

Método sencillo para la síntesis de bisfosfonatos geminales

Anaís Prats-Capote, Alejandro Perera-Pintado, Raúl Mocelo-Castell*, Yoel Griffith-Pérez, Marisé García-Batlle***, Beatriz O'Reilly-Dueñas*, Osmar Calderón-Sánchez*, Rafaela Pérez-Perera****, Chryslaine Rodríguez-Tanty*******

Dirección de Investigaciones Clínicas, Centro de Isótopos, Calle 34 #4501 entre 45 y 47, Reparto Kholy, Playa, Habana, CP 11300, Cuba. *Facultad de Química, Universidad de La Habana, Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, CP 10400, Cuba. **Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, Calle 30 #502 e/ 5ta y 7ma Avenida, Playa, La Habana, CP 11300, Cuba. ***Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías de Avanzadas, Ave. Salvador Allende No. 1110 e/Infanta y Ave. Boyeros, Plaza de la Revolución, La Habana, Código Postal: 10400, Cuba. ****Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba, Avenida 25, No. 15202, esquina a 158, Playa, La Habana, CP 11300, Cuba. anaís.prats@infomed.sld.cu

Recibido: 18 de abril de 2016. Aceptado: 21 de noviembre de 2016.

Palabras clave: bisfosfonato, paliación del dolor, metástasis óseas, cáncer, radiofármacos.

Key words: bisphosphonate, bone palliation, bone metastases, cancer, radiopharmaceuticals.

RESUMEN. La aparición de metástasis óseas constituye la complicación más frecuente en las enfermedades oncológicas. Éstas son usualmente incurables, producen severos dolores, disminuyendo las expectativas y la calidad de vida de los pacientes. El uso de radiofármacos para la paliación del dolor óseo metastásico tiene grandes ventajas. Los bisfosfonatos son de los compuestos más empleados con estos fines; sin embargo, su síntesis es relativamente compleja. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de síntesis de bisfosfonatos geminales partiendo de los aminoácidos respectivos. Se estableció una ruta sintética de tres pasos, para la obtención de estos compuestos: 1) la protección del grupo amino del aminoácido de partida, 2) la fosfonación y posterior hidrólisis del grupo amino protegido y 3) la obtención de la sal sódica. Se probaron tres vías para la protección de los grupos amino e hidroxilo de los aminoácidos de partida. La reacción de acilación con ácido fórmico y anhídrido acético, previa a la fosfonación, mejoró las condiciones prácticas de la síntesis para obtener los respectivos bisfosfonatos con rendimientos satisfactorios. Por esta vía se sintetizaron cuatro ácidos bisfosfónicos no reportados en la literatura consultada, los cuales fueron caracterizados mediante espectroscopía infrarroja y RMN.

ABSTRACT. Appearance of bone metastases is the most common complication of oncological diseases. They are usually incurable, produce severe pain, decreasing the expectancy and quality of life of patients. The use of radiopharmaceuticals for bone metastatic pain palliation have shown significant advantages. Bisphosphonates are the main compounds employed for that purpose; nevertheless, their synthesis is relatively a complex process. The aim of the present work was to develop a method for the synthesis of geminal bisphosphonates, starting from the respective amino acids. A three-steps way of synthesis was established for the obtainment of such compounds: 1) protection of amino group of the starting amino acid, 2) phosphonation and subsequent hydrolysis of the protected amino group and 3) obtainment of sodium salt. Three different procedures for the protection of amino and hydroxyl groups of the starting amino acids were tested. The use of acylation reaction with formic acid and acetic anhydride, before phosphonation, improved practical conditions for the synthesis of respective bisphosphonates with satisfactory yields. Thus, four bisphosphonic acids, non-previously reported in consulted literature, were synthesized. They were characterized by infrared spectroscopy and NMR.

INTRODUCCIÓN

Los bisfosfonatos son moléculas que presentan una elevada afinidad por el tejido óseo y se dirigen específicamente a los lugares de formación o resorción del mismo. Se caracterizan por tener dos enlaces carbono-fósforo, que le

confieren a la molécula una elevada resistencia a la hidrólisis enzimática y le permiten enlazarse fuertemente a la hidroxiapatita de la matriz ósea.¹

Los bisfosfonatos geminales han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de enfermedades del sistema osteoarticular como la osteoporosis y la enfermedad de Paget, entre otras.²⁻⁵ Su empleo en pacientes con metástasis óseas permite disminuir el dolor y reducir el número de fracturas asociadas a esta patología, retrasa la progresión de la afección y disminuye la necesidad de otras intervenciones como radioterapia, el uso de opiáceos o cirugía ortopédica.^{3,6,7} Se ha observado un incremento en su efecto, cuando se administran concomitantes con las radiaciones, la quimioterapia o la terapia hormonal.⁸⁻¹²

En los últimos años se ha incrementado el empleo de radiofármacos para la terapia paliativa del dolor producido por las metástasis óseas, gracias a las múltiples ventajas que ofrecen.¹³⁻¹⁵ Estas razones han incidido en considerar la marcación de los compuestos bisfosfonatos geminales con radionucleidos emisores de partículas ionizantes, como una alternativa para potenciar su efecto terapéutico.^{14,16,17} Por esta razón, en el mundo continúan los trabajos encaminados a la obtención de nuevos radiofármacos basados en este tipo de producto.¹⁸ Sin embargo, los métodos de síntesis de bisfosfonatos, reportados hasta el momento, son complejos.¹⁹

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de síntesis de bisfosfonatos geminales partiendo de los aminoácidos respectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disolventes

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad puros para síntesis. El anhídrido acético puro se destiló previo a su utilización. El xileno empleado se secó con tamices moleculares de 3Å, los cuales fueron activados previamente en un horno de microondas doméstico. Los aminoácidos de partida se secaron en una pistola de secado con P₂O₅ al vacío durante 72 horas.

