

Grado Universitario en Farmacia, Universidad de la Laguna

# SÍNTESIS DE POTENCIALES ANTIVIRALES



Daniel González Miranda

2020

TUTORA: Sandra Dévora Gutiérrez

COTUTORA: Dácil Hernández Mesa

## **ÍNDICE.**

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>9</b>
• <b>Caracterización del compuesto 13B .....</b>	<b>13</b>
• <b>Evaluación de la actividad biológica .....</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>32</b>

## **ABSTRACT**

The appearance of antimicrobial resistances and the emergence of unknown viruses and bacteria is one of the major health problems globally. Therefore, the research and development of possible new treatments is considered essential.

In the search for new antimicrobial drugs, *N*-azanucleosides are a very promising family of compounds. In fact, many of them have displayed promising bioactivities, by inhibiting key viral and bacterial enzymes. In order to advance in these studies, it is necessary to have simple, direct and inexpensive synthetic routes that readily provide important collections of compounds for biological screenings.

This work uses a recently developed methodology that enables the preparation of *N*-azanucleosides from commercial  $\alpha$ -amino acid derivatives. Through this synthetic route, a collection of six *N*-azanucleosides was prepared, starting from commercial L-proline and L-trans-hydroxyproline derivatives, for antiviral evaluation. In the process, basic synthetic protocols in organic chemistry were used, the compounds were purified by chromatography and characterized using mainly Nuclear Magnetic Resonance and mass spectrometry. Finally, a first screening of antiviral activity was performed to determine structure-activity relationships.

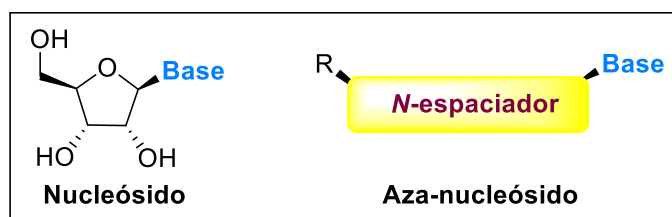
## **ABREVIATURAS.**

<b>ARN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>DIB</b>	<b>(Diacetoyodo) benceno</b>
<b>δ</b>	<b>Desplazamiento químico en RMN</b>
<b>EtOAc</b>	<b>Acetato de etilo</b>
<b>g</b>	<b>Gramos</b>
<b>HTLV1</b>	<b>Virus linfotrópico humano de células T tipo 1</b>
<b>IR</b>	<b>Espectrometría infrarroja</b>
<b>J</b>	<b>Constante de acoplamiento</b>
<b>Me</b>	<b>Metilo</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramo</b>
<b>MHz</b>	<b>Mega hertzio</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>mmol</b>	<b>Milimol</b>
<b>MTAN</b>	<b>Metiladenosina nucleosidasa</b>
<b>MTAP</b>	<b>Metiladenosina fosforilasa</b>
<b>Nm</b>	<b>Nanómetro</b>
<b>OBz</b>	<b>Grupo benzoato</b>
<b>OAc</b>	<b>Grupo acetato</b>
<b>PNP</b>	<b>Purine nucleósido fosforilasa.</b>
<b>Ppm</b>	<b>Partes por millón.</b>
<b>(S)-DHPA</b>	<b>(S)-9-(2,3-dihidroxipropil)adenina.</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de la inmunodeficiencia humana.</b>
<b>°C</b>	<b>Grados centígrados.</b>

## INTRODUCCIÓN.

La aparición de nuevos virus y bacterias, así como el desarrollo de resistencias a los tratamientos antimicrobianos ya existentes son dos de los principales problemas a los que se enfrenta la medicina moderna.<sup>1</sup> Según la OMS, la resistencia a los antimicrobianos es una de las mayores amenazas para la salud pública en los próximos años.<sup>2</sup> En la actualidad existe multiresistencia a gran número de microorganismos y se han realizado, y se están realizando, estudios para encontrar los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia, con el fin de poder sintetizar nuevos productos para hacerle frente.<sup>3</sup> Además, en los últimos años los virus han afectado de forma muy importante a la salud y la economía mundial. Ejemplo de ello son los brotes de gripe A, de ébola y la actual pandemia debida al SARS-CoV<sub>2</sub>. El desconocimiento de estos nuevos patógenos hace que en una primera etapa no haya un tratamiento adecuado, dejando panoramas tan desoladores como el que estamos viviendo con miles de muertos alrededor del mundo. Debido a esto, es necesario que la investigación dedique mayores esfuerzos a la búsqueda de nuevos productos antivirales y antibacterianos con el fin de reducir el impacto de futuros brotes.

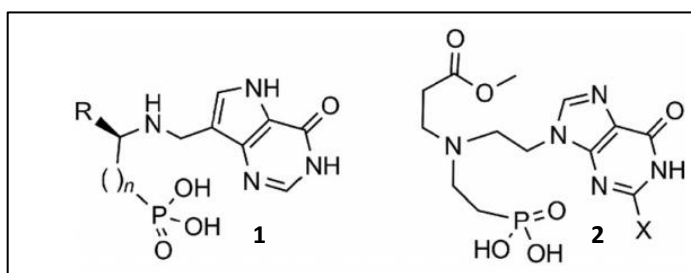
En la búsqueda de nuevos antivirales y antibióticos tienen gran interés los **azanucleósidos**. Se trata de análogos de nucleósidos en los que el anillo de furanosa es sustituido por una cadena o un anillo que contiene nitrógeno (Figura 1).<sup>4</sup>



**Figura 1.** Diferencia estructural entre nucleósido y azanucleósido.<sup>4</sup>

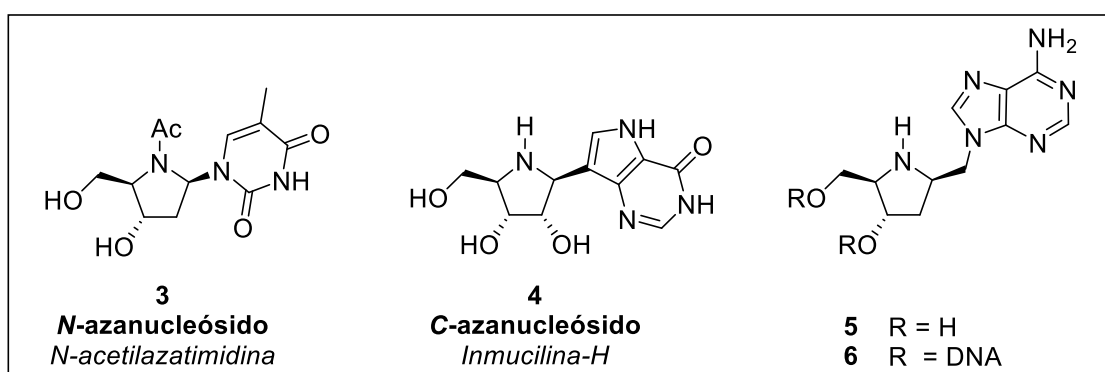
Muchos azanucleósidos poseen actividades biológicas interesantes. Por ejemplo, algunos son inhibidores de la enzima PNPR<sup>5</sup> (fosforilasas de nucleósidos de purina), lo que les convierte en un tratamiento potencial de enfermedades tales como linfomas, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis reumática, etc. También, algunos análogos son inhibidores de enzimas tales como las fosforilasas de nucleósidos de pirimidina<sup>5-8</sup>, las transferasas de oxopurina fosforribosilo (figura 2)<sup>9,10</sup>, la fosforilasa de metiladenosina (MTAP) y la nucleosidasa de metiladenosina (MTAN)<sup>11-14</sup>, jugando así un papel

importante en tratamientos potenciales para diversos tipos de cánceres y como antibacterianos. En cuanto a su actividad antiviral, varios análogos de azanucleósidos son inhibidores de la transcriptasa inversa,<sup>15,16</sup> por lo que presentan actividad anti-VIH. Otros inhiben la replicación del ARN del virus de la Hepatitis C.<sup>17</sup> Algunos también presentan actividad contra los virus de la vacuna<sup>18</sup> o el herpes<sup>19</sup> o inhiben la expresión del oncogen vírico HTLV1.<sup>20</sup>



**Figura 2.** Azanucleósidos activos frente a malaria.<sup>10</sup>

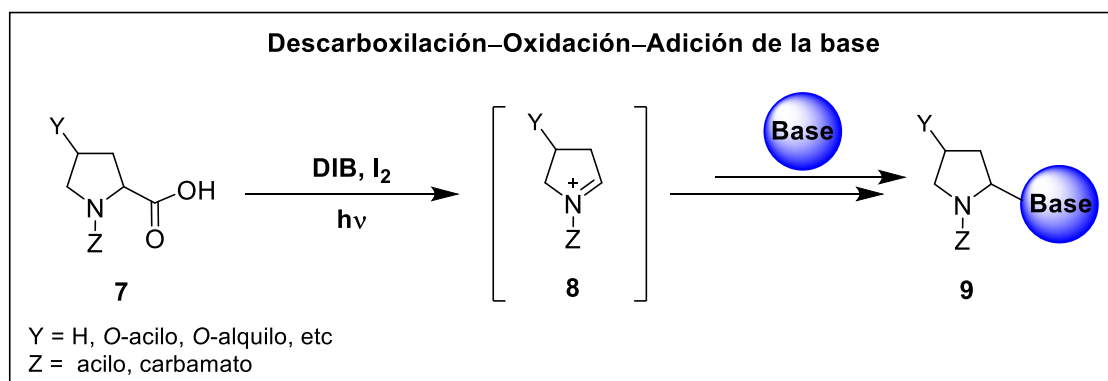
Entre los azanucleósidos bioactivos mencionados se encuentran: los *N*-azanucleósidos, donde un iminoazúcar va unido a una base nitrogenada (Figura 3), y los *C*-azanucleósidos, donde el iminoazúcar se une a un anillo heteroaromático.<sup>21,22</sup> Un ejemplo de *N*-azanucleósido es el análogo de timidina **3**, que permite estabilizar oligonucleótidos frente a las enzimas que los degradan, como las 3'-exonucleasas.<sup>23</sup> Como ejemplo de *C*-azanucleósido se encuentra la inmucilina-H **4**,<sup>24</sup> que se está estudiando clínicamente para tratar enfermedades con proliferación descontrolada de células-T. Un caso intermedio es el del análogo de adenosina **5**, que incorporado al DNA (estructura **6**), produce una fuerte inhibición de la glicosidasa del DNA MutY.<sup>25</sup>



**Figura 3.** Azanucleósidos con importante actividad biológica.<sup>4</sup>

El grupo de Síntesis de Fármacos y Compuestos Bioactivos (SFCB) del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha desarrollado una vía de síntesis directa de *N*-azanucleósidos a partir

de precursores económicos y estables.<sup>4</sup> Esta vía de síntesis consiste en la descarboxilación radicalaria de derivados de aminoácidos cíclicos (**7**) (por ejemplo, la prolina), generando un ion iminio intermedio (**8**) que es atrapado por una base nitrogenada sililada (purina, pirimidina, derivados de benzotriazoles, etc). De esta manera se obtienen los azanucleósidos de interés (**9**), en condiciones de reacción suaves y buenos rendimientos.



**Esquema 1.** Síntesis de *N*-Azanucleósidos a partir de  $\alpha$ -aminoácidos.

La versatilidad de la reacción permite, variando los aminoácidos de partida y la base nitrogenada sililada utilizada en el proceso de adición, generar una interesante colección de compuestos para estudios estructura-actividad. Pero hasta ahora, no se había estudiado la actividad antiviral de los azanucleósidos obtenidos.

