro.

Esta estrategia de diseño fue promovida por Meier, quien investigó sobre la manera de obtener directamente y de forma selectiva difosforatos de nucleósidos a partir de posibles profármacos de NDP con el objetivo de paliar la acción deficiente de las quinasas celulares de NMP, que en determinados casos pueden ejercer de factor limitante para lograr la bioactivación a la especie activa NTP. (3)

Meier logró diseñar con su estrategia profármacos que mostraron una buena actividad anti-VIH en el cultivo de células CEM/TK⁻ deficientes en TK.

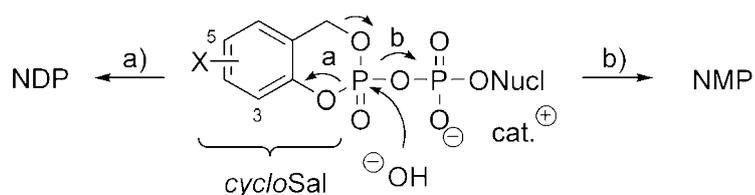
El grupo de investigación de Meier se encontró inicialmente con varias dificultades para materializar esta idea. Para obtener los profármacos lipófilos es necesario enmascarar las

cargas negativas de los grupos fosfato, pero esto da lugar a una rápida hidrólisis de la función anhídrido del resto pirofosfato, produciéndose dos fragmentos monofosforilados entre los que estaría el NMP. (3) Para resolver este problema Meier usó compuestos parcialmente cargados. Las cargas estabilizan el enlace anhídrido, ya que la carga negativa evita un ataque nucleofílico en los grupos fosfato y transforma estos fosfatos en grupos salientes pobres, estabilizando así el resto de difosfato. Por otra parte, una vez dentro de las células, los grupos enmascarados del profármaco del difosfato de nucleósido deben ser escindidos rápidamente por enzimas para liberar el metabolito NDP que por acción de NDP quinasas se transformaría en la especie activa NTP. (8)

Anteriormente a los estudios de Meier, Hostetler y su equipo trabajaron sobre profármacos de NDP portadores de restos glicéridos. Sin embargo, estos compuestos no son útiles como profármacos de NDP, ya que liberan los correspondientes NMP a través de la escisión del grupo pirofosfato. (16)

Otra estrategia para obtener profármacos de NDP la describieron Huynh-Dinh y su equipo. Unieron diferentes restos acilo al fosfato β de la unidad pirofosfato logrando que de esta forma se produzca una escisión más rápida del anhídrido mixto acilo-O-P que la escisión del anhídrido del pirofosfato. Desgraciadamente, al intentar estudiar estos profármacos en medios biológicos, estos fueron poco estables, produciéndose la hidrólisis del anhídrido mixto antes de que el profármaco pudiese llegar a la membrana celular. (8) (18)

Meier y cols. después de ensayar su estrategia de los profármacos ciclo-Sal de NDP en los NDP y ver que esta nueva estrategia no favorecía la liberación por hidrólisis química el NDP esperado de forma eficaz, sino que prevalecía la escisión hidrolítica del resto pirofosfato liberándose NMP (esquema 8), decidieron cambiar de estrategia e investigar profármacos que se bioactiven por acción enzimática y no por hidrólisis química.



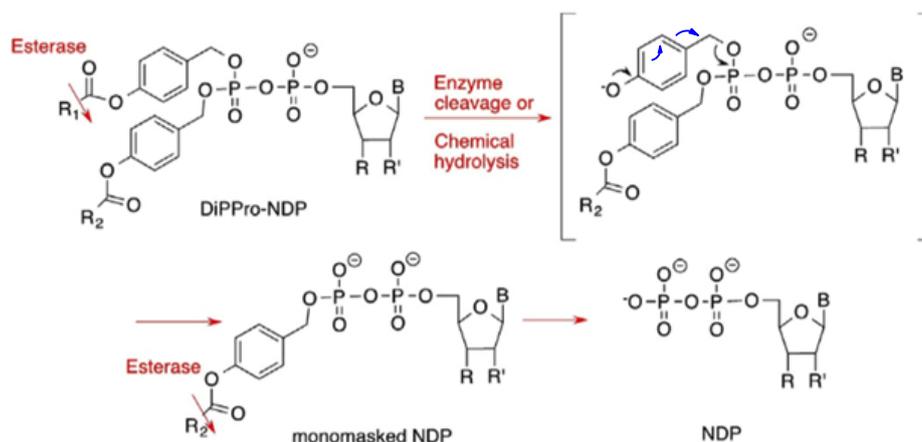
Esquema 8. La hidrólisis de profármacos ciclo-Sal de NDP utiliza preferentemente la vía b. (8)

La elección recayó en los ésteres de bis (4-aciloxibencilo) de nucleósidos difosfato (estrategia DiPPro), que demostraron tener una alta estabilidad química, y a la vez, una rápida y eficiente conversión en el correspondiente NDP en extractos de células CEM.