Determinación del avance de la reacción y métodos de purificación de los productos

El avance de la reacción y la pureza de los productos obtenidos se verificaron mediante cromatografía de capa delgada (CCD). Se utilizaron placas pre-elaboradas de gel de sílice con indicador fluorescente a 254 nm, de 5x10 cm y 0.25 mm de grosor. Las fases móviles empleadas fueron n-butanol: ácido acético: agua (4:1:1 v/v/v) y cloroformo: metanol (4:1 v/v).

Los productos obtenidos se purificaron por recristalización en los sistemas acetona: metanol (1:1 v/v) o acetona.

La pureza del ácido bisfosfónico se determinó mediante el ensayo de azul de molibdeno. Para ello se emplearon tiras de papel Whatman No. 4 de 5x10 cm como fase estacionaria y como fase móvil el sistema cloroformo: metanol (10:3 v/v). El revelado se realizó asperjando las tiras de papel con dos disoluciones por separado, esperando 10 min entre cada aspersión. Dichas soluciones fueron: A) molibdato de amonio al 1 % en HCl 3 mol/L y B) ácido ascórbico al 1% en agua (preparado al momento de usarse).

Caracterización de los productos obtenidos

Las distancias relativas al frente del disolvente (Rf) de los productos obtenidos se calcularon y reportaron para las diferentes fases móviles y soportes en que se realizaron las cromatografías.

Las temperaturas de fusión (Tf) se determinaron en un equipo *Electrothermal*, modelo 9100 en capilares abiertos y no fueron corregidas.

Los espectros infrarrojos se registraron de 500 a 4000 cm⁻¹ en un espectrofotómetro FT/IR JASCO, con resolución de 4 cm⁻¹. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr a temperatura ambiente, utilizando la técnica estándar.

Los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C se registraron en equipos Bruker AC-250 y Bruker AM-300 (250 MHz – ¹H: 62.0 MHz – ¹³C), utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los disolventes empleados en los registros fueron DMSO-*d*₆ y D₂O.

Síntesis de los ácidos bisfosfónicos

Se emplearon los L-aminoácidos siguientes como reactivos de partida para obtener los correspondientes ácidos bisfosfónicos geminales: tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina.

Protección de los grupos aminos e hidroxilo de los aminoácidos

Técnica A.

En un matraz de fondo redondo de destilación de tres bocas, con agitación magnética, se añadieron 27 mmoles del aminoácido correspondiente y 20 mL de una disolución 1 mol/L de hidróxido de sodio. Muy lentamente se adicionaron, a través de sendos embudos goteadores, 1.48 moles de cloroformiato de metilo y 200 mL de una disolución 4 mol/L de hidróxido de sodio, de forma tal que el pH se mantuviera entre 9 y 9.5.

La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se realizaron tres extracciones con 10 mL de éter etílico. El pH de la fase acuosa se ajustó a 1 con ácido fosfórico concentrado (85%), y luego se saturó con cloruro de sodio. Se realizaron 4

extracciones con porciones de 10 mL de diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro y, posteriormente, se evaporó al vacío para obtener el compuesto deseado.

Técnica B.

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, con agitación magnética, se adicionaron 55 mmoles de *p*-formaldehído y 55 mmoles de anhídrido acético. La agitación se mantuvo durante 30 minutos. Posteriormente, se le añadió 30 mmoles del aminoácido correspondiente y se agitó la disolución durante una hora a temperatura ambiente (TA). Una vez concluida la reacción, la mezcla reaccionante se neutralizó con hidróxido de sodio (1 mol/L) y luego se le adicionó metanol para que precipitara el compuesto protegido. Los compuestos se filtraron al vacío y se secaron en una pistola de secado con P₂O₅ al vacío durante 72 horas.

Técnica C.

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, con agitación magnética, se adicionaron 55 mmoles de ácido fórmico (98%) y 55 mmoles de anhídrido acético. La agitación se mantuvo durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 30 mmoles del aminoácido correspondiente y se reflujo la disolución durante 1 hora. La mezcla reaccionante se neutralizó con hidróxido de sodio (2 mol/L) y luego se le adicionó metanol para precipitar el compuesto protegido. Los compuestos se filtraron al vacío y se secaron en una pistola de secado con P₂O₅ al vacío durante 72 horas.