## **OBJETIVOS.**

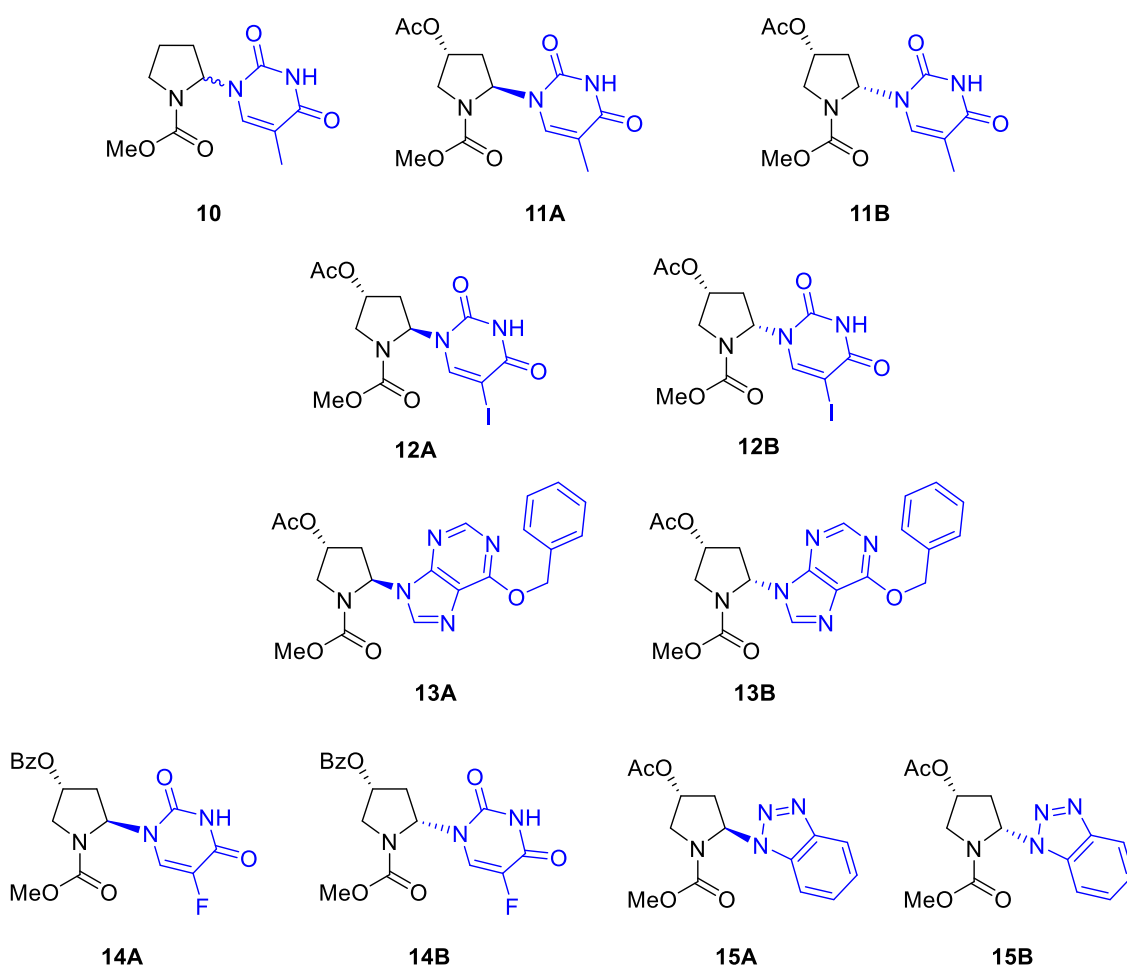
- Resintetizar varios análogos de *N*-azanucleósidos, a partir de derivados de los aminoácidos comerciales L-prolina y L-*trans*-hidroxiprolina, aplicando la metodología explicada anteriormente. Se trata de poner en práctica protocolos sencillos de síntesis, así como técnicas de extracción básicas en química orgánica.
- Purificar los productos obtenidos haciendo uso de las técnicas cromatográficas adecuadas.
- Comprobar la estructura de los compuestos utilizando principalmente Resonancia Magnética Nuclear y espectrometría de masas. También se utilizarán su análisis elemental, actividad óptica, espectro infrarrojo, etc.
- Preparar muestras para la realización de los correspondientes ensayos antivirales y antimicrobianos.
- Interpretar los resultados obtenidos del primer cribado de actividades y extraer relaciones estructura-actividad.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

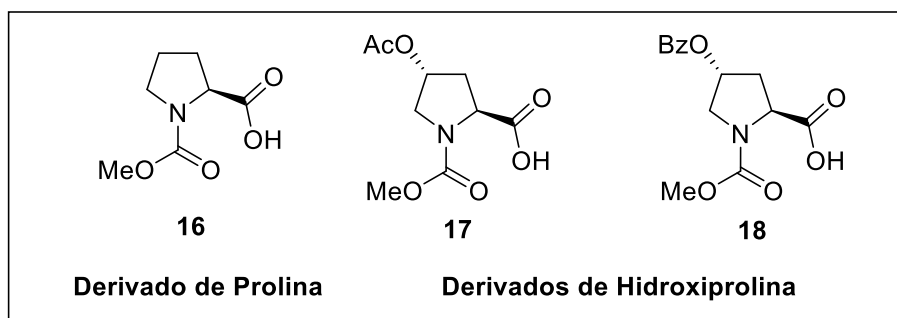
En un trabajo anterior del grupo se describía una metodología para preparar *N*-azanucleósidos, pero no se determinaron sus actividades antimicrobianas. Por ello, se han resintetizado seis compuestos optimizando las condiciones, con el fin de contar con suficientes cantidades de compuestos puros para los ensayos biológicos. Concretamente se ha planteado la síntesis de los derivados de timina (**10** y **11A/B**), yodo- y flúor-uracilo (**12A/B** y **14A/B**), *O*-bencil-adenina (**13A/B**) y benzotriazol (**15A/B**), incluidos en la Figura 4.

Con objeto de poder extraer relaciones estructura-actividad, se han elegido azanucleósidos en las que varían dos aspectos: por un lado, la base nitrogenada (pirimidinas, purinas y benzotriazol) y, por otro lado, el anillo pirrolidínico, el cual no presenta sustituyentes en el compuesto **10**, mientras en el resto de azanucleósidos presenta sustituido el carbono C-4 (OAc o OBz).



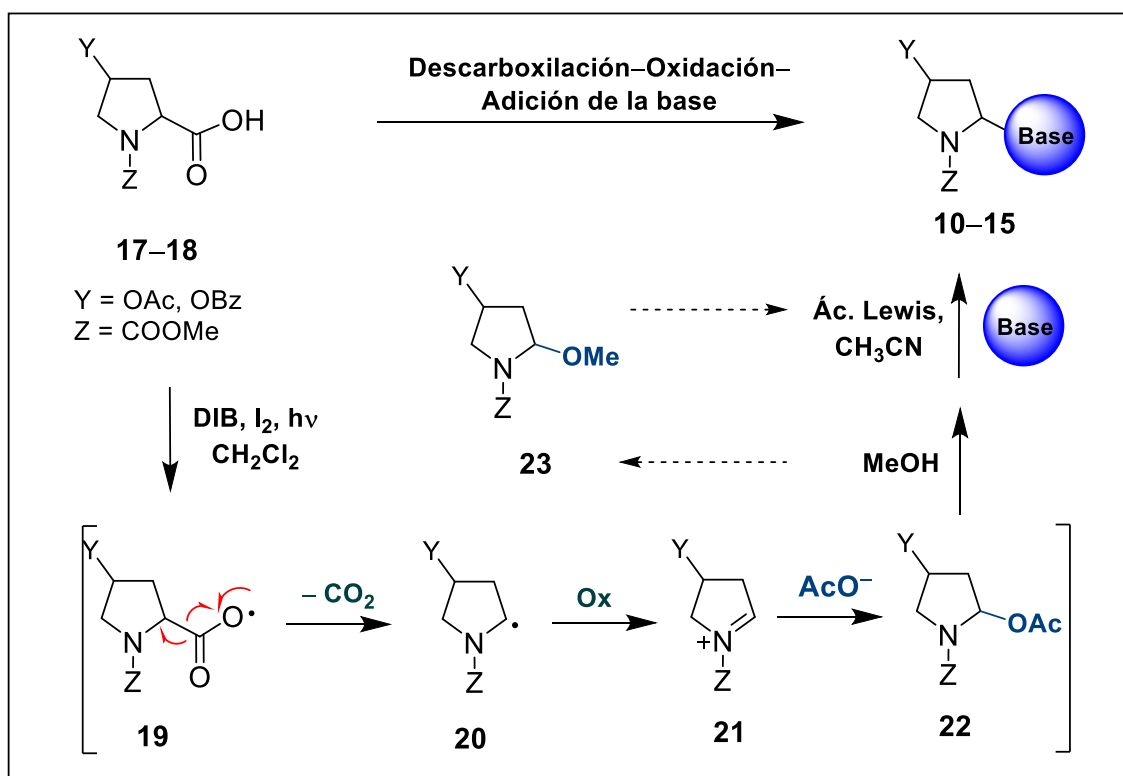
**Figura 4.** Productos sintetizados para estudios antivirales.

Para sintetizar los derivados de azanucleósidos elegidos se ha empleado la metodología ya comentada en la introducción, utilizando como precursores en el proceso los derivados de prolina e hidroxiprolina **16–18** (Figura 5) disponibles en el laboratorio.



**Figura 5.** Precursores derivados de L-prolina y de L-trans-hidroxiprolina.

Los tres sustratos se sometieron al proceso secuencial **descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada** mostrado en el Esquema 2.



**Esquema 2.** Descarboxilación–oxidación–adición de una base nitrogenada sililada.

Así, los precursores se trataron con DIB y yodo, en presencia de luz visible. Bajo esas condiciones, el grupo carboxilo generó un *O*-radical (**19**, **Esquema 2**), que evolucionó por escisión del enlace  $\alpha, \beta$ . El *C*-radical resultante (**20**), en las condiciones de reacción, se oxidó formándose un ion iminio (**21**), que finalmente fue atrapado por iones acetato del medio de reacción para dar los *N,O*-acetales (**22**). Entonces se añadió

MeOH a la reacción. Este alcohol reacciona con los *N,O*-acetales (**22**) formando  $\alpha$ -metoxipirrolidinas (**23**), intermedios de reacción más estable, y, además, contribuye a la eliminación del exceso de DIB y I<sub>2</sub> de la descarboxilación. Tras una hora de reacción se procedió a sustituir el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por un disolvente más polar como es el CH<sub>3</sub>CN (para favorecer la solubilidad de las bases nitrogenadas sililadas) y, finalmente, se añadió un ácido de Lewis, para regenerar el ion iminio intermedio (**21**) y atraparlo con la base nitrogenada sililada comercial o disponible en el laboratorio.

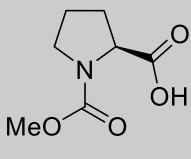
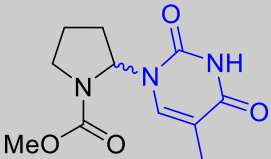
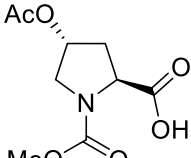
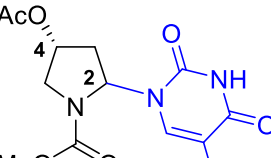
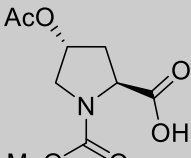
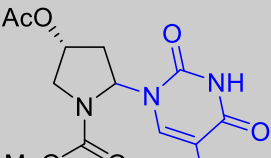
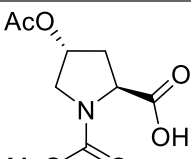
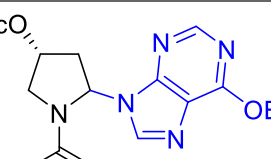
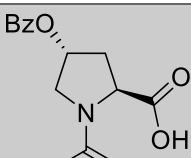
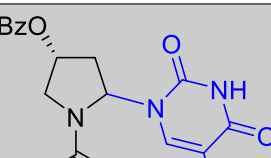
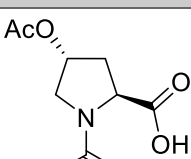
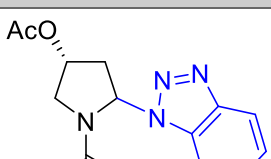
Los resultados obtenidos en el proceso de síntesis se resumen en la Tabla 1.

Como puede observarse en todos los casos el proceso transcurrió de la forma esperada obteniéndose rendimientos globales entre 60-85 %, lo que demuestra que, aunque el proceso consta de varios pasos en cadena, todos ellos transcurren con excelentes rendimientos.

El compuesto **10**, derivado de prolina, se obtuvo como mezcla racémica. Con los otros dos sustratos de partida, que presentan un centro estereogénico en el anillo de pirrolidina, se observó cierta estereoselectividad entre los productos aislados predominando siempre el isómero *2,4-cis*.