La estrategia DiPPro se basa en emplear como grupos moduladores dos ésteres bencílicos *p*-sustituidos unidos al grupo β -fosfato del nucleósido difosfato, lo que permite la captación celular de los compuestos y la liberación de los difosfatos (NDP) por hidrólisis del enlace éster. El α -fosfato debe permanecer libre, sin proteger, debido a que la carga negativa del α -fosfato es imprescindible para lograr la estabilización de la unidad de pirofosfato.

La liberación de NDP se puede iniciar química o enzimáticamente por hidrólisis del éster acilo en posición *para* del anillo aromático del grupo modulador. Se evita por lo tanto, la

reacción química en la unidad de pirofosfato como sucede en los profármacos ciclo-Sal. (19). Con la escisión enzimática del acil-éster en el anillo aromático, tiene lugar una inversión de la polaridad (*Umpolung*) ya que el grupo éster en posición *para*, que es aceptor de electrones, se convierte por hidrólisis en anión fenóxido, un sustituyente electrón-donante fuerte y como consecuencia hay una desestabilización del enlace éster de bencil fosfato que se descompone a través de una eliminación 1,4 seguida de hidrólisis para dar el alcohol 4-hidroxibencílico y el monoéster de NDP. La repetición de este mecanismo de escisión da lugar a la liberación del NDP. No se observa interacción con el anhídrido de pirofosfato por lo que se minimizan las posibles reacciones secundarias. (3,8,11)



Esquema 9: Profármacos DiPPro y mecanismo de liberación de NDP. (3)

Se demostró que la cantidad de NMP formada en la degradación del profármaco se correlacionaba claramente con la estabilidad de los profármacos DiPPro y que esta estabilidad dependía del tamaño de los restos alquilo R de los diferentes radicales acilo estudiados. Cuanto mayor era el grupo alquilo R, mayor era la estabilidad de los compuestos DiPPro, pero también se observaba una mayor formación del NMP no deseado. (20) Por otra parte, restos acilo cortos o ramificados no mostraron actividad antiviral. Ello se debe a que el efecto polar de la carga negativa del grupo α -fosfato no está suficientemente contrarrestado por la cadena lipófila del radical acilo, lo que evita la absorción efectiva en las células. (11)

De los resultados obtenidos se concluye que a pesar de que se requiere una buena estabilidad para el grupo modulador en el profármaco, éste debe ser removido lo antes posible en el medio fisiológico para evitar que se propicie la hidrólisis del pirofosfato. Los autores proponen que semividas de 1 a 30 minutos son suficientes para lograr una buena liberación de NDP. También se observó que la estabilidad de estos profármacos es mayor en plasma humano que en extractos celulares, en los que la actividad de las esterasas es mucho mayor.

Dentro de la estrategia DiPPro es importante diferenciar dos tipos de profármacos: los simétricos o de primera generación y los no simétricos o de segunda generación. Estos segundos se desarrollaron con el fin de mejorar la selectividad y efectividad de estos profármacos. (1) Como se indicó anteriormente, la cantidad del NMP no deseado formado está relacionada con la lipofilia, y por consiguiente, con la estabilidad de los grupos moduladores. En el proceso de eliminación del primero de estos grupos se observó que, una

vez obtenido el producto intermedio, éste ya no liberaba NMP, lo que seguramente se debe a la formación de una carga negativa adicional sobre el grupo β -fosfato que impediría la hidrólisis en el resto pirofosfato. Esta observación llevó al diseño de los DiPPro no simétricos en los que uno de los grupos moduladores llevaría radicales acilo pequeños y sería el que sufriría la primera hidrólisis rápida por acción enzimática (o química). El segundo grupo modulador sería portador de un radical acilo de cadena larga, a fin de aportar la suficiente lipofilia al profármaco. De esta forma se logra una conversión rápida de los profármacos DiPPro a sus intermedios mono-enmascarados, evitando la formación del producto secundario NMP y consiguiéndose una conversión muy selectiva a NDP (esquema 9).