Fosfonación e hidrólisis

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, con agitación magnética, se adicionaron 24 mmoles de ácido fosforoso, 24 mmoles de pentacloruro de fósforo y 2 mL de xileno (como disolvente). Se mantuvo la agitación durante 15 min (reacción exotérmica). Se dejó enfriar y se le añadió 24 mmoles del aminoácido protegido. La mezcla de reacción se reflujo durante 5 horas a 100°C con agitación. Pasado este tiempo, la mezcla reaccionante se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se le añadió 2 mL de agua y se dejó con agitación constante durante 2 horas. Se realizaron tres extracciones sucesivas con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró por rotoevaporación. Se adicionó 10 mL de eterdietílico y se guardó a -20°C para la precipitación del producto final.

Se sintetizaron 4 productos: ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, ácido 2-amino-3-(4H-indol)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, ácido 2-amino-3-(4H-imidazol)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, ácido 2-amino-3-fenil-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico.

Obtención de las sales sódicas a partir de los correspondientes ácidos bisfosfónicos

A un matraz de fondo redondo de 25 mL, se le añadió 6.4 mmoles del bisfosfonato correspondiente y 5 mL de una disolución de hidróxido de sodio (2 mol/L). La disolución obtenida con pH superior a 8, se agitó durante 15 min y luego se concentró por roto evaporación hasta sequedad para adicionar 5 mL de acetona. El sólido que se forma se filtró al vacío, se lavó con acetona y se secó en pistola con pentóxido de difósforo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia P-C-P confiere a los bisfosfonatos geminales, no solo una elevada resistencia a la hidrólisis enzimática, sino una incorporación adecuada al esqueleto, de lo cual se han derivado sus múltiples aplicaciones en medicina.^{20,21} No obstante, entre ellos muestran diferencias en cuanto a su afinidad por el tejido óseo. Estudios de relación estructura-función de los bisfosfonatos sugieren que la adición de un grupo hidroxilo en el primer átomo de carbono, así como la presencia de grupos amino terminales incrementa la capacidad de unión a la matriz ósea de dichos compuestos y su actividad regenerativa.^{1,22-24}

La alta afinidad de este tipo de moléculas por la matriz ósea, con una incorporación a la misma proporcional a su actividad metabólica, unido a su rápida excreción por vía urinaria; los coloca como una alternativa interesante para desarrollar radiofármacos potencialmente útiles para la terapia paliativa del dolor por metástasis óseas.²⁵⁻²⁷

Diferentes isótopos radioactivos emisores de partículas α y β^- , formando parte de distintas sustancias, se han empleado en el tratamiento paliativo del dolor producido por metástasis óseas.^{14-16,28-32} Hasta el momento, todos los radiofármacos actuales presentan ventajas y desventajas, relacionadas con las propiedades físico-nucleares de los radioisótopos, los efectos de mielosupresión y los altos precios o la disponibilidad en el mercado.^{27,33,34} En este sentido se propone el desarrollo de un radiofármaco potencialmente útil para la paliación del dolor por metástasis óseas, que pueda ser marcado con ¹³¹I. Este radionucleido, por sus características nucleares y disponibilidad en el mercado a bajos precios, unido a su química conocida, resulta muy atractivo para estos fines.

Por ese motivo, se decidió la síntesis de bisfosfonatos geminales a partir de aminoácidos aromáticos, moléculas que cumplirían con tener la presencia de un grupo hidroxilo en el primer carbono, un grupo amino terminal, y, además, un anillo aromático que facilitarían su marcaje posterior con ¹³¹I.

Del análisis de los diferentes métodos convencionales de síntesis de bisfosfonatos,^{19,35,36} se desprende que la mayoría tiene el inconveniente de los largos tiempos de reacción, que oscilan entre 12 y 36 h, y en algunos casos implica el

empleo de más de un método para la obtención del producto final. Sin embargo, los métodos de fosfonación directa de grupos carboxílicos sólo transcurren en uno o dos pasos, con tiempos de reacción menores.

La ruta sintética propuesta partió del análisis de la síntesis propuesta por Hun W. y colaboradores.³⁷ La misma constó de dos pasos: 1) la protección de los grupos amino e hidroxilos de los aminoácidos de partida, previa a la fosfonación y 2) la obtención del bisfosfonato.

Protección de los grupos aminos e hidroxilos de los aminoácidos

En la Técnica A se siguió la metodología patentada por Hun W. y cols.³⁷ para la protección del grupo amino de la β -alanina. Este procedimiento presentó los siguientes inconvenientes prácticos:

- El pH de la reacción debía mantenerse constante en un rango entre 9.0 - 9.5, pues de lo contrario se formaba un precipitado blanco, correspondiente a la sal *N*-alcoxycarbonilo del aminoácido correspondiente. Una vez formada la sal, resultaba imposible revertir el proceso.
- Para lograr mantener el rango de pH, se requería del uso de un elevado volumen de disolución de hidróxido de sodio.
- La temperatura de trabajo debía oscilar entre 0 y 5 °C. En caso de aumentar, precipitaba la sal correspondiente.