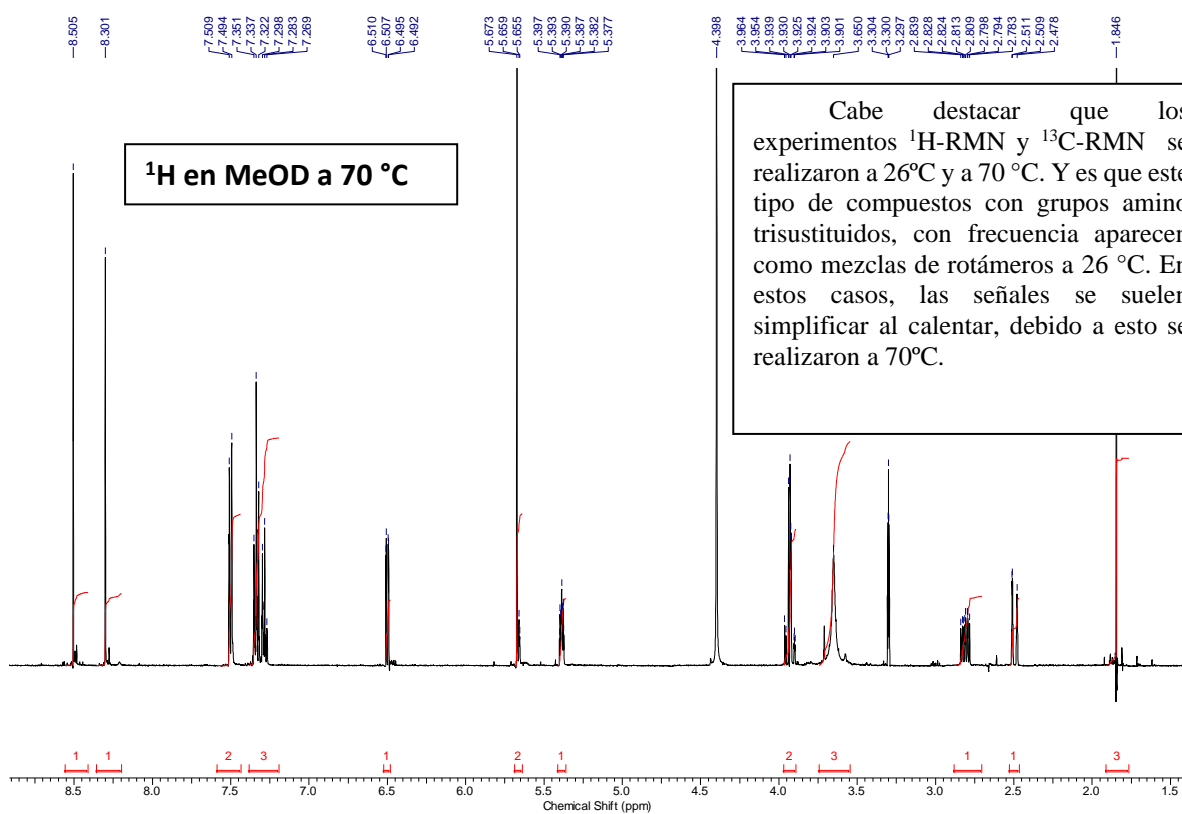
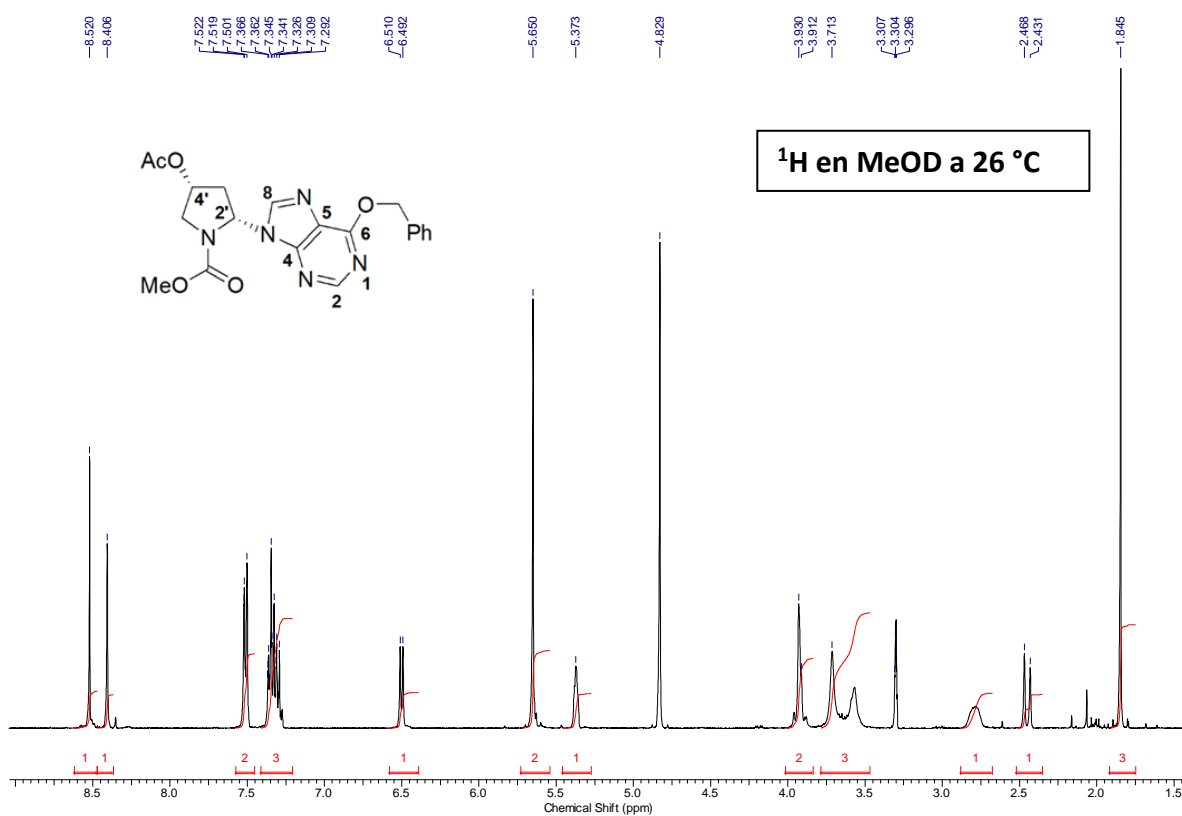
Las estructuras de todos los compuestos sintetizados se confirmaron mediante técnicas de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Como la mayoría de los carbamatos derivados de prolina, nuestros azanucleósidos se presentan como mezclas de rotámeros a temperatura ambiente, por lo que hubo que recurrir a realizar los espectros de RMN a 70 °C para mejorar su caracterización. En este caso se simplifican las señales y se facilita mucho la interpretación de los espectros.

**Tabla 1.** Resultados del proceso de síntesis.

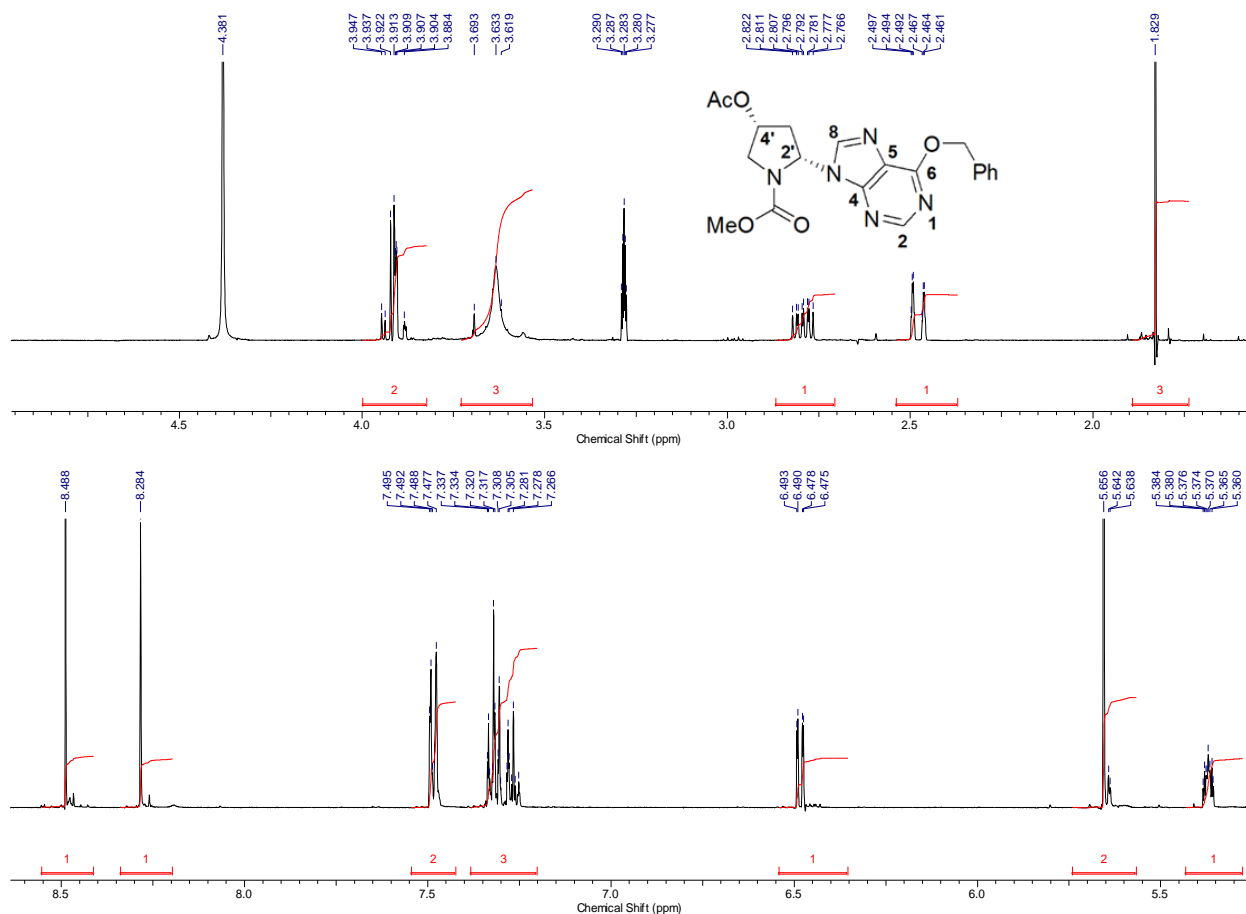
Precursor	Nucleófilo	Productos	Rendimiento
 <p><b>16</b></p>	Trimetilsilil-timina	 <p><b>10</b></p>	83%
 <p><b>17</b></p>	Trimetilsilil-timina	 <p><b>11</b></p>	A. 2,4- <i>trans</i> : 39% B. 2,4- <i>cis</i> : 48%
 <p><b>17</b></p>	Trimetilsilil-5-iodouracilo	 <p><b>12</b></p>	A. 2,4- <i>trans</i> : 36% B. 2,4- <i>cis</i> : 47%
 <p><b>17</b></p>	Trimetilsilil-6-benciloxipurina	 <p><b>13</b></p>	A. 2,4- <i>trans</i> : 31% B. 2,4- <i>cis</i> : 34%
 <p><b>18</b></p>	Trimetilsilil-5-fluorouracilo	 <p><b>14</b></p>	A. 2,4- <i>trans</i> : 27% B. 2,4- <i>cis</i> : 40%
 <p><b>17</b></p>	Trimetilsilil-benzotriazol	 <p><b>15</b></p>	A. 2,4- <i>trans</i> : 33% B. 2,4- <i>cis</i> : 43%

Como ejemplo, se comenta a continuación la caracterización del compuesto **13B**. En los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de este compuesto se distinguen dos zonas claramente diferenciadas. Una de ellas corresponde a las señales del anillo de pirrolidina ( $\delta_{\text{H}}$  1-6 y  $\delta_{\text{C}}$  40-70) y la otra a la base nitrogenada ( $\delta_{\text{H}}$  8 y  $\delta_{\text{C}}$  120-160), actuando como separación entre ambas el  $\text{CH}_2$  del grupo bencilo ( $\delta_{\text{H}}$  5.67 y  $\delta_{\text{C}}$  69.8).