Meier y cols. realizaron un estudio para los anti-VIH estavudina (d4T) y zidovudina (AZT) y observaron que los compuestos DiPPro-NDP no simétricos (**7, 8, 9, 10**) tienen una vida media más alta que los simétricos (**11**). El impedimento estérico y la lipofilia son la razón del aumento en la estabilidad. (20)

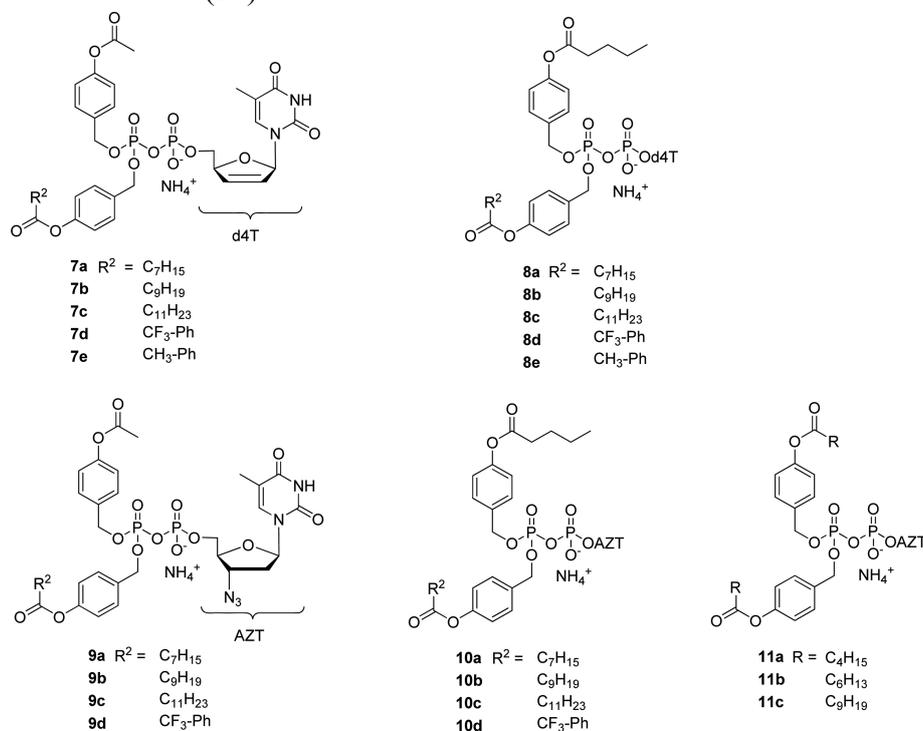


Figura 2: Diésteres no-simétricos DiPPro-d4TDPs **7,8** y diPPro-AZTDPs **9,10** con diferentes restos acilo alifáticos y aromáticos como lipófilos. (20)

Los ensayos también corroboran que los DiPPro-NDP simétricos forman notablemente más producto secundario NMP. Al comparar los DiPPro simétricos entre sí se comprobó que la hidrólisis de **11a** y **11b** en extractos de células CEM/0 dio lugar a una buena relación NDP/NMP. En contraste, esta relación varió significativamente a favor del NMP en el caso de **11c**, mas lipófilo, y más lento a la acción de las esterasas. (20)

La relación NDP/NMP en el caso de los DiPPro no simétricos era de 5/1, mientras que en los simétricos fue de 1,5/1. Curiosamente, la incubación en las mismas condiciones de AZTDP (sintetizado independientemente), dio lugar a una proporción de 3/1 de AZTDP y AZTMP.

La mejor relación NDP/NMP encontrada fue para el profármaco no simétrico DiPPro **9b**. De la comparación de **9b** con AZTDP se deduce que el compuesto **9b** no es susceptible a la escisión en el resto pirofosfato. En el caso de AZTDP la desfosforilación se inicia inmediatamente al comienzo de la incubación. (20)