Estas dificultades, unido a la toxicidad resultante del trabajo con cloroformiato de metilo, obligaron a buscar otras variantes para la protección de los grupos amino e hidroxilo, manteniendo el segundo paso (fosfonación), tal como se expone en la patente de Hun W. y colaboradores.³⁷

Para la protección del grupo amino se empleó un anhídrido mixto como agente protector mediante una reacción de aminólisis. El anhídrido mixto se obtuvo a través de dos procedimientos diferentes (Técnica B y Técnica C).

En la Técnica B, el anhídrido mixto se obtuvo a partir de la reacción entre el *p*-formaldehído y el anhídrido acético. Teóricamente, la reacción de formación del anhídrido debe ocurrir *in situ*. Sin embargo, este método presentó como inconveniente fundamental, que en él se observó la solidificación de la mezcla de reacción con una coloración carmelita oscuro, lo cual debe corresponder a la polimerización del *p*-formaldehído, por lo que no se obtuvieron rendimientos satisfactorios.

En la Técnica C, el anhídrido mixto se obtuvo a partir de una reacción de acidólisis entre el ácido fórmico (I) y el anhídrido acético.

La reacción ocurre por el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo hidroxilo del ácido fórmico sobre el átomo de carbono carbonílico del anhídrido acético, para formar un anhídrido mixto y ácido acético. Esta reacción es casi irreversible, debido a que el ácido acético formado es un ácido más débil que el ácido fórmico y es poco probable el ataque del mismo sobre el carbono carbonílico del anhídrido mixto.

El anhídrido mixto posee un carbono carbonílico más electrofílico que el anhídrido acético, debido a la ausencia del grupo metilo con un efecto inductivo +I sobre el mismo, que disminuye su electrofilia, favoreciéndose de esta forma el ataque nucleofílico del grupo amino sobre dicho carbono, dando lugar a la formamida y el ácido acético correspondientes.

La protección del grupo hidroxilo se realizó mediante una reacción de sustitución nucleofílica ácida, en la cual ocurre el ataque nucleofílico del par de electrones del hidroxilo sobre el carbono más electrofílico del anhídrido mixto.

Los productos se obtuvieron en forma de aceite, debido a la presencia del ácido acético, el cual quedó ocluido en la amida formada. Para eliminar el ácido acético se añadió una disolución de hidróxido de sodio (1 mol/L) con el fin de transformarlo en la sal correspondiente, acetato de sodio, que, al añadir metanol al sistema permanece en solución, mientras los aminoácidos protegidos puros precipitan. Los rendimientos obtenidos oscilaron entre el 75% y el 80%, superiores a los obtenidos por otros autores, que emplearon un cloroformiato de alquilo en medio básico para la protección del grupo amino^{37,38} y a los obtenidos por la Técnica B, por lo que se propone esta variante para la protección del grupo amino.

Las amidas son compuestos relativamente estables, que pueden ser purificados de forma sencilla y ser desprotegidas mediante calentamiento en soluciones fuertemente ácidas o básicas.^{39,40}

De forma general, la acilación constituye una estrategia atractiva, pues resultó el método más sencillo y no requirió condiciones de reacción especiales, lo que posibilitó obtener buenos rendimientos (75-80%) de los compuestos protegidos.

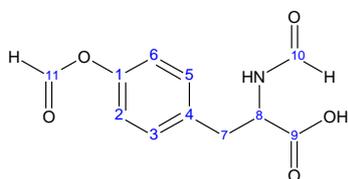
Caracterización espectroscópica

En los espectros **IR** de los aminoácidos protegidos, en general, apareció una señal ancha en 3100 cm⁻¹ y 3500 cm⁻¹, correspondiente a la vibración de valencia OH del grupo carboxilo. Alrededor de 1660 cm⁻¹ se apreció una señal intensa, característica de la vibración correspondiente al grupo amido. En los aminoácidos que presentan anillos aromáticos se destaca la presencia del patrón de fenilo de 1470 cm⁻¹ hasta, aproximadamente, 1610 cm⁻¹.

Según los datos que nos brindan los espectros **RMN-¹H**, en la mayoría de los aminoácidos, se observó en la zona de 7.08 a 7.21 ppm, las señales correspondientes a los protones de la región aromática y en 2.0 y 8.0 ppm aparecieron los correspondientes a los de los grupos hidroxilo y amida, respectivamente.

En la zona alifática del espectro **RMN-¹³C**, aparecieron dos señales correspondientes a los carbonos de los grupos metileno y metino de los compuestos, siendo más blindada la de los carbonos metínicos. En la región de 115.0 ppm a 136.0 ppm se apreciaron las señales del carbono aromático, siendo más blindada la del carbono en posición orto producto al efecto electrónico del grupo sustituyente. De 160.0 ppm a 200.0 ppm se observaron las señales de los carbonos de los grupos carbonilos de la molécula.