# <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 13B.



## Ampliaciones a 70 °C

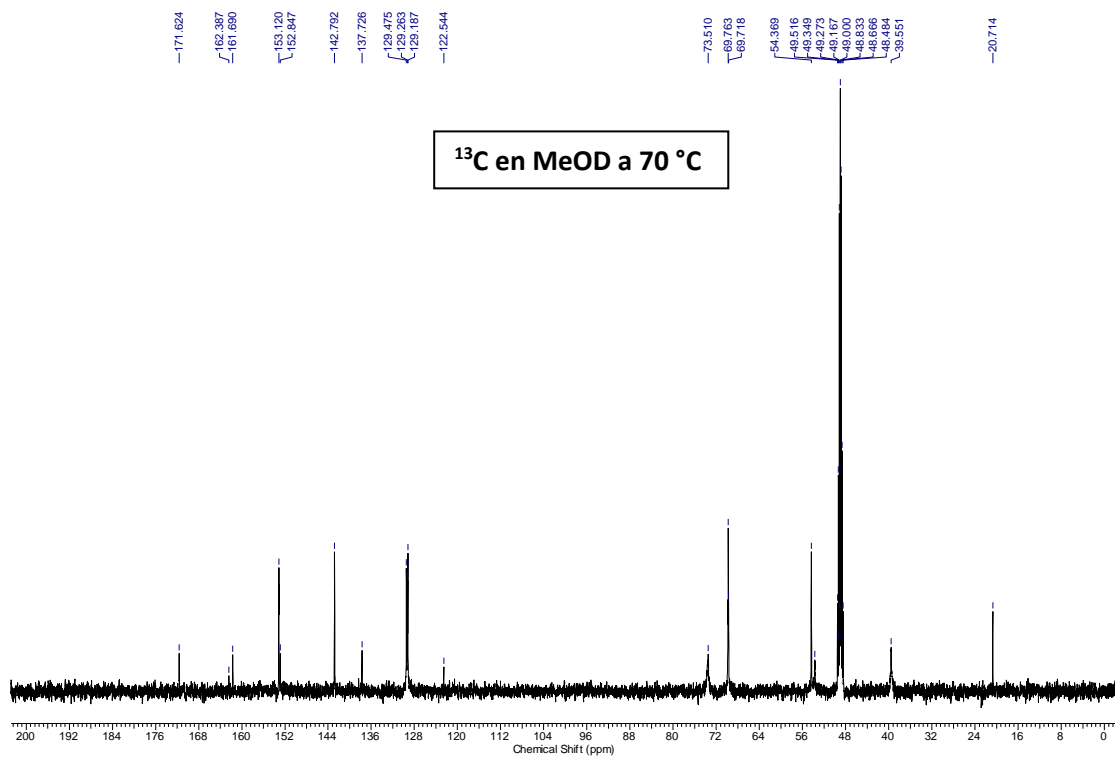
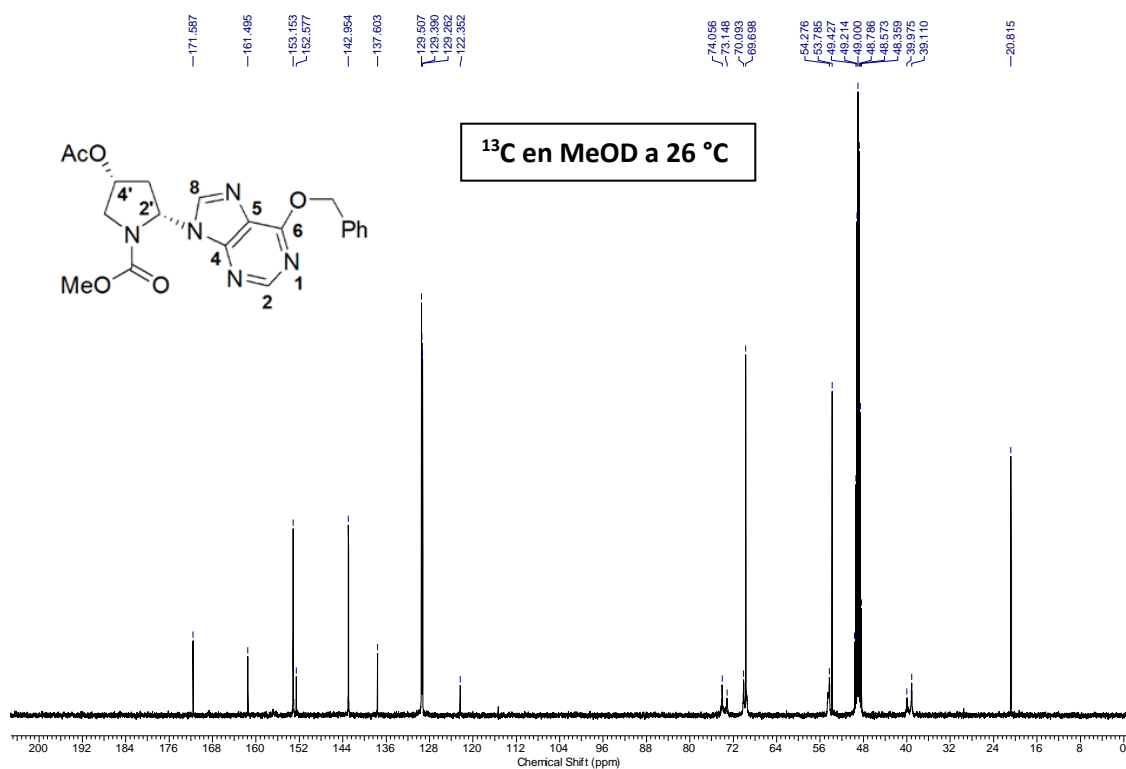


**Tabla 2.** Caracterización  $^1\text{H}$ -RMN

Señal $^1\text{H}$ -RMN	Comentario
1.86 (s, 3H, COMe)	Singlete que integra 3H. Debido a su desplazamiento químico, se trata del metilo unido a un carbonilo por lo tanto se corresponden a los hidrógenos del grupo COMe.
2.51 (dd, $J = 2.9, 15.1$ Hz, 1H, 3'-Hb)	Doblete de doblete que integra por 1H alifático. Por su multiplicidad y desplazamiento se sospecha se trata de uno de los protones en posición 3' del anillo pirrolidínico. Los experimentos COSY y HSQC, como veremos, demuestran que la asignación es correcta.
2.82 (ddd, $J = 5.5, 7.4, 15.0$ Hz, 1H, 3'-Ha)	Doblete de doblete de doblete que integra por 1H alifático. Por su multiplicidad y desplazamiento debe tratarse del otro protón en posición 3' del anillo pirrolidínico.
3.65 (s, 3H, OMe)	Singlete que integra 3H. Su desplazamiento químico se corresponde un metilo unido a un heteroátomo, por lo tanto se trata de los hidrógenos del grupo OMe.
3.92 (ddd, $J = 2.0, 12.3$ Hz, 1H, 5'-Ha)	Doblete de doblete de doblete que integra por 1H alifático. Por su multiplicidad y desplazamiento debe tratarse de uno de los protones en posición 5' del anillo pirrolidínico.

3.96 (dd, $J = 4.6, 12.3$ Hz, 1H, 5'-Hb)	Doblete de doblete que integra por 1H alifático. Por su multiplicidad y desplazamiento se trata del otro protón en posición 5'. Se comprueba con el COSY.
5.39 (m, $J = 1.9, 1.9, 4.5, 4.5$ Hz, 1H, 4'-H)	Multiplete que integra por un hidrogeno alifático. Su multiplicidad y desplazamiento sugieren que se trata del hidrogeno en posición 4' del anillo pirrolidínico.
5.67 (s, 2H, OCH <sub>2</sub> Ph)	Singlete que integra 2H. Debido a su desplazamiento químico y a que se trata de un singlete, la señal se corresponde a los hidrógenos del grupo protector O-CH <sub>2</sub> -Ph.
6.51 (dd, $J = 1.5, 7.5$ Hz, 1H, 2'-H)	Doblete de doblete que integra por 1H alifático. Por su desplazamiento químico y su multiplicidad se trata del hidrogeno en posición 2' del anillo pirrolidínico, bastante desapantallado debido a la acción de los dos nitrógenos contiguos. Presenta señal COSY con los dos protones 3'.
7.28 (dd, $J = 7.3, 7.3$ Hz, 1H, 4-Ph-H)	Doblete de doblete que integra por 1H alifático. Debido a su multiplicidad y su desplazamiento químico se deduce que se trata del hidrógeno unido a la posición 4 del anillo aromático.
7.34 (dd, $J = 7.1, 7.7$ Hz, 2H, 3,5-Ph-H)	Doblete de doblete que integran 2H alifáticos equivalentes. Por su multiplicidad y desplazamiento químico se deduce que se tratan de los hidrógenos equivalentes unidos a la posición 3 y 5 del anillo aromático.
7.51 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2,6-Ph-H)	Doblete que integra 2H alifáticos equivalentes. Atendiendo a su multiplicidad y desplazamiento químico, se deduce que se tratan de los hidrógenos equivalentes unidos a la posición 2 y 6 del anillo aromático.
8.30 (s, 1H, 8-H)	Singlete que integra 1H alifático. Por su desplazamiento químico y debido a que se trata de un singlete, la señal corresponde al hidrogeno unido en la posición 8 de la purina.
8.51 (s, 1H, 2-H)	Singlete que integra 1H alifático. Debido a su desplazamiento químico y debido a que se trata de un singlete, la señal corresponde al hidrogeno unido en la posición 2 de la purina.