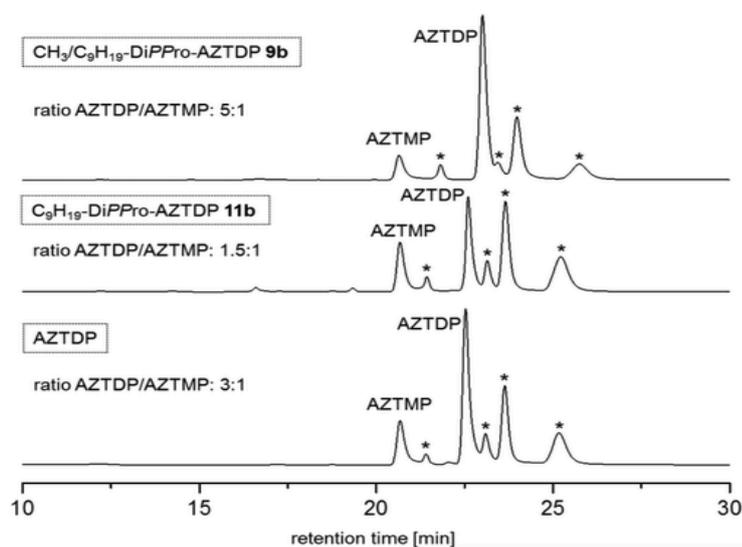
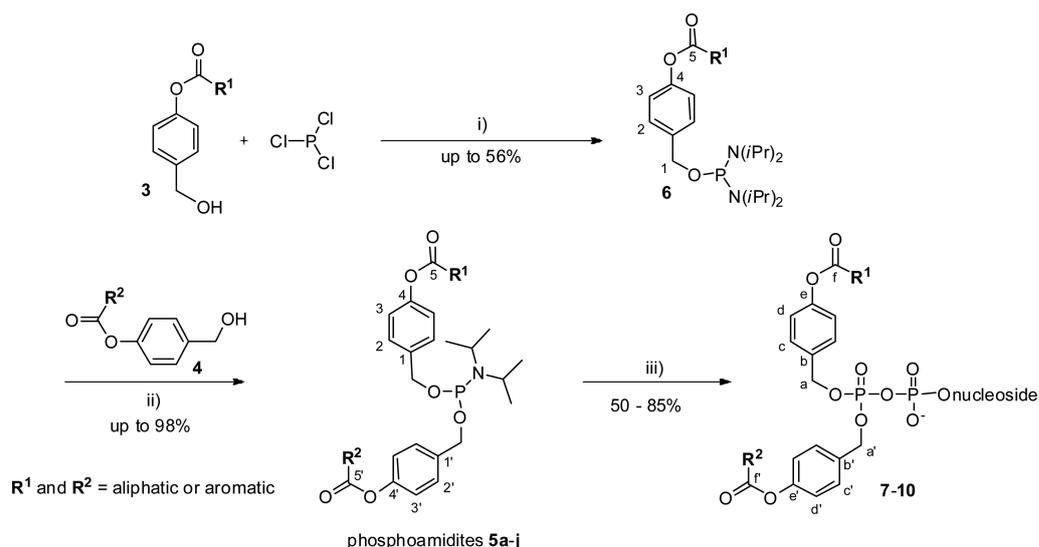


Figura 3: Cromatogramas de HPLC (columna HILIC) de las incubaciones de $\text{CH}_3/\text{C}_9\text{H}_{19}$ -DiPPro-AZTDP **9b**, C_9H_{19} -DiPPro-AZTDP **11c** y AZTDP en extractos de células CEM después 10 h. (20)

De los resultados obtenidos se puede concluir que en los profármacos DiPPro-d4TDP la introducción de dos radicales acilo diferentes permita una liberación escalonada y controlada de los grupos moduladores, obteniéndose una liberación selectiva de NDP en extractos de células CEM. Estos compuestos mostraron ser muy activos contra el virus VIH2, incluso al ser ensayados en células CEM deficientes en timidina quinasa. De ello se concluye que estos profármacos se absorben bien por parte de las células y liberan bien el NDP en el interior de éstas, a pesar de la carga negativa en el agrupamiento α -fosfato. Por otra parte se vio que los profármacos diPPro que llevan grupos acetilo o grupos benzoilo no son adecuados como profármacos debido a su velocidad de hidrólisis elevada y a su reducida lipofilia que no puede ser contrarrestada adecuadamente por el segundo radical acilo.

En el caso de diPPro-AZTDP no se obtuvieron buenas actividades antivirales lo que apunta a un posible segundo cuello de botella adicional en la fosforilación del AZDP al AZTTP. (20)

Para la síntesis de los DiPPro no simétricos, el alcohol 4-aciloxibencílico **3** se hizo reaccionar con tricloruro de fósforo seguido de la adición de 2 equiv. de *N,N*-diisopropilamina (DIPA), lo que dio lugar a bis(diisopropilamino)fosforamiditas **6**. La sustitución de uno de los restos diisopropilamino por el segundo alcohol 4-aciloxibencílico **4** después de la activación con dicianoimidazol (DCI) dio lugar a las fosforamiditas no simétricas **5** con rendimientos muy altos. A continuación, se llevó a cabo el segundo acoplamiento activado por ácido (DCI) de las fosforamiditas **5** con los correspondientes monofosfatos de nucleósido mediante la adición sucesiva de pequeñas cantidades de la solución activadora de DCI, que condujo a una conversión cuantitativa al nucleótido. Esta ruta permitió obtener los compuestos diPPro-d4TDP y diPPro-AZTDP con las diferentes combinaciones de restos acilo alifáticos y aromáticos estudiados por Meier. (20)(21)



Esquema 10: Síntesis de DiPPro no simétricos. (20)

A pesar de que los profármacos de NMP han resuelto muchos problemas farmacocinéticos y tienen una creciente aplicación en el arsenal terapéutico, y para los profármacos de NDP se ha optimizado con éxito la estrategia DiPPro, en ciertos casos, como el de la zidovudina, el condicionante que regula la velocidad de formación del NTP activo es la NDP-quinasa, lo que hace necesario disponer de profármacos de NTP para garantizar una concentración adecuada de la especie activa en el interior de la célula. (3,22)

II. Estrategia de diseño TriPPPro

El diseño de profármacos de nucleósidos trifosfato (TriPPPro) permite omitir todas las transformaciones enzimáticas necesarias para llegar al metabolito activo NTP. A pesar de su interés, hay muy pocas investigaciones en este campo debido a la suposición de que no sería factible la síntesis de estos profármacos debido a su poca estabilidad. El grupo de Meier logró demostrar que no sólo se podían sintetizar estos profármacos, sino que también actúan eficazmente liberando el NTP activo dentro de la célula.