N,O-diformiltirosina



Rendimiento: 3,81g (76,1%)

CCD: Rf= 0.45 (*n*-butanol- ácido acético –agua, 4:1:1, v/v)

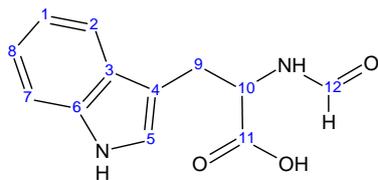
Tf (°C): 193 - 197

Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 11 [s, 2H,- COOH, NH], 9,72 [m, H, CH-11], 6,95-6,68 [m, 4H, CH_{arom}], 5[m, H, H-CONH-10], 3,88 [m, H, CH-8], 3,16-2,91 [m, 2H, CH₂-7]

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 200 [C-9]; 176,8 [C-11]; 174,9 [C-10]; 157 [C-1]; 132 [C-3,5]; 129,2 [C-4]; 115 [C-2,6]; 56,8 [C-8]; 39,4 [C-7]

N-formilriptófano



Rendimiento: 3.77g (75.3%)

CCD: Rf=0.68 (*n*-butanol- ácido acético –agua, 4:1:1, v/v)

Tf (°C): 270 – 274

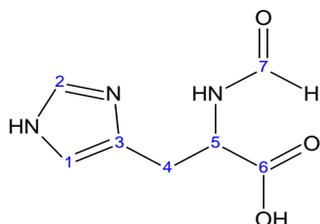
Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 11 [s, 3H, 2NH, OH], 9,72 [m, H, CONH -12)], 7,26-5,94 [s (5H, CH_{arom})], 3,55 [m (H,CH-10)], 2,33 [m, 2H,CH₂-9)]

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm):122,4-153,8 [C-1,8,2,7,6,3(CH_{arom})],37 [C-9], 50,9 [C-10], 174,9 [C-11],163,2 [C-12].

IR(KBr) (cm-1): 3500 [νOH], 1600, 1520, 1460 [ν_{Csp2}, patrón de fenilo], 921 [γOH], 836 [γCH].

N-formilhistidina



Rendimiento: 3,75g (75.0%)

CCD: Rf=0.34 (*n*-butanol- ácido acético –agua, 4:1:1, v/v)

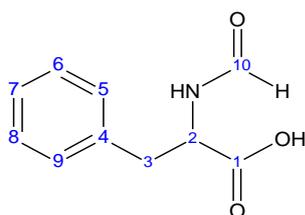
Tf (°C): 186 - 189

Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 11 [s, H, OH-6], 9,72 [s, H, H- CONH-7], 7,44 [s, H, CH-2], 6,80 [s, H, CH-1], 3,88 [m, H, CH-5], 3,16-2,91 [d-d, 2, CH₂-4].

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 199,8 [C-6], 174,9 [C-7], 135,5 [C-2,3], 119,6 [C-1], 56,5 [C-5], 32,1 [C-4], ..

N-formilfenilalanina



Rendimiento: 4.13g (82.5%)

CCD: Rf= 0.60 (*n*-butanol- ácido acético –agua, 4:1:1, v/v)

Tf (°C): 235 - 240

Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 9.28 [s, H- COOH], 8,59-8,49 [m, 7H, CH_{arom}, HN, COH], 5,71-5,69 [m, H, CH-2], 4,48-4,19 [m, 2H, CH₂-3].

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 172,77 [C-1], 160,19 [C-10], 138,26 [C-4], 129,05 [C-6,8], 127,51 [C-5,9], 125,66 [C-7], 53,09 [C-2], 37,27 [C-3].

IR(KBr) (cm-1): 3410 [νNH], 1610, 1528, 1470 [νC_{sp2}, patrón de fenilo], 899 [γOH].

Fosfonación e hidrólisis

La fosfonación del grupo carboxilo se realizó mediante reacción con una mezcla de ácido fosforoso y pentacloruro de fósforo.³⁷ Debido a la poca solubilidad de los aminoácidos protegidos, esta reacción se llevó a cabo a reflujo en xileno como disolvente.

Luego del paso de la fosfonación, se realizó la desprotección de los grupos amino e hidroxilos mediante una hidrólisis ácida. En ambos casos el primer paso es la adición de un protón al átomo de oxígeno carbonílico de la amida y del éster, aumentando la electrofilia del carbono carbonílico. Luego ocurre el ataque nucleofílico de una molécula de agua al carbono carbonílico.

La reacción de fosfonación fue reproducible en todos los compuestos, obteniéndose rendimientos que oscilaron entre 60 % y 65 %, similares a los reportados en la literatura.³⁷

Caracterización espectroscópica

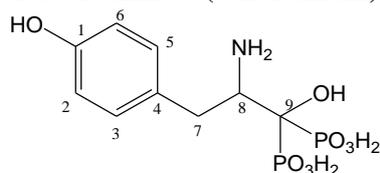
En los espectros **IR** de los ácidos bisfosfónicos, en general, apareció la señal ancha alrededor de 3350 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de valencia OH del grupo carboxilo. Alrededor de 3400 cm⁻¹ se observó una banda fina, que se asigna a la vibración de valencia de ν_{CH2}, que en ocasiones no se apreciaba por lo ancho de la banda carboxílica. Alrededor de 1390 cm⁻¹ se observó una señal correspondiente a la vibración de valencia ν_{P=O}. En los ácidos bisfosfónico que presentan anillos aromáticos, como los del presente trabajo, se destaca la presencia del patrón de fenilo de 1470 cm⁻¹ hasta aproximadamente 1610 cm⁻¹.