# <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 13B.

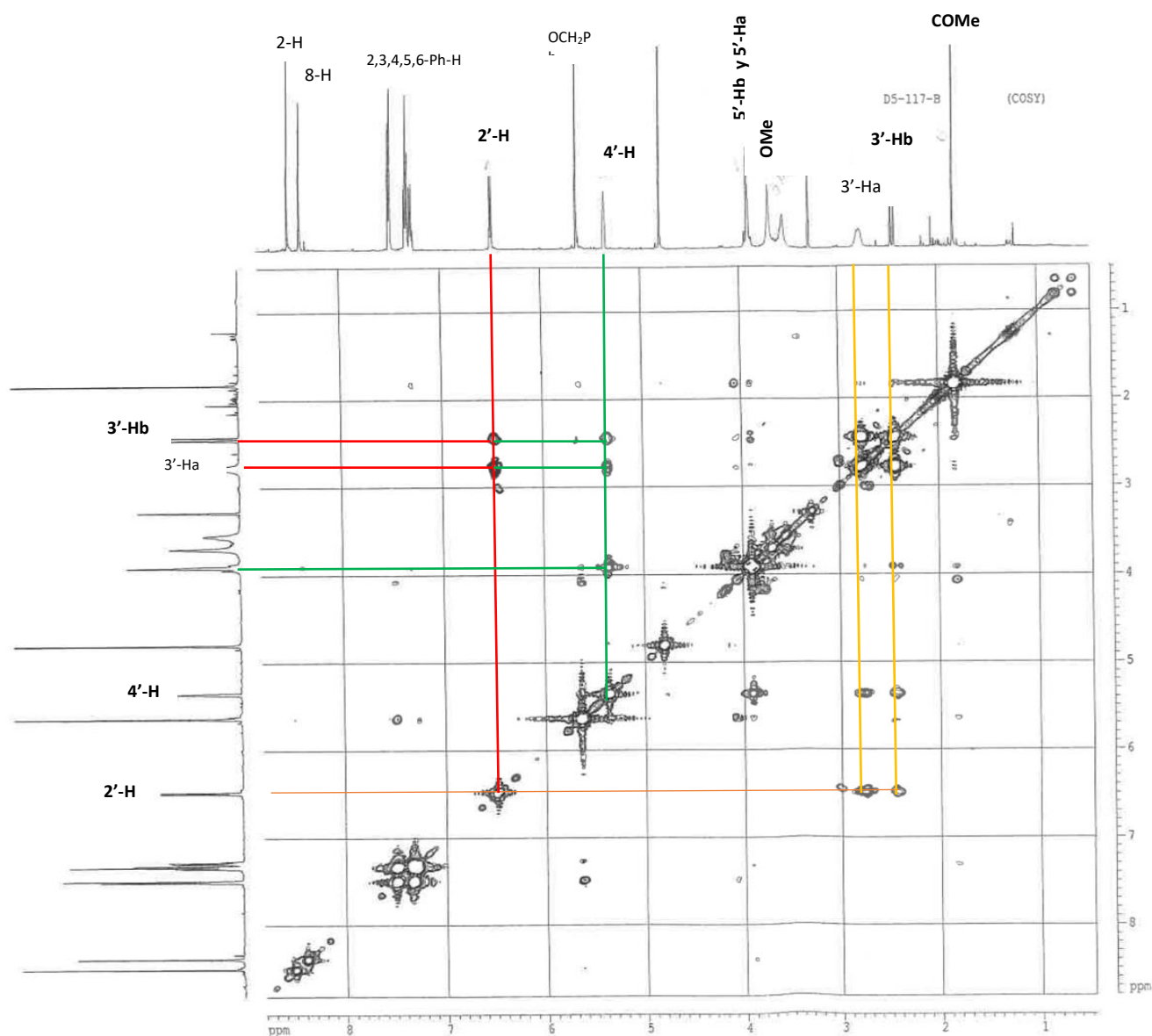




**Tabla 3.** Caracterización  $^{13}\text{C}$ -RMN

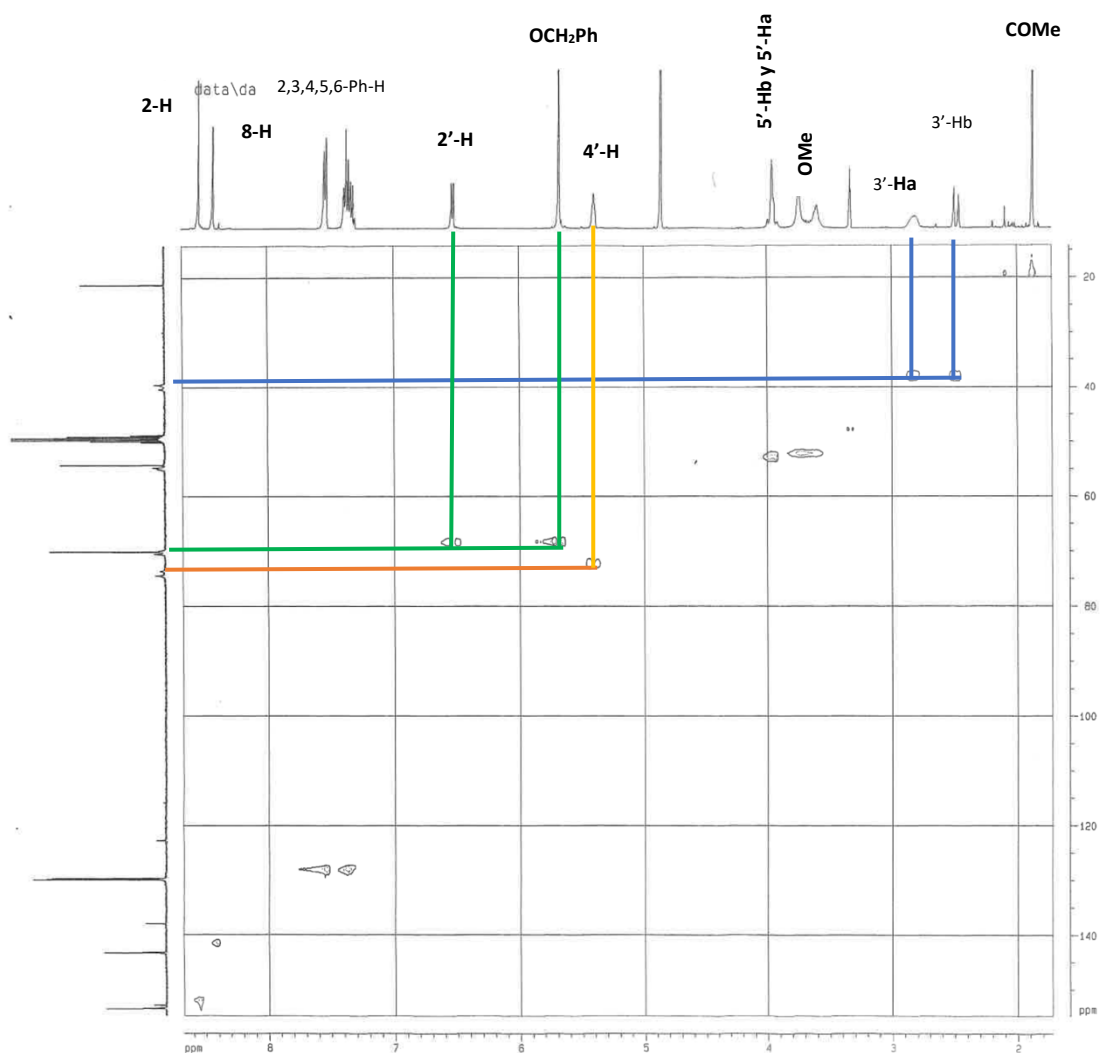
Señal $^{13}\text{C}$ -RMN (ppm)	Comentario
21.7 (CH <sub>3</sub> , COMe)	Su $\delta_c$ indica que la señal se trata del metilo unido al carbonilo del grupo OAc.
39.6 (CH <sub>2</sub> , 3'-C)	Se trata de un CH <sub>2</sub> alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 3'-C. En el HSQC se comprueba su relación con los protones 3'.
53.7 (CH <sub>3</sub> , OMe)	Su $\delta_c$ indica que se trata de un metilo unido a un heteroátomo por lo que se corresponde con el CH <sub>3</sub> unido al oxígeno.
54.4 (CH <sub>2</sub> , 5'-C)	Se trata de un CH <sub>2</sub> alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 5'-C.
69.76 (CH, 2'-C)	CH alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 2'-C pues su desplazamiento químico corresponde a un C-N.
69.81 (CH <sub>2</sub> , PhCH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub> alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del CH <sub>2</sub> del grupo O-CH <sub>2</sub> -Ph. Se encuentra desapantallado por la electronegatividad del oxígeno.
73.5 (CH, 4'-C)	Por su desplazamiento químico se trata del 4'-C pues su desplazamiento químico corresponde a un C-O.
122.5 (C, 5-C)	C alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 5-C del anillo aromático.
129.2 (2 × CH, Ph-C)	Dos CH alifáticos equivalentes pertenecientes al grupo fenilo.
129.4 (2 × CH, Ph-C)	Dos CH alifáticos equivalentes pertenecientes al grupo fenilo.
129.5 (CH, 4-Ph-C)	CH alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 4-Ph-C.
137.7 (C, 1-Ph-C)	C alifático que corresponde al 1-Ph-C del grupo fenilo.
142.8 (CH, 8-C)	CH alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 8-C ya que se encuentra desapantallado por la acción del nitrógeno contiguo.
152.8 (C, 4-C)	C alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del 4-C ya que se encuentra desapantallado por la acción de los dos nitrógenos.
153.1 (CH, 2-C)	C alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del carbono en posición 2 de la base nitrogenada. El desapantallamiento es debido a la acción del nitrógeno.
161.0 (C, MeOCO)	Su $\delta_c$ indica que se trata del carbonilo del grupo MeOCO.
162.4 (C, 6-C)	C alifático cuyo $\delta_c$ indica que se trata del carbono en posición 6 de la base nitrogenada. Se debe al desapantallamiento producido por los nitrógenos y los dobles enlaces.
171.6 (C, MeCO)	Su $\delta_c$ indica que se trata del carbonilo del grupo MeCO.

## COSY del compuesto 13B.



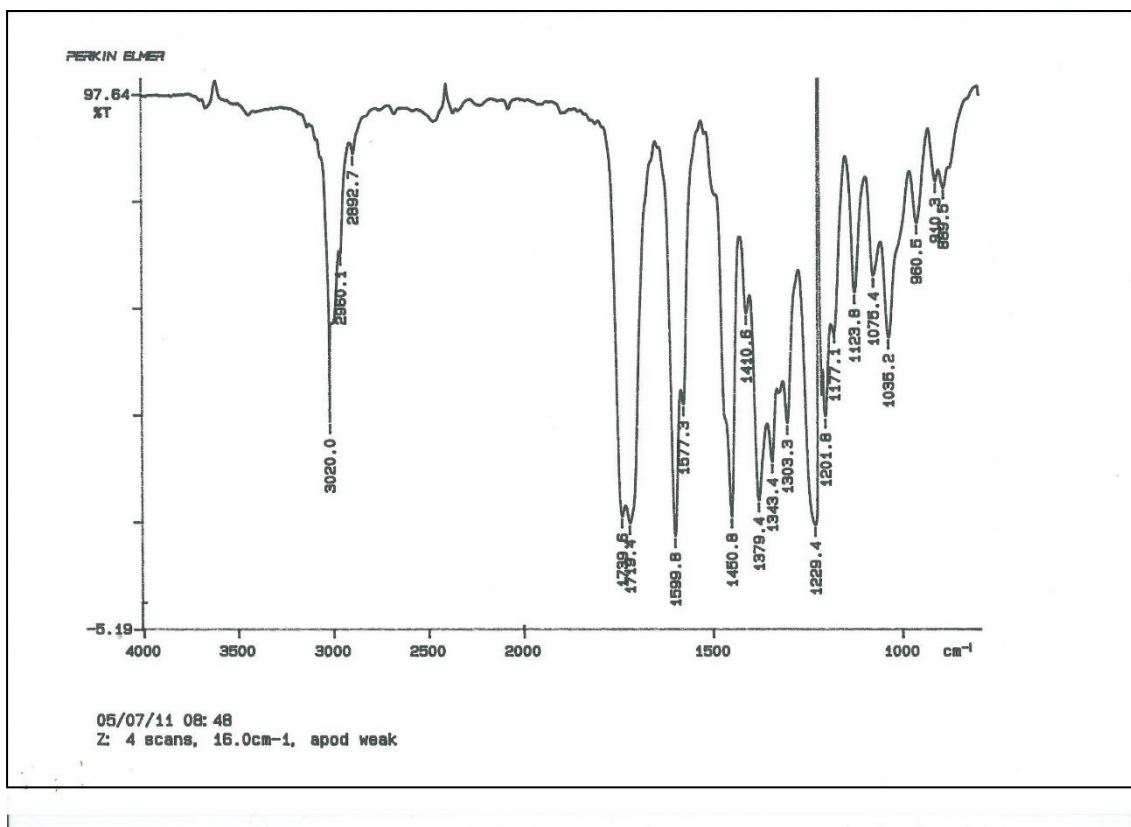
En el experimento COSY se observan dos espectros de protón, uno en horizontal y otro en vertical. Las señales de COSY establecen la relación entre cada protón de la molécula y los protones contiguos o geminales con los que se acopla lo que permite establecer la secuencia  $CH_n$  de la en la estructura.

## HSQC del compuesto 13B.



En el experimento HSQC se ve el experimento de protón en horizontal y el de carbono en vertical. Las señales de HSQC relacionan cada carbono con sus respectivos protones, con lo que nos permite asignar correctamente las señales de ambos espectros en combinación con el COSY.

## IR del compuesto 13B.



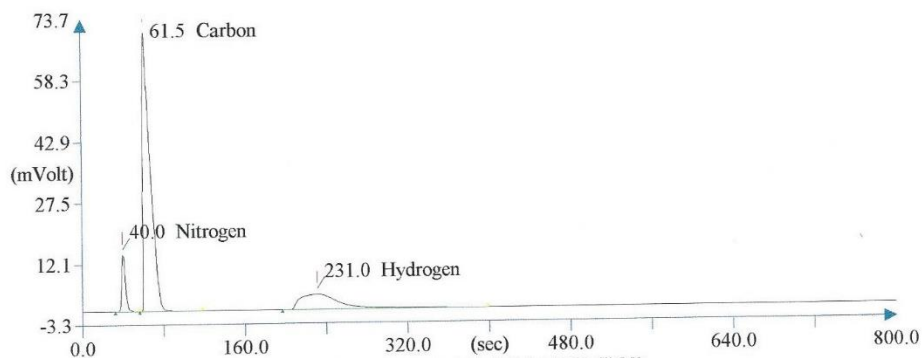
En el espectro de infrarrojo se observan bandas de absorción características de cada grupo funcional presente en la molécula. En este caso destacan las bandas de absorción en 1739 y en 1719  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los carbonilos.

## Análisis elemental del compuesto 13B.

### Servicio de Análisis Elemental



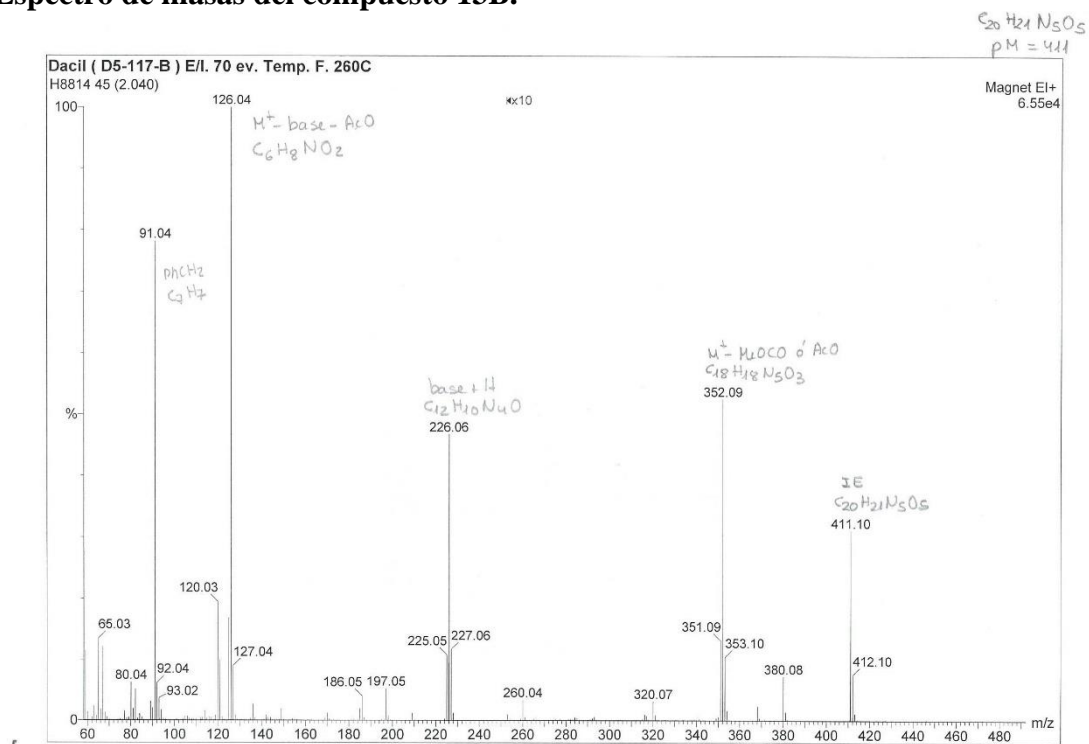
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
Instituto de Productos Naturales y Agrobiología  
Avda. Francisco Sánchez, 3  
38206 La Laguna  
S/C de Tenerife (España)  
Tfno. 922 25 21 44 - 922 25 32 48  
FAX 922 26 01 35



Element Name	Ret. Time	Area	BC	Area ratio	K factor
Nitrogen → 17,02	16.7092	40	595454 FU	9.778187	.170004E+01
Carbon → 58,39	58.5783	62	5822465 FU	1.000000	.474964E+01
Hydrogen → 5,14	5.4140	231	1682131 RS	3.461363	.149034E+01

El análisis elemental nos proporciona el porcentaje de nitrógeno (16,71%), carbono (58,57%) e hidrógeno (5,41%) del compuesto. Estos porcentajes concuerdan con la fórmula empírica propuesta para el *N*-azanucleósido **13B**.