En la siguiente figura se resumen los posibles mecanismos de escisión de un profármaco TriPPPro. Mientras que las rutas A1 y A2 dan lugar a una liberación de NTP, las rutas B y C, dan lugar a la formación de NDP o NMP (23). Como se indica en la figura, son necesarios dos procesos de escisión para obtener el NTP, que sería el producto predominante y estos competirían con los ataques nucleofílicos sobre los fosfatos β y γ , que darían lugar a los productos secundarios. En el caso de los TriPPPro-NTP se ha observado que su vida media es inferior a la de los DiPPro-NTP.

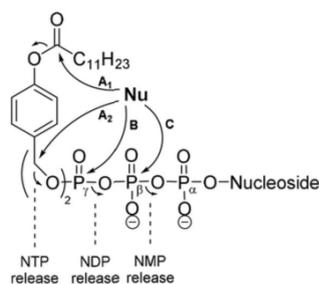
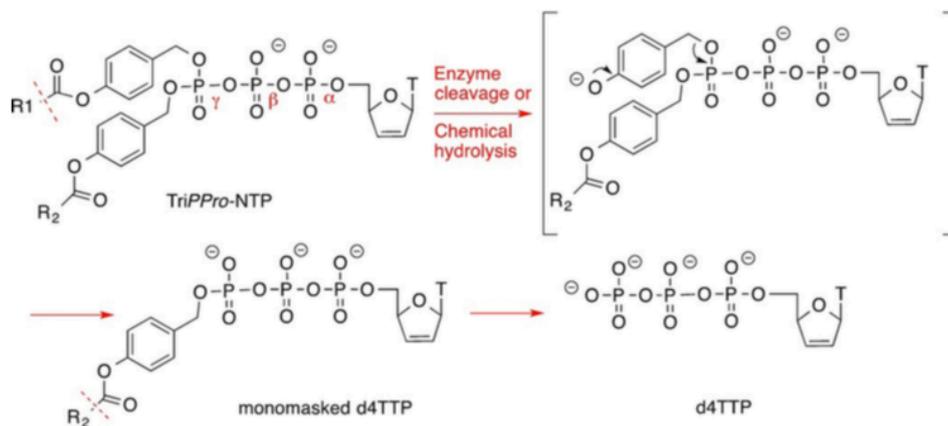


Figura 4: Vías de hidrólisis de los profármacos TriPPPro. (23)

En estos profármacos se enmascaró el grupo γ -fosfato del nucleósido trifosfato con restos aciloxi-bencilo. La variación de los restos acilo hacia cadenas largas permitió, como en el caso de los DiPPPro-NTP, la modulación de la lipofilia y de la permeabilidad a través de la membrana celular al compensarse con las cargas de los fosfatos α y β . (3)



Esquema 11: Profármacos TriPPPro-NTP y su bioactivación.(3)

Utilizando el compuesto d4T, como compuesto modelo, se ha podido demostrar de forma exitosa que los trifosfatos parcialmente enmascarados cruzan eficientemente la membrana celular y liberan directamente el trifosfato de nucleósido (d4TTP) en el interior de la célula. (3)

Los ésteres de ácidos grasos han mostrado ser los más adecuados para el diseño de estos profármacos porque permiten la entrada a la célula independientemente de los transportadores nucleósidos. Además los esterres de ácidos grasos son absorbidos por el sistema de fagocitos mononucleares. (22)

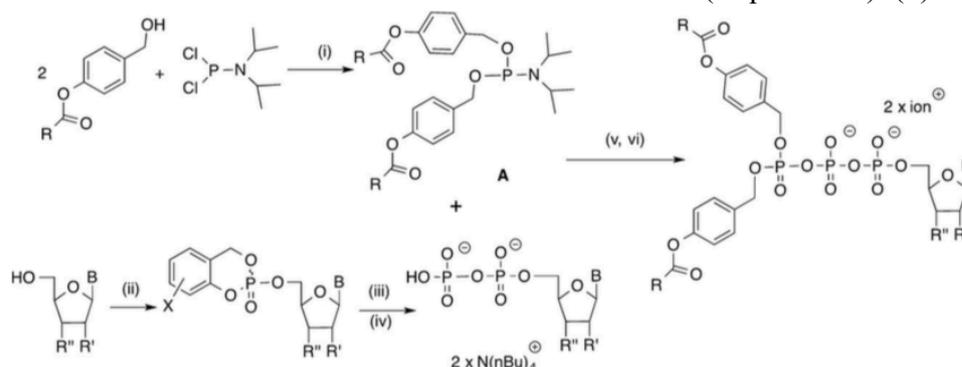
Los derivados de TriPPProNTP retuvieron una marcada actividad anti-VIH en cultivos de células CEM/TK⁻, mientras que sus nucleósidos progenitores era virtualmente inactivos en estas células debido a la falta de timidina quinasa citosólica. La escisión intracelular de los compuestos TriPPProNTP se inicia por hidrólisis enzimática de uno de los acil-ésteres fenólicos seguida de una degradación espontánea. El largo de la cadena influye de forma significativa sobre la estabilidad, la hidrólisis y la actividad antiviral del profármaco. La protección de los NTP también hizo que estos compuestos fueran menos vulnerables a la desfosforilación por fosfatasas no específicas del medio de cultivo o de la sangre. (13)