Según los datos que brindan los espectros **RMN-¹H**, en 2.0 y 5.0 ppm se observaron los hidrógenos activos de los grupos hidroxilo y fosfónicos, respectivamente.

En la zona alifática del espectro **RMN-¹³C**, aparecieron dos señales correspondientes a los grupos metileno y metino, y una tercera señal más desblindada correspondiente al carbono unido a los grupos fosfónicos. De 80.0 ppm a 160.0 ppm se observaron las señales de los grupos aromáticos de la molécula.

Los cuatro ácidos bisfosfónicos sintetizados en este trabajo: el ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, el ácido 2-amino-3-(fenil)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, el ácido 2-amino-3-(4H-imidazol)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico y el ácido 2-amino-3-(4H-indol)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico, no están reportados en la literatura consultada.

Ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)-1-hidroxi-propil-1,1-bisfosfónico



Rendimiento: 2,29g (60.1%)

CCD: Rf=0,34 (*n*-butanol - ácido acético - agua, 4:1:1, v/v)

Tf (°C): 226-230

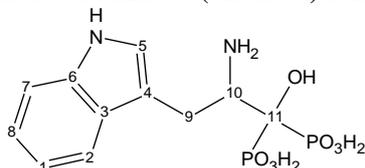
Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 6,68-6,95 [m (4H, CH_{arom})], 5[s (H, OH C-1)], 3,1 [m (H, CH-8)], 2,64-2,89 [m (2H, CH₂-7)], 2 [m (4H, 2PO₃H₂, 2NH₂)],

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 155,7 [C-1]; 132,1 [C-4]; 129,2 [C-3,5]; 115,8 [C-2,6]; 82 [C-9]; 40 [C-8]; 32,5 [C-7].

IR(KBr) (cm⁻¹): 3400-2500 [νNH₂], 1595, 1517, 1489 [νC_{sp2}, patrón de fenilo], 1236 [νP=O], 921 [γOH], 836 [γCH].

Ácido 2-amino-3-(4H-indol)-1-hidroxiopropil-1,1-bisfosfónico



Rendimiento: 2,34 g (62.3%)

CCD: Rf= 0,49 (*n*-butanol - ácido acético - agua, 4:1:1, v/v)

Tf (°C) No fue posible determinarla por ser superior al rango del equipo.

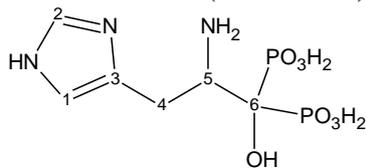
Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 7,1-7,5 [m, 5H, CH_{arom}], 2,7 [m, H, CH-10], 2 [m, 8H, OH, 2PO₃H₂, NH₂, NH], 1,8 [m, 2H, CH₂-9].

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 162 [C-6]; 153 [C-3]; 132,5 [C-1]; 129,5 [C-8]; 127,1 [C-2,5]; 122,2 [C-4,7]; 82,4 [C-11]; 38,8 [C-10]; 29,1 [C-9].

IR(KBr) (cm⁻¹): 3300-2500 [νOH], 921 [γOH], 684 [γCH], 1300 [νP=O]

Ácido 2-amino-3-(4H-imidazol)-1-hidroxiopropil-1,1-bisfosfónico



Rendimiento: 2,33g (62.3%)

CCD: Rf= 0,52 (*n*-butanol - ácido acético - agua, 4:1:1, v/v)

TF (°C) 367-370

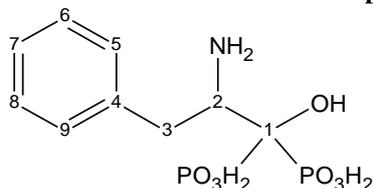
Datos espectroscópicos:

RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 7,44 [s, H, CH-1], 6,80 [s, H, CH-2], 3,1 [m, H, CH-5], 2,84-2,59 [m, 2H, CH₂-4], 2 [s, 7H, -OH, 2-PO₃H₂, NH₂].

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 135,5 [C-2,3]; 119,6[C-1]; 82 [C-6]; 32,2 [C-5]; 31,3 [C-4].

IR(KBr) (cm⁻¹): 3300-2500 [νOH], 921 [γOH], 1258 [νP=O]

Ácido 2-amino-3-fenil-1-hidroxiopropil-1,1-bisfosfónico



Rendimiento: 2,62 g (63.5%)

CCD: Rf= 0,63 (*n*-butanol - ácido acético - agua, 4:1:1, v/v)

Tf (°C) No fue posible determinarla por ser superior al rango del equipo.