## Espectro de masas del compuesto 13B.



En lo relativo a la espectrometría de masas, en el espectro realizado mediante la técnica de impacto electrónico se observan varios picos. El más alto corresponde al ion molecular del compuesto (411 g/mol), y el resto a pérdidas de fragmentos característicos. Por ejemplo, el pico observado a 126 corresponde al ion molecular menos la base nitrogenada y el grupo acetato.

## Evaluación de la actividad biológica.

Una vez caracterizados e identificados los distintos compuestos, se realizó la evaluación biológica de los mismos con el fin de averiguar si poseían actividad antiviral. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Universidad de Lovaina (Bélgica).

Dado el interés del covid y su transmisión a gatos y otros felinos, se realizó un estudio con un coronavirus relacionado, pero de menor transmisibilidad. Para ello se infectaron células de riñón de gato Crandell-Rees (CRFK) con coronavirus felino. En primer lugar, se determinó la citotoxicidad de los compuestos sobre las células CRFK, por medio de la CC50, que es la concentración que reduce la viabilidad de las células en un 50 %. La viabilidad se determinó con el ensayo colorimétrico MTS. Las células viables oxidan el compuesto a formazán y la intensidad del color se mide en un colorímetro. Los compuestos no mostraron efectos tóxicos a dosis superiores a 100 µg/mL. Comprobado este punto, se trataron las células infectadas con distintas concentraciones de los compuestos, para determinar la EC50, es decir, la concentración necesaria para reducir en un 50 % la citopatogenicidad inducida por el virus. De nuevo, la viabilidad celular se midió con el ensayo MTS basado en formazán. Desafortunadamente, los compuestos ensayados no mostraron actividad en este ensayo.

**Tabla 4.** Resultados evaluación contra el coronavirus felino en células CRFK.

Compuestos	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µg/ml)
<b>10</b>	>100	>100
<b>11A</b>	>100	>100
<b>11B</b>	>100	>100
<b>12A</b>	>100	>100
<b>12B</b>	>100	>100
<b>11A</b>	>100	>100
<b>13B</b>	>100	>100
<b>14A</b>	>100	>100
<b>14B</b>	>100	>100
<b>15B</b>	>100	>100
<b>HHA</b>	>100	44.7
<b>UDA</b>	>100	9.7

EC<sub>50</sub><sup>A</sup>. Concentración necesaria para producir citotoxicidad en el 50% de las células.

EC<sub>50</sub><sup>B</sup>. Concentración necesaria para eliminar el 50% del virus.

Células CRFK: Células de riñón de gato Crandell-Rees.

A continuación, se probaron tres virus, patógenos para el ser humano, que infectaron células humanas HeLa (línea de células de tumor humano de ovario, de rápido

crecimiento). Primero se determinó que los compuestos no presentaban citotoxicidad sobre estas células (alteraciones detectables de la morfología celular) a concentraciones iguales o superiores a 100 µg/mL. Luego se realizaron las actividades antivirales contra el virus de la estomatitis vesicular, coxsakie B4 y virus respiratorio sincitial. Para ello se determinó la EC50, usando como controles positivos Ribavirina y (S)-DHPA, y como control negativo a la Brivudina.

**Tabla 5.** Resultados evaluación antiviral en cultivos celulares HeLa .

Compuestos	Concentración mínima citotóxica <sup>A</sup> (µg/mL)	EC <sub>50</sub> <sup>B</sup> (µg/ml)		
		Virus estomatitis vesicular	Virus coxsakie B4	Virus respiratorio sincitial
<b>10</b>	>100	>100	>100	>100
<b>11A</b>	>100	>100	>100	>100
<b>11B</b>	>100	>100	>100	>100
<b>12A</b>	>100	100	>100	>100
<b>12B</b>	>100	>100	>100	>100
<b>13A</b>	<b>100</b>	<b>&gt;20</b>	<b>&gt;20</b>	<b>&gt;20</b>
<b>13B</b>	≥100	>100	>100	>100
<b>14A</b>	>100	>100	>100	>100
<b>14B</b>	>100	>100	>100	>100
<b>15B</b>	>100	>100	>100	>100
<b>Brivudin (µM)</b>	>250	>250	>250	>250
<b>(S)-DHPA (µM)</b>	>250	30	>250	30
<b>Ribavirin (µM)</b>	>250	30	150	10

Como puede observarse en la tabla, el compuesto **13A** muestra unos prometedores resultados, superiores incluso a la ribavirina. El que los otros compuestos no presentaran actividad sugiere que el tener una base púrica es necesario para la actividad. Por otra parte, el isómero **13B** no resultó activo, lo que indica que la configuración del compuesto también es clave para la actividad. Estos estudios se seguirán desarrollando en un futuro.



## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1. Técnicas cromatográficas.**

- **Cromatografía en capa fina.**

La evolución de las reacciones y cromatografías tanto en columna como rotatoria se monitorizaron utilizando placas de gel de sílice Merck (60 F254 de 0,25 mm de espesor). Los eluyentes empleados para realizar la cromatografía se especifican en cada caso. El revelado de las mismas se realizó de dos formas: por exposición a la luz ultravioleta a una longitud de 254 nm y por pulverización con una disolución de permanganato potásico (por cada litro de agua, 10 g de  $\text{KMnO}_4$ , 66.7 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y 0.85 g NaOH) y posterior calentamiento.

- **Cromatografía en columna.**

Se empleó esta técnica para purificar los crudos de reacción, utilizando gel de sílice Merck 60 (0,063–0,2 mm) con gradientes de polaridad de los disolventes adecuados para cada crudo.

- **Cromatografía rotatoria.**

Se realiza con un aparato llamado cromatotrón que utiliza un sistema de placas circulares en los que la mezcla a resolver se separa por un proceso de cromatografía centrífuga. Se utilizó una placa circular de 1 mm de grosor de gel de sílice Merck (60 PF254) con yeso.

### **2. Técnicas de caracterización.**

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

Los experimentos de RMN  $^1\text{H}$  y de RMN  $^{13}\text{C}$  se realizaron a 26 y 70°C en un equipo Bruker, modelo Avance II 500, a 500 MHz y 125.7 MHz, respectivamente. Como disolvente se empleó metanol deuterado. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm), con relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

- **Análisis Elemental.**

Se utilizó en un analizador Fisons modelo EA 1108 CHNS.

- **Espectrometría infrarroja.**

Se realizó en un aparato Perkin-Elmer modelo 681/FTIR utilizando células de 0.2 mm. El producto se disolvió en cloroformo seco sobre gel de sílice Merck que tenía indicador de humedad.

### 3. Procedimiento sintético experimental.

- **Procedimiento general del proceso de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada.**

A una solución del derivado de prolina o de hidroxiprolina correspondiente (0.2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2 mL) se le añadió I<sub>2</sub> (25 mg, 0.1 mmol) y DIB (129 mg, 0.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó tres horas a 25 °C bajo irradiación con luz visible. Entonces, se le añadió MeOH (0.25 mL) y se continuó con la agitación durante 30 minutos. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se redisolvió en MeCN seco (2 mL). La mezcla se enfrió hasta 0°C, se añadió BF<sub>3</sub>•OEt<sub>2</sub> (51 mL, 0.4 mmol) y se le añadió la base nitrogenada correspondiente en cada caso. Después de agitar durante una hora, la mezcla se vertió sobre una solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso al 10% y de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (1:1) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante una columna cromatográfica de silica gel (hexano/EtOAc) dando lugar los azanucleósidos (**10–15**).

- **1-(*N*-metoxicarbonil-2-pirrolidinil)timina (10).** Obtenido como mezcla racémica a partir de *N*-metoxicarbonil-*L*-prolina (**16**) y bis(trimetilsilil)timina de acuerdo con el procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada.

**1-(*N*-metoxicarbonil-2-pirrolidinil)timina (10).** Dos rotámetros 26 °C (1.5:1); un rotámetro a 70 °C; solido cristalino; mp 219–221 °C (en MeOH); IR (neto)  $\nu_{\text{máx}}$  3394, 1703, 1684, 1379, 1224 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (d-DMSO, 500 MHz, 70 °C):  $\delta_{\text{H}}$  = 1.78 (s, 3H), 1.85–1.95 (m, 3H), 2.20–2.30 (m, 1H), 3.45 (ddd, *J* = 7.2, 7.4, 10.8 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.67 (ddd, *J* = 4.9, 7.2, 10.4 Hz, 1H), 5.94 (dd, *J* = 2.5, 7.1 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 10.90 (br s, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (d-DMSO, 125.7 MHz, 70 °C):  $\delta_{\text{C}}$  = 11.5 (CH<sub>3</sub>), 21.7 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 46.7 (CH<sub>2</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 69.8 (CH), 108.4 (C), 135.9 (CH), 149.8 (C), 154.0 (C), 163.6 (C) ppm. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 253 (1) [M<sup>+</sup>], 128 (100) [M<sup>+</sup> + H - thymine], 126 (9) [thymine]<sup>+</sup>. HRMS (EI, 70 eV): calculado para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 253.1063; encontrado 253.1069; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub> 128.0712; encontrado 128.0712. C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (253.26): calculado C 52.17, H 5.97, N 16.59; encontrado C 52.49, H 6.19, N 16.28.

- **1-[(2S,4R)-(11A) y 1-[(2R,4R)-4-acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]timina (11B).** Obtenido a partir de 4-acetoxi-N-(metoxicarbonil)-prolina (17) y bis(trimetilsilil)-timina según el procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada. Los productos fueron purificados por cromatografía en columna (hexano/EtOAc, 1:1).

**1-[(2S,4R)-4-acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]timina(11A).** Dos rotámeros a 26 °C (5:1), un rotámero a 70 °C; aceite incoloro;  $[\alpha]_D + 4.7$  (c 0.32, MeOH); IR (neto)  $\nu_{\text{máx}} = 3391, 1738, 1714, 1687, 1387, 1244 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}} = 1.88$  (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.55 (br dd,  $J = 4.9, 6.5$  Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.72 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 3.97 (dd,  $J = 4.8, 12.2$  Hz, 1H), 5.38 (dddd,  $J = 1.7, 4.2, 4.5, 4.6$  Hz, 1H), 5.99 (dd,  $J = 6.5, 6.8$  Hz, 1H), 7.33 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz):** rotámero mayoritario  $\delta_{\text{C}} = 12.3$  (CH<sub>3</sub>), 20.9 (CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>), 53.5 (CH<sub>3</sub>), 54.0 (CH<sub>2</sub>), 72.1 (CH), 73.6 (CH), 111.0 (C), 140.7 (CH), 152.1 (C), 156.7 (C), 166.5 (C), 172.1 (C) ppm; rotámero minoritario  $\delta_{\text{C}} = 12.4$  (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 53.6 (CH<sub>3</sub>), 54.1 (CH<sub>2</sub>), 72.1 (CH), 74.2 (CH), 111.0 (C), 139.7 (CH), 152.1 (C), 156.7 (C), 166.5 (C), 172.1 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 311 (<1) [M<sup>+</sup>], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (thymine + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 311.1117; encontrado 311.1107; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0559. C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (311.29): calculado C 50.16, H 5.50, N 13.50; encontrado C 50.22, H 5.64, N 13.37.