Se realizó un estudio de la actividad antiviral y permeabilidad celular de una serie de TriPPProNTP empleando como grupo modificador el nonanoiloxibencilo y variando el resto nucleosídico.(13)

Los estudios de hidrólisis enzimática, utilizando esterasa de hígado de cerdo (PLE), demostraron la formación selectiva del NTP, y los estudios de hidrólisis química en PBS (tampón fosfato) a pH 7,3 mostraron la formación predominante del NTP y vidas medias más largas que sus nucleósidos progenitores. Estudios en cultivos celulares mostraron que la

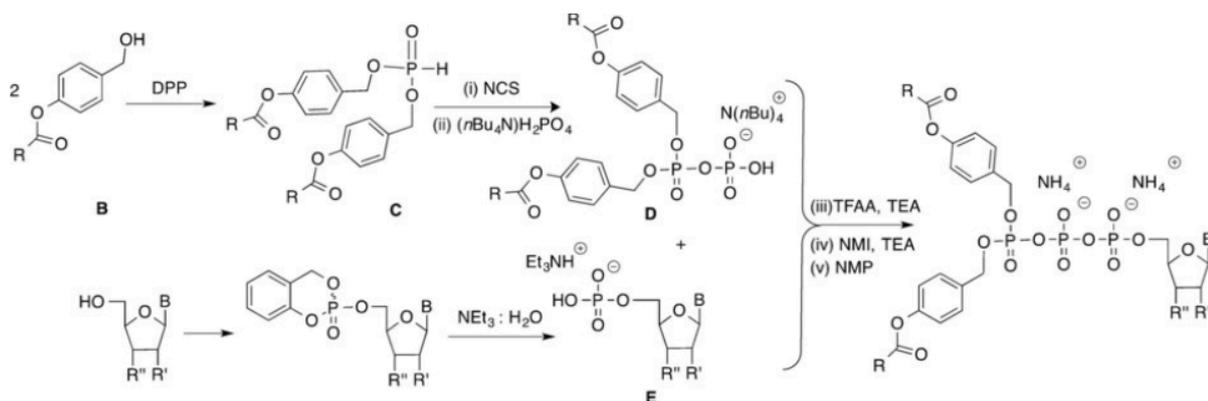
inhibición de la replicación de VIH-1 y VIH-2 por estos profármacos fue mucho mayor, o al menos similar, que la de sus nucleósidos progenitores. Todos los profármacos TriPPPPro-NTP portadores de restos de timina retuvieron la actividad antiviral en las células deficientes en TK, lo que demuestra su absorción por parte de la célula. Es de destacar que los TriPPPPro-NTP de algunos análogos de timina, como el FddCIU, que como nucleósidos no tienen actividad antiviral, dieron lugar a profármacos muy potentes. Curiosamente los compuestos de TriPPPPro de d4U y ddU no mostraron actividad antiviral significativa lo que podría deberse a su rápida desfosforilación. (3,13)

El grupo de Meier diseñó dos procedimientos exitosos para la síntesis de los profármacos TriPPPPro. El primero, se basó en la química de la **fosforamidita** desarrollada por el grupo para la síntesis de profármacos DiPPPPro. En esta síntesis convergente, se obtuvo el TriPPPPro-NTP haciendo reaccionar la bis(4-aciloxibencil)fosforamidita (A) con las sales $(n\text{Bu})_4\text{N}^+$ de los nucleósidos difosfatos en presencia de un catalizador ácido débil como es el 4,5-dicianoimidazol (DCI). Para la síntesis de los nucleósidos difosfato, se utilizó la estrategia sintética cycloSal, también desarrollada por Meier. Por este procedimiento los compuestos TriPPPPro se obtuvieron con un rendimiento del 55 al 80% (esquema 12). (3)