Datos espectroscópicos:

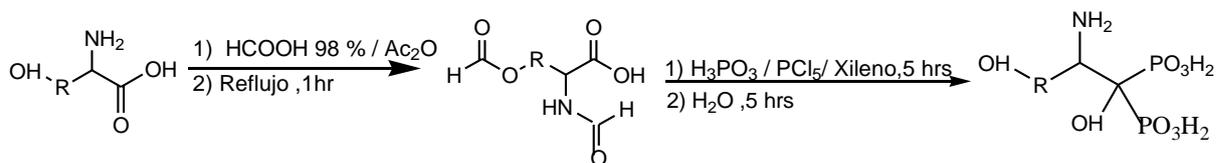
RMN-¹H (DMSO) δ (ppm): 7,21-7,08 [m, 5H, CH_{arom}], 3,1 [m, H, CH-2], 2,89-2,64 [m, 2H, CH₂-3], 2 [m, 7H, -OH, 2-PO₃H₂, NH₂].

RMN-¹³C (DMSO) δ (ppm): 138,1 [C-4]; 128,9 [C-5,9]; 128,2[C-6,8]; 126,1 [C-7]; 82 [C-1]; 40,1 [C-2]; 25 [C-3].

IR(KBr) (cm⁻¹): 3300-2500 [νOH], 684 [γCH], 1310 [νP=O]

Los ácidos bisfosfónicos obtenidos son muy higroscópicos, por lo que la obtención de las sales de sodio, de dichos compuestos, facilita su conservación y posterior aplicación.

El análisis de las diferentes variantes de síntesis encontradas en la literatura permite seleccionar la ruta sintética empleada, la que consta de tres pasos fundamentales: 1) la protección del grupo amino del aminoácido de partida, 2) la fosfonación y posterior hidrólisis del grupo amino protegido y 3) la obtención de la sal sódica por reacción con NaOH 2 mol/L. (Esquema 1).



R: restos de aminoácidos

Esquema 1. Secuencia sintética de los ácidos bisfosfónicos obtenidos.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron, con rendimientos satisfactorios, cuatro ácidos bisfosfónicos novedosos mediante una metodología sencilla: el ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)-1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico, el ácido 2-amino-3-(4H-imidazol)-1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico, el ácido 2-amino-3-(fenil)-1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico y el ácido 2-amino-3-(4H-indol)-1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico, los cuales fueron caracterizados mediante espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear. La reacción de acilación resultó efectiva y más sencilla para la protección del grupo amino de los aminoácidos de partida. Se corroboró que, a partir de una mezcla de ácido fosforoso y pentacloruro de fósforo, es posible realizar la fosfonación de los compuestos protegidos correspondientes con rendimientos satisfactorios. Se obtuvo la sal sódica de los ácidos bisfosfónicos correspondientes mediante reacción de neutralización con hidróxido de sodio, con rendimientos y pureza adecuados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Rev.* 1998; 19: 80-100.
2. Coleman R, Body JJ, Aapro M, Hadji P, Herrstedt J. Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology.* 2014, 25 (Supplement 3): iii124-37.
3. Coleman RE. Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist.* 2004; 9 (suppl 4): 14-27.
4. Pelayo M, Agra Y. Bisfosfonatos en la prevención de la osteoporosis de mujeres posmenopáusicas con baja masa ósea. *Med Clin (Barc).* 2004; 122: 304-10.
5. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioannou A, Cheung AM, Davison KS, *et al.* Bisphosphonates for treatment of osteoporosis. Expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Clinical Review. Can Fam Physician* 2014; 60:324-33.
6. Hillmer BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA, *et al.* American society of clinical oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in woman with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 4042-57.
7. Wong RKS, Wiffen PJ. Bisphosphonates for the relief of pain secondary to bone metastases (Review). *The Cochrane Collaboration and published in The Cochrane Library,* 2009, Issue 4.
8. De los Reyes A, El manejo del dolor óseo intratable: Perspectiva clínica y manejo con radionúclidos. *Avances en Medicina Nuclear y Calidad Científico-Técnica, Consejería de Sanidad, Madrid, España.* 2002, 649-70.
9. Hoskin PJ. Bisphosphonates and radiation therapy for palliation of metastatic bone disease. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29: 321-7.
10. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P *et al.* The Key Role of Bisphosphonates in the Supportive Care of Cancer Patients. *Anticancer Research* 2014, 34: 23-38.
11. Chiacchio, S, Borso E, AlShariff, AA, Boni G, Mariani G. Radiofármacos para el tratamiento paliativo del dolor en pacientes con metástasis óseas y su posible integración con la quimioterapia. *Alasbimn J.* 2010; octubre, 13(50): Article AJ50-1. En: <http://www.alasbimnjournal.cl>.
12. Van Poznak CH. The use of bisphosphonates in patients with breast cancer. *Cancer Control.* 2002; 9: 480-9.
13. Muresan MM, Olivier P, Leclere J, Sirveaux F, Brunaud L, Klein M *et al.* Bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer.* 2008; 15: 37-49.
14. OIEA. Criterios para el tratamiento paliativo de las metástasis óseas. *Aplicaciones clínicas. IAEA-TECDOC-1549.* 2008.
15. García E, Alberti A, Arencibia J, Morín Zorrilla J. Radiofármacos en el tratamiento del dolor por metástasis óseas. *Nucleus Rev.* 2012; (52): 50-3.
16. Krishnamurthy GT, Krishnamurthy S. Radionuclides for metastatic bone palliation: A need for rational re-evaluation in the new millennium. *J Nucl Med.* 2000; 41: 688-91.