**1-[(2R,4R)-4-acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]timina(11B).** Aceite incoloro; dos rotámeros a 26 °C (5:1), un rotámero a 70 °C;  $[\alpha]_D + 61.4$  (c 0.49, MeOH); IR (neto)  $\nu_{\text{máx}} 3393, 1743, 1716, 1686, 1379, 1237 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}} = 1.90$  (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 2.18 (ddd,  $J = 1.5, 1.5, 1.5, 14.7$  Hz, 1H), 2.66 (ddd,  $J = 5.7, 7.7, 15.3$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.80 (ddd,  $J = 1.6, 1.6, 12.3$  Hz, 1H), 3.84 (dd,  $J = 4.7, 12.4$  Hz, 1H), 5.31 (dddd,  $J = 1.7, 2.4, 4.9, 5.2$  Hz, 1H), 6.13 (dd,  $J = 1.5, 7.7$  Hz, 1H), 7.40 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz):** rotámero mayoritario  $\delta_{\text{C}} = 12.4$  (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 38.9 (CH<sub>2</sub>), 53.8 (CH<sub>3</sub>), 54.6 (CH<sub>2</sub>), 71.6 (CH), 73.7 (CH), 110.2 (C), 138.1 (CH), 152.4 (C), 156.7 (C), 166.5 (C), 171.5 (C) ppm; rotámero minoritario  $\delta_{\text{C}} = 12.4$  (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 39.7 (CH<sub>2</sub>), 53.8 (CH<sub>3</sub>), 54.6 (CH<sub>2</sub>), 70.9 (CH), 72.9 (CH), 110.2 (C), 138.1 (CH), 152.1 (C), 156.7 (C), 166.5 (C), 172.1 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 311 (<1) [M<sup>+</sup>], 219 (8) [M<sup>+</sup> - (MeCO<sub>2</sub>H + MeOH)], 186 (9) [M<sup>+</sup> + H - thymine], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (thymine + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 311.1117; encontrado 311.1129; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0554. C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (311.29): calculado C 50.16, H 5.50, N 13.50; encontrado C 50.33, H 5.58, N 13.33.

- **1-[(2S,4R)- (12A) y 1-[(2R,4R)-4-Acetoxi-N-Metoxicarbonil-2-pirrolidinil]-5-iodouracilo (12B).** Obtenido de 4-acetoxi-N-(metoxicarbonil)-prolina (17) y bis(trimetilsilil)-5-iodouracilo según el procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada. Los productos se purificaron mediante cromatografía en columna (hexano/EtOAc, 7:3).

**1-[(2S,4R)-4-Acetoxi-N-Metoxicarbonil-2-pirrolidinil]-5-iodouracilo(12A):** Aceite incoloro; dos rotámeros a 26 °C (5:1), un rotámero a 70 °C;  $[\alpha]_D +9.1$  (c 0.55, MeOH); **IR (neto)**  $\nu_{\max} = 3381, 1718, 1696, 1228 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_H = 2.02$  (s, 3H), 2.55 (dd,  $J = 8.1, 13.8$  Hz, 1H), 2.64 (ddd,  $J = 6.0, 6.0, 14.5$  Hz, 1H), 3.70 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.97 (dd,  $J = 4.9, 12.1$  Hz, 1H), 5.36-5.41 (m, 1H), 5.95 (dd,  $J = 6.8, 7.2$  Hz, 1H), 7.94 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100.6 MHz):** rotámero mayoritario  $\delta_C = 20.9$  (CH<sub>3</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 53.6 (CH<sub>3</sub>), 54.2 (CH<sub>2</sub>), 67.8 (C), 73.8 (CH), 74.4 (CH), 150.2 (CH), 151.7 (C), 156.8 (C), 163.0 (C), 172.1 (C) ppm; rotámero minoritario  $\delta_C = 20.9$  (CH<sub>3</sub>), 38.6 (CH<sub>2</sub>), 53.7 (CH<sub>3</sub>), 54.3 (CH<sub>2</sub>), 67.8 (C), 73.9 (CH), 75.0 (CH), 149.8 (CH), 151.9 (C), 156.7 (C), 163.1 (C), 172.1 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 423 (<1) [M<sup>+</sup>], 186 (29) [M<sup>+</sup> + H - 5-iodouracil], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (5-iodouracil + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 422.9927; encontrado 422.9936; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0551. C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (423.16): calculado C 34.06, H 3.33, N 9.93; encontrado C 34.01, H 3.31, N 10.06.

**1-[(2R,4R)-4-Acetoxi-N-Metoxicarbonil-2-pirrolidinil]-5-iodouracilo(12B):** Aceite incoloro; dos rotámeros a 26 °C (1:1), un rotámero a 70 °C;  $[\alpha]_D +34.8$  (c 0.64, MeOH); **IR (neto)**  $\nu_{\max} = 3381, 1710, 1688, 1212 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_H = 2.06$  (s, 3H), 2.19 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 2.61-2.69 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.80-3.82 (m, 2H), 5.32-5.36 (m, 1H), 6.15 (dd,  $J = 0.8, 7.8$  Hz, 1H), 7.93 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz, 70 °C):**  $\delta_C = 21.3$  (CH<sub>3</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 54.0 (CH<sub>3</sub>), 55.0 (CH<sub>2</sub>), 67.1 (C), 72.0 (CH), 73.4 (CH), 146.8 (CH), 152.2 (C), 156.8 (C), 162.6 (C), 171.5 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 424 (1) [M<sup>+</sup> + H], 238 (5) [5-iodouracil]<sup>+</sup>, 186 (16) [M<sup>+</sup> + H - 5-iodouracil], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (5-iodouracil + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 424.0006; encontrado 424.0010; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0553. C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (423.16): calculado para C 34.06, H 3.33, N 9.93; encontrado C 34.36, H 3.51, N 9.88.

• **6-Benciloxi-9-[(2S,4R)- (13A) y 6-Benciloxi-9-[(2R,4R)-4-Acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]purina (13B).** Obtenido de 4-acetoxi-N-(metoxicarbonil)-prolina (17) y (trimetilsilil)-6-benciloxipurina según el procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación-oxidación-adición de base nitrogenada sililada. Los productos fueron purificados por cromatografía en columna (hexano/EtOAc, 7:3).

**6-Benciloxi-9-[(2S,4R)-4-Acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]purina(13A).** Dos rotámeros 26 °C (2:1), un rotámero a 70 °C; aceite incoloro;  $[\alpha]_D -20.2$  (c 0.58, CHCl<sub>3</sub>); **IR (neto)**  $\nu_{\max} = 3095, 3067, 1739, 1706, 1383, 1235 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_H = 2.07$  (s, 3H), 2.74 (ddd,  $J = 2.5, 7.9, 12.5$  Hz, 1H), 3.00 (ddd,  $J = 5.7, 5.8, 12.5$  Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.82 (dd,  $J = 6.1, 12.7$  Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 4.9, 12.1$  Hz, 1H), 5.61-5.65 (m, 1H), 5.65 (br s, 2H), 6.46 (dd,  $J = 5.7, 8.0$  Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J = 7.2, 7.3$  Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J = 7.7, 7.9$  Hz, 2H), 7.49 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.49 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz, 70 °C):**  $\delta_C = 20.7$  (CH<sub>3</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>), 53.4 (CH<sub>3</sub>), 53.8 (CH<sub>2</sub>), 69.5 (CH<sub>2</sub> + CH), 73.9 (CH), 122.7 (C), 129.0 (CH), 129.1 (2 × CH), 129.3 (2 × CH), 137.5 (C), 144.5 (CH), 152.4 (C), 152.9 (CH), 156.5 (C), 161.6 (C), 172.1 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 411 (19) [M<sup>+</sup>], 352 (22) [M<sup>+</sup> - MeCO<sub>2</sub>], 226 (100) [6-benciloxipurine]<sup>+</sup>, 91 (63) [PhCH<sub>2</sub>]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 411.1543; encontrado 411.1537; calculado para C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O 226.0855; encontrado 226.0850. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (411.42): calculado C 58.39, H 5.14, N 17.02; encontrado C 58.33, H 5.35, N 17.18.

**6-Benciloxi-9-[(2R,4R)-4-Acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]purina(13B).** Dos rotámeros a 26 °C (1:1), un rotámero a 70 °C; aceite incoloro;  $[\alpha]_D -4.5$  (c 0.89, CHCl<sub>3</sub>); **IR (neto)**  $\nu_{\text{máx}}$  = 3095, 3067, 1739, 1706, 1451, 1383, 1235 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}}$  = 1.86 (s, 3H), 2.51 (dd,  $J$  = 2.9, 15.1 Hz, 1H), 2.82 (ddd,  $J$  = 5.5, 7.4, 15.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.92 (dd,  $J$  = 2.0, 12.3 Hz, 1H), 3.96 (dd,  $J$  = 4.6, 12.3 Hz, 1H), 5.40 (dddd,  $J$  = 1.9, 1.9, 4.5, 4.5 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 6.51 (dd,  $J$  = 1.5, 7.5 Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 7.3, 7.3 Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J$  = 7.1, 7.7 Hz, 2H), 7.50 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.52 (s, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 70 °C):**  $\delta_{\text{C}}$  = 21.0 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>), 53.4 (CH<sub>3</sub>), 53.7 (CH<sub>2</sub>), 67.9 (CH), 68.7 (CH<sub>2</sub>), 71.9 (CH), 122.2 (C), 128.2 (2 × CH), 128.1 (CH), 128.4 (2 × CH), 136.8 (C), 140.6 (CH), 152.1 (C), 152.4 (CH), 161.0 (C), 162.6 (C), 170.0 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 411 (2) [M<sup>+</sup>], 352 (4) [M<sup>+</sup> - MeCO<sub>2</sub>], 226 (36) [6-benzoyloxypurine]<sup>+</sup>, 126 (100) [M<sup>+</sup> - (6-benzoyloxypurine + MeCO<sub>2</sub>)], 91 (64) [PhCH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 411.1543; encontrado 411.1556; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0551. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (411.42): calculado C 58.39, H 5.14, N 17.02; encontrado C 58.59, H 5.41, N 16.71.

- **5-Fluoro-1-[(2R,4R)-(14B) y 5-Fluoro-1-[(2S,4R)-4-Benzoiloxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]uracilo (14A).** Obtenido del 4R-benzoiloxi-N-(metoxicarbonil)-L-prolina (18) y trimetilsilil-5-fluorouracilo según el procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada. Los productos fueron purificados por cromatografía en columna (hexano/EtOAc, 7:3).

**5-Fluoro-1-[(2R,4R)-4-Benzoiloxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil]uracilo (11B).** Aceite, dos rotámeros a 26 °C (1.2:1), un rotámero a 70 °C;  $[\alpha]_D +41.4$  (c 1.0, MeOH); **IR (neto)**  $\nu_{\text{máx}}$  = 3382, 1719, 1671, 1271, 1205, 1093 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}}$  = 2.40 (dd,  $J$  = 1.3, 15.4 Hz, 1H), 2.78 (ddd,  $J$  = 5.7, 7.6, 15.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.94 (dd,  $J$  = 4.8, 12.6 Hz, 1H), 3.98 (ddd,  $J$  = 1.6, 1.6, 12.3 Hz, 1H), 5.56–5.60 (m, 1H), 6.15 (ddd,  $J$  = 1.3, 1.3, 7.0 Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J$  = 7.6, 8.2 Hz, 2H), 7.57 (dd,  $J$  = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.82 (d, JFH = 7.0 Hz, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{C}}$  = 38.4 (CH<sub>2</sub>), 53.9 (CH<sub>2</sub>), 54.8 (CH<sub>3</sub>), 72.1 (CH), 74.1 (CH), 126.4 (CH, d, JCF = 34.9 Hz), 129.6 (2 × CH), 130.5 (2 × CH), 130.8 (C), 134.6 (CH), 141.5 (C, d, JCF = 234.1 Hz), 150.8 (C), 156.8 (C), 159.3 (C, d, JCF = 26.5 Hz), 167.1 (C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 248 (6) [M<sup>+</sup> + H - 5-fluorouracil], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (5-fluorouracil + PhCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub> 248.0923; encontrado 248.0916; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0550. C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (377.33): calculado. C 54.11, H 4.27, N 11.14; encontrado C 54.10, H 4.57, N 10.64.

- **1-[(2R,4R)- (15B) y 1-[(2S,4R)-4-Acetoxi-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil] benzotriazol (15A).** Obtenido a partir de 4-acetoxi-N-(metoxicarbonil) prolina (17) y (trimetilsilil)-benzotriazol según procedimiento general del proceso secuencial de descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada. Los productos se purificaron mediante cromatografía en columna (hexano/EtOAc, 8:2).

**1-[(2R,4R)-4-Acetoxy-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil] benzotriazol(12B).** Dos rotámeros a 26 °C (1:1), un rotámero a 70 °C; aceite;  $[\alpha]_D +111.1$  (c 0.31, MeOH); **IR (neto)**  $\nu_{\text{máx}} = 1739, 1714, 1452, 1382, 1242 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}} = 1.73$  (s, 3H), 2.61 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 2.99 (ddd,  $J = 6.3, 7.4, 14.7$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.89 (dd,  $J = 2.5, 12.3$  Hz, 1H), 4.10 (dd,  $J = 5.9, 12.2$  Hz, 1H), 5.36-5.41 (m, 1H), 6.83 (dd,  $J = 2.0, 7.6$  Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J = 7.6, 7.7$  Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 7.4, 8.1$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100.6 MHz):**  $\delta_{\text{C}} = 21.2$  (CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>), 40.1/41.1 (CH<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>), 54.4 (CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>), 54.5/54.8 (CH<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>), 73.8 (CH/CH), 74.1 (CH/CH), 113.0 (CH/CH), 120.6 (CH/CH), 126.2 (CH/CH), 129.4 (CH/CH), 133.0 (C/C), 147.5 (C/C), 154.0 (C/C), 172.6 (C/C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 304 (4) [M<sup>+</sup>], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (benzotriazole + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 304.1172; encontrado 304.1181; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0551. C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (304.31): calculado C 55.26, H 5.30, N 18.41; encontrado C 55.06, H 5.66, N 18.74.