Esquema 12: Síntesis de Tri PPPPro-NTP utilizando la química de la fosforamidita: i) trietilamina, THF, 0°C → RT, 20h; ii) 5-clorosalingenil-clorofosfito, *N,N*-diisopropilamina, CH₃CN, -20°C → RT, 3h; iii) *t* BuOOH, 0°C → RT, 30 min; iv) (H₂PO₄)Bu₄N, DMF, RT, 20h; v) NDP, fosforamidita, DCI, CH₃CN, RT, 1min; vi) *t*BuOOH, 0 ° C, 20 min. (3)

La segunda vía está basada en la química del **H-fosfonato**. Este método consiste en acoplar un nucleósidos monofosfato **E** (NMP) y un *P,P*-bis-(4-acililoxibencil)pirofosfato **D**. En esta ruta se construye el profármacos trifosfato formando el anhídrido entre los fosfatos α y β , mientras que en el primer procedimiento la unión formada es entre los fosfatos β y γ . La ventaja de esta ruta de síntesis está en que los NMP son más fáciles de preparar que los NDP. La segunda ventaja está en que esta ruta permite el empleo de nucleósidos y de grupos protectores sensibles a la oxidación, ya que a diferencia de la ruta anterior, aquí no se emplean agentes oxidantes. Por último, esta vía de síntesis es más rápida y reproducible y permite el empleo de una mayor variedad de disolventes (esquema 13). (3) (24).



Esquema 14: Síntesis de TriPPPPro -NTP utilizando la química de hidrógeno fosfonato. DPP (hidrógeno fosfonato de difenilo); NCS (N-clorosuccinimida); TFAA (anhídrido trifluoroacético); TEA (triethylamina); NMI (1-metilimidazol).(3)

Primero, se preparó el fosfonato de hidrógeno (C) a partir de hidrógeno fosfonato de difenilo y el correspondiente acilato de (4-hidroximetil)fenilo (B). A continuación, el compuesto C se convirtió en su correspondiente clorofosfato utilizando N-clorosuccinimida (NCS), seguido de una fosforilación con fosfato de tetra-n-butilamonio. El producto de reacción se purificó por extracción a pesar de su baja estabilidad, obteniéndose D con rendimientos cuantitativos. La reacción de acoplamiento final se realizó mediante la activación gradual de D con anhídrido trifluoroacético en presencia de N-metilimidazol, seguido de la adición del NMP E para dar los TriPPPPro-NTP con rendimientos de hasta el 85%. (13)

Meier afirma que con algunas investigaciones adicionales para mejorar la eficacia y la selectividad de la estrategia TriPPPPro-NTP, ésta se puede aplicar en un futuro no sólo a agentes antivirales VIH, sino que también a otros antivirales y a agentes anticancerígenos. Es de destacar que estas estrategias de diseño de profármacos de nucleótidos, no sólo permiten mejorar la actividad de fármacos conocidos sino que incorporar nuevos principios activos que como nucleósidos no presentan suficiente actividad. (2)

CONCLUSIÓN

Aunque los profármacos de nucleósidos monofosfato hayan demostrado ser un gran avance en el diseño de profármacos y tener ya aplicación clínica, sería muy interesante disponer de profármacos de nucleósidos trifosfato que permitiesen omitir todos los pasos de la fosforilación intracelular por quinasas y maximizasen la concentración intracelular de los NTP bioactivos. El principal problema en el desarrollo de profármacos de nucleósido di- y trifosfato, a diferencia de los profármacos de nucleósidos monofosfato, es la presencia de los enlaces lábiles de anhídrido del pirofosfato en los restos di- o trifosfato. Para solventar este problema deben emplearse profármacos parcialmente esterificados con moduladores lipófilos y que sean portadores parciales de carga negativa en los restos fosfato, lo que contribuye positivamente a su estabilidad.

Las estrategias de diseño DiPPPro para los nucleósidos difosfato y de TriPPPPro para los nucleósidos trifosfato desarrolladas por Meier y cols. son una herramienta poderosa que

permite administrar intracelularmente NDP y NTP. Abre nuevas perspectivas para los nucleósidos que inicialmente fueron descartados por la falta de actividad viral o antineoplásica debido a su ineficiente conversión por quinasas celulares hacia sus correspondiente metabolitos activos.

Tanto la estrategia diPPro como la estrategia triPPPro han demostrado dar profármacos más eficaces que sus nucleósidos progenitores al liberar el NTP en el interior celular.

A pesar de haberse logrado buenos resultados, esta nueva estrategia aún está en fases iniciales, y requiere de más investigación.

Estas estrategias tienen un gran potencial que permite proyectar la investigación no sólo al tratamiento del VIH, sino que también a otras dianas víricas y al cáncer, y pueden ser utilizadas como herramientas bioquímicas en los enfoques de Biología Molecular(8).