17. Arteaga C, Ferro-Flores G, Pedraza M, Melendez L, Croft BY, Ramórez FM, Padillae J. Labelling of Re-ABP with ^{188}Re for bone pain palliation. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001; 54: 435-42.
18. Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, Muller K, Bachmann R, Bisping M *et al.* Highly potent geminal bisphosphonates. From Pamidronate Disodium (Aredia) to Zoledronic Acid (Zometa). *J. Med. Chem.* 2002; 45: 3721-3738.
19. Solomons, TW G y Fryhle CB. *Química orgánica I*. Livros Técnicos e Científicos Editorial SA, Brasil. 2001.
20. Reszca AR. Osteoporosis. Prevención y tratamiento; Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. 1ra Ed. 2002; 175-80.
21. Djulbegovic B, Wheatley K, Ross J, Clark O, Bos G, Goldschmidt H, *et al.* Bisfosfonatos para el mieloma múltiple. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; (3): CD003188.
22. Bijvoet OLM, Frijlink WB, Jie K, van der Linden H, Meijer CJ, Mulder H *et al.* APD in Paget's disease of bone. Role of the mononuclear phagocyte system. *Arthritis Rheum*. 1980; 23: 1193-204.
23. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the proapoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their antiapoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone*. 2006; 39: 443-52.
24. Martínez A. Estudio experimental de osteonecrosis producida por bisfosfonatos nitrogenados. [Tesis de Doctorado]. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia, España; 2010.
25. Saha GB. Characteristics of specific radiopharmaceuticals. In: Saha GB (Ed.). *Fundamentals of nuclear pharmacy*. Springer-Verlag, New York. 1998; 112-47.
26. Puerta N, Pérez JH, Nevares NN, Zapata AM, López AC, Rojo AM *et al.* Estudio biocinético y dosimétrico de un kit de producción local de ^{177}Lu -EDTMP para su uso como agente paliativo del dolor. *Alasbimn J*. 2011; julio, 13(53): Article AJ53-3. En: <http://www.alasbimnjournal.cl>.
27. Loke KSH, Padhy AK, Ng DCE, Goh ASW, Divgi Ch. Dosimetric considerations in radioimmunotherapy and systemic radionuclide therapies: A Review. *World J Nucl Med*. 2011; 10 (2):122-38.
28. FDA. Points to consider in the manufacturing and testing of MAb products for human use. Preclinical studies. US Department of Health and Human Services. FDA; 1994.
29. Pandit-Taskar N, Batraki M, Divgi CR. Radiopharmaceutical Therapy for Palliation of Bone Pain from Osseous Metastases. *J Nucl Med*. 2004; 45:1358-65.
30. Baranauskas Z, Aleknavičius E, Burneckis A, Steponavičienė R. Efficiency of strontium-89 for the palliation of painful bone metastases in prostate cancer. *Acta Medica Lituanica*. 2008; 15 (2): 113-7.
31. Fizazi K, Beuzebec P, Lumbroso J, Haddad V, Massard C, Gross-Goupil M. Phase II Trial of Consolidation Docetaxel and Samarium-153 in Patients With Bone Metastases From Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27:2429-35.
32. Noticias Alasbimn. La aprobación de la FDA para dicloruro de radio-223 (marca registrada: Xofigo, Bayer), 08/2013. NIH. *Alasbimn Journal*.httm. Revisado Diciembre 2013.
33. Larsen RH, Saxtorph H, Skydsgaard M, Borrebaek J, Jonasdottir TJ, Bruland OS *et al.* Radiotoxicity of the alpha-emitting bone-seeker ^{223}Ra injected intravenously into mice: Histology, clinical chemistry and hematology. 2006; 20: 325-32.
34. Boerman OC, Koppe MJ, Postema EJ, Corstens FH, Oyen WJ. Radionuclide therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, Bentham Sci Pub. 2007.
35. Eisenhut M, Barber J, Taylor MD. ^{131}I -Labeled diphosphonates for the palliative treatment of bone metastases -IV. Syntheses of benzylidenediphosphonates and their organ distribution in rats. *Appl Radiat Isot*. 1987; 38: 535-40.
36. Bosch J, Pagans E, Onrubia MC. Procedimiento para la obtención del ácido 4-amino-1-hidroxi-butano-1,1-bisfosfónico y de su sal monosódica trihidratada. Patente No. ES 2153794, 2001.
37. Hun HW, Hun JY, Young OC, *et al.* "Fabricación del ácido 3-amino-1-hidroxi-propano-1,1-bisfosfónico". Patente No. ES 2138539.A1, 2000.
38. Prats A, Perera A, Leyva R, García L, Moreno Y, Beckford D *et al.* Acido 3-amino-1-hidroxi-propano-1,1-bisfosfónico en oncología: Síntesis y biodistribución. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36 (No. Especial), 2005.
39. Perrin DD, Armarego WLF. Purification of laboratory chemicals. Pergamon Pres; Third edition; 1988: 365-7.
40. Green TW, Wuts PGM. Protective groups in organic synthesis. Wiley-Interscience, New York, 1999: 518-25.