**1-[(2S,4R)-4-Acetoxy-N-metoxicarbonil-2-pirrolidinil] benzotriazol(12A).** Dos rotámeros a 26 °C (1:1), un rotámero a 70 °C; solido cristalino; mp 204–206 °C (en MeOH);  $[\alpha]_D +5.2$  (c 0.20, MeOH); **IR (neto)**  $\nu_{\text{máx}} = 1741, 1709, 1452, 1385, 1242 \text{ cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, 70 °C):**  $\delta_{\text{H}} = 2.09$  (s, 3H), 2.82 (ddd,  $J = 4.8, 7.5, 14.4$  Hz, 1H), 2.96 (ddd,  $J = 4.2, 6.1, 14.4$ , 1H), 3.56 (s, 3H), 3.81 (dd,  $J = 2.2, 11.9$  Hz, 1H), 4.09 (dd,  $J = 5.7, 12.0$  Hz, 1H), 5.72 (dddd,  $J = 3.8, 4.5, 5.6, 5.7$  Hz, 1H), 6.88 (dd,  $J = 4.3, 7.8$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 7.7, 7.9$  Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J = 7.4, 7.9$  Hz, 1H), 7.83 (br b, 1H), 7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) ppm. **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125.7 MHz):**  $\delta_{\text{C}} = 20.8$  (CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>), 39.2/40.2 (CH<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>), 52.9 (CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>), 53.3/53.5 (CH<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>), 70.5/70.9 (CH/CH), 73.2/73.8 (CH/CH), 111.7/112.2 (CH/CH), 119.9/120.1 (CH/CH), 125.7 (CH/CH), 128.9/129.1 (CH/CH), 134.2/134.3 (C/C), 146.4 (C/C), 154.0/156.2 (C/C), 172.2 (C/C) ppm. **MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 304 (1) [M<sup>+</sup>], 273 (1) [M<sup>+</sup> - MeO], 126 (100) [M<sup>+</sup> - (benzotriazole + MeCO<sub>2</sub>)]. **HRMS (EI, 70 eV):** calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 304.1172; encontrado 304.1186; calculado para C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub> 126.0555; encontrado 126.0554. C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (304.31): calculado C 55.26, H 5.30, N 18.41; encontrado C 55.12, H 5.45, N 18.24.

## CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron once *N*-azanucleósidos diferentes, a partir de derivados de L-prolina y *L-trans*-hidroxiprolina, utilizando el proceso secuencial descarboxilación–oxidación–adición de base nitrogenada sililada, un protocolo que permite acceder a los productos en pocos pasos de reacción y desde sustratos comerciales y baratos. Durante el proceso de síntesis se trabajaron técnicas usuales en un laboratorio de química orgánica.
2. Los productos fueron purificados utilizando técnicas cromatográficas tales como la cromatografía en columna y la cromatografía rotatoria.
3. La estructura de los productos se comprobó mediante Resonancia Magnética Nuclear y espectrometría de masas. También se determinaron otras de sus características como el espectro de IR o la actividad óptica.
4. Se ha realizado una evaluación preliminar de la actividad antiviral de los compuestos sintetizados observándose una actividad antiviral favorable en el compuesto **13A**.
5. Se prepararon muestras para posteriores estudios antimicrobianos.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Serra Valdés, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. Consultado en 9 de mayo de 2020, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es).
2. Medina-Morales, D., Machado-Duque, M., & Machado-Alba, J. (2015). Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 74. Consultado en 9 de mayo de 2020, de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-06672015000100013&lng=en&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-06672015000100013&lng=en&tlng=pt)
3. World Health Organization. (2018, febrero 5). Antibiotic Resistance. Consultado 8 de mayo de 2020, de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance+](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance)
4. Hernández, D., & Boto, A. (2014). Nucleoside Analogues: Synthesis and Biological Properties of Azanucleoside Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(11), 2201–2220.
5. El Bissati, K., Zufferey, R., Witola, W. H., Carter, N. S., Ullman, B., & Ben Mamoun, C. (2006). The plasma membrane permease PfNT1 is essential for purine salvage in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 9286-9291.
6. Cui, H., Ruda, G. F., Carrero-Lérida, J., Ruiz-Pérez, L. M., Gilbert, I. H., & González-Pacanowska, D. (2010). Exploring new inhibitors of *Plasmodium falciparum* purine nucleoside phosphorylase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5140-5149.
7. Diab, S. A., De Schutter, C., Muzard, M., Plantier-Royon, R., Pfund, E., & Lequeux, T. (2012). Fluorophosphonylated nucleoside derivatives as new series of thymidine phosphorylase multisubstrate inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 55(6), 2758–2768.
8. a) Kocalka, P., Rejman, D., Vanek, V., Rinnová, M., Tomecková, I., Králíková, S., Petrová, M., Páv, O., Pohl, R., Budesínský, M., Liboska, R., Tocík, Z., Panova, N., Votruba, I., & Rosenberg, I. (2010). Structural diversity of nucleoside phosphonic acids



as a key factor in the discovery of potent inhibitors of rat T-cell lymphoma thymidine phosphorylase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(3), 862–865. b) Keough, D. T., Hocková, D., Rejman, D., Spaček, P., Vrbková, S., Krečmerová, M., Eng, W. S., Jans, H., West, N. P., Naesens, L. M., de Jersey, J., & Guddat, L. W. (2013). Inhibition of the Escherichia coli 6-oxopurine phosphoribosyltransferases by nucleoside phosphonates: potential for new antibacterial agents. *Journal of medicinal chemistry*, 56(17), 6967–6984.

**9.** Hazleton, K. Z., Ho, M. C., Cassera, M. B., Clinch, K., Crump, D. R., Rosario, I., Jr, Merino, E. F., Almo, S. C., Tyler, P. C., & Schramm, V. L. (2012). Acyclic immucillin phosphonates: second-generation inhibitors of Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Chemistry & biology*, 19(6), 721–730.

**10.** Hocková, D., Keough, D. T., Janeba, Z., Wang, T. H., de Jersey, J., & Guddat, L. W. (2012). Synthesis of novel N-branched acyclic nucleoside phosphonates as potent and selective inhibitors of human, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax 6-oxopurine phosphoribosyltransferases. *Journal of medicinal chemistry*, 55(13), 6209–6223.

**11.** Clinch, K., Evans, G. B., Fröhlich, R. F., Gulab, S. A., Gutierrez, J. A., Mason, J. M., Schramm, V. L., Tyler, P. C., & Woolhouse, A. D. (2012). Transition state analogue inhibitors of human methylthioadenosine phosphorylase and bacterial methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase incorporating acyclic ribooxacarbenium ion mimics. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(17), 5181–5187.

**12.** Longshaw, A. I., Adanitsch, F., Gutierrez, J. A., Evans, G. B., Tyler, P. C., & Schramm, V. L. (2010). Design and synthesis of potent "sulfur-free" transition state analogue inhibitors of 5'-methylthioadenosine nucleosidase and 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *Journal of medicinal chemistry*, 53(18), 6730–6746.

**13.** Kamath, V. P., Ananth, S., Bantia, S., & Morris, P. E., Jr. (2004). Synthesis of a potent transition-state inhibitor of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase. *Journal of medicinal chemistry*, 47(6), 1322–1324.

**14.** Worthington, R. J., Richards, J. J., & Melander, C. (2012). Small molecule control of bacterial biofilms. *Organic & biomolecular chemistry*, 10(37), 7457–7474.

**15.** Nishonov, A. A., Ma, X., & Nair, V. (2006). Azadideoxyadenosine: synthesis, enzymology, and anti-HIV activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(15), 4099–4101.

- 16.** Martínez-Montero, S., Fernández, S., Sanghvi, Y. S., Theodorakis, E. A., Detorio, M. A., McBryer, T. R., Whitaker, T., Schinazi, R. F., Gotor, V., & Ferrero, M. (2012). Synthesis, evaluation of anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *20*(23), 6885–6893.
- 17.** Chiacchio, U., Borrello, L., Crispino, L., Rescifina, A., Merino, P., Macchi, B., Balestrieri, E., Mastino, A., Piperno, A., & Romeo, G. (2009). Stereoselective synthesis and biological evaluations of novel 3'-deoxy-4'-azaribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication. *Journal of medicinal chemistry*, *52*(13), 4054–4057.
- 18.** Westwood, N. B., & Walker, R. T. (1998) Synthesis and biological properties of a new series of 5-substituted-pyrimidine-L-nucleoside analogues. *Tetrahedron*, *54*, 13391-13404.
- 19.** Zhou, D., Lagoja, I. M., Van Aerschot, A., & Herdewijn, P. (2006). Synthesis of Aminopropyl Phosphonate Nucleosides with Purine and Pyrimidine Bases. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, *71*(1), 15-34.
- 20.** Chiacchio, U., Balestrieri, E., Macchi, B., Iannazzo, D., Piperno, A., Rescifina, A., Romeo, R., Saglimbeni, M., Sciortino, M. T., Valveri, V., Mastino, A., & Romeo, G. (2005). Synthesis of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleosides: novel inhibitors of reverse transcriptase. *Journal of medicinal chemistry*, *48*(5), 1389–1394.
- 21.** (a) Yokoyama, M., & Momotake, A. (1999). Synthesis and Biological Activity of Azanucleosides. *Synthesis*, 1541-1554. (b) Kočalka, P., Pohl, R., Rejman, D., & Rosenberg, I. (2006). Synthesis of racemic and enantiomeric 3-pyrrolidinyl derivatives of nucleobases. *Tetrahedron*, *62*(24), 5763-5774.
- 22.** (a) Burton, G., Ku, T. W., Carr, T. J., Kiesow, T., Sarisky, R. T., Lin-Goerke, J., Hofmann, G. A., Slater, M. J., Haigh, D., Dhanak, D., Johnson, V. K., Parry, N. R., & Thommes, P. (2007). Studies on acyl pyrrolidine inhibitors of HCV RNA-dependent RNA polymerase to identify a molecule with replicon antiviral activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *17*(7), 1930–1933. (b) Qiu, X. L., & Qing, F. L. (2005). Synthesis of 3'-deoxy-3'-difluoromethyl azanucleosides from trans-4-hydroxy-l-proline. *The Journal of organic chemistry*, *70*(10), 3826–3837. (c) Koszytkowska-Stawinska, M., Sas, W. (2004). Facile synthesis of acyclic azanucleosides from N-pivaloyloxymethyl amides and sulfonamides: synthesis of aza-analogues of Ganciclovir. *Tetrahedron Lett.*, *45*(28), 5437-5440. (d) Han, B., Wang, Z., Jaun, B., Krishnamurthy, R., & Eschenmoser, A. (2003). C-Nucleosidations with 2,6-Diamino-5,8-diaza-7,9-

- dicarba-purine1. *Organic Letters*, 5(12), 2071-2074. (e) Buchholz, M., & Reissig, H. U. (2003). Enantioselective Synthesis of the Pyrrolidine Core of Endothelin Antagonist ABT-627 (Atrasentan) via 1,2-Oxazines. *Eur. J. Org. Chem.* 3524-3533.
23. Altmann, K. H., Freier, S. M., Piele, U., & Winkler, T. (1994). Synthesis of an azathymidine and its incorporation into oligonucleotides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 33, 1654-1657.
24. Evans, G. B., Furneaux, R. H., Hausler, H., Larsen, J. S., & Tyler, P. C. (2004). Imino-C-nucleoside synthesis: heteroaryl lithium carbanion additions to a carbohydrate cyclic imine and nitrene. *The Journal of organic chemistry*, 69(6), 2217–2220.
25. (a) Deng, L., Scharer, O. D., & Verdine, G. L. (1997). Unusually Strong Binding of a Designed Transition-State Analog to a Base-Excision DNA Repair Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(33), 7865-7866. (b) Mayer, A., Häberli, A., & Leumann, C.J. (2005). Synthesis and triplex forming properties of pyrrolidino pseudoisocytidine containing oligodeoxynucleotides. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(9), 1653-1658.
- (c) Häberli, A., & Leumann, C. (2002). DNA Binding Properties of Oligodeoxynucleotides Containing Pyrrolidino C-Nucleosides. *J. Org. Lett.*, 4(19), 3275-3278.