BIBLIOGRAFIA

1. Meier C. Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs- An unsolvable task? *Antivir Chem Chemother.* **2017**;25(3):69-82.
2. Dr Chris Meier - Enhancing the Efficacy of Anti-Viral & Anti-Cancer Drugs. *Scientia.global.* **2018**. Disponible en: <https://www.scientia.global/dr-chris-meier-enhancing-the-efficacy-of-anti-viral-anti-cancer-drugs/>
3. Camarasa, MJ. Prodrugs of Nucleoside Triphosphates as a Sound and Challenging Approach: A Pioneering Work That Opens a New Era in the Direct Intracellular Delivery of Nucleoside Triphosphates. *ChemMedChem.* **2018**; 13, 1885-1889. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.bucm.idm.oclc.org/doi/full/10.1002/cmdc.201800454>
4. Thornton PJ, Kadri H, Miccoli A, Mehellou Y. Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates. *J Med Chem.* **2016**;59(23):10400-10.
5. Zemlicka J. Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* **2002**;1587(2):276-86.
6. Pradere U, Garnier-Amblard EC, Coats SJ, Amblard F, Schinazi RF. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs | *Chem Rev* **20014**, 114, 9154-9218. Disponible en: <https://pubs-acsc-org.bucm.idm.oclc.org/doi/10.1021/cr5002035>
7. Rautio J, Kärkkäinen J, Sloan KB. Prodrugs – Recent approvals and a glimpse of the pipeline. *Eur J Pharm Sci.* **2017**;109:146-61.
8. Jessen HJ, Schulz T, Balzarini J, Meier C. Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates. *Angew Chem. Int. Ed.* **2008**;47(45):8719-22.
9. Mehellou Y, Balzarini J, McGuigan C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem.* **2009**;4(11):1779-91.
10. Meier C, Meerbach A, Balzarini J. Cyclosal-pronucleotides--development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy. *Front Biosci* **2004**;9:873-90.
11. Schulz T, Balzarini J, Meier C. The DiPPPro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and Antiviral Activity of Lipophilic d4T Diphosphate Prodrugs. *ChemMedChem.* **2014**;9(4):762-

75.

12. Ho HT, Hitchcock MJ. Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **1989**;33(6):844-9.

13. Gollnest T, Dinis de Oliveira T, Rath A, Hauber I, Schols D, Balzarini J, Meier C. Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues. *Angew Chem Int. Ed.* **2016**;55(17):5255-8.

14. Lavie, A.; Schlichting, I.; Vetter, I. R.; Konrad, M.; Reinstein, J.; Goody, R. S. The bottleneck in AZT activation. *Nat. Med.* **1997**, 3, 922-924.

15. Yan, J. P.; Ilsley, D. D.; Frohlick, C.; Street, R.; Hall, E. T.; Kuchta, R. D.; Melanco, P. J. 3'-Azidothymidine (zidovudine) inhibits glycosylation and dramatically alters glycosphingolipid synthesis in whole cells at clinically relevant concentrations. *Biol. Chem.* **1995**, 270, 22836-22841.

16. Van Wijk, G. M. T; Hostetler, K. Y.; Kroneman, E.; Richman, D. D.; Sridhar, C. N.; Kumar, R.; van den Bosch, H. Synthesis and antiviral activity of 3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate distearoylglycerol: A novel phospholipid conjugate of the antiHIV agent AZT. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, 70, 213-222.

17. Bonnaffé, D.; Dupraz, D.; Ughetto-Monfrin, J.; Namane, A.; Henin, Y.; Huynh-Dinh, Y. Potential Lipophilic Nucleotide Prodrugs: Synthesis, Hydrolysis, and Antiretroviral Activity of AZT and d4T Acyl Nucleotides. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 895-902.

18. A. Kreimeyer, F. André, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, Transmembrane Transport of Adenosine 5'-Triphosphate Using a Lipophilic Cholesteryl Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2853 – 2855.

19. Weinschenk L, Gollnest T, Schols D, Balzarini J, Meier C. Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues. *ChemMedChem.* **2015**;10(5):891-900.

20. Weinschenk L, Schols D, Balzarini J, Meier C. Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides. *J Med Chem.* **2015**;58(15):6114-30.

21. Warnecke S, Meier C. Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cycloSal-Nucleotides. *J Org Chem.* **2009**;74(8):3024-30.

22. Gollnest T, de Oliveira TD, Schols D, Balzarini J, Meier C. Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals. *Nat Commun.* **2015**;6:8716.

23. Weising S, Sterrenberg V, Schols D, Meier C. Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPro-AbacavirTP, TriPPPro-CarbovirTP, and Their 1',2'-cis-Disubstituted Analogues. *ChemMedChem.* **2018**;13(17):1771-8.

24. Meier, C. Design of lipophilic trojan horses for the intracellular delivery of phosphorylated nucleoside metabolites. Disponible en: <https://www.chemie.uni-hamburg.de/institute/oc/arbeitsgruppen/meier/research/cyclosal.html>